

Lehrstuhl für Biologische Chemie
Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen

**Konstruktion eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments zur
Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms**

Dipl.-Biochem. Univ. Martin Schlapschy

Vollständiger Abdruck der vom
Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Josef Friedrich

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Arne Skerra

2. Univ.-Prof. Dr. Dieter Langosch

Die Dissertation wurde am 11.03.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan am 19.5.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Struktur und gentechnische Herstellung von Antikörpern und deren Fragmenten	1
1.2 Bispezifische Antikörper: Struktur und gentechnische Herstellung	4
1.3 Humanisierung und Affinitätsmaturierung durch <i>Antibody-Engineering</i>	9
1.4 Das Hodgkin-Lymphom als Gegenstand der Immuntherapie	11
1.5 Ein Therapiekonzept für das Hodgkin-Lymphom mit bispezifischen Antikörpern	14
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	18
2.1.2 Oligodesoxynukleotide	19
2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine	21
2.1.4 Chemikalien	23
2.1.5 Standards und Kits	26
2.1.6 Geräte	27
2.1.7 Sonstiges Material	32
2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	34
2.2 Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	40
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	41
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	41
2.2.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA	41
2.2.3.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	42
2.2.3.3 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA	43
2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	44
2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	44
2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA- Fragmenten	44
2.2.4.3 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese	45
2.2.4.4 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	46
2.2.5 <i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	47
2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	47
2.2.5.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel	47
2.2.5.3 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	48
2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung sowie zur Synthese von Genen	49
2.2.5.5 Dephosphorylierung von DNA	51

2.2.5.6	Auffüllen überstehender DNA-Enden	51
2.2.5.7	Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung	52
2.2.5.8	Ligierung von DNA-Fragmenten	52
2.2.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	53
2.2.6.1	Radioaktive Sequenzanalyse	53
2.2.6.2	Sequenzanalyse mit Hilfe eines ABI-Prism [®] 310 Sequencers	53
2.3	Gentechnische Methoden	54
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	54
2.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben	54
2.3.1.2	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter	55
2.3.2	Kolonie-Filterstapel-Test	57
2.4	Proteinchemische Methoden	59
2.4.1	Chromatographische Verfahren	59
2.4.1.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose	59
2.4.1.2	Metallchelat-Affinitätschromatographie	59
2.4.1.3	Größenausschlußchromatographie	61
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	62
2.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	63
2.4.4	Konzentrierung von Proteinen	64
2.4.5	Kopplung zweier Fab-Fragmente zum F(ab) ₂ -Fragment	64
2.4.6	N-terminale Proteinsequenzierung	66
2.5	Immunchemische Methoden	66
2.5.1	Western Blotting	66
2.5.2	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	68
2.6	Biophysikalische Methoden	69
2.6.1	Massenspektrometrie	69
2.6.2	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)	70
2.7	Computerprogramme und Datenbanken	72
3	Ergebnisse	73
3.1	Herstellung funktioneller Fragmente des CD30- und CD16-Antigens in <i>E. coli</i> und deren funktionelle Analyse	73
3.1.1	Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren, Produktion und Reinigung der Subdomäne ECD2 des CD30-Antigens	73
3.1.2	Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren, Produktion und Reinigung von Fragmenten der extrazellulären Domäne des Fcγ-Rezeptors IIIa (CD16) ..	79
3.1.3	Funktionelle Analyse der gentechnisch hergestellten Antigenfragmente mittels ELISA und Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie	84

3.2	Bakterielle Produktion, Reinigung und funktionelle Charakterisierung der partiell humanisierten (chimären) Fab-Fragmente muHRS3c und muA9	88
3.2.1	Konstruktion von Expressionsvektoren für die bakterielle Produktion des muHRS3c Fab-Fragments	89
3.2.2	Konstruktion von Expressionsvektoren für die bakterielle Produktion des muA9 Fab-Fragments	92
3.2.3	Untersuchung der Antigenbindung im ELISA und Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie	101
3.3	Chemische Kopplung zweier Fab-Fragmente zur Herstellung bivalenter und bispezifischer F(ab) ₂ -Antikörperfragmente	105
3.3.1	Entwicklung eines Sequenzmotivs mit zwei freien Cysteinresten und dem <i>Strep</i> -tag-II-Affinitätsanhängsel	108
3.3.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren pASK119-HRS3c und pASK119-A9 zur Produktion der entsprechenden Fab-Fragmente ...	108
3.3.1.2	Kopplung zweier muHRS3c Fab-Fragmente durch Thioetherbrücke mit o-Phenylendimaleimid als Linkerreagens	112
3.3.1.3	Kopplung der muHRS3c- und muA9 Fab-Fragmente mittels Disulfidbrücke zum bispezifischen F(ab) ₂ -Fragment, Isolierung und Charakterisierung	114
3.3.2	Entwicklung eines Sequenzmotivs mit zwei freien Cysteinresten und einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel	121
3.3.2.1	Konstruktion der Expressionsvektoren pASK121-HRS3c und pASK121-A9 zur Produktion der entsprechenden Fab-Fragmente ...	121
3.3.2.2	Kopplung zweier muHRS3c Fab-Fragmente zum bivalenten F(ab) ₂ -Fragment	123
3.3.3	Entwicklung eines Sequenzmotivs mit nur einem freien Cysteinrest und dem <i>Strep</i> -tag-II-Affinitätsanhängsel	124
3.3.3.1	Konstruktion der Expressionsvektoren pASK120-HRS3c und pASK120-A9 zur Produktion der entsprechenden Fab-Fragmente ...	125
3.3.3.2	Kopplung der Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 zum bispezifischen F(ab) ₂ -Fragment	127
3.4	Humanisierung der variablen Domänen des muHRS3c Fab-Fragments mittels CDR-Transplantation	128
3.4.1	Auswahl der zu humanisierenden Positionen und Synthese der Gene für die V _L - und V _H -Domäne mittels PCR- <i>Assembly</i>	129
3.4.2	Produktion und funktionelle Analyse des humanisierten HRS3 Fab-Fragments	138
3.5	Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments	141
3.5.1	Analyse des Affinitätsverlusts anhand hybrider Fab-Fragmente	141

3.5.2 Optimierung der Antigenbindungseigenschaften der huV _H -Domäne des humanisierten HRS3 Fab-Fragments	143
3.5.2.1 Versuche zur Generierung eines hybriden hu/mu-V _H -Gens mittels rekombinanter PCR	143
3.5.2.2 Schrittweise Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments durch Zufallsmutagenese der V _H -Domäne	147
4 Diskussion	162
4.1 Heterologe Produktion von sekretorischen Proteinen in <i>E. coli</i>	162
4.1.1 Rekombinante Antikörperfragmente	162
4.1.2 Extrazelluläre Domänen des CD16- und des CD30-Antigens	165
4.2 Kopplung von Fab-Fragmenten zum bispezifischen F(ab) ₂ -Fragment	169
4.3 Humanisierung als Methode zur Herstellung therapeutischer Antikörper	174
4.4 Optimierung der CD30-Antigenerkennung durch <i>in vitro</i> -Affinitätsmaturierung	180
5 Zusammenfassung	187
6 Abkürzungsverzeichnis	189
7 Literatur	191

1 Einleitung

1.1 Struktur und gentechnische Herstellung von Antikörpern und deren Fragmenten

Antikörper werden von Plasmazellen des Immunsystems höherer Wirbeltiere produziert und sind die Funktionsträger der humoralen Immunantwort. Als solche können sie einerseits immunogene Moleküle spezifisch binden, andererseits Effektorfunktionen vermitteln, wie beispielsweise die Aktivierung des Komplementsystems oder die Induktion der Phagozytose zur Eliminierung des Antigens (Janeway & Travers, 1995).

Die zur Klasse der Immunglobuline gehörenden Proteine sind aufgrund ihrer molekularen Architektur (Übersicht in Padlan, 1994) in der Lage, strukturell sehr verschiedene Antigene bzw. Epitope zu erkennen. Deshalb sind sie vor allem seit der Entwicklung von Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper (Köhler & Milstein, 1975) zu wichtigen Hilfsmitteln in der Grundlagenforschung und der medizinischen Diagnostik geworden (Winter & Milstein, 1991).

Das theoretische Antikörperrepertoire des menschlichen Organismus umfaßt über 10^{11} verschiedene Antikörpermoleküle, die in ihrer Grundstruktur größtenteils identisch sind. Der funktionellen Vielfalt der Antikörper liegt die hohe strukturelle Variabilität eines nur kleinen, definierten Bereichs ihrer Proteinstruktur – des sogenannten Paratops – zu Grunde. Diese erlaubt eine Immunantwort auf nahezu jede körperfremde Substanz durch Biosynthese von Antikörpermolekülen mit individueller Affinität und Spezifität.

Jeder Antikörper (Abb. 1) setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen, je zwei identischen leichten (L-Kette, ca. 25 kDa) und zwei identischen schweren (H-Kette, ca. 50 kDa) Polypeptidketten. Die einzelnen Ketten falten sich repetitiv in kompakte Immunglobulindomänen von ca. 120 Aminosäuren mit antiparalleler β -Faltblattstruktur. Die Domänen werden jeweils durch eine zentrale, intramolekulare Disulfidbindung stabilisiert. Die leichten Ketten bestehen aus der sogenannten variablen (V_L) sowie einer konstanten (C_L) Domäne, die schweren Ketten aus einer variablen (V_H) und mehreren konstanten Domänen (C_{H1} bis C_{H3} bei den Immunglobulin-Klassen A, D, G; C_{H1} bis C_{H4} bei den Klassen E und M). Zwischen der C_{H1} - und der C_{H2} -Domäne befindet sich ferner eine Scharnier (*Hinge*)-Region (H), innerhalb derer die beiden schweren Ketten z. B. im Fall eines menschlichen IgGs durch zwei Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind.

Die Antigenbindungsstelle eines Antikörpers wird von bestimmten Abschnitten der variablen Domänen der schweren und der leichten Kette gebildet. Die Struktur der variablen Domänen weist konservierte Bereiche (Gerüstregionen oder *Framework Regions*, FR) auf, die von 9 β -Faltblattsträngen gebildet werden (im Gegensatz zu 7 β -Faltblattsträngen der konstanten Domänen) und wenig Sequenzvariabilität zeigen. Diese Bereiche werden in jeder variablen Domäne durch drei hypervariable Schleifen, die auch als *Complementarity Determining*

Regions (CDRs) bezeichnet werden, miteinander verbunden. Die Aminosäuren in den insgesamt sechs CDRs (CDR L1-3 und CDR H1-3), die mit dem Antigen in Kontakt stehen, bilden die Antigenbindungsstelle, das Paratop des Antikörpers.

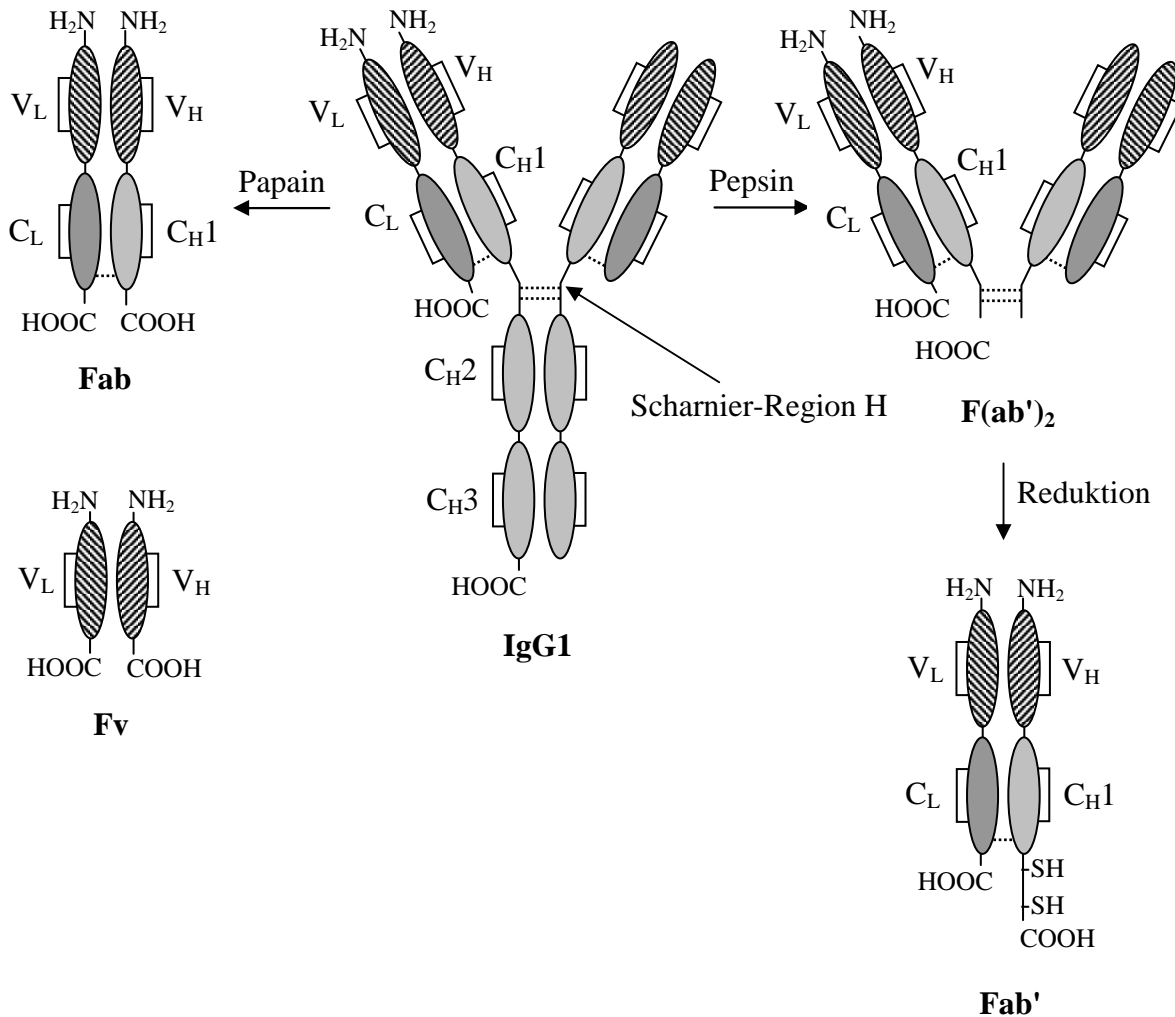


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines menschlichen Immunglobulins (IgG1) und der davon abgeleiteten antigenbindenden Fragmente, die durch Proteolyse erhalten werden können. Intrachene Disulfidbrücken sind durch schwarze Klammern symbolisiert, interchene Disulfidbrücken durch gepunktete Linien. Pepsin spaltet die schweren Immunglobulinketten C-terminal der Scharnier-Region H, jedoch N-terminal von C_{H2}, so daß als Produkt einerseits das Fc-Fragment (*Fragment Crystallizable*; nicht dargestellt) mit den gepaarten C_{H2}- und C_{H3}-Domänen und andererseits das F(ab')₂-Fragment mit den beiden Antigenbindungsstellen entsteht. Wird dieses einer partiellen Reduktion unterworfen, entsteht das Fab'-Fragment (*Fragment Antigen Binding*) mit freien Thiolgruppen am C-Terminus der verkürzten schweren Immunglobulinkette. Fab-Fragmente ohne freie Thiolreste können meist durch Proteolyse mit Papain, das die schwere Immunglobulinkette N-terminal der Scharnier-Region spaltet, erhalten werden. Ebenfalls dargestellt ist das kleinste antigenbindende Bruchstück, das Fv-Fragment (*Fragment Variable Domains*), das lediglich aus den variablen Domänen beider Immunglobulinketten besteht, welche nicht kovalent miteinander assoziiert sind..

Mit der Entwicklung der Hybridomtechnik (Köhler & Milstein, 1975), die auf der Fusion von B-Lymphozyten mit immortalen Myelomzellen basiert, wurde es möglich, nahezu beliebige "monoklonale" Antikörper *in vitro* herzustellen.

Durch proteolytischen Abbau eines Immunglobulins können gezielt Antikörperfragmente (Abb. 1) hergestellt werden. Durch Spaltung mit Papain wird das antigenbindende Fab-Fragment gewonnen, das aus der vollständigen leichten Kette und aus der variablen sowie der ersten konstanten Domäne der schweren Kette besteht. Beide Ketten sind dabei in der Regel durch eine interchenare Disulfidbindung miteinander verknüpft. Außerdem entsteht das die Effektorfunktionen vermittelnde Fc-Fragment, das aus den C-terminalen C_H2- und C_H3-Domänen besteht.

Ein Verdau mit Pepsin führt zur Spaltung beider schweren Ketten auf der C-terminalen Seite der Scharnier-Region, wodurch das bivalente antigenbindende F(ab')₂-Fragment erzeugt wird. Dieses setzt sich aus den beiden Fab'-Fragmenten zusammen, die in der Scharnier-Region über Disulfidbrücken noch kovalent miteinander verknüpft sind. Durch partielle Reduktion dieses F(ab')₂-Fragments werden die Disulfidbindungen in der Scharnier-Region gespalten, wodurch zwei Fab'-Fragmente mit freien Thiolresten am C-Terminus der schweren Kette erhalten werden. Als nachteilig erwies sich bei dieser enzymatischen Prozedur neben den geringen Ausbeuten vor allem die Heterogenität der isolierten Antikörperfragmente.

Erst die funktionelle Biosynthese von Antikörperfragmenten in *E. coli* (Skerra & Plückthun, 1988; Better *et al.*, 1988) eröffnete aufgrund der einfachen gentechnischen Handhabbarkeit dieses Wirtsorganismus die Möglichkeit, Immunglobulinfragmente in gleichbleibender Qualität und in hohen Ausbeuten herzustellen.

Die bakterielle Produktion von Antikörperfragmenten in löslicher Form beruht auf dem Prinzip der Kosekretion von schwerer und leichter Immunglobulinkette in den periplasmatischen Raum. Das dort herrschende oxidierende Milieu erlaubt die Faltung der beiden Ketten unter gleichzeitiger Ausbildung der strukturellen Disulfidbrücken, welche von der Assoziation zum funktionellen Antikörpermolekül gefolgt wird (Skerra & Plückthun, 1988; 1989).

Neben den im Prinzip auch durch die klassischen proteinchemischen Verfahren erhältlichen Fab- und zum Teil Fv-Fragmenten (Rousseaux *et al.*, 1986) konnten unter Nutzung des modularen Aufbaus der Immunglobuline mittels *Protein-Engineering* diverse künstliche Fragmente entwickelt werden (Überblick in Plückthun, 1992). Hervorzuheben sind hierbei *single-chain* Fv-Fragmente (scFv; Bird *et al.*, 1988), disulfidverbrückte Fv-Fragmente (dsFv; Brinkmann *et al.*, 1993) sowie bivalente bzw. bispezifische Antikörperfragmente (Carter *et al.*, 1992), die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden. Weiterhin sind Fusionsproteine aus Antikörperfragmenten und Enzymen (Wels *et al.*, 1992) wie auch

Immuntoxinen (Reiter *et al.*, 1996) gegenwärtig von großem diagnostischem bzw. therapeutischem Interesse (Übersicht in Chester & Hawkins, 1995).

1.2 Bispezifische Antikörper: Struktur und gentechnische Herstellung

Sogenannte bispezifische Antikörper besitzen Bindungsstellen für zwei verschiedene Antigene, wodurch sie die beiden Antigene oder gar komplette Zellen hochspezifisch miteinander verbinden können. Damit besteht z. B. die Möglichkeit, Effektorzellen des Immunsystems mit Tumorzellen zu vernetzen (Zhu *et al.*, 1995). Ein Arm des bispezifischen Antikörpers übernimmt dabei die Aufgabe der Tumorerkennung (Link *et al.*, 1993; Holliger *et al.*, 1996), während der andere Arm die Effektorfunktionen durch Bindung an eine Effektorzelle vermittelt.

Erstmalig wurden bispezifische Antikörper durch somatische Fusion zweier unterschiedlicher antikörperproduzierender Maus-Hybridomzelllinien (Milstein & Cuello, 1984) hergestellt. Die resultierende Hybrid-Hybridom- oder "Quadrom"-Zelle produziert allerdings neben dem gewünschten bispezifischen Antikörper noch bis zu neun andere Varianten, die sich aufgrund der zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten zwischen leichter und schwerer Immunglobulinkette bilden können (Suresh *et al.*, 1986a). Die bispezifischen Immunglobuline G [BsIgG] machen nur 10-50 % der produzierten Immunglobuline einer solchen Hybrid-Hybridom-Zelle aus (Suresh *et al.*, 1986b) und müssen aus der Mischung durch ein aufwendiges Reinigungsverfahren isoliert werden. Für solche [BsIgG] wurde oft eine zusätzliche Toxizität beobachtet, die auf die Wechselwirkung von Fc-Rezeptor exprimierenden Effektorzellen mit dem Fc-Teil zurückzuführen war, welches dabei als dritte Spezifität fungierte (Peipp & Valerius, 2002). Durch Proteolyse mit Pepsin kann das die Effektorfunktionen vermittelnde Fc-Fragment abgespalten werden und man erhält ein bispezifisches F(ab')₂-Fragment [BsF(ab')₂]. Dieses besitzt im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung im Menschen gegenüber dem vollständigen [BsIgG] weitere Vorteile, wie z. B. eine reduzierte Immunogenität und eine höhere Tumorpenetration (King *et al.*, 1992).

Eine andere Möglichkeit, bispezifische F(ab')₂-Fragmente zu produzieren, besteht in der gerichteten chemischen Kopplung zweier Fab'-Fragmente, die konventionell durch Proteolyse und milde Reduktion zweier monoklonaler Antikörper gewonnen werden. Sie tragen am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette freie Thiolreste aus der Scharnier-Region und können mittels Disulfid- (Brennan *et al.*, 1985) oder Thioetherbindung (Glennie *et al.*, 1987) zum bispezifischen F(ab')₂-Fragment gekoppelt werden. Jedoch weisen die Fab'-Fragmente, die aus kompletten Antikörpern gewonnen wurden, eine gewisse Heterogenität auf, was auf die teilweise unspezifische Proteolyse und die erforderliche Reduktion zurückzuführen ist, die nicht immer selektiv für Disulfidbindungen in der Scharnier-Region ist (Parham, 1983).

Ein vielversprechender moderner Ansatz zur Immuntherapie besteht in der Produktion bispezifischer Antikörperfragmente mit gentechnischen Methoden (Holliger & Winter, 1993; Carter *et al.*, 1995). Erste Aufmerksamkeit erlangte die Arbeit von Carter *et al.* (1992), in der zunächst die Synthese eines bivalenten – anstelle bispezifischen – F(ab')₂-Fragments gegen das Brustkrebs-Antigen HER2 beschrieben wurde. Das rekombinante humanisierte Fab'-Fragment wurde in monomerer Form durch Fermentation in *E. coli* in beachtlichen Mengen produziert (1-2 g/l Kulturmedium) und nach seiner Reinigung *in vitro* über einen einzelnen freien Cysteinrest am C-Terminus der schweren Kette dimerisiert (Abb. 2A). Dieselbe Strategie wurde in einer weiteren Arbeit angewendet, um ein entsprechendes bispezifisches F(ab')₂-Fragment zu präparieren, welches nicht nur das HER2-Protoonkogen sondern auch das CD3-Antigen auf menschlichen T-Zellen erkennt (Shalaby *et al.*, 1992). Für die gerichtete proteinchemische Kopplung der beiden Fab'-Fragmente haben sich sowohl die Verknüpfung über Disulfidbindungen (Shalaby *et al.*, 1992) als auch die Kopplung über Thioether (Rodrigues *et al.*, 1992) bewährt. Auf diese Weise konnten bispezifische F(ab')₂-Fragmente mit einer hohen Kopplungseffizienz von mehr als 50 % in großen Mengen (15-60 mg) und mit nur geringem Anteil von bivalentem F(ab')₂ gewonnen werden.

Eine Alternative zur chemischen Kopplung stellt die Heterodimerisierung unter Verwendung von Leucinzippern als Fusionspartner dar (Abb. 2B). Eine geregelte Abfolge von Leucinresten bewirkt eine Dimerisierung dieser relativ kurzen, C-terminalen Peptide. Besonders interessant sind dabei die Leucinzipper der Transkriptionsfaktoren *Fos* und *Jun* (Kostelny *et al.*, 1992). Fab'-Fragmente, die entweder ein *Fos*- oder *Jun*- Anhängsel tragen, ließen sich in Ausbeuten von 100 mg pro Liter Myelom-Zellkultur (Tso *et al.*, 1995) oder auch in *E. coli* (Carter *et al.*, 1995) produzieren. Die gebildeten bivalenten F(ab')₂-Fragmente wurden einer milden Reduktion unterworfen, um die interchenaren Disulfidbindungen zu spalten. Die Vereinigung der beiden Fab'-*Fos* bzw. Fab'-*Jun* Fragmente in stöchiometrischen Mengen führte zu 99 % zur Bildung des *Fos/Jun* Heterodimeren und somit zum bispezifischen F(ab')₂-Fragment. Durch das Vorhandensein von drei Cysteinresten in der Scharnier-Region konnten sich stabilisierende Disulfidbindungen zwischen den beiden Fab'-Fragmenten ausbilden. Die möglicherweise immunogenen Leucinzipper wurden proteolytisch mit Pepsin abgespalten.

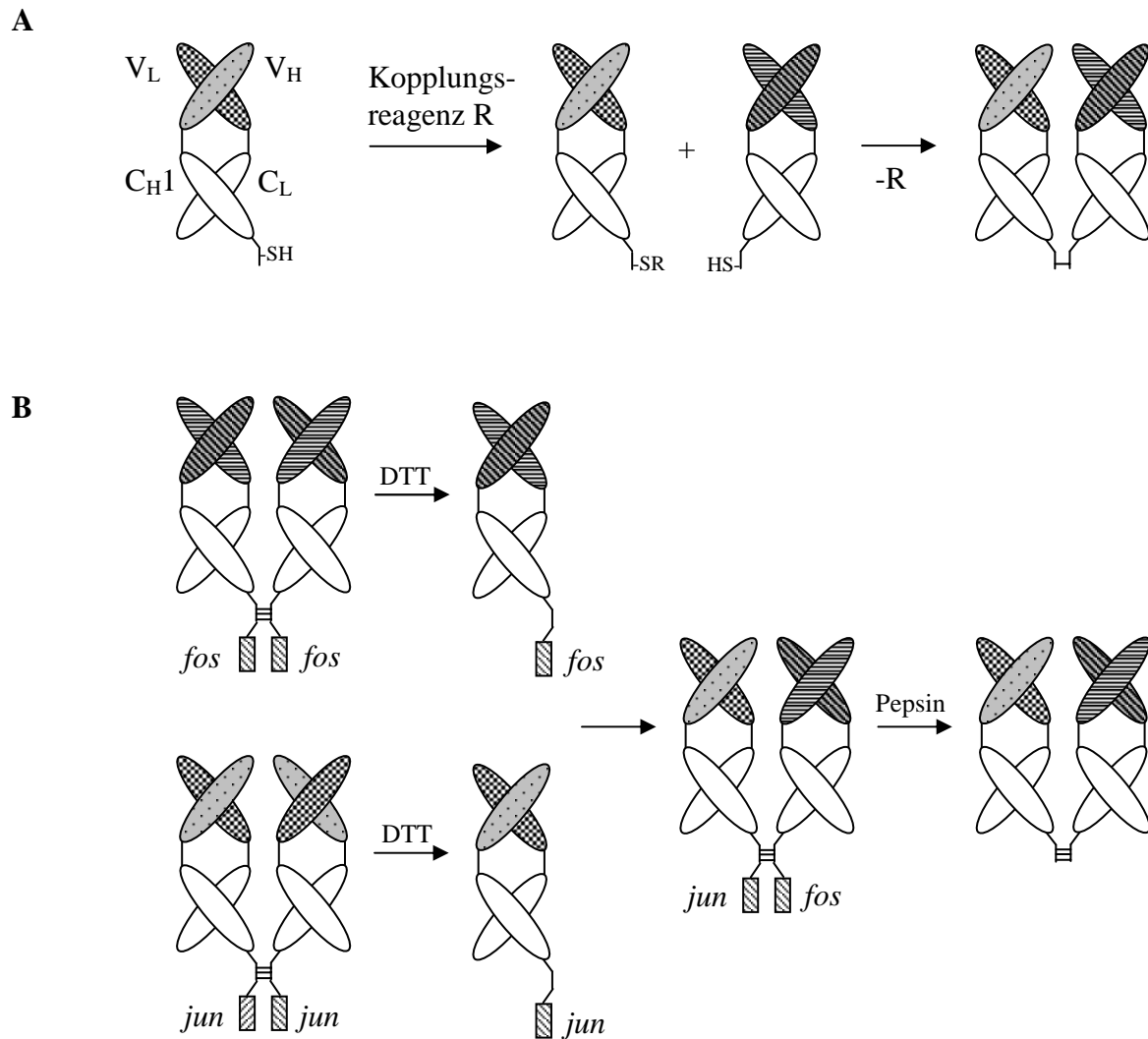


Abbildung 2: Herstellung bispezifischer $F(ab')_2$ -Fragments. (A) Produktion eines bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragments durch chemische Kopplung zweier Fab' -Fragments, die freie Thiolreste am C-Terminus der schweren Kette tragen und entweder gentechnisch in *E. coli* oder aus einem monoklonalen Antikörper mittels Proteolyse und Reduktion hergestellt wurden. Zunächst wird ein Fab' -Fragment mit dem Kopplungsreagenz R derivatisiert und anschließend mit dem zweiten Fab' -Fragment gekoppelt (hier mittels einer Disulfidbindung). (B) Herstellung eines bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragments unter Verwendung der Dimerisierungsdomänen *jun* und *fos*. In bivalenten $F(ab')_2$ -Fragments, die sich jeweils durch Homodimerisierung der Leucinzipper *jun* und *fos* bilden, werden durch milde Reduktion mit Dithiothreitol (DTT) die drei interchenaren Disulfidbrücken gespalten und die isolierten monomeren Fab' -*jun* bzw. Fab' -*fos* Fragmente in stöchiometrischem Verhältnis gemischt. Durch Heterodimerisierung der *Jun*- und *Fos*-Leucinzipper kommt es dabei überwiegend zur Bildung des bispezifischen $F(ab')_2$ -Fragments.

Generell wird angenommen, daß mit abnehmender Größe eines Antikörperfragments eine bessere Tumorenpenetration und günstigere Pharmakokinetik erreicht wird (King *et al.*, 1992). Es mangelte deshalb in der Vergangenheit nicht an Versuchen, bispezifische Antikörperreagenzien mit noch kleineren als den Fab' -Fragmenten herzustellen. Im Vordergrund standen dabei die sogenannten *single chain* (sc) Fv -Fragments, bei denen zur Stabilisierung der Domänenassoziation ein künstlicher Peptidlinker zwischen der V_H - und der

V_L -Domäne des jeweiligen Antikörpers eingeführt wird (Bird & Walker, 1991). Dimere bispezifischer scFv-Fragmente Dimere $[Bs(scFv)_2]$ (Abb. 3A) lassen sich auf DNA-Ebene herstellen – durch simple Genfusion mittels eines Peptidlinkers (Kranz *et al.*, 1995) – so daß alle vier variablen Regionen auf einem einzigen Polypeptidstrang hintereinanderliegen. Allerdings zeigen diese Derivate oft verminderte Antigenbindung (aufgrund sterischer Probleme oder ungerichteter Domänenpaarung) und häufig sogar ein unerwünschtes Oligomerisierungsverhalten (Desplancq *et al.*, 1994), das nur schwer kontrollierbar und deshalb nachteilig bei der Produktion strukturell definierter pharmazeutischer Wirkstoffe ist. Zudem ließen sich bispezifische scFv-Fragmente in *E. coli* bislang nicht effizient in funktioneller Form produzieren. Sie bilden in *E. coli* üblicherweise unlösliche Einschlusskörper, aus denen erst durch Rückfaltung das $[Bs(scFv)_2]$ -Fragment gewonnen wird (Gruber *et al.*, 1994). Generell wird das Potential der scFv-Fragmente daher im Zusammenhang mit der Herstellung bispezifischer Reagenzien als niedrig eingestuft (Carter *et al.*, 1995). Eine Ausnahme bilden die mittels Zellkultur in großer Menge produzierbaren $[Bs(scFv)_2]$ BiTE™ Antikörperfragmente ("Bispecific T-Cell Enganger") der Firma Micromet AG (Martinsried, Deutschland; Baeuerle *et al.*, 2003). Vorklinische Daten für das BiTE™ Antikörperfragment MT103 (bscCD19xCD3), das für die Behandlung von Blutkrebskrankungen entwickelt wurde und dabei maligne B-Lymphozyten mit T-Zellen vernetzt, deuten auf eine hohe therapeutische Wirksamkeit dieses Antikörperformats hin (Dreier *et al.*, 2002).

Ein interessanter Weg wurde mit der Konstruktion der sogenannten Diabodies besprochen (Holliger *et al.*, 1993), wobei gerade die ungewöhnlichen Oligomerisierungseigenschaften von scFv-Fragmenten ausgenutzt wurden. Bei der Reinigung von in *E. coli* exprimierten scFv-Fragmenten durch Gelfiltration fiel auf, daß ein erheblicher Anteil dieser scFv-Fragmente Dimere – bzw. höhere Oligomere – bildete. Die Menge der Dimere hing dabei von der Länge der Peptidverbindung zwischen den beiden variablen Domänen ab. Je kürzer der Linker, desto größer ist allgemein der Gehalt an Homodimeren (Raag & Whitlow, 1995). Für die Herstellung eines Diabody (Abb. 3B) verwendet man eine dicistronische Expressionskassette für zwei verschiedene scFv-Fragmente, deren variable Domänen untereinander ausgetauscht wurden; d. h. eines der scFv-Fragmente exprimiert die V_H -Domäne des Antikörpers A gefolgt von der V_L -Domäne des Antikörpers B. Beim anderen scFv-Fragment ist es umgekehrt: $V_H(B)$ wird gefolgt von $V_L(A)$. Durch Dimerisierung der beiden scFv-Fragmente unter Ausbildung der Antigenbindungsstellen des Antikörpers A sowie B entsteht ein bispezifischer Diabody.

Die Eignung der Diabodies zur Kontaktvermittlung zwischen malignen Zellen und Effektorzellen des Immunsystems *in vivo* ist allerdings noch nicht geklärt. Aufgrund der kompakten Struktur der Diabodies – im Vergleich z. B. mit einem $F(ab')_2$ -Fragment – ist zu befürchten, daß die zweite Antigen-Bindungsstelle sterisch nicht mehr gut genug zugänglich

ist, sobald der Diabody an das erste Antigen gebunden hat. Bei der Präparation von Diabodies besteht zudem häufig das Problem, daß die variablen Domänen eine falsche Paarung eingehen. Das führt zur teilweisen Bildung nicht funktioneller Assoziante und macht spezielle Reinigungsmaßnahmen erforderlich. Schließlich ist die Frage offen, in wie weit der künstlich eingeführte Linker zwischen den Immunglobulindomänen immunogene Eigenschaften im Menschen aufweist (Carter *et al.*, 1995).

Eine weitere Möglichkeit, bispezifische Antikörperreagenzien herzustellen, welche auf scFv-Fragmenten basieren, bieten die sogenannten Miniantibodies (Pack & Plückthun, 1992). Diese bestehen aus einem scFv-Fragment, das über einen flexiblen Linker mit einem Dimerisierungsmotiv, wie einem Leucinzipper oder einem *de novo* entwickelten Helix-Bündel-Motiv, fusioniert ist (Abb. 3C). Die Gene für die beiden scFv-Fragmente liegen dabei auf einem dicistronischen Operon, und die Assemblierung zum bispezifischen Miniantibody findet analog den vorherigen Beispielen im Periplasma von *E. coli* statt. Durch die Fusion eines Gens für ein scFv-Fragment über ein Helix-Bündel-Motiv als Dimerisierungsdomäne mit einem Gen für ein zweites scFv-Fragment mit anderer Spezifität, ist es möglich, ein Miniantibody-Fragment zu generieren (Abb. 3D), das zwei Bindungsstellen unterschiedlicher Spezifität aufweist (Müller *et al.*, 1998). Die Dimerisierungsdomäne führt dazu, daß sich zwei solcher bispezifischer (scFv)₂-Fragmente zu einem dimeren bispezifischen Miniantibody-Fragment assoziieren können. Dies ist bisher das kleinste verfügbare Antikörperfragment (120 kDa), das Bispezifität mit der Avidität von je zwei Bindungsstellen vereinigt.

Die Auswahl des richtigen Formats eines bispezifischen Antikörpers für eine potentielle klinische Anwendung ist von mehreren Faktoren abhängig. Die Größe eines bispezifischen Antikörpers sollte sorgfältig auf die jeweilige Applikation zugeschnitten sein. Dies gilt vor allem in Bezug auf pharmakokinetische Eigenschaften, Serumhalbwertszeit und die Tumorpenetration als auch für die Unterstützung sekundärer Immunfunktionen wie die *Complement-Dependent Cytotoxicity* (CDC) und *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC). Bispezifische Antikörper der Klasse IgG bieten wahrscheinlich das geeignetste Format, wenn lange Plasmahalbwertszeiten und sekundäre Immunfunktionen erwünscht sind (Carter, 2001). Inzwischen wurden Diabodies entwickelt, die ebenso CDC und ADCC unterstützen, indem eine Bindungsstelle gegen Plasma-IgGs gerichtet ist (Holliger *et al.*, 1997). Bispezifische Antikörperfragmente sind für klinische Anwendungen interessant, wenn kurze Verweildauern im Plasma oder die Penetration solider Tumore erforderlich sind.

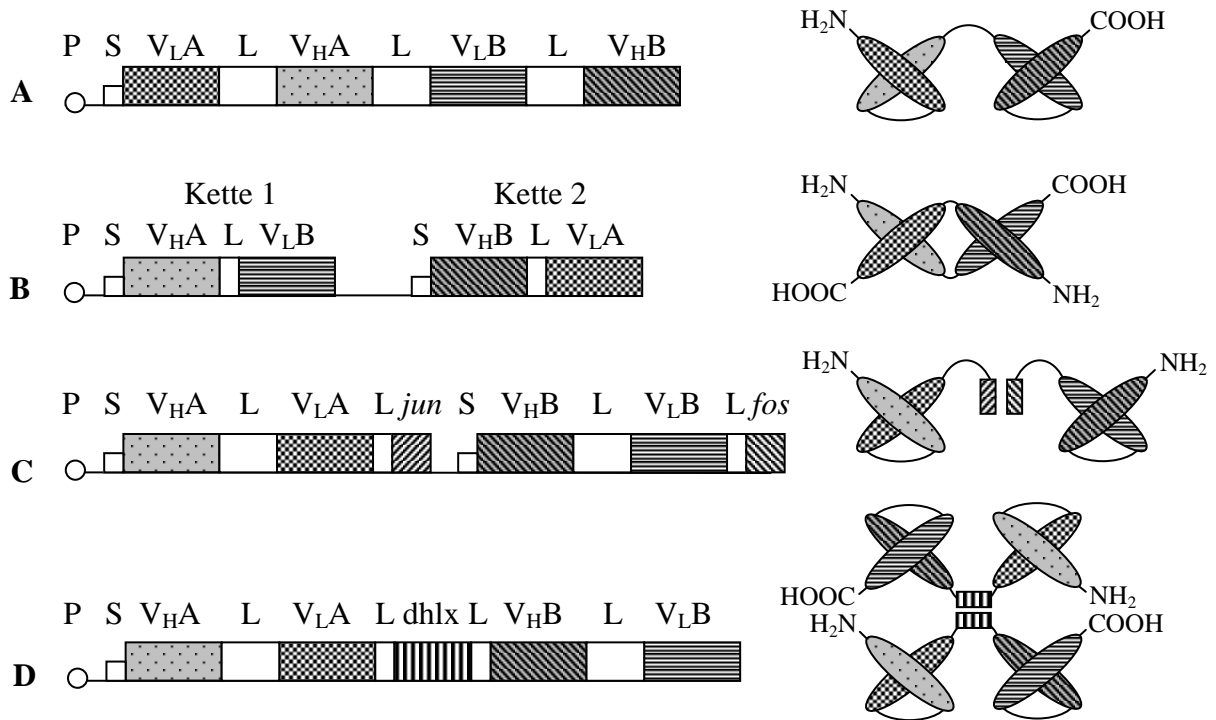


Abbildung 3: Genstruktur für die Herstellung bispezifischer Antikörperfragmente in *E. coli* und deren Struktur. (A) Bispezifisches (scFv)₂-Fragment: zwei scFv-Fragmente mit unterschiedlicher Spezifität sind über einen Linker verbunden. (B) Bispezifischer Diabody: Sind die beiden variablen Domänen in einem scFv-Fragment durch einen sehr kurzen Linker (< 10 Aminosäuren) oder direkt miteinander verbunden, können sie nicht intramolekular assoziieren. Die Dimerisierung mit einem zweiten entsprechenden scFv-Fragment ist jedoch unter Ausbildung zweier Antigenbindungsstellen möglich. Ein bispezifischer Diabody bildet sich durch Koproduktion zweier solcher scFv-Fragmente in *E. coli*, wenn die V_H- und V_L-Domänen zweier Antikörper unterschiedlichen scFv-Fragmenten zugeordnet werden. (C) Miniantibody: Zwei scFv-Fragmente mit angehängtem Dimerisierungsmotiv (*Jun*- oder *Fos*-Leucinzipper) bilden ein bispezifisches Heterodimer. (D) Dimerer bispezifischer Miniantibody: Zwei scFv-Fragmente mit verschiedener Spezifität sind über ein *helix-turn-helix* Motiv als Dimerisierungsdomäne als Linker kovalent miteinander fusioniert. Abkürzungen: P: Promotor; S: bakterielle Signalsequenz; L: Linker; Dhlx: *Helix-Turn-Helix* Dimerisierungsdomäne, die ein Vierhelixbündel ausbildet; N- und C-Termini sind jeweils gekennzeichnet.

1.3 Humanisierung und Affinitätsmaturierung durch *Antibody Engineering*

Die Techniken zur Herstellung von rekombinanten Antikörperfragmenten in *E. coli* ermöglichen nicht nur deren Bereitstellung für Diagnostik und Therapie in ausreichender Qualität und Quantität, sondern darüber hinaus auch die einfache Modifizierung ihrer protein- und immunchemischen Eigenschaften. Die leichte Handhabbarkeit des bakteriellen Wirtsorganismus erlaubt die unkomplizierte Veränderung der vektorkodierten Gene mit molekularbiologischen Standardmethoden. Durch *Antibody Engineering* (Hayden *et al.*, 1997; Kontermann & Dübel, 2001) können so Antikörperfragmente z. B. hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und -spezifität (Jackson *et al.*, 1992), ihrer Immunogenität (Winter & Harris, 1993) oder ihrer Wirtsverträglichkeit (Vaughan *et al.*, 1998) optimiert werden.

Eine Vielzahl von therapeutisch interessanten Antikörpern – bzw. deren gentechnisch hergestellte Antikörperfragmente – besitzen aufgrund der Gewinnung mittels der Hybridomtechnik Sequenzen der Maus. Diese Herkunft ist jedoch bei der Anwendung am Menschen problematisch, denn Proteine aus einer fremden Spezies werden vom menschlichen Immunsystem in der Regel als fremd erkannt (Courtenay Luck *et al.*, 1986; Lamers *et al.*, 1995). Es kommt zur Bildung der sogenannten humanen anti-Maus-Antikörper-Immunantwort (HAMA). Diese zügig vom menschlichen Immunsystem gebildeten Antikörper neutralisieren meist den therapeutisch eingesetzten Maus-Antikörper und machen ihn damit unwirksam. Eine wiederholte Therapie ist somit nur sehr eingeschränkt möglich.

Die Mehrzahl der HAMA sind gegen den konstanten Teil der Antikörper gerichtet. Dies gab den Ansporn zur Herstellung von rekombinanten Immunglobulinen mit variablen Domänen eines monoklonalen Antikörpers aus der Maus und humanen konstanten Domänen (Wright *et al.*, 1992). Die resultierenden "chimären" Antikörper binden immer noch spezifisch an das Antigen, die HAMA-Antwort ist allerdings deutlich herabgesetzt. Allerdings werden auch gegen den verbliebenen Mausanteil in den variablen Domänen letztlich HAMA gebildet (Lo Buglio *et al.*, 1989; Bruggemann *et al.*, 1989).

Die Immunogenität der variablen Domänen kann in einem als Humanisierung bezeichneten Verfahren weiter reduziert werden (Winter & Harris, 1993). Dazu stehen zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, die als *CDR-Grafting* bzw. *Resurfacing* bezeichnet werden.

Die variablen Domänen unterteilen sich in die eigentlichen hypervariablen Regionen (CDRs) einerseits und die Gerüstregionen, welche weniger variabel sind, andererseits. Durch Übertragung der hypervariablen Regionen aus einem Maus-Antikörper auf ein humanes Gerüst (*CDR-Grafting*) – mit möglichst hoher Sequenzhomologie – erhält man nahezu vollständig (90 %) humanisierte Antikörper (Verhoeyen *et al.*, 1988). In vielen Fällen ist aber eine einfache Transplantation der CDRs nicht ausreichend zur Wahrung der Affinität für das Antigen (Carter & Merchant, 1997), da diese nicht nur von den CDR-Sequenzen sondern auch von dem strukturellen Kontext der Gerüststruktur bestimmt wird (Foote & Winter, 1992). Deshalb ist es nötig, einzelne Aminosäuren aus der murinen Gerüstregion in die humane zu übernehmen, um die funktionelle Präsentation der CDRs auf dem humanen Antikörpergerüst zu gewährleisten (Hurle & Gross, 1994).

Bei der zweiten Methode zur Humanisierung, dem "Funieren" (*Resurfacing*) der Oberfläche der variablen Domänen, wird versucht, die Immunogenität der variablen Domänen durch selektiven Ersatz der exponierten murinen Aminosäurereste in der Gerüstregion zu vermindern. Das Innere der variablen Domänen bleibt unverändert, so daß verbesserte Aussichten für die korrekte Präsentation der CDRs auf dem Antikörpergerüst bestehen (Roguska *et al.*, 1994).

Falls die Affinität des humanisierten Antikörpers dennoch deutlich geringer ist als die des murinen Antikörpers, muß eine sogenannte Affinitätsmaturierung durchgeführt werden. Dabei sind zwei grundsätzliche experimentelle Ansätze zu unterscheiden, das rationale Design und das evolutive Verfahren. Beim rationalen Design werden auf der Basis eines Strukturmodells Aminosäuresubstitutionen an definierten Positionen der variablen Domänen, die an der Antigenbindung beteiligt sind, geplant (Morea *et al.*, 2000). Vorrangig handelt es sich dabei um Positionen innerhalb der CDRs sowie jener Regionen, die für die korrekte Präsentation der CDRs verantwortlich sind. Computerprogramme wie QUANTA und INSIGHT II (Molecular Simulations, San Diego, CA, USA) erlauben die Simulation von Struktur- und Funktionsveränderungen, die durch den Austausch erreicht werden. Diese Vorgehensweise kann in letzter Konsequenz bis zum vollständigen Design eines künstlichen Paratops für einen Antikörper führen (Essen & Skerra, 1994; Schiweck & Skerra, 1997).

Bei evolutiven Verfahren werden dagegen durch Einführung von Zufallsmutationen oder gar die *De-novo*-Synthese der Immunglobulingene synthetische Bibliotheken von Antikörperfragmenten hergestellt (Knappik *et al.*, 2000). Durch geeignete Auswahlstrategien, wie der *Phage Display*- oder der *Ribosome Display*-Technik (Winter, 1998, Hoogenboom *et al.*, 1998; Hanes *et al.*, 2000), können Antikörperfragmente mit optimierter Affinität aus diesen Bibliotheken isoliert werden.

1.4 Das Hodgkin-Lymphom als Gegenstand der Immuntherapie

Das Hodgkin-Lymphom ist eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems. Sie wurde 1832 von Thomas Hodgkin erstmals beschrieben (Hodgkin, 1832). Die Häufigkeit der Erkrankung wird in Deutschland mit etwa 3 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner bei einer zweigipfligen Verteilung (Häufung um das 25. und das 55. Lebensjahr) angegeben (DeVita, 1987). Als Beschwerde tritt oft zunächst nur ein allgemeines Krankheitsgefühl mit eingeschränkter Leistungsfähigkeit auf. Etwa ein Drittel der Patienten klagt über Allgemeinsymptome wie Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Bei den meisten Neuerkrankungen sind vergrößerte Lymphknoten das erste Krankheitssymptom. In fortgeschrittenen Stadien kommt es allerdings zur Tumorbildung in Milz, Leber, Knochenmark, Knochen oder Lunge.

Das Hodgkin-Lymphom wird im Fall des histologischen Nachweises von wenigen (0,01-1 %) ein- oder mehrkernigen malignen Riesenzellen, den Hodgkin/Reed-Sternberg- (HRS) Zellen, im Tumorgebilde diagnostiziert. Charakteristischerweise sind die HRS-Zellen von einer Vielzahl an reaktiven Lymphozyten, Histiocyten, Granulozyten und Fibroblasten umgeben. In befallenen Lymphknoten stellen aktivierte T-Helferzellen die Mehrzahl der infiltrierenden Lymphozyten dar (Poppema *et al.*, 1999). Regelmäßig lassen sich auf der Zelloberfläche der HRS-Zellen akzessorische Moleküle wie das B7.1- (CD80) und B7.2- (CD86) Antigen sowie

Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (CD54) und LFA-3 (CD58) nachweisen. Dieses Expressionsprofil weist die Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen als antigenpräsentierende Zellen aus. Es ist daher möglich, daß die T-Zellen aufgrund der Präsentation eines noch nicht näher definierten Antigens angezogen werden.

Küppers & Rajewsky (1998) konnten anhand der PCR-Amplifizierung von rearrangierten Immunglobulingenen in HRS-Zellen zeigen, daß diese von B-Lymphozyten abstammen. Zudem zeigte die Sequenzanalyse, daß in diesen umgelagerten Immunglobulingenen eine hohe Anzahl an somatischen Mutationen vorliegt (Kanzler *et al.*, 1996), welche von der physiologischen Affinitätsreifung der B-Lymphozyten im Keimzentrum des Lymphfollikels herrühren (Küppers *et al.*, 1993).

Die somatische Hypermutation erfolgt als Anpassungsreaktion auf den Kontakt des B-Lymphozyten mit einem Antigen, das den B-Lymphozyten im Keimzentrum von den follikulären dendritischen Zellen präsentiert wird, und dient der Affinitätssteigerung des Oberflächenimmunglobulins. Bedingt durch die entstandenen Mutationen verlieren einige Zellen ihre Fähigkeit, Antikörper zu bilden. Andere Zellen generieren Antikörper mit schlechterer Bindungseigenschaft für ihr Antigen. B-Zellen mit solchen Mutationen sterben üblicherweise ab, während B-Zellen, deren Antikörper eine höhere Affinität aufweisen, das *bcl-2* Gen exprimieren und so dem apoptotischen Zelltod entgehen (Liu *et al.*, 1991). Offenbar durchläuft die Vorläuferzelle der HRS-Zellen ebenfalls eine Keimzentrumsreaktion nach primärem Kontakt mit einem Antigen und akkumuliert somatische Mutationen.

In den Immunglobulinsequenzen der HRS-Zellen finden sich jedoch häufig Mutationen, die die Antikörpersynthese unterbinden (Kanzler *et al.*, 1996), was eigentlich zur Apoptose führen sollte. Dennoch überleben die Zellen diese potentiell fatalen Mutationsereignisse. Der Mechanismus, der der Apoptoseresistenz in den HRS-Zellen zugrundeliegt, ist jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit einer Infektion durch das Epstein-Barr-Virus. In industrialisierten Ländern wurde das Epstein-Barr-Virus in 50 % der untersuchten Fälle in den HRS-Zellen nachgewiesen (Herbst *et al.*, 1992; Weiss *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1990), in Entwicklungsländern sogar zu 96 % (Chang *et al.*, 1993).

In infizierten HRS-Zellen werden die Gene für die latenten Membranproteine LMP-1 und LMP-2A des Epstein-Barr-Virus exprimiert (Herbst *et al.*, 1991; Young & Rowe, 1992; Niedobitek *et al.*, 1997). LMP-1 kann *in vitro* epitheliale Zellen transformieren (Wang *et al.*, 1985). Durch die von LMP-1 ausgelöste Aktivierung des *bcl-2* Gens kann in Lymphozyten die Apoptose verhindert werden (Gregory *et al.*, 1991). LMP-2A trägt offenbar zum Überleben der HRS-Zellen in der Keimzentrumsreaktion bei (Caldwell *et al.*, 1998). Durch die Expression von LMP-1 und LMP-2A könnte demnach die Apoptoseresistenz EBV-positiver HRS-Zellen in den Keimzentren bewirkt werden.

Die Hodgkin-Lymphome sind sensibel gegenüber Strahlen- und Chemotherapie, so daß bei Patienten mit frühen Krankheitsstadien eine Heilung in 70-90 % der Fälle möglich ist. Bis zu 40 % der Patienten befinden sich aber bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium und erleiden trotz initial guten Ansprechens auf die konventionellen Therapieverfahren ein frühzeitiges Rezidiv. Kurative Therapieoptionen können diesem Patientenkollektiv bisher nicht geboten werden, da die Heilungsraten nach einer erneuten, aggressiven Therapie sehr gering sind (20-30 %) (Pfreundschuh *et al.*, 1987; Pfreundschuh *et al.*, 1992). Für solche Patienten mit therapierefraktärem Hodgkin-Lymphom besteht der dringende Bedarf an grundlegend neuen Therapien, da herkömmliche Strategien versagen und das Gros der Patienten aus jungen Menschen besteht. Daher ist es auch verständlich, daß zahlreiche Arbeitsgruppen weltweit versuchen, neue Strategien zur Behandlung des fortgeschrittenen Hodgkin-Lymphoms zu entwickeln (Engert *et al.*, 1990; Winkler *et al.*, 1994).

Unter Berücksichtigung der typischen Limitationen einer auf immunologischen Mechanismen beruhenden Therapie – genannt seien hier großes Tumorumfang, geringe Vaskularisation des Tumors, Spezifität, Heterogenität, Antigenität und Expressionsdichte tumorassoziierter Antigene sowie die eingeschränkte Immunkompetenz des Patienten – erscheint das Hodgkin-Lymphom aus den folgenden Gründen für eine Immuntherapie besonders geeignet (Longo *et al.*, 1990; Engert *et al.*, 1992):

- (1) Der größte Anteil der in Hodgkin-Tumoren nachweisbaren Zellen wird von nicht malignen Zellen des lymphatischen Systems gebildet (Diehl *et al.*, 1990). Damit ist die Tumorzellzahl, verglichen mit soliden Tumoren gleicher Größe, sehr gering.
- (2) Die hohe Rate von initial erreichbaren Remissionen ermöglicht es, große Tumormassen durch Standardtherapieverfahren drastisch zu reduzieren. Die von der Chemotherapie und Strahlentherapie nicht erreichten, residualen Tumorzellen stellen dagegen ein geeignetes Ziel für die Immuntherapie dar.
- (3) Hodgkin-Tumore sind in der Regel gut vaskularisiert, was den Zugang von zytotoxischen Antikörpern bzw. Zellen erleichtert (Kaplan, 1980).
- (4) HRS-Zellen aller histologischen Subtypen exprimieren in hoher Dichte das als CD30 klassifizierte Ki-1 Aktivierungsantigen (Stein *et al.*, 1985). Dieses Antigen und sein Ligand (CD30-Ligand) gehören zur Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor-Familie (TNFR; (Dürkop *et al.*, 1992; Bengtsson, 2001). Kennzeichnend für diese Rezeptorenfamilie sind cysteinreiche Domänen (CRD) innerhalb der extrazellulären Domäne mit jeweils sechs Cysteinresten, die drei Disulfidbrücken bilden. CD30 weist aufgrund einer partiellen Duplikation der drei aminoterminalen CRD insgesamt fünf CRD auf (Bodmer *et al.*, 2002). Die extrazelluläre Domäne (ECD) kann somit in zwei Subdomänen (ECD1 mit den drei aminoterminalen und ECD2 mit den beiden carboxyterminalen CRDs) unterteilt

werden, die zueinander eine Homologie von 64 % aufweisen (Dürkop *et al.*, 1992). Bezüglich ihrer physiologischen Bedeutung ist die Rolle des Typ-I Transmembran-Glykoproteins CD30 und seines Liganden noch nicht eindeutig geklärt. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen an Patienten mit therapierefraktärem Hodgkin-Lymphom, die eine fortwährende Expression des CD30-Antigens auch bei zurückgehendem Krankheitsverlauf zeigen. Damit ist ein Verlust der antigenen Eigenschaften im Falle eines Rezidivs nicht gegeben. Immunszintigraphische Untersuchungen an Patienten mit Hodgkin-Lymphom zeigten eine spezifische Anreicherung des CD30-spezifischen Antikörpers HRS3 im befallenen Gewebe (Engert *et al.*, 1990; Carde *et al.*, 1990; Da Costa *et al.*, 1992). Damit kann dieser monoklonale Antikörper als vielversprechende Trägerstruktur für Toxine (Engert *et al.*, 1990) und Enzyme (Sahin *et al.*, 1990) oder als Tumorbindungsarm in bispezifischen Antikörpern dienen (Renner *et al.*, 1994).

1.5 Ein Therapiekonzept für das Hodgkin-Lymphom mit bispezifischen Antikörpern

Bispezifische Antikörper ermöglichen es, die Vorteile der Antikörperspezifität mit der zytotoxischen Kapazität von Effektorzellen zu verbinden (Milstein & Cuello, 1983; Segal *et al.*, 1992). Durch Bindung an ein tumorassoziiertes Antigen (TAA) wird einerseits der Tumor spezifisch erkannt, durch Bindung an einen aktivierenden Oberflächenrezeptor auf einer immunologischen Effektorzelle kann andererseits die zytotoxische Maschinerie der Effektorzelle in Gang gesetzt werden (Lichtenfeld *et al.*, 1988; Nakajima & Henkart, 1994).

Als zytotoxische Effektorzellen bieten sich im humanen Immunsystem T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen oder Monozyten an. NK-Zellen und T-Lymphozyten besitzen die gleiche pluripotente Vorläuferzelle und unterscheiden sich hauptsächlich in der Form der Antigenerkennung. Während T-Lymphocyten über den T-Zell-Rezeptor von MHC-Molekülen der Klasse I präsentierte Antigenpeptide erkennen, gibt es bei den NK-Zellen zahlreiche Oberflächenglycoproteine, die für die MHC-unabhängige Zielerkennung eine wichtige Rolle spielen (Gumperz & Parham, 1995). NK-Zellen können ohne vorherige Stimulierung Tumorzellen lysieren, T-Lymphocyten dagegen benötigen neben der Bindung des T-Zellrezeptors an das Antigenpeptid eine Kostimulation mit löslichen oder zellulären Signalstoffen, wie Cytokinen oder Adhäsionsmolekülen. Ein weiterer Vorteil von NK-Zellen gegenüber T-Zellen besteht darin, daß NK-Zellen präformierte Granula mit zytotoxischen Proteinen besitzen (Kaegi *et al.*, 1994; Nakajima & Henkart, 1994) und diese nach Kontakt mit der Zielzelle sofort ausschütten können. T-Zellen müssen dagegen erst die Proteinsynthese betreiben, bevor sie andere Zellen lysieren.

Ein Hauptrezeptor auf NK-Zellen zur Freisetzung der Granula ist der Fc γ -Rezeptor IIIa (CD16), der zur Familie der Immunglobulin-G-Rezeptoren gehört und den Fc-Teil der IgG1- und IgG3-Subklassen bindet. Der Fc γ -Rezeptor IIIa ist ein Transmembranglykoprotein mit einer vom Glykosilierungsgrad abhängigen molaren Masse von 50 – 80 kDa (Gessner *et al.*, 1998). Die extrazelluläre Domäne weist zwei immunglobulinartige Domänen des C2-Typs auf (Sondermann *et al.*, 1999). Die Bindung an den Fc-Teil von IgGs erfolgt durch die C-terminale Domäne und löst einen cytotoxischen Angriff der NK-Zellen auf mit IgGs markierte Zielzellen aus. Ebenso können Antikörper mit einer Spezifität für ein Epitop auf CD16 außerhalb der Fc-Bindungsdomäne das zytotoxische Potential einer NK-Zelle aktivieren und – nach Quervernetzung – die Ausschüttung der Granula bewirken (Abb. 4). Diese vom Fc-Teil unabhängige antikörperbasierte Aktivierung hat den Vorteil, die Konkurrenz mit Serum IgGs bezüglich Bindung an den Fc γ -Rezeptor zu umgehen. Mehrere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren bispezifische Antikörper entwickelt, die auf der einen Seite ein tumorassoziiertes Antigen und auf der anderen Seite CD16 erkennen (Fanger *et al.*, 1989; Moretta *et al.*, 1989).

Die Etablierung eines hochaffinen und CD30-spezifischen Antikörper machte es möglich, einen immuntherapeutischen Ansatz zur Therapie des Hodgkin-Lymphoms zu etablieren (Jung *et al.*, 1995; Renner *et al.*, 1995). Dabei wurde die Strategie zur Rekrutierung und Aktivierung von humanen NK-Zellen verfolgt. Mit Hilfe des CD16-spezifischen monoklonalen Antikörpers A9 (Hombach *et al.*, 1993) und des CD30-spezifischen Antikörpers HRS3 (Engert *et al.*, 1990) wurde mittels der Quadromtechnik ein muriner bispezifischer anti-CD16/CD30-Antikörper (A9/HRS3) hergestellt (Hombach *et al.*, 1993). *In vitro*-Experimente zeigten, daß dieser Quadrom-Antikörper die spezifische Lyse von Hodgkin-Zellen in Gegenwart von gereinigten NK-Zellen oder auch von Mononukleären Blutzellen induzierte. *In vivo*-Untersuchungen an immundefekten Mäusen mit xenotransplantierten, humanen Hodgkin-Tumoren belegten die Effizienz dieses Proteinreagens, da bereits die einmalige Antikörpergabe zur Heilung von 60 % der tumortragenden Tiere führte (Renner *et al.*, 1994; Renner *et al.*, 1995).

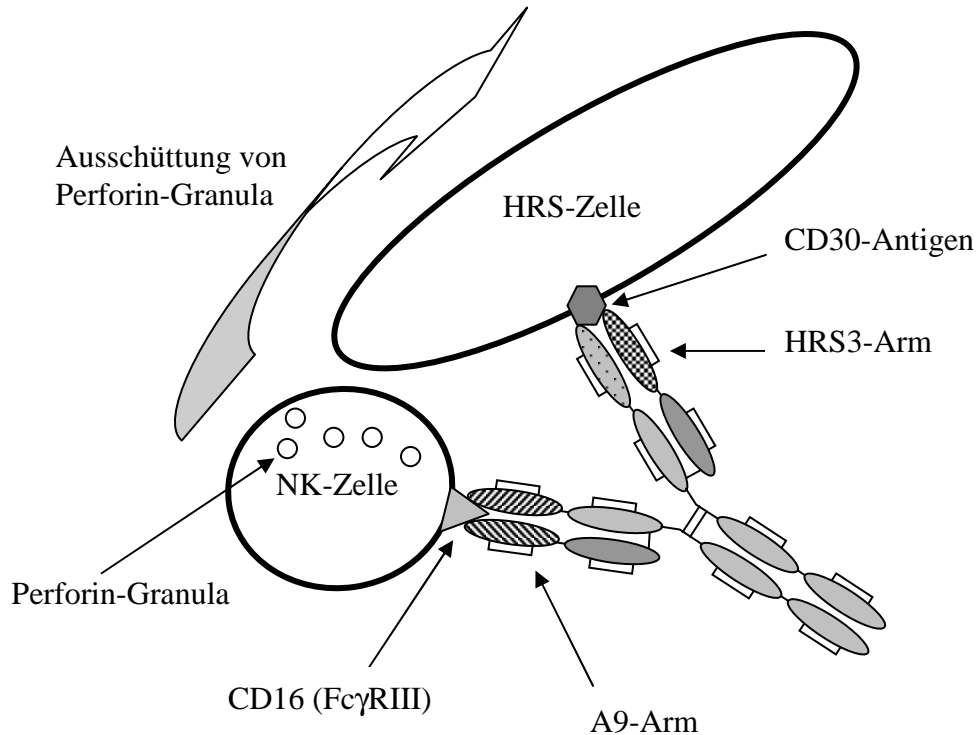


Abbildung 4: Prinzip der Immuntherapie des Hodgkin-Lymphoms mit dem bispezifischen A9/HRS3-Antikörper. Der Quadrom-Antikörper bindet mit seinem A9-Arm an CD16 auf Natürlichen Killerzellen (NK), mit seinem HRS3-Arm an das CD30-Antigen auf HRS-Zellen, wodurch die beiden Zelltypen miteinander vernetzt werden. Durch multiplen Kontakt und Aktivierung über den Fcγ-Rezeptor III kommt es zur Freisetzung von Perforin-Granula, die die Lyse der HRS-Zellen einleiten.

Die antitumorale Wirksamkeit dieses bispezifischen A9/HRS3-Antikörpers wurde in zwei Studien der klinischen Phase I/II an insgesamt 31 Patienten mit – bezüglich konventioneller Behandlung – therapierefraktärem oder rezidivem Hodgkin-Lymphom untersucht (Hartmann *et al.*, 1997; Renner *et al.*, 1997). In beiden Studien konnte bei 30 % der behandelten Patienten eine antitumorale Wirkung festgestellt werden. Der dokumentierte Rückgang des Tumors hielt für eine Dauer von bis zu 8 Monaten an. Die dann erneut aufgetretenen Rezidive konnten mit dem vorhandenen murinen Quadrom-Antikörper nicht weiter behandelt werden, da die Patienten eine HAMA-Immunantwort entwickelt hatten.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Immuntumorthherapie mit dem bispezifischen A9/HRS3-Antikörper ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung therapierefraktärer oder rezidiver Hodgkin-Lymphome. Hierfür sind weitere klinische Studien dringend erforderlich, die jedoch aufgrund der limitierten Menge des mit großem Aufwand produzierten Quadrom-Antikörpers und der Entwicklung einer HAMA-Reaktion in den damit behandelten Patienten nicht im erforderlichen Umfang durchführbar sind. Als vornehmliches Ziel muß daher die

Bereitstellung eines weniger immunogenen bispezifischen Antikörpers gelten, der sich zudem leicht in größerer Menge und homogener Form produzieren läßt.

Dies soll mit Hilfe gentechnischer Methoden erreicht werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Grundlagen zur Herstellung eines vollständig humanisierten bispezifischen A9/HRS3-Antikörpers mit in *E. coli* produzierten rekombinanten F(ab)₂-Fragmenten zu schaffen. Ausgangspunkt waren die Plasmide pASK102-A9 und pASK102-HRS3c (Gresch, 1997; Schäfer, 1998), auf denen die variablen Domänen der monoklonalen Antikörper A9 (Hombach *et al.*, 1993) und HRS3 (Da Costa *et al.*, 1992) in Form der Fab-Fragmente mit humanen konstanten Domänen kloniert vorlagen.

Zunächst sollte ein Verfahren zur effizienten Kopplung der beiden in *E. coli* separat produzierten Proteine zum bispezifischen F(ab)₂-Fragment entwickelt werden. Des weiteren sollten die variablen Domänen des HRS3-Antikörpers bzw. Fab-Fragments mittels CDR-*Grafting* humanisiert werden. Für die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der rekombinanten Fab-Fragmente war zudem die Produktion funktioneller Fragmente der Antigene CD16 und CD30 erforderlich.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

E. coli K12-Stämme

CJ236i	<i>dut, ung, thi, relA1</i> [F': <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)</i>] (Geisselsoder <i>et al.</i> , 1987), von A. Skerra, TU München
JM83	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), von A. Skerra, TU München
TG1-F ⁻	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB)</i> von A. Skerra, TU München
W3110	F ⁻ , λ ⁻ (Bachmann, 1972), von A. Skerra, TU München
JM83/F' (tet)	<i>ara, Δ(lac-proAB), rpsL (= strA), φ80, lacZΔM15</i> (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), [F': <i>proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)</i>] (Bullock <i>et al.</i> , 1987), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

Bakteriophagen

VCS-M13	Helferphage, Stratagene GmbH, Heidelberg
---------	------------------------------------------

Plasmide

pASK75	(Skerra, 1994b), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK88-IN1	(Bandtlow <i>et al.</i> , 1996), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK88-D1.3	(Skerra, 1994), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK102-A9	(Gresch, 1997), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK102-HRS3c	(Schäfer, 1998), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK106-IN1	(Fiedler <i>et al.</i> , 2002), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK107-IN1	aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK109-IN1	aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München
pASK111	(Vogt & Skerra, 2001), aus der Abteilung von Prof. A. Skerra, TU München

- pVL1392-CD30VL von Dr. Christoph Renner, Universitätsklinikum des Saarlandes,
Bad Homburg
- pCRII-CD16-2 von Dr. Christoph Renner, Universitätsklinikum des Saarlandes,
Bad Homburg

Übersicht: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide:

- pASK75 *tet^{p/o}*; ompA-PL-strep; *bla/tetR* als Transkriptionsfusion
- pASK88 wie pASK75; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-his₆, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK102 wie pASK75; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-strepIIC, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK106 wie pASK75; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-his₆, phoA-V_K-C_{huK}-ABD
- pASK107 wie pASK75; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-strepII, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK109 wie pASK75; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}ΔC-strepII, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK111 *tet^{p/o}*; ompA-PL-strep; *cam/tetR* als Transkriptionsfusion
- pASK111-skp wie pASK111; mit skp nach PL-Strep (dicistronisches Operon)
- pASK116 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-his₆, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK118 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-his₆, phoA-V_K-C_{huλ}
- pASK119 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}ΔC-strepII, phoA-V_K-C_{huK}+C
- pASK120 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}ΔC-strepII, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK121 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}ΔC-his₆, phoA-V_K-C_{huK}+C
- pASK122 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}ΔC-his₆, phoA-V_K-C_{huK}
- pASK124 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-strepII, phoA-V_K-C_{huK}-PPC
- pASK125 wie pASK111; mit ompA-V_H-C_{huH}1_{γ1}-strepII, phoA-V_K-C_{huK}

2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

Die Primer für die Sequenzierung standen teilweise im Labor von Prof. Skerra zur Verfügung oder wurden von der Firma NAPS GmbH, Göttingen synthetisiert

- D12 5'-AAC TGC TCA TCA GAT GGC-3'
- F55: 5'-CAC TGG CAC TCT TAC CG-3'
- F83 5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'
- MFC_K 5'-CTT CTA TCC CAG AGA GGC-3'

PR1 5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'

PR3 5'-TGG GTG AGC TCG ATG TC-3'

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

Die Oligodesoxynukleotide Skp-1 und Skp-2 wurden von NAPS GmbH bezogen und mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4.3 und 2.2.4.4) gereinigt. Alle anderen Oligodesoxynukleotide wurden von der INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm in HPLC-gereinigter Form bezogen.

CD16Forw 5'-GCA TGC CGG CCG AAG ATC TCC CAA AGG CTG-3'

CD16Back 5'-GCT AGA CAC ATT TTT ACT CCC AAC AAG-3'

CD16ForwII 5'-AAG TCC CGG CCG AAT GGC TGT TGC TCC AGG CC-3'

CD16BackII 5'-GCT ACC TTG AGT GAT GGT GAT GTT CAC-3'

CD30Forw 5'-GCA CCC GGT CTC CGG CCG AAG CTG CTT CTA AAC TGA
CG-3'

CD30ForwII 5'-TGG GAA GGT CTC GGG CCG ATC CAG GTC TGT CCC CAA
CA-3'

CD30BackI 5'-GCT CTG AGT GGG GCT GGT-3'

CD30BackII 5'-GCT GAG AGC GAC GGG AGC GCT-3'

MS-1 5'-AGG TCA AGC TTA TTA GCA ACA CTC TCC ACG GTT GAA GC
CTT T -3'

MS-2 5'-CTG CGG GTG AGA CCA AGC AGA AGA TTT GGG CTC AAC
TTT-3'

MS-3 5'-ATG GTG ATG GTG GTG ATG AGA TTT AGG CTC AAC TTT CTT
GTC G-3'

HRS-V_HX 5'-GAA GTT CAA CTG CAG GAA TCC GGT GGT GGT CTG GTT
CAG CCA GGT GGT TCC CTG-3'

HRS-V_HY 5'-GGA GGA AAC GGT AAC CAG CGT GCC CTG ACC CCA GTA
AGC GAA CCA GGT GTA TTC G-3'

HRS-V_HYII 5'-GGA AAC GGT GAC CAG CGT GCC CTG ACC CCA GTA AGC
G-3'

HRS-V_HA 5'-CAG CCA GGT GGT TCC CTG CGT CTC TCG TGC GCT GCT TCC
GGT TTC ACC TTC ACC ACC TAC ACC ATC CAC TGG GTA CGT
CAG GCC CCG-3'

HRS-V _H B	5'-GAA GTT CTG GTT GTA GTC GGA GTA TCC GGA CGA TGG GTT GAT GTA GGA AAC CCA TTC CAG ACC TTT ACC CGG GGC CTG ACG TAC CCA-3'
HRS-V _H C	5'-CCG ACT ACA ACC AGA ACT TCA AAG GTC GTT TCA CCA TCT CAG CTG ACA AAT CCA AAA ACA CTG CTT ACC TCC AGA TGA ATT CCC TCC GTG-3'
HRS-V _H D	5'-AAG CGA ACC AGG TGT ATT CGT AGT TAC CGT AGT CGG CAC GAC GCG CGC AAT AGT AAA CAG CAG TGT CTT CAG CAC GGA GGG AAT TCA TCT G-3'
HRS-V _L X	5'-ACA TCG AGC TCA CCC AAT CCC CGT CCT CCC TGT CCG CTT CCG TTG GCG ACC GTG TT-3'
HRS-V _L Y	5'-TTG ATC TCG AGT TTG GTG CCC TGA CCG AAG GTT AAC GGG TAG GTG TGG TAC-3'
HRS-V _L A	5'-CCG TTG GCG ACC GTG TTA CCA TCA CCT GCA AGG CCT CCC AGA ATG TAG GCA CTA ACG TAG CTT GGT ACC AGC AG-3'
HRS-V _L B	5'-AAC ACC GGA GTA TCG ATA GGA AGC GGA ATA GAT CAG AAC TTT CGG AGC TTT ACC CGG TTT CTG CTG GTA CCA AGC TAC G-3'
HRS-V _L C	5'-TCG ATA CTC CGG TGT TCC ATC CCG TTT CTC TGG ATC CGG TTC CGG CAC CGA CTT CAC CCT GAC GAT CTC CTC CC-3'
HRS-V _L D	5'-ACG GGT AGG TGT GGT ACT GCT GGC AGT AGT AGG TAG CGA AGT CTT CCG GCT GGA GGG AGG AGA TCG TCA GGG-3'
Skp-1	5'-CGA AAA AGC TTG GTA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GG -3'
Skp-2	5'-CTT ATT TAA CCT GTT TCA GTA CGT CG-3'

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

Alkalische Phosphatase aus <i>Arctic Shrimp</i>	USB, Cleveland, Ohio, USA
Anti-Digoxigenin-Fab-Alkalische Phosphatase Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Human-C _κ -Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Anti-Human-C _κ -IgG (aus Kaninchen)	Dako GmbH, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG (aus Schweinen)	Dako GmbH, Hamburg
Alkalische Phosphatase-Konjugat	
Aprotinin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Benzonase [®] , Reinheitsgrad I, 25 U/μl	E. Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
DNase I aus Rinderpankreas, 2000 U/mg, Reinheitsgrad I	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Humanes Serum Albumin (HSA), Frak. V	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (5 u/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Lysozym aus Hühnereiweiß, 95 % Protein	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ni-NTA-Alkalische Phosphatase- Konjugat	Qiagen GmbH, Hilden
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase (2,5 u/μl)	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Proteinase K	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach; MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Promega Deutschland GmbH, Mannheim
RNase A aus Rinderpankreas	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptavidin-Alkalische Phosphatase- Konjugat	Amersham Buchler GmbH & Co. KG Braunschweig
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
Transferrin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
T4 DNA-Ligase (3 Weiss units/μl)	Promega Deutschland GmbH, Mannheim
T4 DNA-Polymerase (3 units/μl)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

T4 Polynukleotidkinase (10 units/ μ l) New England Biolabs GmbH, Schwalbach

2.1.4 Chemikalien

Aceton Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Acrylamid-Fertiglösungen für Harnstoff-
Gele (Sequagel Concentrate & Diluent) National Diagnostics, Atlanta, USA

Acrylamid-Stammlösung 30 %ig mit
0,8 % Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 30) Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Adenosin-5'-triphosphat, Na₂-Salz (ATP) Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Agarose, electrophoresis grade GIBCO BRL, Life Technologies GmbH,
Eggenstein;
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Agarose (low melting point),
electrophoresis grade GIBCO BRL, Life Technologies GmbH,
Eggenstein;
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Ammoniumacetat E. Merck KGaA, Darmstadt;
AppliChem, Darmstadt

Ammoniumperoxodisulfat (APS) E. Merck KGaA, Darmstadt

Ampicillin, Natrium-Salz (Amp) Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc) Acros Organics, Geel, Belgien

Antifoam A-Stammlösung Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Bacto Agar Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Bacto Tryptone Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Bacto Yeast Extract Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Betain-Monohydrat Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

Blue Dextran Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Borsäure E. Merck KGaA, Darmstadt

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-
4-Toluidinsalz (BCIP) Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), > 99 %, DNase-, RNase-frei	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
[α - ³⁵ S]dATP, 37-55 TBq/mmol	NEN Life Science Products, Belgien
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Dichlordimethylsilan (2 % v/v in 1,1,1-Trichlorethan)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxy- succinimidester (NHS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimid (EDC)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreit (DTT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) (DTNB; Ellman's Reagenz)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Ethylendinitrilo-tetraessigsäure-Na ₂ -2H ₂ O (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe; AppliChem, Darmstadt
Essigsäure, 99,9 %	Riedel-de-Haën AG, Seelze
Ethanol p.a., 99,9 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol technisch	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanolamin	E. Merck KGaA, Darmstadt

Ethidiumbromid (1 % w/v in Wasser)	E. Merck KGaA, Darmstadt; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
D(+)-Glucose, Monohydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	E. Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Pufferan® für die Gewebebezug (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Imidazol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Isoamylalkohol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
γ -(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan	E. Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mineralöl (Heavy White Oil) für die PCR	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Amresco, Solon, Ohio, USA
P-20 <i>Surfactant</i>	BIACORE, Uppsala, Schweden
Phenol, $\geq 99\%$, redestilliert	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
o-Phenylendimaleimid	Acros Organics, Geel, Belgien
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Sauerstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Stickstoffgas, Reinheitsgrad IV	Linde, Weiterstadt
Tetracyclin, Hydrochlorid (Tet)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Thiaminhydrochlorid	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Triethanolamin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Ultra-Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylencyanol FF	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
Zinksulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

2.1.5 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

λ /BstEII-Verdau

New England Biolabs GmbH, Schwalbach

φX174 RF/ <i>Hae</i> III-Verdau	GIBCO BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein
100 bp DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Protein-Größenstandards:	
SDS-PAGE Standard, <i>Low Range</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Prestained</i> SDS-PAGE Standard, <i>Broad Range</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München; New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Kits zur DNA-Isolierung:	
JETsorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Plasmid Midiprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Kits zur DNA-Sequenzierung:	
DNA-Sequencing Kit, Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
T7-Sequencing™ Kit	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

2.1.6 Geräte

ABI-Prism™ 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt
Autoklaven:	
Varioklav® Typ 500	H & P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Sanoclav Typ LaS-201	Wolf, Geislingen
BIACORE-X System	BIACORE, Uppsala, Schweden
Bio-Mag 10 Magnetrührer	BCC Spezialgeräte, Göttingen

Brutschränke:

B 5060 EK	Heraeus Christ GmbH, Osterode
BM800	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Pelion	Bayer, Frankfurt/Main

Drehtisch zum Ausplattieren

Gesellschaft für Laborbedarf mbH,
Würzburg

Durchflußdetektoren:

UV/Vis Filter Photometer	Knauer, Berlin
Variable Wavelength Monitor	Knauer, Berlin
2138 Uvicord S	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
2138 Uvicord SII	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
UV/Vis UV-1 Photometer	Rainin, Woburn, MA, USA

Elektroblot-Apparatur

Eigenbau

Elektrophoresekammern

Eigenbau;
Biometra, Göttingen

Fermenter:

5 u. 10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder	Schütt Labortechnik, Göttingen
C Flow Durchfluß-Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pH Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C pO ₂ Meß- und Regelmodul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
C Pump D Schlauchpumpen-Modul	BCC Spezialgeräte, Göttingen
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Meßtechnik, Steinbach
O ₂ -Sensor (12/320 A-Type)	Mettler-Toledo, Steinbach

Fraktionssammler:

Redi Frac	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Multirac 2111	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Superrac 2211	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Ultrorac 7000	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geltrockner:	
2003 Slab Gel Dryer	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Geltrockner D62	Biometra, Göttingen
Glasspritze 50 µl	Hamilton Company, Reno, USA
Heizrührer:	
IKA-Combimag	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RCT	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
IKAMAG®RET	Janke & Kunkel KG, Staufen im Breisgau
Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
HPLC:	
Dynamax® SD-300 (Pumpe)	Rainin, Woburn, MA, USA
Dynamax® UV-1 (Detektor)	Rainin, Woburn, MA, USA
Gradientenmischer	Rainin, Woburn, MA, USA
Metallblockthermostate:	
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Netzgeräte:	
TN 300-120	Heinzinger, West Germany
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Power Pack P30	Biometra, Göttingen
LKB 2197 Power supply	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
PCR-Gerät UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Peristaltische Pumpen:	
Miniplus 2	Gilson, Villiers le Bel, Frankreich
P1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
pH-Meter:	
E512	Metrohm, Herisau
pH 526 und pH531	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten

	GmbH, Weilheim
pH27	Knick, Berlin
Pipettierhilfen:	
Pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
accu-jet®	Brand GmbH & Co., Wertheim
Pipetten:	
Gilson P10, P20, P100, P200	Abimed Analysen-Technik GmbH,
P1000	Langenfeld
Multipette 4780	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Polaroid-Kamera MP4	Polaroid Corporation, Cambridge, MA, USA
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen
Signalschreiber:	
REC 112	Amersham Pharmacia Biotech Europe
	GmbH, Freiburg
SE 120	ABB Goerz AG, Wien, Österreich
2210	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Knauer	Knauer, Berlin
Schüttelapparate:	
Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
Typ 3012	Gesellschaft für Labortechnik mbH,
	Burgwedel
Typ 3017	Gesellschaft für Labortechnik mbH,
	Burgwedel
Schüttelinkubatoren:	
Modell G25	New Brunswick Scientific Co., Inc.,
	Edison, New Jersey, USA
Modell TR-125/ITE-K	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
CM5-Sensorchips	BIACORE, Uppsala, Schweden
Spektrophotometer:	

ELISA-Photometer SpectraMax 250	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Speed-Vac-Konzentrator	UniEquip, Martinsried
Univapo UVC 150H	
UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpen:	
Drehschieberpumpe RD4	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Drehschieberpumpe RD15	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Membranpumpe MZ2C	Vacuubrand GmbH & Co, Wertheim
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen:	
Micro m3p	Sartorius GmbH, Göttingen
PAG Oerlikon PJ Precisa junior 2000C	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
PAG Oerlikon Precisa 125 A	W. Wolfinger GmbH, Straubenhardt
R160P-*D1	Sartorius GmbH, Göttingen
U5000D	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbäder:	
Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo PC/8A	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Julabo UC/5B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Thermomix 1460	Braun Melsungen AG, Melsungen
Zentrifugen:	
Biofuge A	Heraeus Christ GmbH, Osterode
J-21C und J2-21 mit Rotoren JA-10 und JA-20	Beckman Instruments, München
Labofuge 6000	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Sigma 4K10	Sigma GmbH, Osterode

Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000A/HBB-6	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RC 5B und RC 5C Plus mit Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Sorvall RMC 14	Sorvall Instruments, Bad Nauheim
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.7 Sonstiges Material

Diafilm	Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA
Dialyseschläuche:	
Spectra/Por [®] , MWCO: 6-8 kDa	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Typ 27, MWCO: 12-16 kDa	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Dispenser-Tips 2,5 und 5 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Einweg-Spritzen 1, 5, 10, 20, 60 ml	Braun Melsungen AG, Melsungen Dispomed Witt oHG, Gelnhausen Henke-Sass Wolf, Tuttlingen
Reaktionsgefäße:	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	
SDS-PAGE:	
Apparaturen, Glasplatten, Spacer, Dichtungen, Kämme	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg; Biometra, Göttingen
Größenausschlußchromatographie-Säulen:	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	

Superdex 200 HR 10/30	
Superdex 75 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>	
Superdex 200 HiLoad 16/60 <i>prep grade</i>	
Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Konzentratoren:	
Makrosep™ 10K	Pall GmbH, Dreieich
Mikrosep™ 10K	Pall GmbH, Dreieich
Vivaspin 4, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 10 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 4, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Vivaspin 15, MWCO: 30 kDa	Diagonal GmbH & Co. KG
Kunststoffröhrchen:	
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Cellstar® PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Linbro-Gewebekulturplatte	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	
Immobilon™-P (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
GVWP (0,22 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Nitrocellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikrotiter-Platten:	
Falcon Micro Test III Flexible Assay-Plates	Becton Dickinson Labware, Oxnard, CA, USA
PD-10 Gelfiltrationssäulen	Amersham Pharmacia Biotech Europe

	GmbH, Freiburg
Petrischalen aus Polystyrol	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten-Spitzen:	
blau (200-1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
gelb (5-200 µl)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
kristallklar (0,5-10 µl)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polaroidfilm 667	Polaroid Deutschland, Offenbach
Röntgenfilm X-OMAT DS	Eastman Kodak Company, Rochester, N.Y., USA
Schwan-Stabilo [®] -Klarsichtfolie aus PP	Müller & Nemecek GmbH, Frankfurt/Main
Säulenmaterialien:	
Chelating Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
POROS MC/M	PerSeptive Biosystems GmbH, Wiesbaden
Sterilfilter:	
Filtropur (0,45 und 0,22 µm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Millex [®] HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Eschborn
Membransterilfilter (0,22 µm; Ø 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatman-Filterpapier 3MM	Bender & Hobein AG, München
Zentrifugenbecher für Beckman-Rotoren	Nalgene Company, New York, USA
JA-10 und JA-20, sowie für Sorvall- Rotoren SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	

2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden entweder im Autoklav oder durch Filtration sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, die mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen unter Verwendung von Millipore[®] Wasser hergestellt. Kulturplatten wurden bei 4 °C und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigmedien erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.

Antibiotika-Stammlösungen:

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei -20 °C gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µM).

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)
Kanamycin (Kan)	35 mg/ml in Wasser (1:500 zum Medium)
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml in 70 % v/v Ethanol (1:1000 zum Medium)
Lagerung bei -20 °C	

Induktor-Stammlösungen:

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium) oder 5 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium)
Lagerung bei -20 °C	

LB-Medium:

Bacto Tryptone	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklav sterilisiert.

Lösungen für die Fermentation:A) Mineralsalzlösung:

31 mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	5,51 g/l
19 mM KH ₂ PO ₄	2,58 g/l
25 mM NH ₄ Cl	1,33 g/l
5 mM Na ₃ -Citrat • 2 H ₂ O	0,47 g/l

Die Mineralsalzlösung hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 6,9.

B) Glucoselösungen:

20 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)

50 % (w/v) Glucose (separat autoklavieren)

C) MgSO₄-Stammlösung:

1 M MgSO₄ (separat autoklavieren)

D) Thiamin-Stammlösung:

10,0 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid (sterilfiltriert)

E) FeCl₃-Stammlösung:

35,0 g/l FeCl₃ • 6 H₂O (mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)

F) Zn-Acetat-Stammlösung:

8,0 g/l Zn-Acetat • 2 H₂O (sterilfiltriert)

G) Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert):

MnCl₂ • 4 H₂O 3,0 g/l

CuCl₂ • 6 H₂O 0,3 g/l

H₃BO₃ 0,6 g/l

CoCl₂ • 6 H₂O 0,5 g/l

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ • 4 H₂O 1,2 g/l

EDTA 4 mM

H) Weitere Lösungen für die Fermentation:

12,5 % (w/v) NH₃ zur pH-Regulierung

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:TAE-Puffer:

Tris 40 mM

Essigsäure 20 mM

EDTA 1 mM

TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

10x Auftragspuffer für Agarosegele

Bromphenolblau	1 mg/ml
Xylencyanol	1 mg/ml
Glycerin	50 % v/v

Puffer für die SDS-PAGE:1x SDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson:

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l

pH 8,8 stellt sich ein.

4x Lower-Tris:

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS	4 g/l

4x Upper-Tris:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	4 g/l

5x Auftragspuffer:

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 % w/v
Glycerin	25 % v/v

Bromphenolblau	0,25 mg/ml
2-Mercaptoethanol	12,5 % v/v (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung:

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v
Coomassie Brilliantblau R-250	0,25 % w/v

Entfärbelösung:

wie Färbelösung, aber ohne Coomassie Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

Essigsäure	7 % v/v
Glycerin	2 % v/v
Wasser	93 % v/v

Lösungen für die Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA:

Chloroform/Isoamylalkohol:

Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung im Verhältnis 24:1

Phenol:

Kristallines Phenol $\geq 99\%$ (unter Schutzgas destilliert) wird bei 65 °C im Wasserbad geschmolzen, mit $\frac{1}{2}$ Volumen Wasser gemischt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Phenol/Chloroform:

Mit Wasser gesättigtes Phenol (s. o.) wird im Verhältnis 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol gemischt und bei 4 °C aufbewahrt.

3 M Na-Acetat-Lösung pH 4.8:

3 M Na-Acetat wird mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt

Sonstige Puffer:AP-Puffer:

Tris 100 mM

NaCl 100 mM

MgCl₂ 5 mM

pH 8,8 mit HCl einstellen

10 x Formamid-Auftragspuffer:

Formamid 98 % v/v

0,5 M EDTA 2 % v/v

Bromphenolblau 2 % w/v

Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC-Puffer):

Na₂HPO₄ 50 mM

Betain 0.5 M

pH 7,5 mit 5 M NaOH einstellen

PBS:

KH₂PO₄ 4 mM

Na₂HPO₄ 16 mM

NaCl 115 mM

pH 7,4 stellt sich ein

PBS/T:

PBS mit 0,1 % v/v Tween 20

PBS/T 0,5:

PBS mit 0,5 % v/v Tween 20

Periplasma-Aufschlußpuffer:

Saccharose	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer):

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	50 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

TE-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und maximal 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Verwendete Volumina waren 4 ml im 13 ml Kulturröhrchen sowie 50 ml und 2.000 ml im 100 ml- bzw. 5.000 ml-Erlenmeyerkolben mit Verschluss aus Aluminiumfolie. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 l wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀)

mit Hilfe eines Ultrospec 2000- oder Ultrospec 3000-Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Meßwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von mit Plasmiden transformierten *E. coli*-Stämmen wurde 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 1 ml hitzesterilisiertem 87 % v/v Glycerin gemischt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, müssen *E. coli*-Zellen zuvor in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde die klassische CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972) eingesetzt, wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca. 10⁵ bis 10⁶ Transformanten pro µg Plasmid-DNA erhalten wurden.

50 ml LB-Medium ohne Antibiotikum wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung kompetenter Zellen des Stammes CJ236i (siehe Abschnitt 2.2.3.3) wurde dem LB-Medium das Antibiotikum Tetracyclin im Verhältnis 1:1000 zugesetzt. Nach Erreichen einer optischen Dichte von OD₅₅₀ = 0,5 wurde die Kultur in ein 50 ml-Sarstedt-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 50 mM CaCl₂, 15 % v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 µl entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Dampfautoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4 °C abgekühlt.

Zur Transformation wurden 200 µl Zellsuspension mit typischerweise 1 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligierungsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf 37 °C erwärmt, anschließend in 2 ml LB-Medium überführt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA

Für die Isolierung von chromosomaler DNA aus *E. coli* W3110 (Schmidt, 1994) wurden 1,5 ml einer stationären Übernachtskultur sedimentiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 2 min,

14.000 rpm). Das Medium wurde sorgfältig entfernt, die Zellen in 567 μ l TE-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 30 μ l 10 % (w/v) SDS, 2 μ l DNase-freier RNase (10 mg/ml) und 3 μ l Proteinase K (20 μ g/ml) durch Invertieren gemischt. Die Mischung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, und dann zunächst mit 100 μ l 5 M NaCl und anschließend mit 80 μ l 0,7 M NaCl, 10 % (w/v) CTAB versetzt. Nach jeder Zugabe wurde gemischt (Vortex) und der Ansatz dann für 10 min bei 65 °C inkubiert.

Zur Abtrennung der Proteine wurde zunächst mit 1 ml Phenol/Chloroform und danach mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol unter kräftigem Mischen extrahiert. Die obere, wäßrige Phase, die die chromosomale DNA enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung mit dem 0,6-fachen Volumen Isopropanol (p. a.) versetzt. Nach Inkubation für 90 min bei -20 °C wurde zur Präzipitation der chromosomalen DNA zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 10 min, 14.000 rpm). Das Präzipitat wurde mit 500 μ l eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in der Speed-Vac getrocknet. Die DNA wurde in 100 μ l TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firmen Qiagen oder Genomed verwendet. Diese beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birboim & Doly, 1979), gefolgt von der selektiven Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA.

Plasmid-Präparation aus 4 ml-Kulturen (analytischer Maßstab)

Zur Analyse einzelner Transformanden, die bei der Neukonstruktion von Plasmiden oder der ortsgerichteten Mutagenese erhalten wurden, wurde die Plasmid-DNA aus stationären 4 ml-Übernachtskulturen unter Verwendung des Plasmid-Isolierungs-Kits der Firma Genomed (Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit) nach Herstellerangaben präpariert und für Restriktions- und Sequenzanalysen wie auch zur Transformation und zur Neukonstruktion von Plasmiden eingesetzt. Bei der Präparation wurden typischerweise 10 bis 20 μ g DNA in 75 μ l TE-Puffer erhalten. Die Plasmid-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

Plasmid-Präparation aus 50 ml-Kulturen (präparativer Maßstab)

Um größere DNA-Mengen für den präparativen Restriktionsverdau zu gewinnen, wurde die Plasmid-DNA im 50 ml-Maßstab isoliert. Ausgehend von einer stationären 50 ml-Kultur wurde dazu die DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits gemäß Herstellerangaben präpariert. Die DNA-Ausbeute betrug in der Regel ca. 100 μ g in 100 μ l TE-Puffer. Bei der Plasmid-Isolierung aus dem *E. coli*-Stamm JM83 wurde zur vollständigen Entfernung von Exonukleasen zusätzlich eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Ethanol-Fällung

durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.5.7). Bis zur Verwendung wurde die DNA bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3.3 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Die für die Mutagenese nach Kunkel *et al.* (1987) benötigte zirkuläre, einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde ausgehend von Plasmiden, die die intergenische Region des filamentösen Phagen f1 trugen, präpariert. Durch Infektion des mit einem entsprechenden Plasmid transformierten *E. coli*-Stamms CJ236i mit dem VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen wurde die Plasmid-DNA in einzel-strängiger Form in Phagemiden verpackt. Aus den sezernierten Phagemiden konnte die ssDNA daraufhin isoliert werden (Vieira & Messing, 1987; Geisselsoder *et al.*, 1987). Die dabei als Verunreinigung mitisolierte ssDNA des Helferphagen mit einem Anteil von < 5 % störte bei der Mutagenese nicht. Der verwendete Stamm CJ236i trägt ein F'-Plasmid (Skerra, unveröffentlicht) und kann somit die für die Infektion mit filamentösen Bakteriophagen vom Typ M13 benötigten Sex-Pili ausbilden. Darüber hinaus bewirken die chromosomalen Mutationen *dut*⁻ und *ung*⁻ den partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in die DNA.

4 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin bzw. Chloramphenicol) wurden mit einer Kolonie des *E. coli*-Stamms CJ236i, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war, angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Mit dieser stationären Kultur wurden 20 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₅₅₀ = 0,26 (ca. 1,6•10⁸ Zellen/ml) geschüttelt. Dieser Kultur wurde 1 ml entnommen, mit VCS-M13 Helferphage entsprechend einer *multiplicity of infection* (moi) von 10 infiziert und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 ml LB/Kan-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (JA-20, 10000 rpm, 12100 g, 4 °C, 10 min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 10 µl einer 10 mg/ml RNase A-Lösung versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Phagemidpartikel durch Zugabe von 5 ml einer frisch angesetzten Lösung von 3,5 M Ammoniumacetat, 20 % PEG 8000 für 30 min auf Eis gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (JA-20, 12200 rpm, 18000 g, 4 °C, 15 min), das Präzipitat in 200 µl Hochsalz-Puffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 2 min) entfernt.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde der Überstand zweimal mit 200 µl Phenol und je einmal mit 200 µl Phenol/Chloroform und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert

(siehe Abschnitt 2.2.5.7). Um die bei der Extraktion auftretenden Verluste an DNA gering zu halten, wurden die organischen Phasen in der gleichen Reihenfolge mit 100 μl TE-Puffer rückextrahiert. Die beiden wässrigen Phasen wurden vereinigt (ca. 300 μl), und die ssDNA wurde durch Zugabe von 30 μl (1/10 Volumen) 7,8 M Ammoniumacetat und 750 μl (2,5 Volumina) Ethanol für mindestens 1 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Das nach der Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 500 μl 70 % v/v Ethanol gewaschen und im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet. Die ssDNA wurde in 20 μl TE-Puffer gelöst und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zur Abschätzung der isolierten DNA-Menge sowie zur Kontrolle des Reinheitsgrades wurde 1 μl einer 1:10 verdünnten Lösung auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Die erhaltenen Ausbeuten lagen je nach Plasmid zwischen 10 und 100 μg ssDNA.

2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von der Größe wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt. Zur Auftrennung von Oligodesoxynukleotiden zum Zweck der Reinigung sowie zur Auftrennung von DNA-Fragmenten bei der DNA-Sequenzierung wurde dagegen die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet.

2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 0,8 % oder 1 % w/v Suspension von Agarose in TBE-Puffer in der Siedehitze homogenisiert, mit 1/10.000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das nach Erstarren der Lösung erhaltene Gel war typischerweise 10,5 cm lang und 7,5 cm breit, bei einer Dicke von ca. 0,5 cm. Anschließend wurde das Gel in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und pro Tasche mit 10 μl DNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug 60 min bei einer Spannung von 90 V. Anschließend wurden die DNA-Fragmente anhand der Interkalation des Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Rotfilters photographiert.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden zur Herstellung des Gels 0,6 g "Low

Melting Point-Agarose und 60 ml TAE-Puffer verwendet. Nach dem Erhitzen der Suspension und der Zugabe von 1/10.000 Volumen 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Das Gel wurde mit 2 cm breiten Taschen versehen, die mit der gesamten Reaktionsmischung aus DNA und Restriktionsenzym bzw. dem gesamten PCR-Ansatz nach Zugabe von 1/10 Volumen Agarose-Auftragspuffer gefüllt wurden. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 70 V für ca. 90 min durchgeführt. Das Sichtbarmachen der aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht erfolgte zur Vermeidung von Strahlenschäden bei 312 nm mit verminderter Intensität. Das Gelstück mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Abtrennung der DNA von der Agarose wurde unter Verwendung des JETsorb Gel Extraction 150TM Kits der Firma Genomed nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Dabei wurde die DNA vorübergehend an ein Anionenaustauschermaterial gebunden, gewaschen und anschließend mit 20 µl TE-Puffer eluiert.

DNA-Konzentrationen wurden schließlich durch analytische Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung der DNA-Größenstandards λ /BstEII-Verdau oder ϕ X174 RF/HaeIII-Verdau abgeschätzt. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.4.3 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung einzelsträngiger DNA-Fragmente bei der Reinigung von Oligodesoxynukleotiden sowie der DNA-Sequenzanalyse wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Ausgehend von einer Fertiglösung mit 8,3 M Harnstoff, 25 % w/v Acrylamid-Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 (Sequagel Concentrate), einer 8,3 M Harnstoff-Fertiglösung (Sequagel Diluent) sowie 10 x TBE wurden – abhängig vom Verwendungszweck – Mischungen mit 5-16 % w/v Acrylamid und 7,5 M Harnstoff in TBE hergestellt. Durch Zugabe von 40 µl TEMED (unter schnellem Rühren) und 1 ml 10 % w/v APS zu 100 ml dieser Lösung wurde die Polymerisation gestartet. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde TBE verwendet.

Die Reinigung von Oligodesoxynukleotiden erfolgte durch vertikale Gelelektrophorese in 1,5 mm starken Gelen. Die Acrylamid-Konzentration betrug 16 % w/v. Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (20 x 40 cm) mit entsprechenden Abstandshaltern durch Klammern fixiert, die polymerisierende Gellösung in die entstandene Gelkammer gefüllt und ein Geltaschenformer mit 6 Taschen eingebracht. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Leistung von 40 W für ca. 4 h durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker das Gelende erreicht hatte.

Für die DNA-Sequenzierung wurden keilförmige Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 6 % w/v hergestellt. Dazu wurden zunächst zwei Glasplatten (20 x 60 cm) so

vorbehandelt, daß nach Beendigung der Elektrophorese das Gel nur an einer der beiden Platten haften blieb (Heinrich, 1987). Im ersten Schritt wurden beide Platten mit 5 ml Ethanol gereinigt. Diejenige Platte, an der das Gel haften bleiben sollte, wurde dann mit 5 ml Bindsilan (5 ml Ethanol, 150 µl H₂O, 17,5 µl Essigsäure, 17,5 µl γ-(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan) behandelt, während die andere Platte mit 5 ml 2 % v/v Dichlordimethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan hydrophobisiert wurde. Diese beiden Schritte wurden wiederholt und die Platten mit 0,2 mm dicken Abstandhaltern von 60 cm, 40 cm sowie 12,5 cm Länge so zusammengeklemmt, daß am oberen Ende eine Gelstärke von 0,2 mm und am unteren Ende eine Gelstärke von 0,6 mm resultierte. Nach Befüllen der Gelkammer mit der polymerisierenden Acrylamid-Lösung wurde das Gel mit Hilfe eines Geltaschenformers mit 36 Taschen versehen. Das polymerisierte Gel wurde dann einer einstündigen Vorelektrophorese bei einer konstanten Leistung von 60 W mit TBE als Laufpuffer unterzogen. Die eigentliche Elektrophorese erfolgte nach dem Auftragen der Proben unter den gleichen Bedingungen. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde die Glasplatte mit dem Gel zur Entfernung des Harnstoffs für 20 min in 10 % v/v Essigsäure geschwenkt, für 10 min in H₂O gewaschen und für 1 h bei 80 °C getrocknet. Durch Exposition eines Röntgenfilms wurde eine Autoradiographie hergestellt.

2.2.4.4 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Wie in Abschnitt 2.1.2 angegeben, wurde ein Teil der verwendeten Oligodesoxynukleotide durch präparative Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt. Die Reinigung erfolgte dabei ausgehend von dem lyophilisierten Endprodukt eines 40 nmol-Syntheseansatzes gemäß dem von Skerra (1989) beschriebenen Protokoll.

Die Hälfte des lyophilisierten Rohproduktes wurde in 20 µl H₂O gelöst, mit 20 µl Formamid-Auftragspuffer versetzt, für 5 min auf 80 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Lösung (à 20 µl) auf zwei Taschen eines 16 %igen Polyacrylamid-Harnstoffgels (siehe Abschnitt 2.2.4.3) als möglichst schmale Zone aufgetragen und die Elektrophorese bei 40 W gestartet.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen, auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und diese auf eine DC-Kieselgelplatte mit Fluoreszenzindikator (Kieselgel 60 F₂₅₄) gelegt. Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurden die Oligodesoxynukleotide als dunkle Banden vor dem fluoreszierendem Hintergrund sichtbar gemacht (UV-Shadowing). Die Hauptproduktbande wurde dann möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Zerkleinerung des Gelstücks wurde dieses in eine 1 ml-Einwegspritze überführt, deren Spitze vorher über einer Flamme zugeschmolzen und nach Erkalten mit einer Kanüle durchbohrt worden war. Unter Zugabe von insgesamt 1 ml TE-Puffer wurde das Gelstück durch die

Bohrung gepreßt und die erhaltene Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

Die Gelmasse wurde mit Hilfe einer Spin-X-Filtereinheit abgetrennt (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, RT, 5 min) und das Filtrat (ca. 0,9 ml) dreimal mit je 1 ml 1-Butanol extrahiert, wobei die wässrige Phase auf ca. 400 µl eingeengt wurde. Nach Zugabe von 40 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8, 4 µl 1 M MgCl₂ und 1 ml Ethanol (p. a.) wurde die DNA bei -20 °C für mindestens 1 h gefällt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 30 min), das Präzipitat mit 500 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen, im Vakuum für 2 min getrocknet und schließlich in 50 µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Zur Bestimmung der molaren Konzentration des Oligodesoxynukleotids wurden 2 µl der Lösung mit 398 µl TE-Puffer verdünnt (1:200) und die Absorption bei 260 nm gegen TE-Puffer gemessen. Der Extinktionskoeffizient wurde dabei aus der Summe der Absorptionsbeiträge der einzelnen Basen abgeschätzt (A: 15,0 mM⁻¹cm⁻¹; C: 7,4 mM⁻¹cm⁻¹; G: 11,8 mM⁻¹cm⁻¹; T: 8,8 mM⁻¹cm⁻¹).

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Durch 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden oder auch von ungeschnittenen PCR-Fragmenten wurde deren kovalente Verknüpfung durch T4 DNA-Ligase mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls ermöglicht. Dies war z. B. für die Zirkularisierung des durch DNA-Polymerase *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese notwendig (siehe Abschnitt 2.2.5.2). Die Phosphorylierung geschah mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase (PNK).

Oligodesoxynukleotide bzw. PCR-Fragmente (200 pmol) wurden hierzu mit 3 µl 10x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (700 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol, DTT), 1,2 µl 10 mM ATP und 0,5 µl (5 u) T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert, um die Polynukleotidkinase zu inaktivieren. Der Anteil des phosphorylierten Oligonukleotides bzw. PCR-Fragments, der nicht sofort für die ortsgerichtete Mutagenese bzw. Ligierung eingesetzt wurde, wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.5.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde die Vorschrift von Geisselsoder *et al.* (1987) entsprechend der Methode von Kunkel *et al.* (1987) angewendet. Dabei wird zunächst ein Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschten Substitutionen trägt, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmids unter Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen hybridisiert. In der sich anschließenden Polymerase-Reaktion dient das

Oligodesoxynukleotid als *Primer* für die Synthese des zweiten DNA-Strangs, der mit Hilfe einer DNA-Ligase schließlich kovalent zirkularisiert wird.

Aufgrund der Herkunft des parentalen Stranges aus dem *E. coli*-Stamm CJ236i (siehe Abschnitt 2.2.3.3) und dem damit verbundenen teilweisen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines *ung*⁺-Stammes (z. B. JM83, XL1-Blue) mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang kodierte Mutation selektiert.

Die Hybridisierung erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂), ca. 200 ng einzelsträngiger DNA (Abschnitt 2.2.3.3) und 3,3 pmol des phosphorylierten Oligodesoxynukleotids (Abschnitt 2.2.5.1). Der Ansatz wurde für 5 min auf 80 °C erhitzt, im Verlauf von mindestens 2 h langsam auf ca. 20 °C abgekühlt und schließlich auf Eis gestellt. Zur Neusynthese des zweiten DNA-Strangs wurde die Lösung zunächst auf Eis mit 1 µl 10x Synthesepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 10 mM ATP, je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 3 u T4 DNA-Polymerase (New England Biolabs) sowie 3 u T4 DNA-Ligase (Promega) versetzt. Erst wurde für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37 °C inkubiert. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend mit 45 µl TE-Puffer verdünnt, 5 µl davon für die Transformation von *E. coli* JM83 verwendet und die restlichen 45 µl der Lösung bei -20 °C gelagert. Die verbliebenen 8 µl der unverdünnten Lösung wurden zur Kontrolle der *in vitro*-Reaktion auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

2.2.5.3 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt.

Bei analytischen Verdaus wurden typischerweise ca. 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 u der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µl für 1 h inkubiert.

Präparative Spaltungen wurden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 1-2 h durchgeführt. Hierfür wurden 2-10 µg Plasmid-DNA und 20 u eines jeden Restriktionsenzym eingesetzt.

Isolierte PCR-Fragmente wurden ebenso in einem 50 µl Ansatz mit 20 u des jeweiligen Restriktionsenzym gespalten. Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese oder durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation isoliert.

2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung sowie zur Synthese von Genen

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; Saiki *et al.*, 1988) wurde in der vorliegenden Arbeit zu verschiedenen Zwecken verwendet: zur selektiven Amplifizierung von Genen, zur Synthese künstlicher Gene (*Assembly PCR*), zur Generierung murin/humaner Hybridgene mittels *DNA-Shuffling* (sexuelle PCR) und zur Einführung von Zufallsmutationen (*Error Prone PCR*).

Amplifizierung eines Gens (Standard-PCR-Ansatz)

Die in der PCR paarweise eingesetzten Oligodesoxynukleotide (*Primer*) flankierten jeweils den zu amplifizierenden Bereich und besaßen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz.

Wurde für die PCR die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) eingesetzt, die sich aufgrund ihrer *Proofreading*-Aktivität durch eine niedrige Fehlerrate auszeichnet, wurden die eingesetzten *Primer* vor der 3' zu 5' Exonukleaseaktivität dieses Enzyms geschützt. In diesem Fall wurden modifizierte *Primer* verwendet, die an ihrem 3'-Terminus eine einzelne Phosphorthioatbindung besaßen (Skerra, 1992).

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 0,01-1 µg Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µl 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 3 µl MgCl₂ (25 mM) sowie 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Wurde die *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, wurden 5 µl des mitgelieferten 10x *Pfu*-Puffers (200 mM Tris/HCl, pH 8,8, 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 mg/ml BSA) verwendet, in dem bereits MgCl₂ enthalten war. Nach Auffüllen mit H₂O auf 50 µl wurde der Reaktionsansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet, im Thermocycler für 2 min auf 94 °C erhitzt und 2,5 u der entsprechenden Polymerase zugegeben (*Hot Start*). Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der *Primer* an die DNA-Matrix bei 55 bis 60 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1,5 min (Polymerase-Reaktion). Der Zyklus wurde in der Regel 25mal durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert. Zum Vergleich wurde ein Reaktionsansatz ohne Matrizen-DNA mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen nachzuweisen.

Gensynthese mittels Assembly PCR

Eine *Assembly PCR* wurde nach einem Protokoll von Essen & Skerra (1994) in einem Reaktionsansatz von 50 μ l mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase und unter den Pufferbedingungen der Standard-PCR durchgeführt. Dabei wurden neben zwei flankierenden *Primern* vier Oligodesoxynukleotide eingesetzt, die in ihrer Basenpaarabfolge insgesamt das zu synthetisierende Gen repräsentierten. Die Sequenzen dieser Oligodesoxynukleotide entsprachen jeweils 70 bis 80 Basenpaare langen Abschnitten des kodierenden bzw. nicht-kodierenden DNA-Stranges des künstlichen Gens und überlappten alternierend an ihren 3'- und 5'-Enden mit ca. 20 Basen. Von den beiden flankierenden *Primern* (10 μ M) und den vier Oligodesoxynukleotiden (0,1 μ M) wurden jeweils 2,5 μ l zu dem Reaktionsansatz pipettiert. Ein Kontrollansatz enthielt lediglich die beiden flankierenden Primer. Die PCR wurde mit dem Temperatur/Zeit-Programm des Standard-PCR Ansatzes mit 55 °C als *Annealing* Temperatur durchgeführt.

DNA-Shuffling

Mittels *DNA-Shuffling* (Stemmer, 1994) wurde versucht, ein hybrides Gen für die V_H -Domäne des HRS3 Fab-Fragments zu generieren, das sowohl Gensequenzen aus der humanisierten V_H - als auch aus der murinen V_H -Sequenz enthielt. Diese Gensequenzen wiesen 70 %ige Homologie auf.

Für die Herstellung kleinerer DNA-Fragmente aus der murinen sowie der humanisierten V_H -Gensequenz wurden die beiden V_H -Gene zunächst mittels Restriktionsverdau mit *Pst*I und *Bst*EII aus den Plasmiden pASK88-huHRS3 und pASK88-HRS3c isoliert. Jeweils 2,5 μ g der V_H -Gene wurden gemeinsam in einem Reaktionsansatz mit 40 μ l Gesamtvolumen (25 mM Tris/HCl pH7,4, 1 mM $MgCl_2$) durch Inkubation mit DNaseI (Konzentration: 0,0015 U/ μ l) für 5 min bei RT weitestgehend in Fragmente zwischen 20 und 100 bp verdaut. Der Reaktionsansatz wurde auf ein präparatives Agarosegel (0,8 %) aufgetragen und die DNA-Fragmente im Größenbereich zwischen 30 und 50 bp isoliert und in 20 μ l TE-Puffer aufgenommen.

Für die *DNA-Shuffling* Reaktion wurden die DNA-Fragmente in einer Konzentration von 30 ng/ μ l in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l eingesetzt. Der Ansatz enthielt jeweils 2,5 μ l der Primer HRS- V_H X und HRS- V_H YII (jeweils 10 μ M), 5 μ l 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 3 μ l $MgCl_2$ (25 mM) sowie 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Nach Auffüllen mit H_2O wurde der Reaktionsansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und folgendes PCR-Programm durch *Hot Start* in Gang gesetzt: 1. Denaturierung bei 94 °C für 30 s; 2. *Hybridisierung* bei 50 °C für 45 s; 3. Polymerisation bei 72 °C für 45 s. Dabei wurden 40 Temperaturzyklen durchgeführt, und zur Vervollständigung der Syntheseprodukte wurde abschließend bei 72 °C für 5 min inkubiert.

Error Prone PCR

Eine *Error Prone* PCR wurde nach dem Protokoll von Casson & Manser (1995) durchgeführt. Limitierende Mengen an dATP und dGTP, die Verwendung des Nucleotidanalogs dITP und die Präsenz von Mn^{2+} -Kationen im PCR-Ansatz führen zu einer drastischen Erhöhung der Fehlerrate der *Taq* DNA-Polymerase, was sich in zufälligen Mutationen im PCR-Produkt widerspiegelt. Das Reaktionsvolumen betrug 100 μ l und enthielt 0,01-1 μ g Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden *Primer*. Weiterhin waren 10 μ l 10x *Taq*-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0, 500 mM KCl, 1 % (v/v) Triton X-100), 6 μ l $MgCl_2$ (25 mM), jeweils 2 μ l dATP und dGTP (je 10 mM), jeweils 2 μ l dCTP und dTTP (je 50 mM), 2 μ l 50 mM dITP sowie 16 μ l 10 mM $MnCl_2$ enthalten. Nach Auffüllen mit H_2O wurde der Reaktionsansatz mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und das Temperatur/Zeit-Programm der Standard-PCR gestartet.

Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert und falls notwendig mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten.

2.2.5.5 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (*Blunt Ends*) wurde das Vektorfragment zur Erhöhung der Ausbeute an dem korrekten heterodimeren Ligierungsprodukt mit der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) dephosphoryliert. Dabei wurde die Alkalische Phosphatase in den präparativen Reaktionsansätzen abschließend direkt – unter Verwendung des für die Nuklease empfohlenen Puffers – eingesetzt (Abschnitt 2.2.5.3). 1 μ l (1 u) Alkalische Phosphatase wurde 1 h nach Beginn der Restriktionsspaltung zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase durch zehnmütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert und im Verlauf der Reinigung der DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese abgetrennt.

2.2.5.6 Auffüllen überstehender DNA-Enden

Die Überführung eines durch Spaltung von Doppelstrang-DNA mit einem Restriktionsenzym erhaltenen überstehenden Endes in ein glattes Ende wurde durch die Auffüllreaktion mit dem *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase I vorgenommen.

In einem typischen Reaktionsansatz wurde eine DNA-Menge von 5 μ g mit 5 u *Klenow*-Fragment der DNA-Polymerase I in einem Gesamtvolumen von 50 μ l mit 2 μ l dNTP-Lösung (je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und 5 μ l des 10x Polymerase-Puffers (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM $MgCl_2$, 75 mM Dithiothreitol) umgesetzt. Nach 15 min Inkubation bei 25 °C wurde die Reaktion durch Einstellen einer EDTA-Konzentration von 10 mM gestoppt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit Ethanol-fällung durchgeführt (siehe

Abschnitt 2.2.5.7).

2.2.5.7 Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung

Phenol/Chloroform-Extraktion

Um die DNA im Anschluß an eine der oben beschriebenen Umsetzungen von den Enzymen oder bei der Präparation von Plasmid-DNA von restlichen Zellproteinen (z. B. verbliebene Exonukleasen aus dem *E. coli*-Stamm JM83) zu befreien, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 40 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) versetzt und das Volumen mit H₂O auf 400 µl eingestellt. Nach Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform wurde das Gemisch ausgeschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, RT, 4 min). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt und erneut durch Zentrifugation wie zuvor abgetrennt.

Ethanol-Fällung

Für die Ethanol-Fällung – zur Abtrennung von restlichem Phenol – wurde die wässrige Phase mit 1 ml eiskaltem Ethanol gemischt und mindestens für 1 h bei -20 °C inkubiert. Das nach Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 18500 g, 4 °C, 30 min) erhaltene Präzipitat wurde mit 750 µl 70 % v/v Ethanol gewaschen und im Speed-Vac-Konzentrator für 2 min getrocknet. Abhängig von der weiteren Verwendung wurde das Präzipitat in 20-100 µl TE-Puffer gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.5.8 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft.

Für einen Standardansatz wurden dazu in einem Gesamtvolumen von 20 µl 2 µl 10x Puffer (300 mM Tris/HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP; Promega), 0,5 µl T4 DNA-Ligase (3 Weiss u/µl; Promega) und je ca. 50 fmol der zu ligierenden DNA-Fragmente eingesetzt. Der Ansatz wurde für etwa 16 h bei 16 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments ohne Insert der Ligierungsreaktion unterworfen. 5 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen verwendet.

2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte wurden einer Sequenzanalyse unterworfen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA (Chen & Seeburg, 1985) nach zwei verschiedenen Methoden, die beide auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977) basieren, verwendet.

2.2.6.1 Radioaktive Sequenzanalyse

Die radioaktive Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T7 DNA-Polymerase (Tabor & Richardson, 1987) durchgeführt. Dabei wurde der T7-SequencingTM-Kit nach Angaben des Herstellers sowie 1,5-2 µg Plasmid-DNA und 1 pmol des entsprechenden *Primers* verwendet. Der naszierende DNA-Strang wurde während der Polymerasereaktion mit [α -³⁵S]dATP markiert und durch den Einbau von Di-desoxynukleotiden terminiert. Die entstandenen radioaktiv markierten DNA-Fragmente wurden anschließend durch Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiogramm sichtbar gemacht.

2.2.6.2 Sequenzanalyse mit Hilfe eines ABI PRISM[®] 310 Sequencers

Für die Analyse von DNA-Abschnitten mit Hilfe des ABI PRISM[®] 310-Sequenzierautomaten fand der ABI PRISM[®] BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Verwendung. Dieser enthält eine modifizierte *Taq* DNA-Polymerase (Ampli[®]Taq; Tabor & Richardson, 1995) sowie Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelt sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Auf diese Weise wird die naszierende DNA-Kette während der Polymerasereaktion abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente werden im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*, POP-6TM) aufgetrennt und ihre Fluoreszenzgruppen durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wird von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera detektiert und als digitales Signal an einen Power Macintosh G3 Rechner weitergeleitet. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe einer geeigneten Software (ABI PRISM[®] DNA Sequencing Analysis 3.3) interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

Zu 4 µl BigDyeTM Ready Reaction Mix wurden je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 1 µg), 2 µl eines geeigneten *Primers* (1 µM) und 2 µl H₂O gegeben. Die Mischung wurde mit 3 Tropfen Mineralöl überschichtet und 25mal folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 96 °C, 30 s; 55 °C, 15 s; 60 °C, 4 min. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 1 µl 3 M Na-Acetat

pH 4,8 und 25 µl Ethanol (p. a.) für 20 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, RT, 20 min, 14.000 rpm), mit 70 % (v/v) Ethanol (p. a.) gewaschen, unter Vakuum (Speed-Vac) getrocknet und in 12 µl des mitgelieferten TSR-Puffers resuspendiert. Nach Inkubation bei 95 °C für 2 min zur Denaturierung der Probe wurde diese in ein dafür vorgesehenes Reaktionsgefäß überführt und im ABI PRISM[®] 310-Sequenziergerät platziert. Das Gerät wurde durch den Einbau der Kapillare, Befüllen des Pumpenblocks mit Polymer und Bereitstellung des Elektrophoresepuffers nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Die Sequenzanalyse wurde schließlich mit Hilfe der Kontroll-Software (ABI PRISM[®] 310 Data Collection) gestartet.

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Durch die Verwendung von Expressionsvektoren, auf denen das Strukturgen des zu produzierenden Proteins als Fusion mit dem Gen für eine bakterielle Signalsequenz (OmpA bzw. PhoA) vorlag, erfolgte die Sekretion der Polypeptidkette in den periplasmatischen Raum von *E. coli* (Skerra & Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran nach Induktion der Genexpression konnte die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

50 ml LB/Amp- bzw. LB/Cam-Medium wurden mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83 angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 l LB/Amp- bzw. LB/Cam-Medium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 22 °C und 200 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch stündliche Probenentnahme zur Messung der Optischen Dichte (OD₅₅₀) verfolgt. Bei einer OD₅₅₀ von 0,5 wurde mit 200 µl Anhydrotetracyclinlösung in DMF (2 mg/ml) induziert (Endkonzentration: 200 µg/l). Die Induktionsdauer betrug je nach verwendetem Plasmid 2 bis 3 h.

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur zügig auf sechs Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (Beckmann- oder Sorvall-Zentrifuge, 4 °C, 15 min, 5.000 rpm). Der Medienüberstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen unter Kühlung in insgesamt 20 ml eiskaltem Saccharose-Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und in einem 50 ml Kunststoffröhrchen für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (Sigma 4K10, 5.000 rpm, 4 °C, 15 min sowie SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 15 min). Der periplasmatische

Extrakt wurde anschließend zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie über Nacht gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert (siehe Abschnitt 2.4.1.1 und 2.4.1.2).

Für die spätere Analyse durch SDS-PAGE wurde auch eine Gesamtzellprobe der Kultur im kleinen Maßstab hergestellt: 1 ml der Kultur wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (Sorvall RMC 14, 14000 rpm, 4 °C, 2 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonaselösung (12,5 U/ml in Benzonasepuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE wurden die Zellen unter vorsichtigem Mischen lysiert. Im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert. Danach wurde das Lysat bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C eingefroren.

2.3.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Für manche Anwendungen wurden größere Mengen eines rekombinanten Proteins benötigt, die nach einer von Schiweck & Skerra (1995) etablierten Methode durch Fermentation von *E. coli* hergestellt wurden.

Die Bakterienzellen wurden in einem 5 L bzw. 10 L-Fermentergefäß in einem Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugefüttert wurde. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des gesamten Verlaufs der Fermentation gewährleistet. Als Expressionsstamm wurde dabei neben dem *E. coli* K12 Wildtyp W3110 der Stamm JM83/F' verwendet.

Als Vorvorkultur wurden 2 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztes LB-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 180 (360) ml Mineralsalzlösung (Die Angaben in Klammern gelten für den 8 L-Maßstab), denen 20 (40) ml 20 % (w/v) Glucose, 2 (4) ml 1 M MgSO₄, 200 (400) µl Antibiotika-Stammlösung und 200 (400) µl Thiamin-Stammlösung zugesetzt worden waren. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1 : 1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zelldichte der stationären Vorkultur betrug typischerweise OD₅₅₀ = 1,5-2,0. Zur Bestimmung der Optischen Dichte wurden der Kultur entnommene Proben im Verhältnis 1:10 mit der Mineralsalzlösung verdünnt und im Spektrometer bei 550 nm vermessen.

Das Kulturgefäß wurde mit 3,5 l (7 l) Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert und auf dem Magnetrührer fixiert. Vor dem Inokulieren der Fermenterkultur wurde die Fermentationslösung auf 30 °C temperiert und über einen Trichter 400 (800) ml 20 % (w/v)

Glucose, 40 (80) ml 1 M MgSO₄, je 4 (8) ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 2 (4) ml FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 5 (10) ml Spurenelement-Lösung sowie 100 (200) µl 30 %ige Antifoam A-Lösung hinzugegeben. Die Belüftung fand zunächst durch Druckluft statt, worauf dem im begasten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck der relative Wert "100 %" zugeordnet wurde. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert ≥ 30 % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 rpm (entsprechend 40 % der Maximalleistung des Geräts). Das Medium wurde mit der gesamten stationären Vorkultur (200 bzw. 400 ml) angeimpft und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur auf 25 °C erniedrigt und nochmals 300 (600) µl Antifoam A zugegeben.

Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 %ige (w/v) Glucose nach folgendem Protokoll zudosiert:

Ab einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 7,5 Zugabe mit 14 ml/h

= 12,5 " 20 ml/h

= 18,5 " 30 ml/h

= 22,5 " 40 ml/h

Weiterhin wurden der Kultur bei OD₅₅₀ = 13 nochmals je 2 (4) ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 5 (10) ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 20 durch Einstellen einer Konzentration von 0,5 mg Anhydrotetracyclin je l Kultur induziert, die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugation (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, H-6000 A- Rotor, 4 °C, 20 min, 5.000 rpm) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 600 (1000) ml-Becherglas überführt und in vorgekühltem Periplasma-Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose) für 10 min auf einem Magnetrührer (300 rpm) resuspendiert. Das eingesetzte Puffervolumen betrug 2 ml l⁻¹ OD⁻¹. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8,0) und 250 µg Lysozym/ml (Lysozym-Stammlösung: 20 mg/ml in Aufschlußpuffer, frisch angesetzt) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluß zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 20 min, 11.500 rpm) von den Sphäroplasten grob getrennt. In einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter sonst gleichen Bedingungen) wurde der Extrakt von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt.

Trug das gentechnisch hergestellte Protein ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel, wurde es anschließend dreimal gegen jeweils 5 (10) l 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5 dialysiert. Durch Zugabe von festem Betain-Monohydrat wurde anschließend eine Konzentration von 0,5 M Betain im dialysierten Periplasmaaufschluß eingestellt, was der Stabilisierung der heterodimeren Antikörperfragmente diente und die Auflösung der nachfolgenden Metallchelate-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.4.1.2) verbesserte. Im Falle des *Strep*-Tag-Affinitätsanhängsel am rekombinanten Protein wurde der periplasmatische Proteinextrakt gegen SA-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) dialysiert (3 x gegen 5 bzw. 10 l). Ausgefallenes Protein und Partikel wurden durch Zentrifugation (Sorvall-Zentrifuge, SLA-1500-Rotor, 4 °C, 30 min, 11.500 rpm) und Sterilfiltrieren (0,45 µm) abgetrennt und die so erhaltene Proteinlösung entweder sofort zur Chromatographie eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren.

2.3.2 Kolonie-Filterstapel-Test

Die mittels *DNA-Shuffling* und *Error Prone PCR* generierten Mutanten-Bibliotheken des humanisierten HRS3 Fab-Fragments wurden mit Hilfe des Kolonie-Filterstapel-Tests (Skerra *et al.*, 1991a) nach Varianten mit verbesserter Antigenbindung für das rekombinante CD30-Antigen untersucht. Hierfür wurde ausgehend von den Plasmiden pASK88-huHRS3 und pASK106-IN1-abd der Vektor pASK106-huHRS3 durch Umklonieren der Expressionskassette über die singulären Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III konstruiert. Dieser trägt die Gensequenzen für das humanisierte HRS3 Fab-Fragment mit konstanten humanen Domänen, einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel am Carboxyterminus der schweren sowie der albuminbindenden Domäne (ABD) von *Streptococcus*-Protein G am Carboxyterminus der leichten Kette. Für den *Colony Sandwich Filter Screening Assay* (Skerra *et al.*, 1991a; Schlehuber *et al.*, 2000) wurde das PCR-Produkt mit *Pst*I und *Bst*EII geschnitten und durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde anschließend mit dem ebenso geschnittenen Vektor pASK106-huHRS3 ligiert und kompetente *E. coli* JM83 Zellen transformiert.

Für den anschließenden Kolonie-Filterstapeltest wurde eine passend zurechtgeschnittene, an einer Stelle markierte hydrophile PVDF-Membran (Millipore, Typ GVWP, Porengröße 0,22 µm) auf eine LB/Amp-Agarplatte gelegt. Auf dieser Membran wurden 150 µl der Zellsuspension aus dem Transformationsansatz mit Hilfe eines Drigalskyspatels und eines Drehtellers gleichmäßig ausplattiert, wobei ca. 500 Kolonien erhalten wurden. Die Platte wurde für 8 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 0,5 mm erreicht hatten.

In der Zwischenzeit wurde eine ebenfalls passend zurechtgeschnittene hydrophobe Membran (Millipore, Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm) zur Befeuchtung nacheinander für je 5 min in

20 ml Methanol, in 20 ml Wasser und anschließend in 20 ml PBS geschwenkt. Danach wurde sie für 4 h bei Raumtemperatur in 10 ml einer Lösung von 10 mg/ml Human-Serumalbumin in PBS beladen. Verbliebene Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 10 ml 3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20 in PBS für 2 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Membran wurde zweimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS gewaschen und danach für 10 min in 10 ml LB/Amp-Medium mit 200 µg/l Anhydrotetracyclin geschwenkt. Anschließend wurde sie an einer Stelle markiert und auf eine Kulturplatte mit LB/Amp-Agar, dem 200 µg/l Anhydrotetracyclin zugesetzt worden war, gelegt.

Die zuvor erhaltene, mit den Kolonien bewachsene hydrophile Membran wurde daraufhin so auf der hydrophoben Membran platziert, daß die beiden Markierungen zur Deckung kamen. Die Kulturplatte mit den beiden Membranen wurde bei 22 °C für 15 h (über Nacht) inkubiert. Während dieser Phase wurden die Varianten des huHRS3 Fab-Fragmentes als Fusionsproteine von den Kolonien sekretiert und durch die Komplexbildung zwischen der Albumin-Bindungsdomäne und dem HSA auf der unteren Membran selektiv immobilisiert.

Die obere Membran mit den Kolonien wurde anschließend auf eine frische LB/Amp-Agarplatte transferiert und bei 4 °C aufbewahrt. Die hydrophobe Membran wurde dreimal für jeweils 10 min mit 20 ml PBS/T gewaschen und daraufhin für 1 h in 10 ml einer Lösung von 15 µg/ml eines Konjugats von CD30A mit Digoxigenin inkubiert.

Zur Herstellung dieses Konjugats wurde eine Lösung von 100 nmol (66 µg) Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-hydroxyl-succinimid-Ester in 10 µl DMSO µl-weise und unter stetigem Rühren zu 10 nmol (168 µg) des gereinigten rekombinanten CD30A-Proteins (siehe Abschnitt 3.1.1) in 1 ml PBS gegeben. Der Ansatz wurde unter Rühren für 1 h bei RT inkubiert und überschüssiges Reagenz von dem CD30A-Konjugat mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule abgetrennt.

Um das durch die immobilisierten Fab-Fragmente auf der Membran gebundene Digoxigenin-CD30A-Konjugat nachzuweisen, wurde die Membran nach zweimaligem Waschen für 5 min in 20 ml PBS/T für eine Stunde mit 10 ml Anti-Digoxigenin Fab-Fragment Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:1000 verdünnt in PBS/T) inkubiert. Die Membran wurde danach für jeweils 5 min zweimal mit 20 ml PBS/T und zweimal mit 20 ml PBS gewaschen und schließlich kurz in AP-Puffer geschwenkt. Für die anschließende chromogene Nachweisreaktion (Blake *et al.*, 1984) wurde die Membran in 10 ml AP-Puffer, dem 30 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat, p-Toluidinsalz (BCIP; 50 µg/ml in Dimethylformamid) und 5 µl Nitro Blue Tetrazolium (NBT; 75 µg/ml in 70 % v/v Dimethylformamid) zugesetzt waren, inkubiert, bis an den Positionen einiger der Kolonien deutliche Farbsignale zu erkennen waren. Kolonien, die zu einer besonderen Signalintensität oder -morphologie Anlaß gaben, wurden ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und der Sequenzanalyse unterzogen.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Chromatographische Verfahren

2.4.1.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Die Isolierung rekombinanter Proteine aus der periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-Tag bzw. dem *Strep*-Tag II Affinitätsanhängsel (Schmidt & Skerra, 1993; Skerra & Schmidt, 2000; Schlapschy & Skerra, 2001) erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Die Periplasmafraktion (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde dazu über Nacht bei 4 °C gegen das etwa 100fache Volumen an SA-Puffer dialysiert und vor dem Auftragen auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Streptavidin-Sepharose-Säule mit der immobilisierten Streptavidin-Mutante Nr. 1 (Voss & Skerra, 1997), entsprechend einer Beladung an Streptavidin von 5 mg/ml, wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie – anhand der Absorption bei 280 nm (A_{280}) – mit SA-Puffer gespült. Bis zu einem Volumen von 30 ml Periplasmafraktion wurde ein Bettvolumen von 2 ml verwendet. In diesem Fall wurde die Chromatographie bei einer konstanten Flußrate von 20 ml/h betrieben. Bei größeren Volumina (bis zu 300 ml Periplasmafraktion aus der Fermentation) wurde eine Säule mit 12 ml Bettvolumen bei einer konstanten Flußrate von 80 ml/h betrieben.

Die Periplasmafraktion wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Das über das *Strep*-Tag bzw. *Strep*-Tag II gebundene rekombinante Protein wurde daraufhin mit einer 2,5 mM Lösung an D-Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Zur Regenerierung wurde das D-Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur vollständigen Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt, vereinigt und gegen einen geeigneten Puffer dialysiert. Nach Sterilfiltration (0,45 µm) wurde das Protein üblicherweise bei 4 °C gelagert.

2.4.1.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC; Porath *et al.*, 1975) beruht auf der Bindungswechselwirkung von funktionellen Gruppen auf der Proteinoberfläche, vor allem Cystein- oder Histidin-Seitenketten, zu immobilisierten Übergangsmetallionen. Auch rekombinante Proteine mit künstlich angehäuften Oligohistidin-Sequenzen können wegen ihrer ausgeprägten Affinität zu chelatisierten Metallionen auf diese Weise gereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1988; Skerra *et*

al., 1991b). Die Immobilisierung der Übergangsmetallionen erfolgt durch chelatisierende chemische Gruppen, die auf einem Säulenmaterial fixiert sind. Hier wurde eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Iminodiessigsäure-Gruppen (*Chelating Sepharose Fast Flow*) als Chelatbildner eingesetzt, und als Übergangsmetallion wurde Zn^{2+} verwendet. Zur Metallbindung des rekombinanten Proteins diente das C-terminale *His*₆-Tag.

IMAC unter Verwendung eines peristaltischen Pumpensystems

Zur Isolierung eines rekombinanten Proteins aus 20 ml Periplasmaextrakt wurde eine Säule mit einem Bettvolumen von 2 ml verwendet. Die Reinigung aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von Fermentationsansätzen wurde an einer Säule mit 30 ml Bettvolumen durchgeführt (Angaben in Klammern). Der Verlauf der Chromatographie wurde durch Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflußphotometers bei 280 nm dokumentiert. Der periplasmatische Proteinextrakt (siehe Abschnitt 2.3.1) wurde zur Entfernung des Komplexbildners EDTA vor dem Auftragen auf die Säule gegen 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,5 dialysiert, anschließend durch Zugabe der Festsubstanz auf eine Konzentration von 0,5 M Betain eingestellt und sterilfiltriert.

Die Säule wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe zunächst mit einer Flußrate von 20 ml/h (200 ml/h) betrieben und mit 20 ml (300 ml) Wasser bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Dann wurde mit 10 ml 10 mM $ZnSO_4$ (150 ml) beladen, mit 20 ml (300 ml) Wasser nachgespült und schließlich mit 20 ml (300 ml) IMAC-Puffer äquilibriert.

Anschließend wurde die periplasmatische Proteinfraction aufgetragen und bis zum Erreichen der Basislinie mit MC-Puffer nachgespült. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten mit 40 ml (600 ml) Volumen von 0 bis 300 mM Imidazol/HCl in IMAC-Puffer bei einer verringerten Flußrate von 10 ml/h (100 ml/h). Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers in Fraktionen von 1,5 ml (12 ml) aufgefangen. Nach der Elution wurde die Säule zur Entfernung der Zn^{2+} -Ionen mit 20 ml (300 ml) Regenerierungspuffer (1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) und anschließend mit 10 ml (150 ml) Wasser gespült.

Der Proteingehalt der Eluatfraktionen und deren Reinheit wurde mittels SDS-PAGE bestimmt. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an reinem rekombinanten Protein wurden vereinigt, gegen einen geeigneten Puffer dialysiert und nach Sterilfiltration (0,45 µm) bei 4 °C gelagert.

IMAC an einer POROS[®]-Säule unter HPLC-Bedingungen

Die Verwendung einer POROS[®] MC/M Säule (Durchmesser: 4,6 mm; Länge: 100 mm; Säulenvolumen: 1,7 ml) erlaubte die Durchführung der IMAC bei hohen Flußgeschwindigkeiten. Das auf Perfusionspartikeln basierende Säulenmaterial mit Iminodiessigsäure-Gruppen weist eine spezielle dreidimensionale Struktur mit sowohl Diffusionsporen als auch Durchflußkanälen auf. Bei der Chromatographie erreichen die in der

mobilen Phase gelösten Probenmoleküle über die Durchflußkanäle schnell die Diffusionsporen, die netzwerkartig von diesen abzweigen. Auf diese Weise ist die Diffusionslimitierung bei der Einstellung des Adsorptionsgleichgewichts praktisch vernachlässigbar.

Für die Durchführung der Reinigung wurde eine programmierbare Dynamax HPLC-Anlage mit zwei biokompatiblen PEEK (Polyether-Ether-Keton) Pumpenköpfen, einem Hochdruck-Gradientenmischer und einem 50 ml Superloop als Probenschleife verwendet. Die verwendeten Puffer waren identisch mit denen des herkömmlichen Verfahrens, wurden jedoch vor dem Gebrauch sterilfiltriert und im Ultraschallbad entgast. Der Chromatographieverlauf wurde durch Absorptionsmessung mit Hilfe eines Dynamax UV-1 Durchflußdetektors verfolgt.

Die Säule wurde zunächst mit einer Flußrate von 4 ml/min betrieben, mit 20 ml 10 mM ZnSO₄ beladen und anschließend mit 20 ml Wasser gespült. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 20 ml IMAC-Puffer wurden 20 ml des periplasmatischen Proteinextraktes mit Hilfe des Superloops aufgetragen. Anschließend wurde erneut mit IMAC-Puffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm auf die Basislinie zurückfiel. Die Flußrate wurde daraufhin auf 2 ml/min vermindert und die Elution durch Anlegen eines kontinuierlichen Gradienten von 20 ml IMAC-Puffer gegen 20 ml IMAC-Puffer mit 300 mM Imidazol/HCl gestartet. Das Eluat wurde fraktioniert aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml 1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0 mit einer Flußrate von 4 ml/min regeneriert und mit 20 ml Wasser gespült. Mit den erhaltenen Proteinfractionen wurde wie oben beschrieben weiterverfahren.

2.4.1.3 Größenausschlußchromatographie

Die Größenausschlußchromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe sowie Form und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Feinreinigung von rekombinanten Proteinen bzw. zur Isolierung von F(ab)₂-Fragmenten aus Kopplungsansätzen (siehe Abschnitt 3.3.1.3) verwendet.

Die Chromatographie wurde mit einem Dynamax SD-300 HPLC-System betrieben. Die Absorptionsmessung erfolgte dabei mit Hilfe eines Dynamax UV-1 Durchflußdetektors. Die im verwendeten Chromatographie-Puffer wurden sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min unter Rühren entgast.

Zur Reinigung der Fab-Fragmente und des CD30A-Antigens wurde die präparative Superdex 75 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule verwendet. Diese besitzt ein Säulenbettvolumen von 124 ml und einen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa.

Für die Isolierung des F(ab)₂-Fragments aus dem Kopplungsansatz wurde die präparative Superdex 200 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule benutzt. Diese weist ebenfalls ein

Säulenbettvolumen von 124 ml auf, hat aber einen Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa.

Beide Säulen wurden vor der Trennung bei einer Flußrate von 1 ml/min mit 2 Säulenvolumen Chromatographie-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) äquilibriert. Von der Proteinlösung (typische Konzentration: 1-5 mg/ml) wurde jeweils 1 ml mit Hilfe einer 1 ml Probenschleife aufgetragen. Über einen Fraktionskollektor wurden Fraktionen á 4 ml gesammelt und anschließend mittels SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit des F(ab)₂-Fragments untersucht.

Die Säulen wurden durch Spülen mit einem Säulenvolumen an 0,5 M Natronlauge regeneriert, mit Wasser gespült und in 20 % Ethanol gelagert.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen und deren Mischungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins (Creighton, 1997). Je nach Größe des zu analysierenden Proteins wurden 10 %ige, 12 %ige oder 15 %ige SDS-Polyacrylamidtrenngelle verwendet. Bei rekombinanten Antikörperfragmenten wurden, sofern nötig, 12 %ige SDS-Harnstoff-Polyacrylamidgele zur Trennung verwendet, da in Gegenwart von 6 M Harnstoff mitunter eine Auftrennung der einzelnen Ketten bei sehr ähnlicher Masse erreicht wird (Skerra, 1994a).

Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5,5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm. Zunächst wurde eine Gelkammer aus Glasplatten und Kunststoff-Abstandhaltern zusammengebaut und mit in der Hitze verflüssigtem 1 % w/v Bacto Agar abgedichtet.

Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml enthielt 1,25 ml 4x Lower-Tris sowie einen der gewünschten Prozentigkeit des Gels entsprechenden Anteil einer 30 %igen (w/v) Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % (w/v) Bisacrylamid. Zur Herstellung von 10 %igen Gelen wurden 1,5, für 12 %ige Gele wurden 2 ml und für 15 %ige Gele 2,5 ml Acrylamid-Stammlösung verwendet. Für ein 12 %iges SDS-Harnstoffgel enthielt die Trenngelmischung zusätzlich 1,8 g Harnstoff. Nach dem Polymerisationsstart durch Zugabe von 1,3 µl TEMED und 25 µl 10 % (w/v) APS wurden 3,6 ml bis 4 ml der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit 1 ml Wasser überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (ca. 45 min) wurde das Wasser abgossen. Für die Herstellung der 5 %igen Sammelgelmischung wurden 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 ml

aufgefüllt. Für SDS-Harnstoffgele enthielt die Sammelgelmischung zusätzlich 1,08 g Harnstoff. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 µl TEMED und 18 µl 10 % (w/v) APS gestartet. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen, und es wurde ein Taschenformer mit zehn Zähnen eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden die Metallklammern sowie der untere Abstandhalter vorsichtig entfernt und das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. In die Probentaschen des vollständig polymerisierten Gels wurden dann je 20 µl Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA betrieben. Nach ca. 2 h hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Daraufhin wurde das Sammelgel abgetrennt, das Trenngel entnommen und für 20 min in Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel bis zur Trockenkonservierung in Aufbewahrungslösung bei 4 °C gelagert.

2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Lösungen gereinigter Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm – unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des für die vorherige Dialyse verwendeten Puffers – mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Die dazu notwendigen molaren Extinktionskoeffizienten wurden jeweils mit Hilfe der Computerprogramme TRANSLATE und PEPTIDESORT aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) errechnet (siehe Tabelle 1). Sie werden dabei näherungsweise als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren der vollständig entfalteten Peptidkette bestimmt (Gill & von Hippel, 1989).

Protein	ϵ_{280} [$M^{-1}cm^{-1}$]
chimäres muA9 Fab-Fragment	81146
chimäres muHRS3c Fab-Fragment	72130
huHRS3 Fab-Fragment	73410
huHRS3 Variante EP3/1	73410
CD16B-Antigen	44500
CD30A-Antigen	15640

Tabelle 1: Molare Extinktionskoeffizienten verschiedener in dieser Arbeit verwendeter rekombinanter Proteine bei 280 nm.

2.4.4 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Experimente – insbesondere für die chemische Kopplung zweier Fab-Fragmente – waren Lösungen mit hoher Proteinkonzentration notwendig. Dazu wurde das gereinigte Protein zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Lösung mittels einer Konzentratoreinheit (Vivaspin, Makrosep™) mit einer geeigneten Ausschlußgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiertes Protein abzentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415C, 4 °C, 20 min, 14.000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die Konzentration einer 1:10 verdünnten Probe der Lösung wurde schließlich durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Um die Unversehrtheit der Ultrafiltrationsmembran sicherzustellen wurde auch der Proteingehalt des Filtrats untersucht.

Durch Fermentation und präparative Metallchelat- bzw. Streptavidin-Affinitätschromatographie erhaltene Proteine lagen in großen Volumina (50-80 ml) vor und wurde daher mit Hilfe eines 15 ml Vivaspin-Konzentrators auf 5–10 mg/ml konzentriert (siehe oben). War die erwünschte Proteinkonzentration erreicht, wurde die Lösung sterilfiltriert (0.22 μ m) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.4.5 Kopplung zweier Fab-Fragmente zum F(ab)₂-Fragment

Kopplung mittels Disulfidbindung unter Verwendung von DTNB

Alle für die Kopplung verwendeten Puffer wurden mit Stickstoffgas gesättigt, um eine unerwünschte Oxidation der reaktiven Thiolgruppen zu verhindern.

Zur Herstellung des bispezifischen HRS3/A9 F(ab)₂-Fragments wurde die Vorgehensweise

von Carter *et al.* (1992) gewählt, bei der die Thiolgruppe eines der beiden Fab-Fragmente zunächst mit Ellman's Reagenz (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat); DTNB) in ein aktiviertes, gemischtes Disulfid überführt und dieses – nach Abtrennung des überschüssigen Reagens – mit dem zweiten Fab-Fragment in der aktiven Thiolform umgesetzt wurde.

Die beiden Fab-Fragmente muA9 und muHRS3c, jeweils in Form des Sequenzmotivs C oder D (siehe Abschnitt 3.3) wurden nach der Reinigung in einem Vivaspin-Konzentrator (30 kDa MWCO) auf eine Konzentration von ca. 150 μM eingestellt. Durch milde Reduktion mit 2-Mercaptoethanol (10 mM in 1 ml Reaktionsvolumen) für 30 min bei 30 °C wurden die freien Cysteinreste beider Kopplungspartner separat aktiviert. Das Reduktionsmittel wurde anschließend durch Gelfiltration (PD-10 Säule) entfernt, und das Fab-Fragment jeweils in 100 mM Tris/Acetat pH 5 (100 mM Tris mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt), 5 mM EDTA eluiert. Bei dem sauren pH-Wert lagen die Cysteinreste in der protonierten Thiolform vor. Nach erneuter Aufkonzentrierung beider Fab-Fragmente mit einem Vivaspin-Konzentrator (30 kDa MWCO) auf eine Konzentration zwischen 20 und 80 μM , wurde das muHRS3c Fab-Fragment mit einem 400-fachen molaren Überschuß an DTNB (40 mM Stammlösung in 100 mM Tris/Acetat pH 5, 5 mM EDTA) versetzt (1 ml Reaktionsvolumen). Die Derivatisierungsreaktion wurde durch Deprotonierung der Thiolgruppen bei pH 8 durch Zugabe von 70 μl 1 M Tris-Base gestartet und für 4 h bei 30 °C inkubiert. Durch Messung der Absorption des TNB bei 412 nm wurde der Reaktionsverlauf verfolgt. Zudem wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für TNB ($\epsilon_{412} = 14100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Anzahl der reaktiven Thiolgruppen pro Fab-Fragment bestimmt (Ellman's Assay). Das überschüssige DTNB sowie das entstandene TNB wurden anschließend durch Gelfiltration über eine PD-10 Säule abgetrennt, die wiederum mit 100 mM Tris/Acetat pH 5, 5 mM EDTA äquilibriert worden war. Das derivatisierte Fab-Fragment wurde auf eine Konzentration zwischen 20 und 80 μM aufkonzentriert (ca. 800 μl).

Für die eigentliche Kopplungsreaktion wurden äquimolare Mengen des so derivatisierten Fab-Fragments und des zweiten Fab-Fragments als Kopplungspartner bei einer Gesamtproteinkonzentration von 20 bis 80 μM (1 ml Reaktionsvolumen) eingesetzt und die Thiol-Disulfidaustauschreaktion durch Einstellen von pH 8 mit 70 μl 1 M Tris-Base bei 30 °C gestartet. Die Kopplungsreaktion wurde anhand der Freisetzung des TNB bei 412 nm wiederum spektroskopisch verfolgt und so das Ende der Reaktion (2 bis 4 h) bestimmt. Aus der Menge des freigesetzten TNB wurde durch Vergleich mit dem theoretischen Maximalwert (100 % Kopplung) die Kopplungseffizienz abgeschätzt. Das F(ab)₂-Fragment wurde schließlich durch präparative Gelfiltration auf einer Superdex 200 HiLoad 16/60 *prep grade* Säule isoliert (Chromatographie-Puffer: 50 mM Natriumphosphat pH 7,5, 150 mM NaCl).

Kopplung mittels Thioether unter Verwendung von o-Phenylendimaleimid

Zur Kopplung zweier Fab-Fragmente mit dem Linkerreagens o-Phenylendimaleimid unter

Michael-Addition wurde nach der Vorschrift von Glennie *et al.* (1987) verfahren. In einem Pilotversuch wurde die Kopplung zweier chimärer muHRS3c Fab-Fragmente mit Sequenzmotiv C demonstriert.

Die freien Thiolgruppen des chimären muHRS3c Fab-Fragments mit Sequenzmotiv C wurden wie weiter oben beschrieben zunächst mit 2-Mercaptoethanol reduziert. Nach Abtrennung des Reduktionsmittels und Aufkonzentrierung auf 20 μM (1 ml) wurde das Fab-Fragment mit einem 400-fachen molaren Überschuß an o-Phenylendimaleimid (200 μl einer 40 mM Lösung in DMF) in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml für 2 h bei Raumtemperatur derivatisiert. Die Abtrennung des überschüssigen Linkerreagens erfolgte mittels Gelfiltration auf einer PD-10 Säule, wodurch das derivatisierte Fab-Fragment gleichzeitig auf 20 mM Natriumacetat pH 5,3, 5 mM EDTA) umgepuffert wurde. Nach Aufkonzentrieren des Proteins auf 20 μM (ca. 800 μl) wurden äquimolare Mengen des underivatisierten (mit freien Thiolgruppen) und des mit o-PDM derivatisierten Fab-Fragments bei einer Gesamtproteinkonzentration von 30 μM in 20 mM Natriumacetat pH 5,3, 5 mM EDTA unter Stickstoff für 48 h bei 4 °C inkubiert.

2.4.6 N-terminale Proteinsequenzierung

Zur Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz des Skp-Proteins wurden 10 μg einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Borat-Laufpuffers ohne Glycin (100 mM Tris, 100 mM Borsäure pH 8,3, 0,1 % w/v SDS) unterzogen. Alle anderen Lösungen waren identisch mit den sonst verwendeten Lösungen (siehe Abschnitt 2.4.2). Anschließend wurde der Elektrotransfer auf eine Immobilon-P-Membran (siehe Abschnitt 2.5.1) mit Transferpuffer (20 % v/v Methanol in Borat-Laufpuffer) durchgeführt. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran für 5 min in Färbelösung (siehe Abschnitt 2.4.2) geschwenkt und bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbelösung gewaschen. Die Membran wurde mit bidestilliertem Wasser gespült und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Für die Sequenzanalyse wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und in einem Procise 492-Gasphasensequenator (Applied Biosystems Instruments GmbH) sequenziert (Mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. S. Wolf, TU Darmstadt).

2.5 Immunchemische Methoden

2.5.1 Western Blotting

Für den immunchemischen Nachweis eines Proteins in einem Proteingemisch wurde die Methode des *Western Blotting* verwendet. Das Proteingemisch wird zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und das gewünschte Protein schließlich in einem

immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt.

Die SDS-PAGE wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben und das Trenngel anschließend für 20 min in Transferpuffer (20 % v/v Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Der Elektrotransfer erfolgte auf eine Nitrocellulose-Membran.

Für den Elektrotransfer wurden 4 Blatt Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektrobloßapparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, die mit Transferpuffer benetzte Membran sowie weitere 4 Blatt mit Puffer getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca. 1 mA/cm²) betrieben. Die Nitrocellulose-Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 15 min in 10 ml PBS/T geschwenkt.

Immunchemischer Nachweis anhand des *Strep*-Tag bzw. *Strep*-Tag II Affinitätsanhängsels

Um die Bindungseigenschaften des *E. coli* Biotin-Carboxyl-Carrierproteins abzusättigen, wurde die Membran für 10 min in 10 ml PBS/T mit 2 mg/ml Avidin inkubiert. Danach wurden direkt 10 µl eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats zugegeben, für 1 h geschwenkt und wie unten beschrieben angefärbt.

Immunchemischer Nachweis anhand des Hexahistidin-Affinitätsanhängsels

Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran für 1 h in 10 ml PBS/T mit einer 1:1000 Verdünnung eines Ni-NTA-Alkalische Phosphatase-Konjugats geschwenkt und wie unten beschrieben angefärbt.

Immunchemischer Nachweis der humanen konstanten Domäne der leichten Kette (C_κ)

Die leichten Ketten von intakten Immunglobulinen sowie deren Fab-Fragmenten wurden entweder direkt mit Hilfe eines Anti-Human-C_κ Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats oder durch einen Anti-Human-C_κ-Antikörper aus Kaninchen in Verbindung mit einem Anti-Rabbit-Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Schwein – als Zweitantikörper – nachgewiesen. Im ersten Fall wurde die Membran mit den transferierten Proteinen für 1 h in 10 ml PBS/T mit einer 1:1000 Verdünnung des Anti-Human-C_κ-Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats geschwenkt und wie unten beschrieben angefärbt. Im anderen Fall wurde die Membran für 1 h in 10 ml PBS/T mit einer 1:1000 Verdünnung des Anti-Human-C_κ-IgG inkubiert, anschließend dreimal für jeweils 10 min mit 10 ml PBS/T gewaschen und danach wiederum für 1 h in 10 ml einer 1:1000 Verdünnung des Anti-Rabbit-IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugats geschwenkt.

Zur selektiven Anfärbung der rekombinanten Proteine wurde die Membran im Anschluß an die Inkubation mit dem jeweiligen Alkalische Phosphatase-Konjugat dreimal für 5 min mit 10 ml PBS/T und einmal mit AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM

MgCl₂) gewaschen. Durch Inkubation in 20 ml AP-Puffer unter Zusatz von 10 µl NBT (75 mg/ml in 70 % DMF) und 60 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht (Blake *et al.*, 1984). Nachdem die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

2.5.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bindungsaktivität von Immunglobulinen und -fragmenten gegenüber ihrem jeweiligen Antigen wurde mit Hilfe des ELISA nachgewiesen. Dazu wurde das Antigen an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte adsorbiert und nach Applikation des Antikörpers dessen Bindung – ggf. vermittelt durch Zweitreagenzien – durch chromogene Enzymreaktion detektiert.

Enzymatischer Bindungsnachweis mit Hilfe der Alkalischen Phosphatase

Die Bindung von rekombinanten Fab-Fragmenten an die entsprechenden Antigene wurde mit Hilfe eines Anti-Human-C_κ Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugats nachgewiesen. Die Bindung der monoklonalen Maus-Antikörper HRS3 und A9/HRS3 wurde mit einem Anti-Maus-Antikörper Alkalische Phosphatase-Konjugat, spezifisch für den Fc-Teil, detektiert. Die durch die Alkalische Phosphatase katalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat wurde photometrisch anhand der Absorption des p-Nitrophenolats bei 405 nm im ELISA-Photometer Spectra-Max 250 dokumentiert.

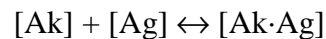
Zur Durchführung des Assays wurde in jede Vertiefung einer Reihe auf der Mikrotiterplatte jeweils 50 µl Antigenlösung (typischerweise: CD30A: 50 µg/ml in PBS/T; CD16B: 250 µg/ml in 10 mM Na-Acetat, pH 3,85) pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Antigenlösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen wurde jede Vertiefung für 1 Stunde mit jeweils 200 µl einer Blockierungslösung (3 % w/v BSA in PBS/T 0,5) inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Reihe zuvor nicht belegter Vertiefungen mit dergleichen Lösung inkubiert und im weiteren Verfahren als Kontrolle verwendet. Die Vertiefungen wurden daraufhin dreimal mit PBS/T gespült und ausgeklopft. Anschließend wurden je 100 µl der Lösung des jeweiligen Antikörpers in PBS/T in die erste Vertiefung einer Reihe pipettiert. In den darauffolgenden Vertiefungen jeder Reihe wurden zunächst 50 µl PBS/T vorgelegt. Ausgehend von der Proteinlösung der ersten Vertiefung wurden jeweils 50 µl Protein entnommen, in die darauffolgende Vertiefung pipettiert, gemischt und auf diese Weise eine Verdünnungsreihe in PBS/T hergestellt. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurde wiederum dreimal mit PBS/T gespült.

Für den Nachweis des gebundenen Fab-Fragments bzw. monoklonalen Antikörpers wurde das entsprechende Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat 1:1000 in PBS/T verdünnt und

zu je 50 µl pro Vertiefung zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS/T und zweimal mit PBS gespült. Schließlich wurden jeweils 50 µl 0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat gelöst in AP-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 M NaCl, 5 mM MgCl₂) zupipettiert. Die Platte wurde in das auf 25 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt, und nach 5 minütiger Äquilibration wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min aufgezeichnet.

Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten mittels ELISA

Für die Antikörper/Antigen Komplexbildung wurde eine einfache, monovalente Gleichgewichtsreaktion zwischen dem auf der Mikrotiterplatte adsorbierten Antigen (Ag) und dem in einer Verdünnungsreihe zupipettierten Antikörper (Ak) zugrunde gelegt:



Die Dissoziationskonstante ist als $K_D = [\text{Ak}] \cdot [\text{Ag}] / [\text{Ak}\cdot\text{Ag}]$ definiert. Hierbei bezeichnet [Ak] die Konzentration des umkomplexierten Antikörpers, [Ag] die Konzentration des nicht an den Antikörper gebundenen Antigens und [Ak·Ag] die Konzentration des Antikörper/Antigen-Komplexes. Setzt man – anhand der Bilanzgleichungen für die bimolekulare Komplexbildung – die Konzentrationen $[\text{Ag}] = [\text{Ag}]_{\text{tot}} - [\text{Ak}\cdot\text{Ag}]$ und $[\text{Ak}] = [\text{Ak}]_{\text{tot}} - [\text{Ak}\cdot\text{Ag}]$ mit $[\text{Ag}]_{\text{tot}}$ als Gesamtkonzentration des eingesetzten Antigens und $[\text{Ak}]_{\text{tot}}$ als Gesamtkonzentration des Antikörpers bei dem jeweiligen Titrationsschritt, so ergibt sich unter der Annahme, daß $[\text{Ak}]_{\text{tot}} \gg [\text{Ak}\cdot\text{Ag}]$, d. h. $[\text{Ak}]_{\text{tot}} \approx [\text{Ak}]$, der Anteil an komplexiertem Protein zu

$$[\text{Ak}\cdot\text{Ag}] = \frac{[\text{Ag}]_{\text{tot}} \cdot [\text{Ak}]_{\text{tot}}}{K_D + [\text{Ak}]_{\text{tot}}} \quad (2)$$

Durch Auftragen der Anfangsgeschwindigkeiten der gemessenen Absorptionsänderungen (in $\Delta A/\Delta t$ in $10^{-3}/\text{min} = \text{mOD}/\text{min}$) gegen die jeweilige Proteinkonzentration der Verdünnungsstufe ($[\text{Ak}]_{\text{tot}}$: Konzentration des zupipettierten Antikörpers) und Anpassung der erhaltenen Kurve mit Hilfe des Computerprogrammes "Kaleidagraph" gemäß Gleichung (2) wurden die Parameter K_D sowie $[\text{Ag}]_{\text{tot}}$ (entsprechend dem asymptotischen Maximalwert von $\Delta A/\Delta t$) bestimmt (Voss & Skerra, 1997).

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung des in *E. coli* produzierten CD30-Antigens erfolgte mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (MALDI-TOF = *Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation – Time of Flight*; Zenobi & Knochenmuss, 1998) des Typs Biflex III (Bruker) und wurden freundlicherweise von F. J. Winkler, TU München

durchgeführt. Das Verfahren ermöglicht die zerstörungsfreie Überführung von Proteinmolekülen in die Gasphase nach Kokristallisation mit einer sublimierbaren Matrix, in diesem Fall α -Cyano-4-hydroxycimtsäure, die ein Absorptionsmaximum bei 337 nm aufweist. Durch gepulstes Einstrahlen von Licht eines N_2 -Lasers mit einer Wellenlänge von 337 nm kommt es zur Sublimation der Matrixmoleküle, wobei auch die Proteinmoleküle freigesetzt und schließlich im Spektrometer entsprechend ihres Molmasse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) aufgetrennt werden können. Die Eichung der Massenskala erfolgte mit Hilfe eines Proteins bekannter Molmasse (wt-BBP mit kalkulierter Masse = 21009,35 im Falle des CD30A).

Für die Messungen wurden 100 μ l des Proteins in Mikrodialysiereinheiten (10 kDa MWCO) gegen 2 l Millipore[®] Wasser dialysiert. 5 μ l dieser 10 μ M Proteinlösung wurden mit demselben Volumen einer gesättigten α -Cyano-4-hydroxycimtsäure-Lösung in 66 % v/v Acetonitril, 1 % v/v Trifluoressigsäure gemischt. Anschließend wurden jeweils 0,5 μ l dieser Lösung in die Vertiefungen des Probenträgers pipettiert, im Luftstrom getrocknet und in das Spektrometer eingesetzt.

Die Spektren wurden durch Akkumulation von jeweils 200 bis 280 Datensätzen im linearen Betriebsmodus des Detektors bei einer Abschwächung des Laserlichtes von 42 – 44 % erhalten. Die Beschleunigungsspannung betrug 19 kV und wurde mit einer Verzögerungszeit von 45 μ s nach Ende des Laserpulses angelegt. Die Masse der untersuchten Proteinmoleküle wurde anhand der m/z -Skala jeweils als Signal für das einfach positiv geladene Molekülion ermittelt.

2.6.2 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Für die quantitative Analyse der Bindung eines Antikörpers (Analyt) an sein Antigen (Ligand) wurde das BIACORE X System in Verbindung mit dem CM-5 *Sensorchip* verwendet (BIACORE, Uppsala, Sweden). Über die Carboxyl-Funktion der Carboxydextran-Matrix dieses kommerziell erhältlichen Probenträgers wurden die gentechnisch hergestellten Antigene CD16B und CD30A mittels Amin-Kopplung kovalent an der *Sensorchip*-Oberfläche immobilisiert, und ihre Interaktion mit Antikörpern bzw. -fragmenten in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen wurden daraufhin in Echtzeit gemessen. Das mit einem Rechner und der *BIAcoreX Control Software* (Version 2.1) gesteuerte System gestattet den kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch anwählbare Kanäle über die *Sensorchip*-Oberfläche, so daß entweder Laufpuffer aus einem Reservoir oder die zu untersuchenden (Protein-)Lösungen über die Probenschleife geleitet werden können.

Kovalente Immobilisierung von rekombinanten Proteinen auf der *Sensorchip*-Oberfläche

Für die effiziente kovalente Beladung ist eine Anreicherung des Proteins durch ionische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Carboxydextran-Oberfläche des CM5-Sensorchips essentiell (*Pre-concentration Effect*). Deshalb wurde das jeweilige Antigen für die

Immobilisierung in einem Puffer appliziert, bei dessen pH-Wert das Protein positiv geladen vorlag. Im Falle des CD16B- (pI = 6,9) und CD30A-Antigenfragments (pI = 4,6) wurde dazu ein 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 3,8 verwendet. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 50 µg/ml.

Die Aktivierung der Carboxydextran-Oberfläche erfolgte durch Derivatisierung mit 35 µl einer 1:1 Mischung von 0,2 M EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid als Hydrochlorid) und 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid), wodurch N-Hydroxysuccinimidester auf der *Sensorchip*-Oberfläche generiert werden. Daraufhin wurden 35 µl des zu immobilisierenden Proteins auf Kanal Nr. 2 appliziert, wobei die kovalente Immobilisierung des Antigens durch Ausbildung von Amidbindungen zwischen seinen freien Aminogruppen (hauptsächlich Lysin-Seitenketten) und den Carboxygruppen der *Sensorchip*-Oberfläche. Nach Absättigung verbliebener NHS-Estergruppen durch Injektion von 35 µl 1 M Ethanolamin war die Chip-Oberfläche für Bindungsanalysen bereit. Kanal 1 diente zur Kontrolle und wurde nur aktiviert und blockiert, ohne Immobilisierung von Protein.

Alle Messungen wurden bei 25 °C und einem kontinuierlichen Pufferfluß von 5 µl/min durchgeführt. Als Laufpuffer und zur Lösung der verwendeten Proteine wurde sterilfiltrierter und entgaster PBS/P-Puffer (PBS mit 0,005 % Detergenz P-20) benutzt. Für eine Interaktionsanalyse wurden 100 µl des rekombinanten Antikörperfragments mit einer definierten Konzentration in die in Reihe geschalteten Kanäle injiziert und danach durch kontinuierlichen Pufferfluß für 10 Minuten nachgewaschen. Durch Injektion von 10 µl 1 mM NaOH wurde die Oberfläche des *Sensorchips* regeneriert und es konnte eine weitere Messung unter Verwendung einer anderen Konzentration des Antikörperfragments erfolgen. Die Aktivität des immobilisierten Antigens wurde durch die Behandlung mit NaOH nicht beeinträchtigt. Dies zeigte die exakte Übereinstimmung von Sensorgrammen aus sechs hintereinander durchgeführten Injektions-Regenerations-Zyklen (100 µl 100 nM muHRSc bzw. muA9 Fab-Fragment).

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten können die Meßkurven einer kinetischen oder einer Gleichgewichtsanalyse unterzogen werden (Übersicht in Huber *et al.*, 1999). Bei ersterer werden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) durch Anpassung der Meßkurven an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der *BIAevaluation Software* (Version 3.0) bestimmt. Die Dissoziationskonstante (K_D) ergibt sich aus dem Quotienten k_{off} / k_{on} .

Bei der Gleichgewichtsanalyse wird die Dissoziationskonstante durch die Analyse der Gleichgewichtsphase einer Meßkurve bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt (Neri *et al.*, 1996). Ein wesentlicher Vorteil der Analyse des thermodynamischen Gleichgewichts ist, daß die Meßkurven im Gegensatz zur kinetischen Analyse nicht angepaßt werden müssen und unabhängig von Massentransporteffekten sind. Das gemessene Bindungssignal (in *Resonance Units*, RU) des mit Antigen belegten Kanals 2 wurde um das Hintergrund-Signal des

unbelegten Kontrollkanals 1 mit Hilfe der *BIAevaluation Software* (Version 3.0) korrigiert. Die Bindungssignale unter Gleichgewichtsbedingungen wurden anschließend gegen die entsprechende eingesetzte Konzentration des Antikörperfragments aufgetragen und die erhaltenen Punkte durch nicht-lineare Regression unter Verwendung von Gleichung (2) angepaßt (Voss & Skerra, 1997). Auf diese Weise wurde die Dissoziationskonstante (K_D) für die Bindung eines Antikörpers bzw. -fragments an das jeweilige Antigen bestimmt.

2.7 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE, PEPTIDESORT sowie der Sequenzeditor SEQED aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) eingesetzt.

Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen erfolgte mit Hilfe des Programms Insight II (Version 95.0.3, MSI/Biosym Technologies) an einer Indigo 2-Workstation der Firma Silicon Graphics.

Die graphische Auswertung von Meßwerten erfolgte mit Hilfe des Programms Kaleidagraph (Abelbeck). Die nicht-lineare Regression wurde unter der Option *General Curve Fit* mit Gleichung (2) durchgeführt. Die anzupassenden Parameter wurden dazu mit den Variablen m_1 bis m_2 substituiert und folgender Ausdruck für die Konzentration des Antikörper/Antigen-Komplexes in ELISA und BIAcore Bindungsexperimenten erhalten: $[Ag \cdot Ak] = m_0 * m_1 / (m_2 + m_0)$ mit $[Ak]_{tot} = m_0$, $[Ag]_{tot} = m_1$, $K_D = m_2$ (siehe Abschnitt 2.5.2).

Gele aus der SDS-PAGE wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert und das erhaltene Bild bloß hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert.

Sequenz- und Strukturdaten von Proteinen wurden unter Verwendung folgender im *World Wide Web* zugänglicher Datenbanken erhalten:

Protein Data Bank TM	http://www.rcsb.org/pdb
ExPASy Molecular Biology Server	http://www.expasy.ch
KabatMan (Martin, 1996)	http://www.bioinf.org.uk/abs
The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest	http://www.immuno.bme.nwu.edu

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung funktioneller Fragmente des CD30- und CD16-Antigens in *E. coli* und deren funktionelle Analyse

Die Gewinnung von funktionellen Fragmenten des CD30- und CD16-Antigens in homogener Form war die Voraussetzung für die Charakterisierung, Humanisierung und Optimierung der Bindungseigenschaften des anti-CD30 (HRS3) und anti-CD16 (A9) Fab-Fragments.

3.1.1 Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren, Produktion und Reinigung der Subdomäne ECD2 des CD30-Antigens

Das mature CD30 mit 120 kDa hat eine Länge von 578 Aminosäuren, wovon 362 auf die extrazelluläre Domäne und 28 bzw. 188 auf die Transmembran bzw. Cytosolische Domäne entfallen (Dürkop *et al.*, 1992). Die aminoterminal Subdomäne ECD1 des muren Proteins (AS 27-157; Bodmer *et al.*, 2002) umfaßt drei cysteinreiche Domänen (CRD) mit insg. 18 Cysteinresten, die carboxyterminale Subdomäne ECD2 (AS 207-332) besteht aus zwei CRD mit insg. 14 Cysteinresten. Die zwei zusätzlichen Cysteinreste in Subdomäne ECD2 sind auf eine nur teilweise Duplikation der Subdomäne ECD1 zurückzuführen.

Die gentechnische Herstellung der gesamten ECD schien aufgrund der zahlreichen Cysteinreste nicht erfolgversprechend, weshalb lediglich ein Fragment mit dem vom HRS3 Antikörper erkannten Epitop produziert werden sollte. Da die Lage dieses Epitops in der ECD jedoch unbekannt war, wurde zunächst die Lösungsmittelzugänglichkeit (*Solvent Accessibility*) der Aminosäuren in der extrazellulären Domäne mit Hilfe des Programms "*% accessible residues*" (Janin, 1979) des ExPASy Molecular Biology Servers (www.expasy.org) untersucht. Ziel war es, die Lage von exponierten Regionen zu identifizieren, um Anhaltspunkte über die mögliche Position von Epitopen zu bekommen. Die Analyse zeigte, daß die Lösungsmittelzugänglichkeit im Durchschnitt bei der Subdomäne ECD2 höher ist als bei ECD1. Ebenso wiesen die Aminosäurereste 185 bis 206 und 333 bis 357 eine verglichen zu ECD1 höhere Lösungsmittelzugänglichkeit auf. Anhand dieser Untersuchungen wurden insgesamt vier Fragmente der Subdomäne ECD2 für die gentechnische Herstellung ausgewählt, die jeweils die gesamte ECD2 und unterschiedlich lange flankierende amino- und carboxyterminale Aminosäurebereiche enthielten (Abb. 5):

Fragment CD30A (AS 185-335) enthält vor der ECD2 einen flankierenden 22 Aminosäuren langen N-terminalen Bereich, der Teil der Linkersequenz zwischen ECD1 und ECD2 ist, und endet unmittelbar am C-Terminus der ECD2.

Fragment CD30B (AS 185-357) umfaßt zusätzlich eine C-terminale Region von 25 Aminosäuren, die die extrazelluläre Domäne mit der Transmembrandomäne verbindet. Fragment CD30C (AS 206-335) umschließt präzise den Bereich der ECD2.

Fragment CD30D (AS 206-357) enthält zusätzlich denselben C-terminalen Bereich wie Fragment CD30B.

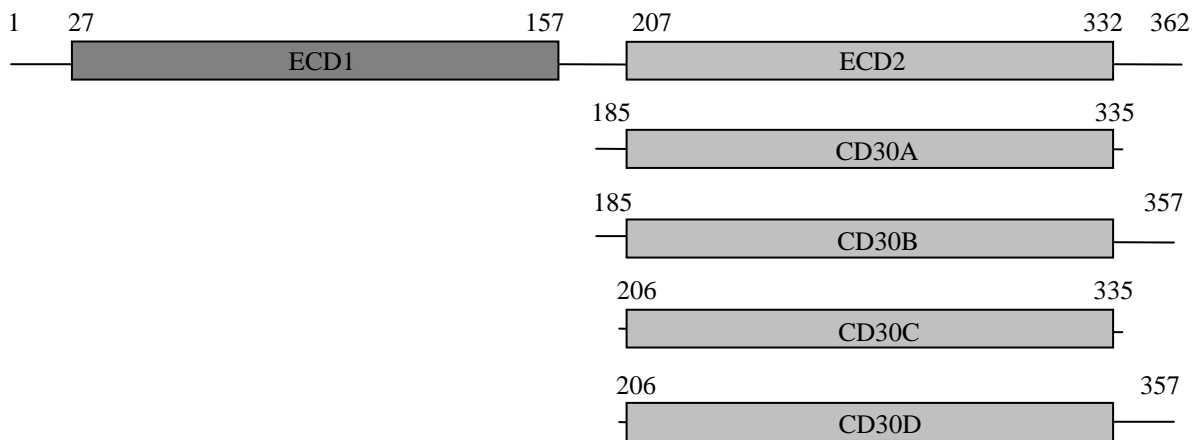


Abbildung 5: Schematische Darstellung der extrazellulären Domäne des CD30-Antigens mit den beiden Subdomänen ECD1/ECD2 und der gentechnisch hergestellten Fragmente CD30A-D. Die Zahlen oberhalb der Schemazeichnungen geben die Aminosäurepositionen an. Nähere Erläuterung im Text.

Für die bakterielle Produktion dieser vier verschiedenen Fragmente wurden die entsprechenden Genabschnitte als Fusion mit der OmpA-Signalsequenz (Movva *et al.*, 1980) auf dem Vektor pASK111 kloniert, was die Sekretion der Antigenfragmente in das Periplasma von *E. coli* ermöglichte. Unter den oxidativen Bedingungen dieses Zellkompartiments sollten sich die Disulfidbindungen der rekombinanten Antigenfragmente ausbilden können. Bei der Translokation des rekombinanten Proteins über die innere Membran der Bakterienzelle wird das Signalpeptid abgespalten, so daß das mature rekombinante Protein aus dem periplasmatischen Zellextrakt isoliert und über das an den C-Terminus fusionierte *Strep*-tag (Skerra & Schmidt, 2000) gereinigt werden kann. Gleichzeitig ermöglichte diese Fusionsstrategie den immunchemischen Nachweis des rekombinanten Proteins über sein Affinitätsanhängsel.

Die cDNA für die vollständige extrazelluläre Domäne des CD30-Antigens stand auf dem Plasmid pVL1392 zur Verfügung (Dr. C. Renner, Universitätsklinik des Saarlandes).

Die Genabschnitte für die vier Fragmente wurden mit den Primerkombinationen CD30ForwI / CD30BackI (Fragment CD30A), CD30ForwI / CD30BackII (Fragment CD30B), CD30ForwII / CD30BackI (Fragment CD30C) und CD30ForwII / CD30BackII (Fragment CD30D) sowie dem Plasmid pVL1392 als Matrize durch PCR unter Verwendung der *Pfu* DNA-Polymerase amplifiziert (Abb. 6). Die Genfragmente wurden anschließend über die Restriktionsschnittstellen *Bsa*I und *Eco*47III auf dem Vektor pASK111 kloniert.

Abbildung 6: Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von CD30 (Dürkop *et al.*, 1992) mit den für die Klonierung der Fragmente CD30A-D verwendeten Oligodesoxynukleotiden (Bezeichnung in Klammern; Erläuterung im Text). Die Numerierung der Nukleotidsequenz ist analog zu Dürkop *et al.* (1992), die Numerierung der Aminosäuresequenz bezieht sich dagegen auf das mature CD30-Protein. Die als ECD2 bezeichnete Subdomäne der extrazellulären Domäne umfaßt die Aminosäuren 207 bis 332 (unterstrichen). Zusätzlich ausgewählte N- und C-terminal flankierende Bereiche zu ECD2 sind gebrochen unterstrichen. Die über die Oligodesoxynukleotide CD30ForwI und CD30ForwII eingefügte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *BsaI* ist unterstrichen (Pfeile markieren die Schnittstelle). Ebenfalls unterstrichen ist das über die Oligodesoxynukleotide CD30BackI und CD30BackII eingeführte Serin-Kodon AGC am 5'-Ende (siehe Text). Nukleotide in Kleinschreibung kennzeichnen Mutationen, die für die Einführung der Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen erforderlich waren.

Mit Hilfe der Primer CD30ForI bzw. CD30ForII wurde dazu am 5'-Ende die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *BsaI* eingefügt. Mit den Primern CD30BackI bzw. CD30BackII wurde am 3'-Ende ein glattes Ende mit dem Serin-Kodon AGC erzeugt. Die singuläre Erkennungssequenz für die glatte Enden erzeugende Restriktionsendonuklease *Eco47III* befindet sich in der für das *Strep*-tag kodierenden Sequenz des Expressionsvektors pASK111. Durch enzymatische Hydrolyse mit *Eco47III* wird diese Sequenz zwischen dem Kodon für den aminoterminalen Serinrest (AGC) des *Strep*-tags und dem folgenden Kodon für Alanin (GCT) getrennt. Da die Strukturgene für die CD30-Antigenfragmente an ihren 3'-Enden für einen Serinrest kodierten, konnten diese direkt mit der für das *Strep*-tag kodierenden Sequenz fusioniert werden.

Aus jeweils 10 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *XbaI* und *HindIII* analysiert. Die bei diesem Verdau erzeugten Fragmente (CD30A: 564 bp; CD30B: 630 bp; CD30C: 501 bp; CD30D: 567 bp) umfaßten die OmpA- und die Gensequenz für das jeweilige CD30-Antigenfragment zusammen mit dem *Strep*-tag. Von jeweils zwei positiven Klonen wurde die korrekte DNA-Sequenz des Inserts durch Sequenzierung mit den Primern F83 und PR1 bestimmt. F83 hybridisierte mit der Sequenz des Vektors pASK111 im Bereich der Sequenz für das bakterielle Signalpeptid und diente zur Sequenzierung des 5'-terminalen Bereichs des CD30-Genfragments. PR1 wurde zur Sequenzierung des 3'-terminalen Bereichs der größeren Genfragmente verwendet, da dieses Oligodesoxynukleotid mit dem kodierenden Strang des Vektors jenseits der Schnittstelle von *HindIII* hybridisiert. Die jeweiligen Plasmide wurde als pASK111-CD30A bis D bezeichnet (Abb. 7).

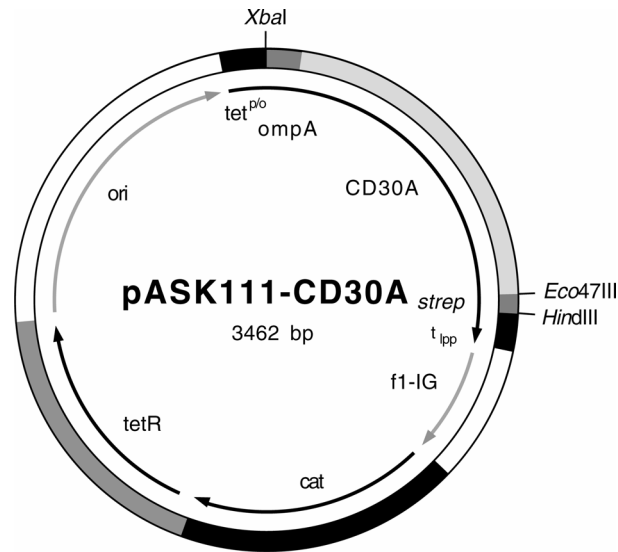


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pASK111-CD30A. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (tet^{P^o}) für ein Fusionsprotein aus der bakteriellen OmpA-Signalsequenz, dem CD30A-Antigenfragment und dem *Strep*-tag-Affinitätsanhängsel. Diese Transkriptionseinheit wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lp}) beendet. Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressor-Gens (*tetR*) gewährleistet, welches als zweites Element in einem dicistronischen Operon hinter dem Gen der Chloramphenicolacetyltransferase (*cat*, Chloramphenicol-Resistenz) angeordnet ist. *ori* und *f1-IG* bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen *f1*. *Eco47III*, *HindIII* und *XbaI* bezeichnen die Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen.

In den konstruierten Expressionsvektoren stehen die Strukturgene für die CD30-Antigenfragmente unter der Transkriptionskontrolle des stringent regulierten *tet*-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994b). Dadurch wird die Basalsynthese eines unter Umständen toxischen Fremdgens im Vergleich zu anderen Promotor/Operator-Systemen sehr niedrig gehalten.

Die bakterielle Produktion der vier verschiedenen CD30-Antigenfragmente erfolgte im 2 l-Maßstab im *E. coli*-Stamm JM83 wie unter Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben. Die Genexpression der rekombinanten CD30-Antigenfragmente wurde durch Einstellen einer aTc Konzentration von 200 µg/l induziert. Nach dreistündiger Induktion befanden sich die Zellen im Übergang zur stationären Phase, ohne Anzeichen auf Zellyse. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (OD_{550} zum Zeitpunkt der Ernte: zwischen 1,0 und 1,1) und die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die daraus mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot analysiert (ohne Abbildung). Es zeigte sich, daß die Fragmente CD30B und CD30D nur im Western-Blot mittels Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen werden konnten und somit nur in geringen Mengen in *E. coli* hergestellt wurden ($< 1 \mu\text{g/L}$ Kulturmedium; $OD_{550} = 1$). Lediglich das CD30A- und CD30C-Fragment wurden in ausreichender Menge in *E. coli* produziert, um sie auf einem Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel als Banden

sichtbar zu machen. Die Ausbeute an CD30C-Fragment betrug 20 µg/L Kulturmedium (OD₅₅₀ = 1). Das CD30A-Fragment dagegen wurde von *E. coli* in für weitere Arbeiten ausreichender Menge produziert (100 µg pro Liter Kulturmedium und OD₅₅₀ = 1). Die genaue Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel zeigte, daß bei Abwesenheit eines Reduktionsmittels zahlreiche oligomere Formen des CD30A-Antigenfragments auftraten (Abb. 8, Spur 1 und 3), die durch Reduktion größtenteils in das Monomer überführt werden konnten. Mittels Gelfiltration konnten diese Oligomere und weitere kontaminierende Proteine abgetrennt werden. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel mit der Fraktion des monomeren CD30A-Antigenfragments (Abb. 8, Spur 2 und 4) waren in Abwesenheit eines Reduktionsmittels immer noch zwei Banden bei 20 kDa und 25 kDa zu erkennen, die als Form 1 bzw. Form 2 bezeichnet wurden. Die kompaktere Form 1 wies – verglichen mit dem reduzierten CD30A-Antigenfragment mit einer definierten Bande bei 28 kDa – eine drastisch erhöhte elektrophoretische Mobilität auf, die auf die vollständige Ausbildung der 7 Disulfidbrücken innerhalb der Polypeptidkette schließen ließ. Die Anwesenheit der weniger kompakten Form 2 deutete darauf hin, daß ein kleinerer Teil (10 %) des rekombinanten CD30A-Antigenfragments in nicht korrekt gefaltetem Zustand vorlag. Eine Abtrennung dieser Form vom korrekt gefalteten Protein durch wiederholte Gelfiltration war nicht möglich. Sowohl im reduzierten als auch nicht reduzierten Zustand weist das CD30A-Protein mit einer theoretisch berechneten Molmasse von 16692 Da eine verminderte elektrophoretische Mobilität auf. Der durch MALDI-Massenspektrometrie bestimmte Wert von 16683 ± 11 g/mol bestätigte die berechnete Masse für das monomere CD30A-Antigenfragment innerhalb der Meßgenauigkeit.

Die Ko-Überexpression der Proteindisulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC analog zum Vorgehen im Fall der bakteriellen Produktion des apoRBP (Schmidt *et al.*, 1998; Müller & Skerra, 1993) hatte weder einen Einfluß auf die Ausbeute an CD30A noch auf das Verhältnis der beiden Formen 1 und 2 zueinander.

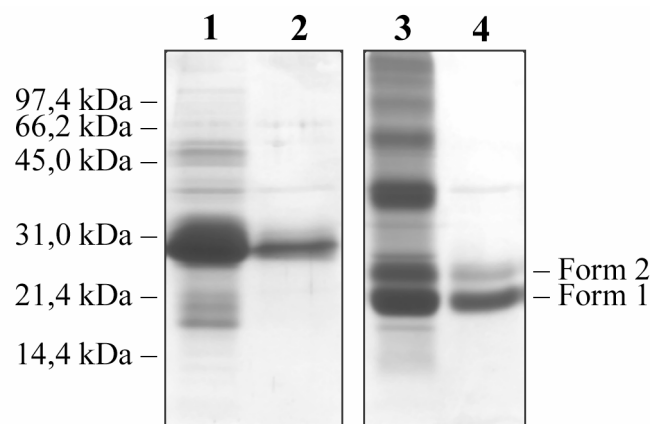


Abbildung 8: SDS-PAGE des mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigten CD30A-Proteins. *E. coli* JM83/pASK111-CD30A wurde im 2 l-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das CD30A-Protein mittels Streptavidin-

Affinitätschromatographie isoliert. In Spur 1 und 3 ist jeweils eine Probe einer Eluatfraktion aus der Streptavidin-Affinitätschromatographie aufgetragen. Die Spuren 2 und 4 zeigen das mittels Gelfiltration weiter gereinigte CD30A-Protein. In den Spuren 1 und 2 wurden die Proben reduzierend aufgetragen, in den Spuren 3 und 4 nicht reduzierend. Die Protein-Banden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Aufgrund der zu erwartenden höheren Ausbeute wurde für das CD30A-Antigenfragment ein Fermentationsverfahren etabliert. Hierfür wurde ein Laborfermenter-System, das homöostatische Wachstumsbedingungen gewährleistete, in Kombination mit einem *Fed-Batch* Fermentationsverfahren verwendet, wie es bereits zur funktionellen Produktion von Antikörperfragmenten erfolgreich eingesetzt wurde (Schiweck & Skerra, 1995).

Für die Fermentation wurde der *E. coli* Wildtyp-Stamm W3110 eingesetzt, der mit dem Expressionsvektor pASK111-CD30A transformiert worden war. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in einem Reaktionsgefäß mit 8 l Nutzvolumen und einsetzbarem Rührwerk mit Umwurfzylinder (siehe. Abschnitt 2.3.1.2). Während des Fermentationsverlaufs wurden durch die integrierte Meß- und Regeltechnik die Temperatur bei 25 °C, der pH-Wert bei 7,5 und der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei mindestens 30 % Luftsättigung konstant gehalten. Als Medium wurde ein Mineralsalz-Medium mit 20 % Glucose, essentiellen Spurenelementen und Chloramphenicol verwendet. Dabei war Glucose die einzige Kohlenstoffquelle, während die zur pH-Wertregulierung zugesetzte 12,5 %ige (w/v) Ammoniaklösung gleichzeitig als Stickstoffquelle diente. Die Zellen zeigten ein reproduzierbares exponentielles Wachstum und hatten nach ca. 20 h Stunden einen OD_{550} -Wert von 20 erreicht, bei dem die Induktion mit 0,5 mg aTc pro Liter Kultur erfolgte. Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen typischerweise bei $OD_{550} = 32$ geerntet und die periplasmatische Proteinfraktion präpariert. Die Reinigung erfolgte mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie und Gelfiltration. Die Ausbeute aus einer Fermentation im 8 l-Maßstab betrug 5,1 mg.

3.1.2 Konstruktion geeigneter Expressionsvektoren, Produktion und Reinigung von Fragmenten der extrazellulären Domäne des Fc γ -Rezeptors IIIa (CD16)

Der Fc γ -Rezeptor IIIa ist ein glycosyliertes Transmembranprotein auf NK-Zellen. Die extrazelluläre Domäne des CD16-Antigens mit insgesamt 190 Aminosäuren faltet sich zu zwei immunglobulinartigen Domänen des C2-Typs mit jeweils einer Disulfidbrücke (Abb. 9). Für die gentechnische Herstellung des CD16-Antigens wurden folgende drei Fragmente der extrazellulären Domäne (Sequenz nach Perussia & Ravetch, 1991) ausgewählt und die entsprechenden Genabschnitte wiederum als Fusionsprotein mit der OmpA-Signalsequenz und dem *Strep*-tag auf dem Vektor pASK111 kloniert:

CD16A-Fragment (AS 3-165) umfaßt beide immunglobulinartigen Domänen.

Nach Publikation der Kristallstruktur von Sondermann *et al.* (2000) wurde ersichtlich, daß die C-terminale immunglobulinartige Domäne erst an Position 171 endet. Deshalb wurde das

CD16B-Fragment (AS 3-176) konstruiert, das um einen C-terminalen β -Faltblattstrang verlängert ist.

Das CD16C-Fragment (AS 89-176) umfaßt lediglich die C-terminale immunglobulinartige Domäne (Abb. 9). Die Auswahl nur der carboxyterminalen Domäne für die Produktion basiert auf der Vermutung, daß die Bindung des anti-CD16 Antikörpers (Hombach *et al.*, 1993) in derselben Region erfolgt wie die des Fc-Teils von IgGs (persönliche Mitteilung Dr. Renner, Universitätsklinik des Saarlandes).

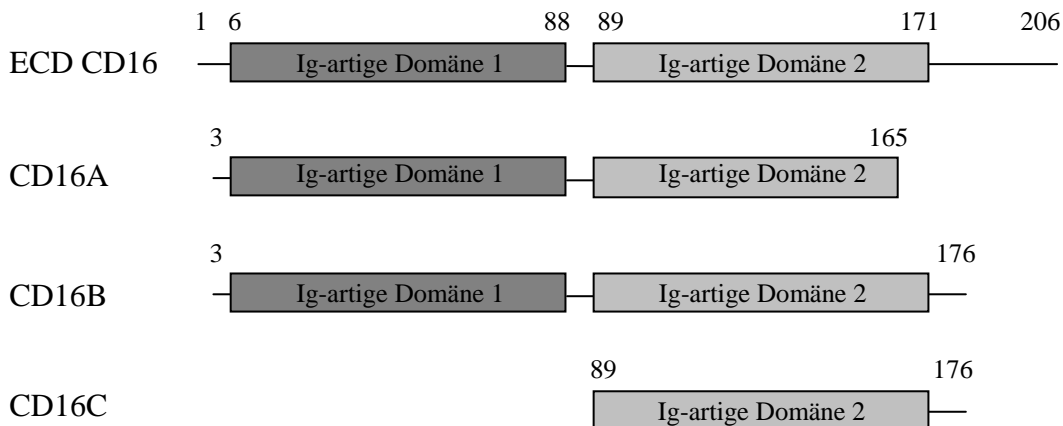


Abbildung 9: Schematische Darstellung der extrazellulären Domäne des CD16 mit den beiden immunglobulinartigen Domänen 1 und 2 sowie der gentechnisch hergestellten Fragmente CD16A-C. Die Zahlen oberhalb der Schemazeichnungen geben die Aminosäurepositionen an. Nähere Erläuterung im Text.

Die cDNA (Perussia & Ravetch, 1991) für die gesamte extrazelluläre Domäne des CD16-Antigens stand auf dem Vektor pCRII-CD16-2 zur Verfügung (Dr. C. Renner, Universitätsklinik des Saarlandes). Mit Hilfe der Primerkombinationen CD16Forw / CD16BackI (CD16A-Fragment), CD16Forw / CD16BackII (CD16B-Fragment) sowie CD16ForwII / CD16BackII (CD16C-Fragment) wurden mit pCRII-CD16-2 als Matrize die entsprechenden Genfragmente mittels PCR amplifiziert (Abb. 10). Durch die Primer CD16Forw und CD16ForwII wurde am 5'-Ende jeweils eine *EagI* Restriktionsschnittstelle eingefügt, die kompatibel zu der *BsaI*-Schnittstelle auf dem Vektor pASK111 war. Mit den Primern CD16BackI und CD16BackII wurde am 3'-Ende ein glattes Ende mit dem Serincodon AGC erzeugt, welches mit der *Eco47III*-Schnittstelle auf pASK111 kompatibel war (siehe Abschnitt 3.1.1). Das amplifizierte PCR-Fragment wurde anschließend mit *EagI* geschnitten und mit dem größeren Fragment des Vektors pASK111 ligiert, das zuvor mit den Restriktionsenzymen *BsaI* und *Eco47III* erhalten worden war.

Nach Transformation des *E. coli* Stammes JM83 wurde aus jeweils 10 Klonen die Plasmid-DNA präpariert und durch Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *XbaI* und *HindIII* analysiert. Die bei diesem Verdau erzeugten Fragmente (CD16A: 600 bp; CD16B: 630 bp; CD16C: 378 bp) umfaßten die Gensequenz für das OmpA-Signalpeptid und für das jeweilige

CD16-Antigenfragment mit dem *Strep*-tag-Affinitätsanhängsel. Von jeweils 2 positiven Klonen wurde die korrekte Sequenz des Inserts durch Sequenzierung mit den Primern F83 und PR1 bestimmt. Die Plasmide wurde als pASK111-CD16A bis C bezeichnet (analog Abb. 7).

Die bakterielle Produktion der drei unterschiedlichen CD16-Antigenfragmente erfolgte im 2 l-Maßstab im *E. coli*-Stamm JM83 wie unter Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben. Die Genexpression der rekombinanten CD16-Antigenfragmente wurde durch Einstellen einer aTc Konzentration von 200 µg/l induziert. Nach dreistündiger Induktion befanden sich die Zellen im Übergang zur stationären Phase, ohne Anzeichen auf Zellyse. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (OD₅₅₀ zum Zeitpunkt der Ernte: zwischen 0,9 und 1,1) und die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die daraus mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurden anschließend unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot analysiert (ohne Abbildung). Für das CD16A-Fragment konnte dabei sowohl im SDS-Polyacrylamidgel als auch im Western-Blot (Nachweis des *Strep*-tags mittels Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat) eine Bande bei 25 kDa beobachtet werden. Die Gesamtausbeute betrug 30 µg. Ebenso konnte für das CD16B-Fragment eine Bande bei 21 kDa im SDS-Polyacrylamidgel und Western-Blot nachgewiesen werden. Die Gesamtausbeute war jedoch mit 100 µg dreimal so hoch wie für das CD16A-Fragment. Dieser Unterschied ist vermutlich auf den zusätzlichen β -Faltblattstrang zurückzuführen, der die C-terminale Domäne komplementiert. Das CD16C-Fragment konnte dagegen lediglich im Western-Blot nachgewiesen werden. Die Gesamtausbeute lag bei weniger als 1 µg.

Abbildung 10: Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von CD16 (Perussia & Ravetch, 1991) mit den für die Klonierung der Fragmente CD16A-C verwendeten Oligodesoxynukleotiden (Bezeichnung in Klammern; Erläuterung im Text). Die extrazelluläre Domäne des muren CD16-Antigens umfaßt die Aminosäuren 1 bis 190 und faltet sich zu zwei immunglobulinartigen Domänen (Domäne 1: 6-88; Domäne 2: 89-171; EMBL-Datenbank; Domänengrenzen sind durch Pfeile gekennzeichnet). Die mit den Oligodesoxynukleotiden CD16ForwI und CD16ForwII eingefügte Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *EagI* ist jeweils unterstrichen. Ebenfalls unterstrichen ist das über die Oligodesoxynukleotide CD16BackI und CD16BackII eingeführte Serin-Kodon AGC am 5'-Ende. Nukleotide in Kleinschreibung kennzeichnen Mutationen, die für die Einführung der Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen erforderlich waren.

Aufgrund der höheren Ausbeuten wurde das CD16B-Fragment für die weitere Verwendung ausgewählt. Die anschließende Charakterisierung des CD16B-Fragments mittels SDS-PAGE zeigte, daß in Abwesenheit eines Reduktionsmittels das CD16B-Fragment eine deutlich erhöhte Mobilität mit einer Bande bei 21 kDa aufwies, was in etwa der berechneten Molmasse von 20820 Da entsprach (Abb. 11). Dies deutet auf eine durch die Ausbildung der Disulfidbrücken hervorgerufene kompaktere Form der Polypeptidkette hin.

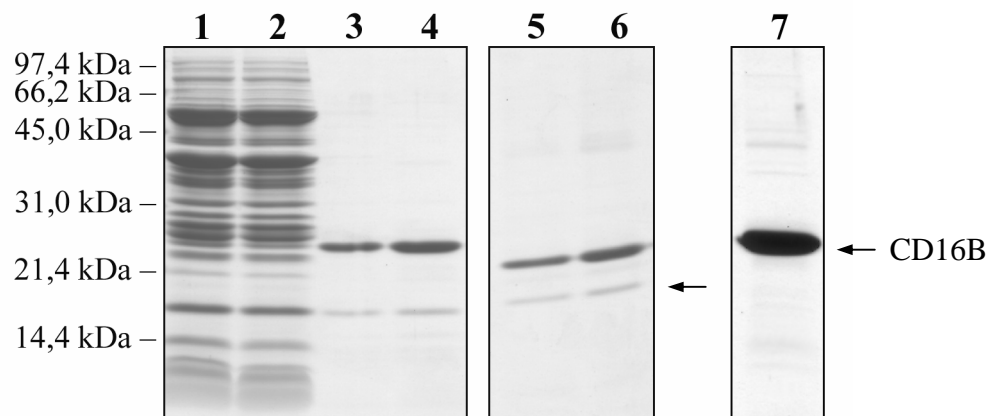


Abbildung 11: SDS-PAGE-Analyse der Einschnitt-Reinigung des rekombinanten CD16B-Antigenfragments. *E. coli* JM83/pASK111-CD16B wurde im 2 l-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das CD16B-Protein mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert. Auf ein 12 %iges SDS Polyacrylamidgel wurde eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2) sowie zweier aufeinanderfolgender Eluatfraktionen der Streptavidin-Affinitätschromatographie (Spur 3 und 4) im reduzierten Zustand aufgetragen. Auf Spur 5 und 6 sind die gleichen Eluatfraktionen ohne vorhergehende Reduktion aufgetragen worden. Bei der Bande bei 17 kDa (mit Pfeil markiert) handelt es sich vermutlich um das Skp-Protein. Auf Spur 7 ist eine Probe des in 10 mM Natriumacetat-Lösung pH 3,85 resolubilisierten CD16B-Fragments unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Protein-Banden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Für die Produktion größerer Proteinmengen wurde für das CD16B-Fragment analog zum CD30A (siehe Abschnitt 3.1.1) ein Fermentationsverfahren etabliert. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm W3110, der mit pASK111-CD16B transformiert worden war, verwendet. Die Zellen zeigten reproduzierbar exponentielles Wachstum und hatten nach ca. 22 h Stunden einen OD₅₅₀-Wert von 20 erreicht, bei dem die Induktion der Genexpression mit 0,5 mg aTc

pro Liter Kultur eingeleitet wurde. Nach 2,5 Stunden wurden die Zellen bei einer OD_{550} von 35 geerntet und die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Reinigung aus dem periplasmatischen Proteinextrakt erfolgte mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Bei Aufkonzentrierung der Eluatfraktionen aus der Streptavidin-Affinitätschromatographie in Makrosep™ 10K Konzentratoren (10 kDa MWCO) wurde wiederholt Aggregation des rekombinanten CD16B-Antigens auf der Konzentratormembran beobachtet. Durch Spülen der Membran mit 100 μ l 10 mM Natriumacetat-Lösung pH 3,85 konnte ein Großteil des Proteins jedoch wieder in Lösung gebracht werden. Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 11, Spur 7) zeigte, daß das rekombinante CD16B-Antigen in 95 % reiner Form vorlag, und daß ein kontaminierendes Protein mit 17 kDa (vermutlich das Skp-Protein) durch diesen ungewöhnlichen Reinigungsschritt von Aggregation und Solubilisierung abgereichert werden konnte. Die Gesamtausbeute betrug 2,1 mg.

3.1.3 Funktionelle Analyse der gentechnisch hergestellten Antigenfragmente mittels ELISA und Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Die Funktionalität der bakteriell produzierten Antigenfragmente CD30A und CD16B wurde mittels ELISA überprüft. Hierfür wurde die Bindungswechselwirkung des bereits in klinischen Studien eingesetzten bispezifischen anti-CD30/anti-CD16 monoklonalen Mausantikörpers (HRS3/A9 MAk; Hombach *et al.*, 1993) mit den beiden gentechnisch produzierten Antigenfragmenten untersucht. Die Funktionalität des CD30A-Antigenfragments wurde zusätzlich mit Hilfe des monoklonalen anti-CD30 Mausantikörpers (HRS3 MAk; Hombach *et al.*, 1999) analysiert.

Im Falle des CD30A-Antigens konnten sowohl beim bispezifischen HRS3/A9 MAk als auch beim bivalenten HRS3 MAk konzentrationsabhängige Bindungssignale im ELISA beobachtet werden, wenn die Mikrotiterplatte mit dem rekombinanten Antigen beladen war (Abb. 12A). Die Signalintensitäten waren über den gesamten Konzentrationsbereich bei beiden Antikörpern vergleichbar, während das als Kontrolle eingesetzte BSA mit beiden Antikörpern keinerlei Wechselwirkung zeigte. Mit diesem Experiment konnte nicht nur nachgewiesen werden, daß das CD30A-Antigenfragment funktionell in *E. coli* produziert worden war, sondern daß es auch dasjenige Epitop trug, welches vom HRS3-Arm des bispezifischen A9/HRS3 MAk (apparente $K_D = 4,6 \pm 0,5$ nM) bzw. vom bivalenten HRS3 MAk (apparente $K_D = 3,7 \pm 0,2$ nM) erkannt wird.

Für den analogen immunchemischen Nachweis der Bindung des bispezifischen Antikörpers an das rekombinante CD16B-Antigenfragment mußten im Vergleich dazu wesentlich höhere Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden (Abb. 12B). Die erhaltenen konzentrationsabhängigen Bindungssignale wiesen dennoch auf eine spezifische Bindung des HRS3/A9 MAk an das rekombinante CD16B-Antigen hin (apparente $K_D = 26,3 \pm 10,6$ nM).

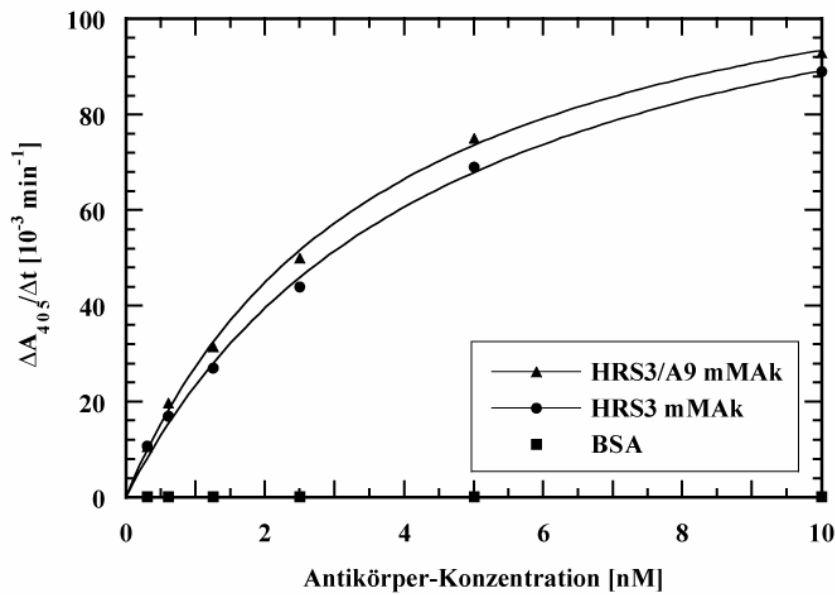
Die niedrigen Bindungssignale sind möglicherweise auf eine geringere Immobilisierungseffizienz des CD16B-Antigenfragments in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zurückzuführen, obwohl im Vergleich zu CD30A eine fünfmal so hohe CD16A-Antigenkonzentrationen eingesetzt wurde. Der bivalente HRS3 MAk zeigte keine Affinität zu dem rekombinanten CD16B-Antigen.

Daraus war zu schließen, daß das rekombinante CD16B-Antigenfragment dasjenige Epitop trug, welches von der A9-Bindungsstelle des bispezifischen Antikörpers erkannt wird. Jedoch war diese Fragestellung beim CD16B-Antigenfragment mit nahezu der gesamten ECD weniger kritisch als bei CD30A, wo nur ein Teil der ECD exprimiert wurde.

Zur Ermittlung der Dissoziationskonstanten zwischen dem bispezifischen HRS3/A9 MAk und dem rekombinanten CD30A- bzw. CD16B-Antigenfragment wurde die Methode der Oberflächen-Plasmonresonanzspektroskopie verwendet, mit der Bindungsereignisse mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden können (Huber *et al.*, 1999). Dazu muß einer der Bindungspartner auf einem *Sensorchip* immobilisiert werden (Ligand), während die zweite, als Analyt bezeichnete Proteinspezies in flüssiger Phase angeboten wird. Die Antigenfragmente (der "Ligand") wurden durch Carboxydiimidkopplung über die primären Amingruppen der Lysinseitenketten an die Carboxymethyloberfläche eines sogenannten CM-5 *Sensorchips* (O'Shannessy *et al.*, 1992) kovalent immobilisiert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Immobilisierung ist die vorherige Anreicherung der Antigenfragmente auf der negativ geladenen *Sensorchip*-Oberfläche. Hierzu wurden die Antigenfragmente in einem Puffer mit einem sauren pH von 3,85 eingesetzt, bei dem sowohl CD30A (pI = 4,5) und CD16B (pI = 6,6) positiv geladen vorlagen. Bei beiden Immobilisierungen wurde eine gute Anreicherung der Antigene auf der *Sensorchip*-Oberfläche erzielt. Es konnten im Falle des CD30A-Antigenfragments 1700 RUs ($\cong 0,1 \text{ pmol/mm}^2$) immobilisiert werden, bei CD16B 3000 RUs ($\cong 0,19 \text{ pmol/mm}^2$). Die schlechteren Kopplungsausbeuten bei CD30A sind vermutlich auf den sauren pI-Wert und auf die geringe Anzahl von Lysinresten (5 im Vergleich zu 11 bei CD16B) zurückzuführen.

Bei der Applikation einer Konzentrationsreihe des bispezifischen HRS3/A9 Mausantikörpers wurde im Fall des rekombinanten CD30A-Antigenfragments eine Komplexbildung in Form eines Anstiegs des Resonanzsignals bis zum Ende der Injektionsphase beobachtet (Überlagerung der Einzelmessungen in Abb. 13A). Die Meßkurven wiesen jeweils eine rasche Assoziations- und nach Injektionsende eine langsame Dissoziationsphase auf. Eine Gleichgewichtsphase wurde nur annähernd erreicht.

A



B

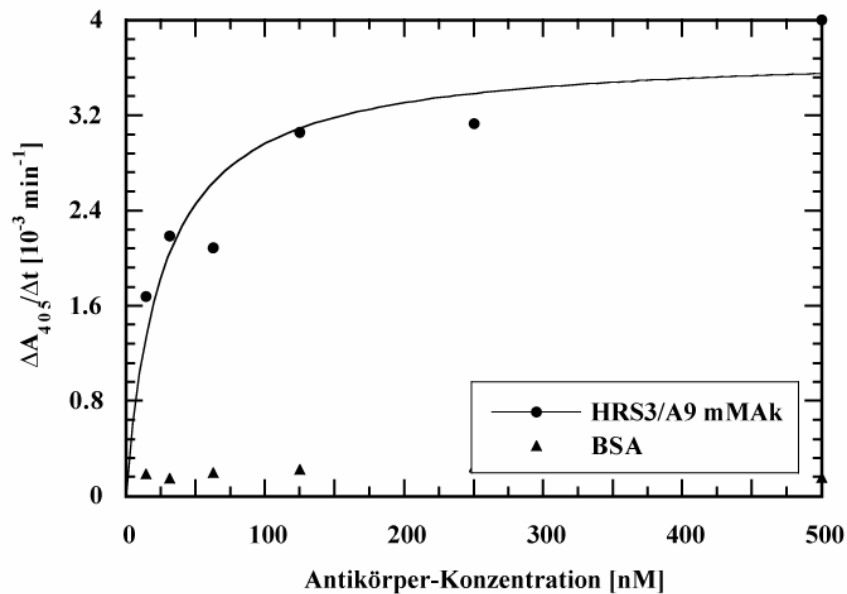


Abbildung 12: ELISA-Experimente zur Untersuchung der Funktionalität der gentechnisch hergestellten Antigenfragmente CD30A und CD16B. (A) Die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem CD30A-Protein (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/T) beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurden Vertiefungen nur mit BSA beschichtet. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des anti-CD30 monoklonalen HRS3-Antikörpers und des bispezifischen anti-CD30/anti-CD16 monoklonalen HRS3/A9-Antikörpers appliziert. Der gebildete Komplex aus Antigenfragment und Antikörper wurde nach Waschschritten mit anti-Maus-Ig-Alkalische Phosphatase-Konjugat durch enzymkatalysierte Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des eingesetzten Antikörpers aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" nach Gleichung (2). Hier ist lediglich die unspezifische Bindung des HRS3 MAk an BSA dargestellt; zur unspezifischen Bindung des HRS3/A9 MAk an BSA siehe (B). (B) Wie (A), unter Verwendung des CD16B-Antigenfragments (250 $\mu\text{g/ml}$ in 10 mM Natriumacetat, pH 3,85) und des bispezifischen HRS3/A9 Antikörpers. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurden Vertiefungen erneut nur mit BSA beschichtet.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten können die Meßkurven einer kinetischen oder einer Gleichgewichtsanalyse unterzogen werden (Übersicht in Huber *et al.*, 1999). Bei ersterer werden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) durch Anpassung der Meßkurven an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Hilfe der BIAevaluation Software bestimmt. Diese Auswertung ergab für k_{on} einen Wert von $2,8 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ und für k_{off} $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Aus dem Quotienten $k_{\text{off}} / k_{\text{on}}$ errechnet sich eine Dissoziationskonstante von 35 nM ($\chi^2 = 68$). Diese ist um Faktor 13 höher als der mittels kinetischer Analyse bestimmte Wert von 2,6 nM (Renner *et al.*, 2001) unter Verwendung eines CD30-Immunadhäsins als Ligand.

Bei der Gleichgewichtsanalyse wird die Dissoziationskonstante durch die Analyse der Gleichgewichtsphase einer Meßkurve bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt (Neri *et al.*, 1996). Ein wesentlicher Vorteil der Analyse des thermodynamischen Gleichgewichts ist, daß die Meßkurven im Gegensatz zur kinetischen Analyse nicht angepaßt werden müssen und unabhängig von Massentransporteffekten sind. Da im Falle der Bindung des bispezifischen HRS3/A9-Mausantikörpers an das CD30A keine Gleichgewichtsphase erreicht wurde, wurden in erster Näherung die maximalen Bindungssignale gegen die jeweilige Konzentration des bispezifischen Antikörpers aufgetragen und die daraus erhaltene Bindungskurve durch nichtlineare Regression angepaßt (Abb. 13B). Für die Affinität zwischen der HRS3-Bindungsstelle und dem rekombinanten CD30A-Antigenfragment ergab sich damit ein K_D -Wert von $82 \pm 9 \text{ nM}$. Dieser ist im Vergleich zum kinetisch bestimmten K_D -Wert um Faktor 3 höher.

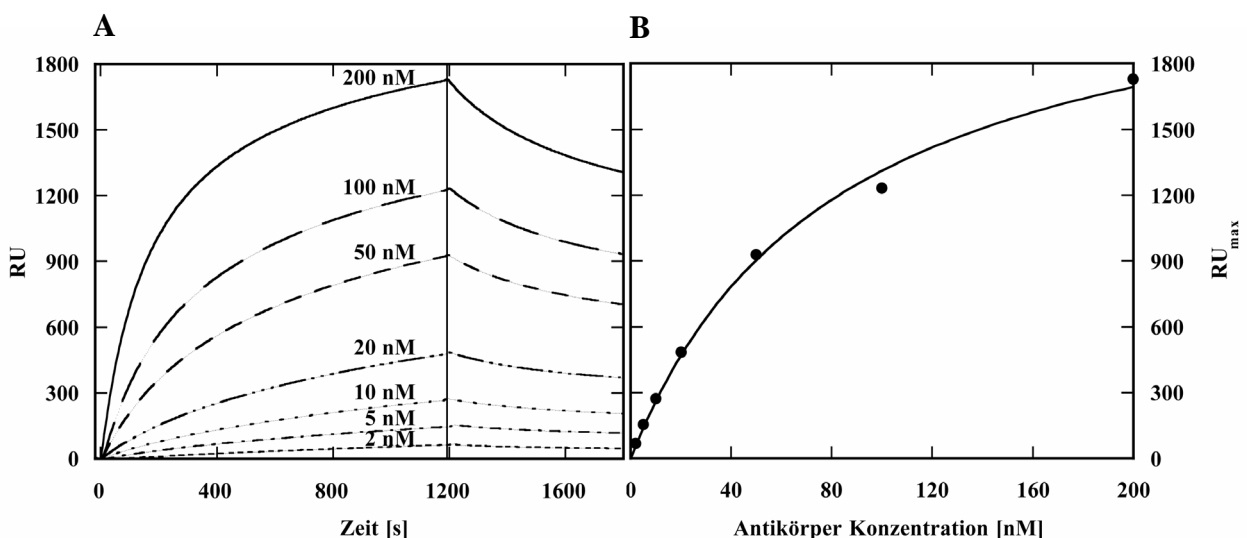


Abbildung 13: Quantitative Analyse der Affinität zwischen dem bispezifischen HRS3/A9-Mausantikörper und dem rekombinanten CD30A-Antigenfragment durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Auf der Carboxydextran-Oberfläche wurde das CD30A-Antigenfragment mittels Amin-Kopplung wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben kovalent immobilisiert, was zu einer Zunahme des Resonanzsignals um 1700 RU führte. Der Flußkanal 1 diente als Referenz. (A) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe. Jeweils 100 μl einer 2, 5, 10, 20, 50, 100 bzw. 200 nM Lösung des bispezifischen HRS3/A9-Mausantikörpers in PBS/P wurden

bei einer Flußrate von 5 µl/min auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle des *Sensorchips* appliziert. Die Bindungssignale im Meßkanal wurden um die geringfügigen unspezifischen Signale im Referenzkanal korrigiert und hier in einem Diagramm überlagert dargestellt. Die senkrechte Linie am Ende der Inkjektionsphase bei ca. 1200 s kennzeichnet die maximalen Resonanzsignale. Die Dissoziationsphase wurde anschließend für ca. 500 s dokumentiert. (B) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von 82 ± 9 nM.

Die Messung der Bindung des bispezifischen-HRS3/A9 Mausantikörpers an das rekombinante CD16B-Antigenfragment wurde von Marton Fogarasi in derselben Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls eine konzentrationsabhängige Komplexbildung und die Auswertung ergab eine Dissoziationskonstante von 320 ± 42 nM (persönliche Mitteilung). Die Applikation des HRS3 mMak als Kontrolle auf die mit CD16B-Antigen beschichtete *Sensorchip*-Oberfläche zeigte keine nennenswerten Bindungssignale.

Mit Hilfe der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie konnte somit ebenfalls gezeigt werden, daß die in *E. coli* hergestellten Antigenfragmente in funktioneller Form vorlagen und diejenigen Epitope trugen, welche von den entsprechenden Bindungsarmen des bispezifischen HRS3/A9-Mausantikörpers erkannt werden.

3.2 Bakterielle Produktion, Reinigung und funktionelle Charakterisierung der partiell humanisierten (chimären) Fab-Fragmente muHRS3c und muA9

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten (O. Gresch, 1997; C. Schäfer, 1998) wurden die Gensequenzen für die variablen Domänen der murinen (mu) HRS3- und A9- monoklonalen Antikörper (Hombach *et al.*, 1993) auf dem Expressionsvektor pASK102 kloniert. Dieser ermöglicht die Produktion von chimären Fab-Fragmenten mit humanen konstanten und murinen variablen Domänen. Am C-Terminus der leichten Immunglobulinkette befand sich das *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel mit einem zusätzlichen freien Cysteinrest, der die Kopplung zweier Fab-Fragmente mittels einer Disulfidbrücke gestattete. Beide Fab-Fragmente konnten in *E. coli* im 2 l-Maßstab mit Ausbeuten von 150 µg für das chimäre muHRS3 Fab-Fragment bzw. 20 µg für das chimäre muA9 Fab-Fragment produziert werden. Im Fall des Fab-Fragments HRS3 wurde der ungewöhnliche Tyrosinrest an der Position 23 der V_L -Domäne gegen den an dieser Stelle normalerweise hochkonservierten Cysteinrest ausgetauscht, so daß sich die intrachenare Disulfidbindung in dieser Immunglobulindomäne ausbilden konnte. Das Ergebnis dieser Maßnahme war eine Steigerung der Ausbeute an funktionellem Fab-Fragment – nun HRS3c genannt – etwa um den Faktor 3.

Zur näheren Charakterisierung der Bindungseigenschaften der beiden rekombinanten Fab-Fragmente sollten diese zunächst ohne freien Cysteinrest produziert werden. Hierzu wurden Expressionsvektoren konstruiert, die die Produktion von chimären Fab-Fragmenten einerseits

mit dem Hexahistidin- und andererseits mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel – als alternative Reinigungsstrategie – ermöglichen.

3.2.1 Konstruktion von Expressionsvektoren für die bakterielle Produktion des muHRS3c Fab-Fragments

Für die Synthese des einfachen chimären muHRS3c Fab-Fragments als Fusionsprotein mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel wurde ausgehend von dem Vektor pASK102-HRS3c (Schäfer, 1998) der Expressionvektor pASK88-HRS3c konstruiert. Die auf diesen pASK-Vektoren vorhandenen singulären und standardisierten Restriktionsschnittstellen ermöglichen den einfachen Austausch der Gensequenzen von Immunglobulindomänen. Durch Schnitt mit den Restriktionsenzymen *BstEII* und *NcoI* wurde aus dem Plasmid pASK102-HRS3c die Gensequenz für die humane konstante Domäne der schweren Immunglobulinkette (C_H -Domäne) inklusive des *Strep*-tags II herausgeschnitten und das Vektorfragment (4255 bp) mit dem Fragment der humanen C_H -Domäne mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (349 bp) ligiert, das zuvor durch Schnitt mit denselben Restriktionsenzymen aus pASK88-D1.3 (Fiedler & Skerra, 1999; Skerra, 1994a) isoliert worden war. Die korrekte Zusammensetzung des Plasmids pASK88-HRS3c (Abb. 14) wurde durch Sequenzanalyse unter Verwendung des Oligodesoxynukleotids PR3 bestätigt, dessen Homologiebereich im Bereich der *SstI* Restriktionsschnittstelle innerhalb der Alkalischen Phosphatase-Signalsequenz lag.

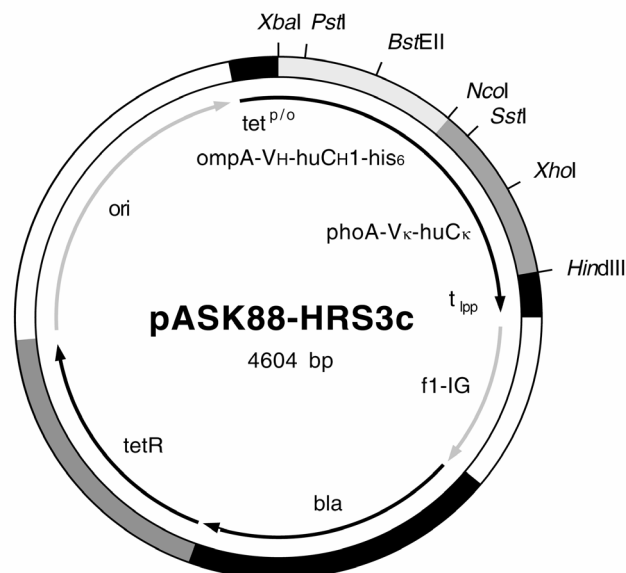


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pASK88-HRS3c, das für das chimäre muHRS3c Fab-Fragment, bestehend aus den variablen Domänen des murinen Antikörpers HRS3 und der $C_H1\gamma1$ - sowie der C_κ -Domäne des Menschen, kodiert. Die Strukturgene V_H - $C_H1\gamma1$ und V_κ - C_κ liegen zur Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* an ihren 5'-Enden fusioniert mit den bakteriellen Signalsequenzen des *Outer Membrane Protein A* (ompA) bzw. der Alkalischen Phosphatase (phoA) vor. Am 3'-Ende des Gens der schweren Kette befindet sich die kodierende Sequenz für ein Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (his_6). Die Abkürzung bla

bezeichnet das β -Lactamasegen, das Ampicillin-Resistenz vermittelt. Alle anderen Abkürzungen entsprechen denen in Abb. 7.

Erfahrungen bei der Herstellung anderer rekombinanter Proteine in *E. coli* hatten gezeigt, daß das Wachstum von Kulturen zur Produktion plasmidkodierter Fremdproteine v. a. bei Fermentationen mit zunehmendem Plasmidverlust der Zellen einhergeht (Zabriskie & Arcuri, 1986). Insbesondere bei Verwendung des Antibiotikums Ampicillin, das bereits durch kleine Mengen der β -Lactamase, die durch Zellyse ins Medium gelangt, abgebaut wird, kann kein hinreichender Selektionsdruck gegen plasmidfreie Zellen während einer längeren Kultivierungsphase aufrechterhalten werden (Corchero & Villaverde, 1997; Brösamle *et al.*, 2001).

Die Verwendung von Expressionsvektoren, die das Gen für die Chloramphenicol-Acetyltransferase konstitutiv exprimierten, sollte den Plasmidverlust in der Produktionskultur gering halten und so – verglichen mit der Verwendung von Ampicillin als Selektionsantibiotikum – zu einer erhöhten Ausbeute an rekombinantem Protein führen (Fiedler & Skerra, 2001). Deshalb wurden ebenfalls solche Vektoren zur Produktion des chimären muHRS3c Fab-Fragments konstruiert. Zu diesem Zweck wurde der gesamte Bereich zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Xba*I und *Hind*III aus pASK88-HRS3c herausgeschnitten (1511 bp) und mit dem ebenso geschnittenen Vektorfragment von pASK111 (2894 bp; Vogt & Skerra, 2001) ligiert. pASK111 ist analog zu pASK75 (Skerra, 1994b) aufgebaut, außer daß das Gen für die β -Lactamase (*bla*) gegen das für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (*cat*) ausgetauscht ist. Das Plasmid wurde als pASK116-HRS3c bezeichnet.

Zudem wurde ausgehend von dem Vektor pASK88-HRS3c das Plasmid pASK107-HRS3c konstruiert, welches für das chimäre muHRS3c Fab-Fragment mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel am C-Terminus der schweren Kette, diesmal allerdings ohne C-terminalen Cysteinrest kodiert. Aus pASK107-IN1 (Fiedler, 2002) wurde durch Schnitt mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*EII und *Nco*I das Strukturgen (361 bp) für die humane konstante Domäne der schweren Immunglobulinkette zusammen mit der Gensequenz für das *Strep*-tag II isoliert. Dieses wurde mit dem durch analogen Restriktionsverdau erhaltenen Vektorfragment von pASK88-HRS3c (4255 bp) ligiert. Der Austausch des *Strep*-tag II wurde durch DNA-Sequenzanalyse mit Hilfe des Primers PR3 bestätigt.

Ein entsprechender Expressionsvektor mit der Chloramphenicol- anstatt der Ampicillin-Resistenz wurde durch Umklonierung der gesamten für das chimäre muHRS3c Fab-Fragment mit dem *Strep*-tag II kodierenden Gensequenz in pASK111 hergestellt. Hierzu wurde der Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Hind*III von pASK107-HRS3c ausgeschnitten (1523 bp) und mit dem ebenso geschnittenen Vektorfragment von pASK111 (2894 bp) ligiert. Der erhaltene Vektor wurde als pASK125-HRS3c bezeichnet.

In allen konstruierten Expressionsvektoren stehen die Strukturgene für die leichte und schwere Immunglobulinkette unter der Kontrolle des *tet*-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994b). Für die Sekretion in den periplasmatischen Raum liegen die Strukturgene für die leichte und schwere Immunglobulinkette an ihren 5'-Enden mit den bakteriellen Signalsequenzen des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) bzw. der Alkalischen Phosphatase (PhoA) fusioniert vor. Mit aTc wird die Genexpression beider Immunglobulinketten induziert, wobei beide Polypeptidketten separat in den periplasmatischen Raum sekretiert werden. Nach Translokation der Polypeptidketten über die innere Membran der Bakterienzelle werden die Signalpeptide abgespalten. In dem vorherrschenden oxidierenden Milieu können sich die beiden Polypeptidketten falten, die intra- und interchenaren Disulfidbrücken ausbilden sowie die beiden Immunglobulinketten zum Fab-Fragment assoziieren (Skerra, 1989). Das korrekt gefaltete Fab-Fragment kann mit Hilfe des an den Carboxy-Terminus der schweren Immunglobulinkette fusionierten Affinitätsanhängsels aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert werden.

Aufgrund seiner guten Sekretionseigenschaften in Verbindung mit einer effizienten Faltung rekombinanter Proteine empfahl sich für die gentechnische Herstellung des chimären muHRS3c Fab-Fragments der *E. coli*-Stamm JM83 (Fiedler, 2002). Nach dessen Transformation mit den Expressionsvektoren pASK88-HRS3c, pASK116-HRS3c, pASK107-HRS3c und pASK125-HRS3c wurden Produktionskulturen im 2 l-Maßstab angesetzt. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde die Genexpression des Fab-Fragments durch Zugabe von 200 µg aTc pro L Kulturmedium für 3 h induziert. Das Zellwachstum in den Kulturen mit Chloramphenicolresistenz war gegenüber denen mit Ampicillin als Selektionsmarker etwas verlangsamt. Nach 3 h Induktion befanden sich alle Kulturen im Übergang zur stationären Wachstumsphase, wobei noch keine Zellyse zu beobachten war. Anschließend wurde jeweils die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Isolierung des chimären muHRS3c Fab-Fragments aus der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte mittels Metallchelate- bzw. Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Die Analyse der Eluatfraktionen durch SDS-PAGE (exemplarisch für die Kultur JM83/pASK88-HRS3c in Abb. 15) zeigte, daß sowohl durch Metallchelate- als auch durch Streptavidin-Affinitätschromatographie das Fab-Fragment zur Homogenität gereinigt werden konnte. In Anwesenheit des Reduktionsmittels wurde die interchenare Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Immunglobulinkette gespalten und die beiden Ketten waren als Banden mit gleicher Intensität bei 31 kDa bzw. 32 kDa sichtbar. Ohne Reduktionsmittel war eine einzelne Bande bei 50 kDa zu sehen, die dem Fab-Fragment mit der interchenaren Disulfidbrücke entsprach. Im Falle des chimären muHRS3c Fab-Fragments mit einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel konnte im Gegensatz zu dem mit Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe Abb. 32A, Spur 1, Abschnitt 3.3.1.3) im Polyacrylamidgel keine vollständige Auftrennung der beiden Immunglobulinketten erreicht werden, auch wenn

die Elektrophorese in Gegenwart von 6 M Harnstoff durchgeführt wurde (Skerra, 1994a). Die Ausbeute war mit 0,6 mg pro Liter Kulturmedium und einer Zelldichte von $OD_{550} = 1,2$ zum Zeitpunkt der Ernte bei allen vier Expressionsvektoren gleich.

Das chimäre muHRS3c Fab-Fragment scheint sowohl mit Hexahistidin- als auch mit *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel keinen toxischen Effekt auf den verwendeten *E. coli*-Stamm JM83 auszuüben. Aufgrund der identischen Ausbeuten bei Verwendung von Ampicillin oder Chloramphenicol als Selektionsmarker ist die Plasmidstabilität somit erfreulich hoch.

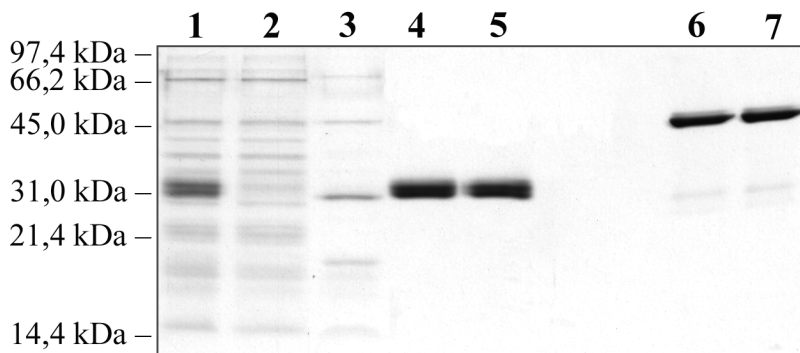


Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse der Einschrittreinigung des chimären muHRS3c Fab-Fragments mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie an einer Zn^{2+} /IDA-Sepharosematrix. *E. coli* JM83/pASK88-HRS3c wurde im 2 l-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraktion gewonnen und daraus das muHRS3c Fab-Fragment durch IMAC mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff wurde im reduzierten Zustand je eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2), sowie die Eluatfraktion von schwach an die Säule gebundenem Wirtsprotein (Spur 3) und zweier Eluatfraktionen von kompetitiv eluiertem, rekombinantem Protein (Spur 4 und 5) aufgetragen. Auf den Spuren 6 und 7 wurden die beiden Eluatfraktionen mit dem rekombinanten Protein zudem im nicht reduzierten Zustand aufgetragen.

3.2.2 Konstruktion von Expressionsvektoren für die bakterielle Produktion des muA9 Fab-Fragments

Die Gensequenzen für die variablen Domänen des murinen A9 Antikörpers lagen – analog zum muHRS3c Fab-Fragment – in Kombination mit humanen konstanten Domänen kloniert auf dem Vektor pASK102-A9 (Gresch, 1997) vor. Dieser ermöglichte, unter Verwendung von Ampicillin als Selektionsmarker, wiederum die Produktion eines chimären muA9 Fab-Fragments mit dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel und einem C-terminalen Cysteinrest. Expressionsversuche im 2 l-Maßstab mit *E. coli* JM83 zeigten, daß die Zellen bereits nach 2 h Induktionsdauer in eine stationäre Wachstumsphase eintraten und nach 2,5 h Eintritt von Zellyse zu beobachten war, was auf einen toxischen Effekt des chimären muA9 Fab-Fragments auf die *E. coli*-Zellen hindeutete. Die Ausbeute nach der Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie war mit etwa 20 µg pro Liter Kulturmedium bei einer Zelldichte OD_{550} von 0,9 zum Zeitpunkt der Zellernte extrem niedrig.

Für die Konstruktion eines Expressionsvektors, der für ein chimäres muA9 Fab-Fragment mit einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel kodierte, wurde eine zu dem muHRS3c Fab-Fragment analoge Klonierungsstrategie gewählt (siehe Abschnitt 3.2.1). Für die Konstruktion des Vektors pASK88-A9 wurde aus dem Vektor pASK102-A9 durch Schnitt mit den Restriktionsenzymen *BstEII* und *NcoI* die Gensequenz für die humane C_H1-Domäne mit dem *Strep*-tag II entfernt und das große Vektorfragment (4243 bp) isoliert. Dieses wurde mit dem Genfragment für die humane C_H1-Domäne mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel (349 bp), das durch Schnitt mit den Restriktionsendonukleasen *BstEII* und *NcoI* aus dem Vektor pASK88-D1.3 gewonnen wurde, ligiert. Nach Transformation von *E. coli* JM83 wurde die Plasmid-DNA von zwei Klonen präpariert und der Austausch des Affinitätsanhängsel durch DNA-Sequenzierung mit Hilfe des Primers PR3 bestätigt.

Für die Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments wurden zwei 2 l LB/Amp Kulturen mit *E. coli* JM83, transformiert mit dem Plasmid pASK88-A9, angeimpft. Nach 2 h Induktionsdauer ging die Kultur in eine stationäre Wachstumsphase über und nach 2,5 h traten erste Anzeichen von Zellyse auf. Daraufhin wurde die periplasmatische Proteinfraction präpariert und das rekombinante Protein mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie isoliert. Das gereinigte Protein zeigte bei der Analyse auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 16) im reduzierten Zustand zwei Banden mit gleicher Intensität bei 26 und 29 kDa, die der schweren bzw. leichten Immunglobulinkette entsprachen. In Abwesenheit eines Reduktionsmittels war eine einzige Bande bei 50 kDa sichtbar, die dem intakten Fab-Fragment mit der interchenaren Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Immunglobulinkette entsprach. Im Vergleich zur Verwendung von pASK102-A9 konnte die Ausbeute mit 40 µg pro Liter Kulturmedium und einer Zelldichte OD₅₅₀ = 0,9 zum Zeitpunkt der Ernte gesteigert und zudem ein höherer Reinigungsgrad mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie erzielt werden.

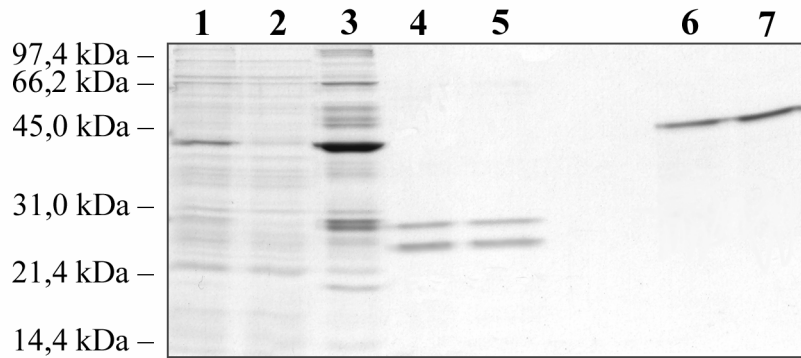


Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der Einschrittreinigung des chimären muA9 Fab-Fragments mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie an einer Zn^{2+} /IDA-Sepharosematrix. *E. coli* JM83/pASK88-A9 wurde im 2 x 2 l-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraktion gewonnen und daraus das muA9 Fab-Fragment durch IMAC mit einem Imidazolgradienten von 0 bis 300 mM isoliert. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff wurde im reduzierten Zustand je eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2), sowie die Eluatfraktion von schwach an die Säule gebundenem Wirtspolypeptid (Spur 3) und zweier Eluatfraktionen von kompetitiv eluiertem, rekombinantem Protein (Spur 4 und 5) aufgetragen. Auf den Spuren 6 und 7 wurden die beiden Eluatfraktionen mit dem rekombinanten Protein zudem im nicht reduzierten Zustand aufgetragen.

Für die Produktion größerer Mengen des chimären muA9 Fab-Fragments wurde die Fermentation basierend auf einer Vorschrift zur Herstellung rekombinanter Antikörperfragmente in *E. coli* (siehe Abschnitt 2.3.1.2; Schiweck & Skerra, 1995) durchgeführt. Als Produktionsstamm wurde *E. coli* JM83/F'(tet) (Schäfer, 1998) gewählt, der mit dem Plasmid pASK88-A9 transformiert wurde. Ein Vergleich der Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments in *E. coli* W3110 bzw. in JM83 im 2 l-Maßstab hatte bei *E. coli* W3110 eine stärkere Tendenz zur Zellyse gezeigt (Schäfer, 1998). *E. coli* JM83 fehlen jedoch die für die Synthese von Prolin aus Glutamat notwendigen Genprodukte ProA und ProB, so daß dieser Stamm in Glucose-Minimalmedium nicht kultiviert werden kann (Fiedler & Skerra, 2001). Deshalb wurde durch Konjugation von *E. coli* XL1 Blue und JM83 das F'-Plasmid transferiert, das die *proAB* Gene trägt (Schäfer, 1998).

Im Fall der mit dem Vektor pASK88-A9 transformierten *E. coli* JM83/F'-Zellen erreichte die Fermentationskultur (8 l) nach 17 h bei 25 °C eine OD_{550} von 18 und wies dabei exponentielles Wachstum auf (Abb. 17A). Nach zweistündiger Induktion der Fremdgen-Expression mit 500 µg aTc/l traten erste Anzeichen von Zellyse auf. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Zellernte betrug 27. Die periplasmatische Proteinfraktion wurde präpariert und das rekombinante Fab-Fragment mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie isoliert (Abb. 17B). In einem zweiten Reinigungsschritt mittels Gelfiltration (Abb. 17C; Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade) wurde das Protein schließlich zur Homogenität gereinigt, wie die Analyse mittels SDS-PAGE (Abb. 17D) zeigte. Die Gesamtausbeute lag bei 2,5 mg.

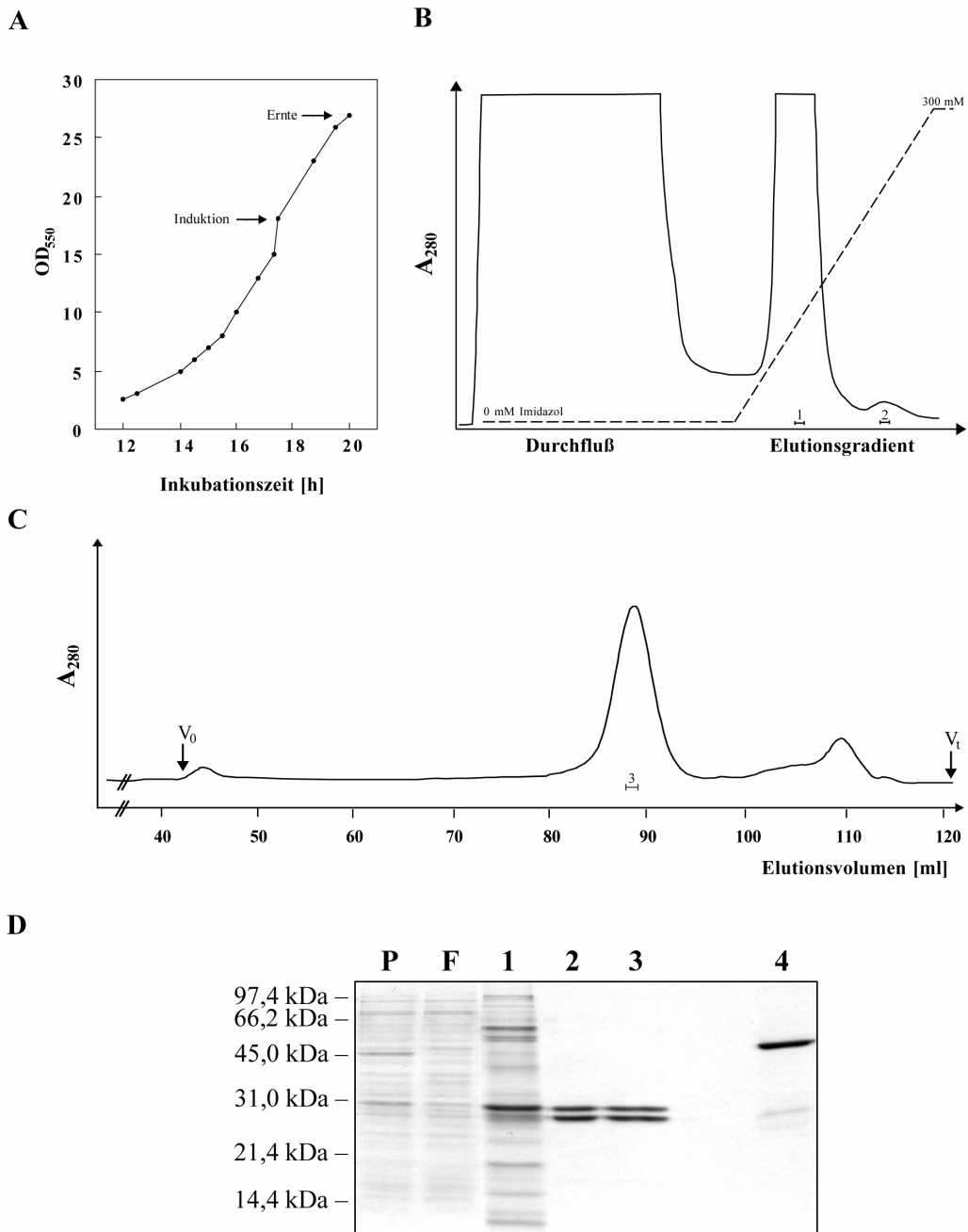


Abbildung 17: Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments durch JM83/F/pASK88-A9 im 8 L-Fermenter unter Verwendung eines Glucose/Mineralsalz-Medium mit Ampicillin als Antibiotikum. (A) Das Wachstum der Kultur wurde durch halbstündliche Messung der Optischen Dichte bei 550 nm dokumentiert. Die Expression der Gene für das muA9 Fab-Fragment wurde bei $OD_{550} = 18$ induziert und die Zellen nach 2,25 h Stunden nach Induktion mittels Zentrifugation geerntet. (B) Die Reinigung des muA9 Fab-Fragments aus dem periplasmatischen Proteinextrakt von (A) erfolgte durch IMAC. Die ansteigende Imidazolkonzentration im Elutionsgradienten von 0 bis 300 mM ist markiert. (C) In einem zweiten Reinigungsschritt mittels Gelfiltration wurde das muA9 Fab-Fragment zur Homogenität gereinigt. (D) Dokumentation der Reinigung auf einem 12 %igen SDS-Gel. Aufgetragen wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (P), des nicht an die IMAC-Säule gebundenen Proteins (F), der Elutionsfraktionen von schwach an die IMAC-Säule gebundenem Wirtsprotein (1) und kompetitiv eluiertem, rekombinantem Fab-Fragment (2) sowie des mittels Gelfiltration gereinigten Proteins (3). Diese Proben wurden mit 2-Mercaptoethanol-haltigem Auftragspuffer versetzt, was zur Trennung von schwerer und leichter Kette bei der Elektrophorese führte. In Spur 4 wurde eine Probe des durch Gelfiltration gereinigten Proteins unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen.

Für die Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel unter Verwendung der stringenteren Cam-Resistenz wurde ein zu pASK88-A9 analoger Expressionsvektor hergestellt, in dem lediglich die Gensequenz für die β -Lactamase gegen das Chloramphenicol-Acetyltransferasegen ausgetauscht war. Hierzu wurde die Genkassette für das chimäre muA9 Fab-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *Xba*I und *Hind*III aus pASK88-A9 herausgeschnitten (1499 bp) und in den ebenso geschnittenen Vektor pASK111 (2894 bp) inseriert. Nach Transformation von *E. coli* JM83 wurde aus zwei Klonen die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *Xba*I und *Hind*III auf die Anwesenheit der Genkassette für das Fab-Fragment überprüft. Der Vektor wurde als pASK116-A9 bezeichnet.

E. coli JM83 wurde mit diesem Vektor transformiert und eine Proteinproduktion im 2 l-Maßstab durchgeführt. Zum Vergleich diente der Vektor pASK88-A9 mit Ampicillin-Resistenz. Beide *E. coli*-Kulturen wurden bei 22 °C angezogen und bei $OD_{550} = 0,5$ mit 200 μ g/l aTc (Endkonzentration) induziert. Die Kultur mit *E. coli* JM83/pASK88-A9 wies dabei eine schnellere Zellteilungsrate auf als die mit JM83/pASK116-A9. Die stationäre Phase wurde im Falle von JM83/pASK88-A9 etwa 2 h nach der Induktion erreicht, und nach 2,5 h Induktionsdauer trat Zellyse auf. Die Kultur mit JM83/pASK116-A9 erreichte auch nach 3 h Induktionsdauer noch keine stationäre Phase. Die Zelldichte der Kultur JM83/pASK88-A9 lag mit $OD_{550} = 1,1$ etwa 20 % höher als die derjenigen mit JM83/pASK116-A9.

Das chimäre muA9 Fab-Fragment wurde jeweils mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert und eine Probe der Periplasmafraction sowie des gereinigten Fab-Fragments auf einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (ohne Abbildung). Der Vergleich zeigte, daß der Periplasmaaufschluß im Falle der Kultur JM83/pASK116-A9 wesentlich selektiver war und deutlich weniger cytosolische Proteine enthielt als bei JM83/pASK88-A9. Dies weist ebenso wie das Wachstumsverhalten auf eine verminderte Tendenz zur Zellyse bei Verwendung von Chloramphenicol als Resistenzmarker hin. Die Ausbeute an dem chimären muA9 Fab-Fragment konnte dadurch jedoch nur geringfügig gesteigert werden. Sie lag bei 60 μ g pro Liter Kulturvolumen und einer Zelldichte von $OD_{550} = 1$ zum Zeitpunkt der Ernte.

Desweiteren wurde versucht, durch gemeinsame Überexpression eines *E. coli*-eigenen periplasmatischen Faltungshelferproteins die Toxizität des chimären muA9 Fab-Fragments zu reduzieren und damit die Ausbeute zu steigern. Koexpression von Faltungshelferproteinen, z. B. des *E. coli* eigenen Chaperonsystems GroEL/S für die Produktion rekombinanter Proteine im Cytosol, einer Proteindisulfidisomerase oder der Peptidylprolyl-cis/trans-Isomerase für periplasmatische Expressionen (Übersicht in Cole, 1996), kann die Faltung rekombinanter Proteine unterstützen und damit die Ausbeute an funktionellem Protein erhöhen. Für die Produktion von Antikörperfragmenten im Periplasma von *E. coli* zeigte die Überexpression des periplasmatischen *Seventeen Kilodalton Proteins* (Skp) eine Verbesserung der

Faltungseffizienz und damit der Proteinausbeute (Mavrangelos *et al.*, 2001). Das periplasmatische Chaperon Skp ist normalerweise an der Faltung von äußeren Membranproteinen beteiligt (Harms *et al.*, 2001) und kann Toxizitätsprobleme mit rekombinanten Proteinen in *E. coli* reduzieren (Hayhurst & Harris, 1999).

Deshalb wurde ein Expressionsvektor konstruiert, der die Überexpression des periplasmatischen Faltungshelferproteins ermöglichte, in dem stromabwärts der Expressionskassette für das rekombinante Protein, die mit der *Hind*III Schnittstelle endet, zusätzlich das *skp*-Strukturgen inseriert wurde. Somit konnte gleichzeitig mit dem Fremdgen die Koexpression von Skp in der Art eines multicistronischen Operons unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators erfolgen. Zur Klonierung des *skp*-Strukturgens wurde chromosomale DNA aus dem *E. coli*-Stamm JM83 isoliert und ein entsprechendes DNA-Fragment durch PCR mit den beiden Oligodesoxynukleotiden Skp1 und Skp2 amplifiziert. Die beiden Primer schlossen das *skp*-Strukturgen einschließlich seines Signalpeptids und der Translationsinitiationssequenz ein (Abb. 18). Der Primer Skp1 wurde an seinem 5'-Ende so konstruiert, daß das PCR-Produkt dort die Erkennungssequenz AAGCTT der Restriktionsendonuklease *Hind*III trägt. Der Primer Skp2 dagegen erzeugte am 3'-Ende ein stumpfes Ende. Nach PCR-Amplifikation des *skp*-Gens wurde dieses mit *Hind*III geschnitten. Für die Insertion des PCR Produkts in den Vektor pASK111, wurde dieser zunächst mit dem Restriktionsenzym *Hind*III linearisiert. Durch Auffüllen der überstehenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I wurden glatte Enden erzeugt. Anschließend wurde mit dem Restriktionsenzym *Xba*I die Polylinkersequenz herausgeschnitten und dadurch ein Vektorrückgrat mit einem überhängenden und einem glatten Ende generiert. Durch Ligierung des mit *Hind*III geschnittenen PCR-Produktes (507 bp) mit diesem Vektorfragment (2894 bp) sowie der Polylinkersequenz (PL; 173 bp), die durch Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Hind*III (mit zwei überhängenden Enden) aus pASK111 isoliert worden war, wurde der Vektor pASK111-*skp* konstruiert (Abb. 19A). Von 8 Klonen wurden 3 mit dem erwarteten Restriktionsmuster durch Verdau mit *Xba*I und *Hind*III identifiziert. Durch DNA-Sequenzierung mit den Primern PR1 und F83, deren Homologiebereiche am 5'- bzw. 3'-Terminus der *multiple cloning site* im Vektor lagen, wurde die Sequenz des *skp*-Gens verifiziert.

HindIII

Skp1 CGAAAaagcttGGTAAGGAGTTTATTGTGAAAAAGTGG
 AAATGGCATGGTAAGGAGTTTATTGTGAAAAAGTGGTTATTAGCTGCAGGTCTCGGTTTA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TTTACCCTACCATTCCCAAATAACACTTTTTCACCAATAATCGACGTCCAGAGCCAAAT
 MetLysLysTrpLeuLeuAlaAlaGlyLeuGlyLeu

GCACCTGGCAACTTCTGCTCAGGCGGCTGACAAAATTGCAATCGTCAACATGGGCAGCCTG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CGTGACCGTTGAAGACGAGTCCGCGACTGTTTAAACGTTAGCAGTTGTACCCGTCGGAC
 AlaLeuAlaThrSerAlaGlnAlaAlaAspLysIleAlaIleValAsnMetGlySerLeu
 1→ 12
 TTCCAGCAGGTAGCGCAGAAAACCGGTGTTTCTAACACGCTGGAAAATGAGTTCAAAGGC
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 AAGGTCGTCCATCGCGTCTTTTGGCCACAAAGATTGTGCGACCTTTTACTCAAGTTTCCG
 PheGlnGlnValAlaGlnLysThrGlyValSerAsnThrLeuGluAsnGluPheLysGly
 32
 CGTGCCAGCGAACTGCAGCGTATGGAAACCGATCTGCAGGCTAAAATGAAAAGCTGCAG
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 GCACGGTCGCTTGACGTCGCATACCTTTGGCTAGACGTCGGATTTTACTTTTTCGACGTC
 ArgAlaSerGluLeuGlnArgMetGluThrAspLeuGlnAlaLysMetLysLysLeuGln
 52
 TCCATGAAAGCGGGCAGCGATCGCACTAAGCTGGAAAAAGACGTGATGGCTCAGCGCCAG
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 AGGTACTTTTCGCCCCTCGCTAGCGTGATTTCGACCTTTTCTGCACTACCGAGTCGCGGTC
 SerMetLysAlaGlySerAspArgThrLysLeuGluLysAspValMetAlaGlnArgGln
 72
 ACTTTTGCTCAGAAAGCGCAGGCTTTTGGAGCAGGATCGCGCACGTCGTTCCAACGAAGAA
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 TGA AACGAGTCTTTTCGCGTCCGAAAACCTCGTCCTAGCGGTGCAGCAAGGTTGCTTCTT
 ThrPheAlaGlnLysAlaGlnAlaPheGluGlnAspArgAlaArgArgSerAsnGluGlu
 92
 CGCGGCAAACTGGTTACTCGTATCCAGACTGCTGTGAAATCCGTTGCCAACAGCCAGGAT
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 GCGCCGTTTGACCAATGAGCATAGGTCTGACGACACTTTAGGCAACGGTTGTCGGTCTTA
 ArgGlyLysLeuValThrArgIleGlnThrAlaValLysSerValAlaAsnSerGlnAsp
 112
 ATCGATCTGGTTGTTGATGCAAACGCCGTTGCTTACAACAGCAGCGATGTAAGACATC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
 TAGCTAGACCAACTACGTTTTCGCGCAACGAATGTTGTCGTCGCTACATTTTCTGTAG
 IleAspLeuValValAspAlaAsnAlaValAlaTyrAsnSerSerAspValLysAspIle
 132
 ACTGCCGACGTACTGAAACAGGTTAAATAA
 481 -----+-----+-----+-----+ 510
 TGACGGCTGCATGACTTTGTCCAATTTATT
 GCTGCATGACTTTGTCCAATTTATTC **Skp2**
 ThrAlaAspValLeuLysGlnValLysEnd

Abbildung 18: DNA- und korrespondierende Aminosäuresequenz des Skp-Proteins nach Holck & Kleppe (1988). Die Shine-Dalgarno Sequenz und das GTG-Startkodon sind in der Nukleotid-Sequenz unterstrichen. Die ersten 20 Aminosäuren bilden die Signalsequenz für die Sekretion in das Periplasma von *E. coli*. Die erste Aminosäure des maturen Skp-Proteins (Alanin) ist markiert. Je nach Orientierung sind die für die Klonierung verwendeten Oligodesoxynukleotide Skp1 und Skp2 ober- (5'→3'-Orientierung) bzw. unterhalb (3'→5'-Orientierung) der Gensequenz wiedergegeben. In der Nukleotidsequenz sind die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen in Kleinbuchstaben dargestellt.

Ein Vektor, der die angestrebte multicistronische Transkriptionseinheit bestehend aus der Genkassette für das chimäre muA9 Fab-Fragment aus pASK88-A9 und dem *skp*-Strukturgen trug, wurde mit dem Plasmid pASK116-A9-skp (Abb. 19B) realisiert. Dazu wurde das nach Spaltung mit *XbaI* und *HindIII* erhaltene 3401 bp große Vektorfragment von pASK111-skp mit der 1499 bp großen Genkassette für das chimäre muA9 Fab-Fragment aus dem analog

geschnittenen Vektor pASK88-A9 ligiert. Das Plasmid pASK116-A9-skp wurde durch Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Hind*III verifiziert.

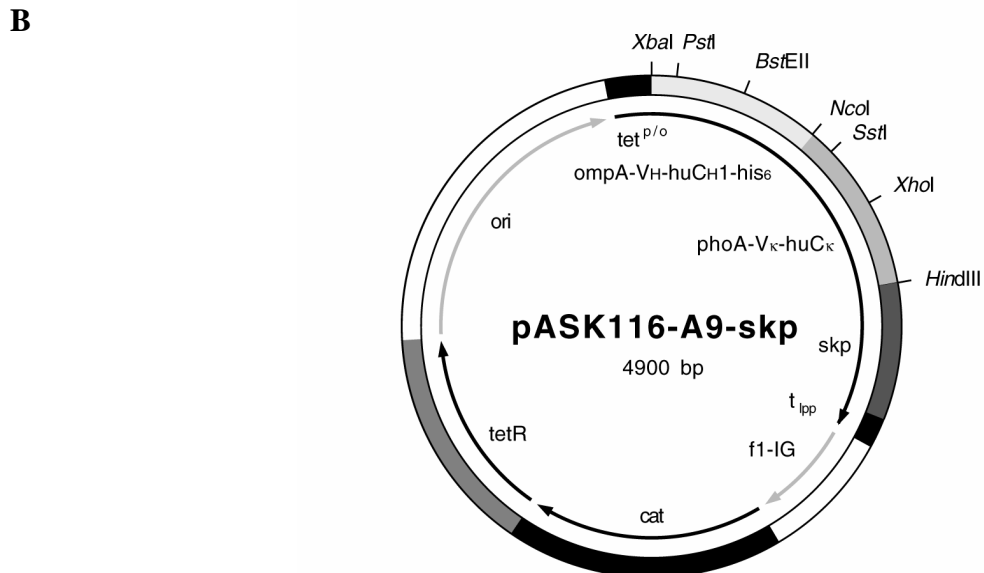
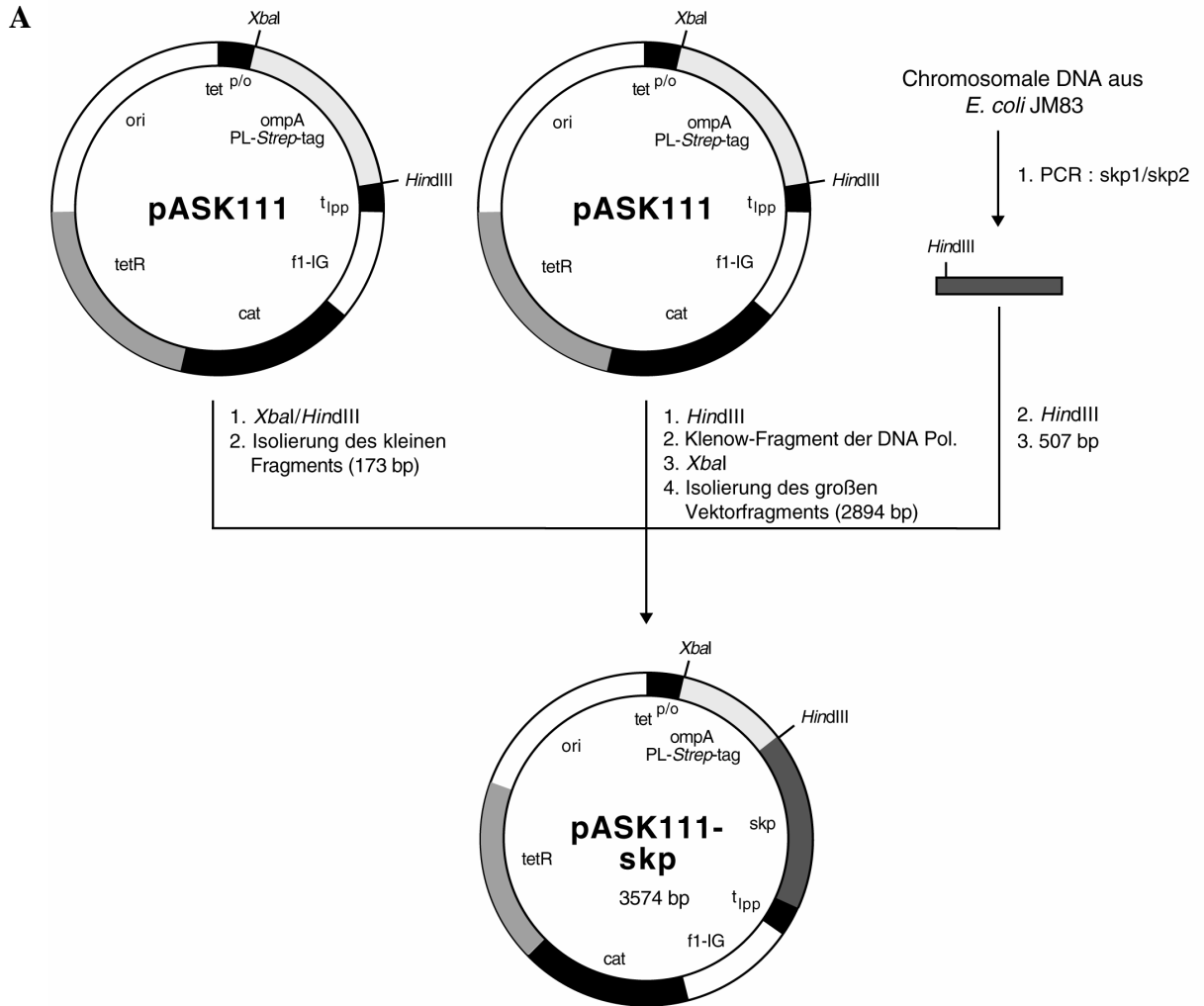


Abbildung 19: Vektoren zur Überexpression des Skp-Proteins. (A) Konstruktion des Vektors pASK111-skp. (Erläuterungen siehe Text). Für Erklärungen der genetischen Elemente siehe Abb. 7. (B) Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pASK116-A9-skp, der die Überexpression des periplasmatischen Faltungshelferproteins Skp ermöglichte. Stromabwärts der Expressionskassette für das rekombinante muA9 Fab-Fragment, die mit der *Hind*III Schnittstelle endet, folgt das *skp*-Strukturgen, wodurch gleichzeitig mit dem Fab-Fragment die Koexpression von Skp in der Art eines multicistronischen Operons unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators erfolgen konnte.

Um die Faltungseffizienz des chimären muA9 Fab-Fragments in Abhängigkeit von der Überexpression des periplasmatischen Faltungshelferproteins Skp zu untersuchen, wurden 2 l-Kulturen mit *E. coli* JM83 angesetzt, die entweder mit pASK116-A9 oder mit pASK116-A9-skp transformiert waren. Die Fremdgenexpression wurde bei einer Zelldichte von 0,5 mit 200 µg/l aTc für 3 h induziert. Wie bereits vorher für die Kultur JM83/pASK116-A9 beobachtet, trat auch bei Verwendung des Expressionsplasmids pASK116-A9-skp keine Zellyse nach 3 h Induktion auf. Die periplasmatischen Proteinfractionen wurden präpariert, das rekombinante Fab-Fragment mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt und die Fraktionen mit kompetitiv eluiertem, rekombinanten Proteins mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 20).

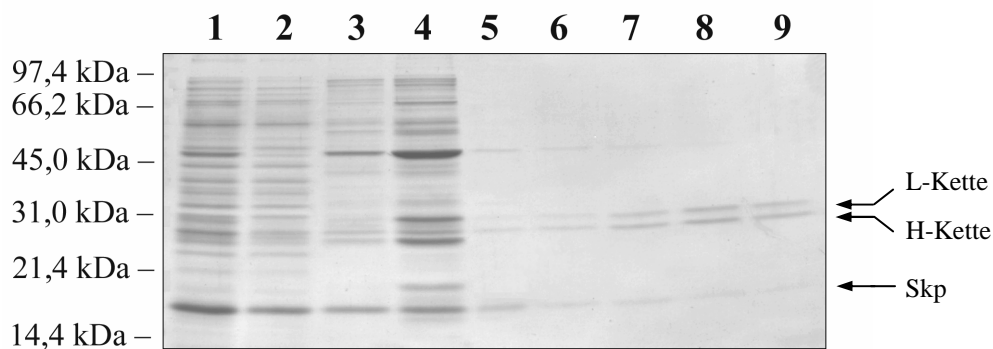


Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse der Einschrittreinigung des chimären muA9 Fab-Fragments mittels IMAC aus der periplasmatischen Proteinfraction einer 2 l-Kultur von *E. coli* JM83/pASK116-A9-Skp. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde im reduzierten Zustand je eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2), sowie die Eluatfraktion von schwach an die Säule gebundenem Wirtspolypeptid (Spur 3 und 4) und fünf Eluatfraktionen von kompetitiv eluiertem, rekombinanten Protein (Spur 5 bis 9) aufgetragen. Die leichte (L-) und schwere (H-) Immunglobulinkette des muA9 Fab-Fragments und das überexprimierte und ko-gereinigte Skp-Protein sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Es zeigte sich, daß nach Abschätzung der Bandenintensitäten die Eluatfraktionen aus der Präparation mit JM83/pASK116-A9-skp ca. 30 % mehr chimäres muA9 Fab-Fragment enthielten als die aus JM83/pASK116-A9. Jedoch war das rekombinante Fab-Fragment darin inhomogen und wies ca. 20 % bakterielle Proteine auf, wovon vor allem ein ca. 17 kDa großes Protein den Hauptanteil ausmachte. Die Vermutung, daß es sich hierbei um das überexprimierte Skp-Protein handelte, wurde durch Proteinsequenzierung eines fünf Aminosäuren langen aminoterminalen Peptidfragments (Ala-Asp-Lys-Ile-Ala) bestätigt. Eine

Abtrennung dieses Proteins durch Größenausschluß-Chromatographie war nicht möglich, was auf eine Komplexbildung mit dem chimären muA9 Fab-Fragment schließen ließ.

Diese Ergebnisse bestätigten im Grunde die von Mavrangelos *et al.* (2001) und Hayhurst & Harris (1999) gemachten Beobachtungen, daß die Überexpression des periplasmatischen Faltungshelferproteins Skp zu einer Ausbeutesteigerung des rekombinanten Proteins führt. Allerdings ist der Chaperoneffekt im Falle des chimären muA9 Fab-Fragments nicht so ausgeprägt wie in den erwähnten Publikationen – dort wurde eine Ausbeutesteigerung um den Faktor 2-3 beschrieben.

3.2.3 Untersuchung der Antigenbindung im ELISA und Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Um zu analysieren, ob die beiden hier gewonnenen chimären Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 (jeweils mit Hexahistidin-Affinitätsanhängsel) an die gentechnisch hergestellten CD30A- und CD16B-Antigenfragmente binden, wurden ihre Antigenbindungseigenschaften mit den zuvor hergestellten rekombinanten Antigenen im ELISA untersucht und die Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie bestimmt.

Für die Analyse der Bindung des chimären muHRS3c Fab-Fragments an CD30A bzw. muA9 Fab-Fragment an CD16B im ELISA wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit dem jeweiligen Antigenfragment beschichtet und mit einer Verdünnungsreihe des entsprechenden Fab-Fragments inkubiert (Abb. 21).

Im Fall des chimären muHRS3c Fab-Fragments wurden im ELISA gegenüber CD30A intensive Signale schon bei geringen Konzentrationen erhalten. Es handelt sich offenbar um eine spezifische Bindung, da in der Kontrolle mit BSA nur vernachlässigbare Signale auftraten. Die apparente Dissoziationskonstante betrug $2,9 \pm 0,2$ nM. Für die Bindung des chimären muA9 Fab-Fragments an das CD16B-Antigenfragment waren die ELISA-Signale dagegen deutlich geringer, obwohl bis zu 20-fach höhere Konzentrationen an Fab-Fragment und eine 10-fach höhere Konzentration an Antigenfragment eingesetzt wurden. Die apparente Dissoziationskonstante betrug 92 ± 2 nM. Ähnlich niedrige Bindungssignale wurden bereits bei der Bindung des bispezifischen HRS3/A9 mMak an CD16B beobachtet (Abschnitt 3.1.3). Für den weiteren Bindungsnachweis zwischen dem chimären muA9 Fab-Fragment und dem CD16B-Antigenfragment wurde deshalb erneut die Methode der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie gewählt.

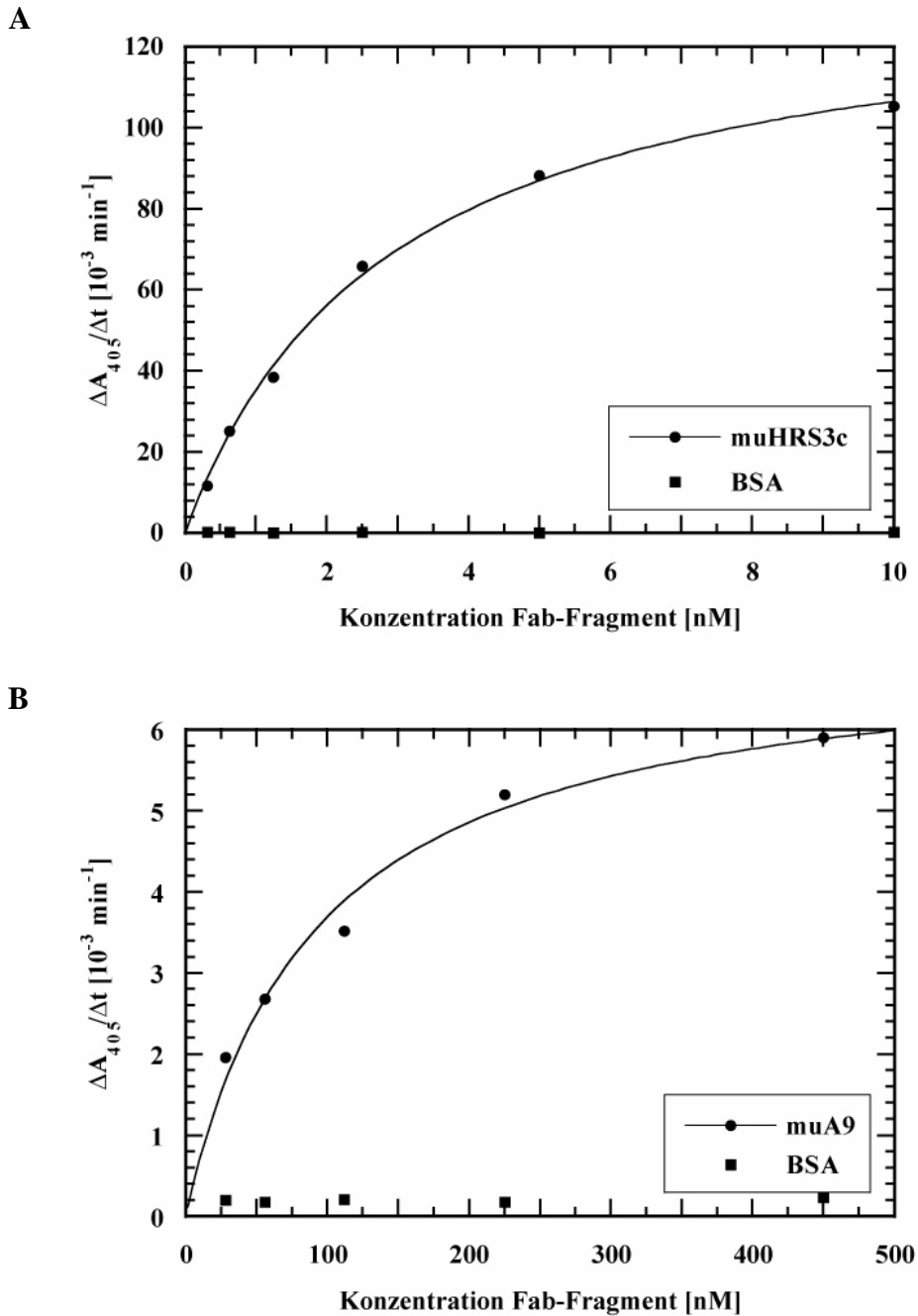


Abbildung 21: ELISA-Experimente zur Untersuchung der Bindungsaffinität der rekombinanten chimären Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 für die Antigenfragmente CD30A bzw. CD16B. (A) Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit in *E. coli* produziertem und mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie gereinigtem CD30A (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/T) belegt und die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* produzierten und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigten muHRS3c Fab-Fragments appliziert. Als Kontrolle diente die Belegung der Vertiefungen mit BSA, wiederum gefolgt von der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe des muHRS3c Fab-Fragments. Gebundenes Fab-Fragment wurde mit Hilfe eines Anti-human- C_{α} /Alkalische Phosphatase-Konjugats nachgewiesen. (B) Wie (A) unter Verwendung von CD16B (250 $\mu\text{g/ml}$ in 10 mM Natriumacetat, pH 3,85) und muA9 Fab-Fragment.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie für die Komplexe aus CD30A und chimärem muHRS3c Fab-Fragment bzw.

aus CD16B und chimärem muA9 wurde wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben verfahren. Jeweils auf dem zweiten Flußkanal wurde das rekombinant hergestellte Antigenfragment kovalent immobilisiert, und der erste Flußkanal diente als Referenz. Bei der Applikation der beiden chimären Fab-Fragmente konnte jeweils eine konzentrationsabhängige Komplexbildung mit den entsprechenden Antigenen beobachtet werden (Abb. 22). Auf dem Referenzkanal wurde dagegen kein nennenswertes Bindungssignal an die *Sensorchip*-Oberfläche gemessen.

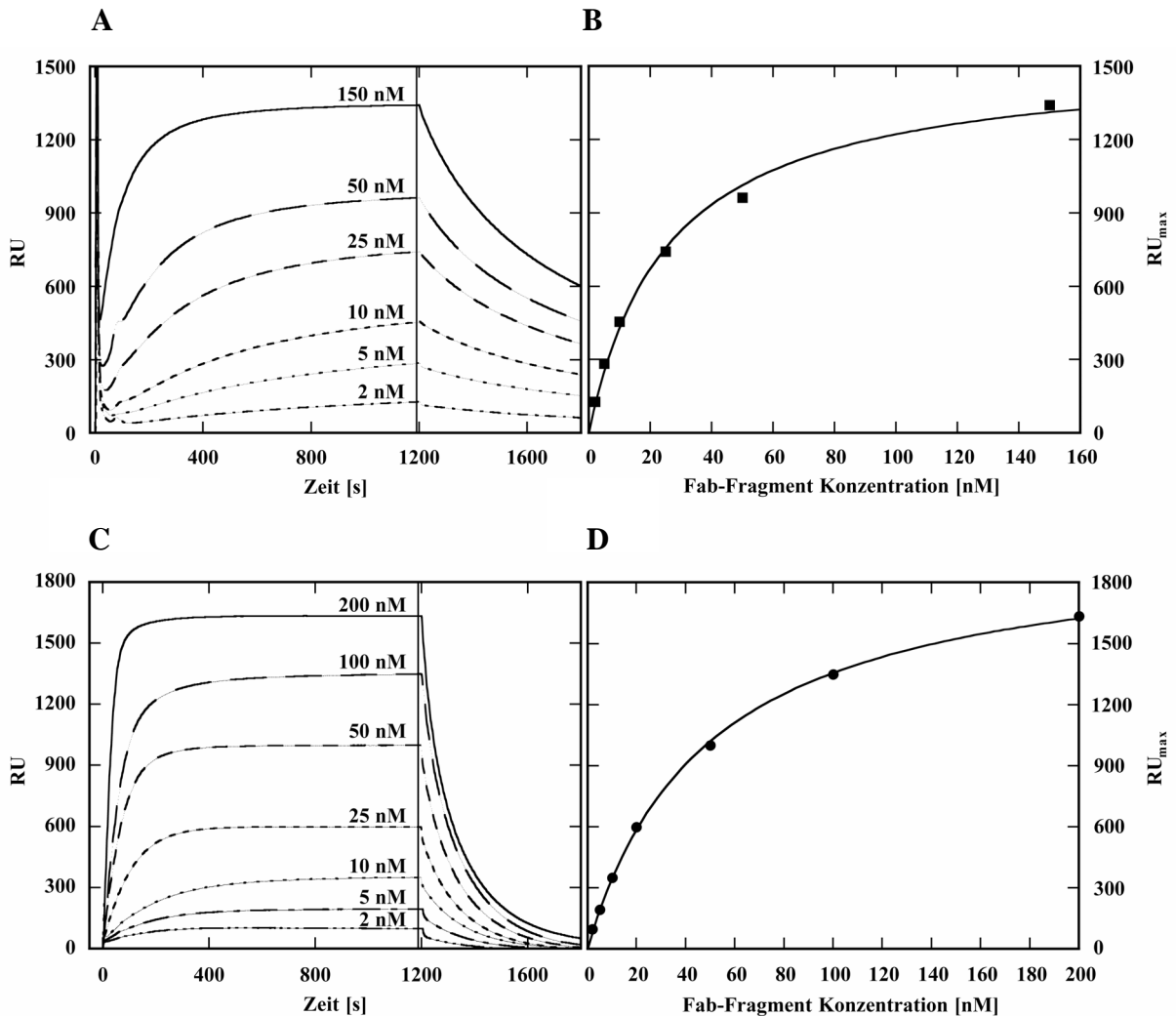


Abbildung 22: Quantitative Analyse der Affinität der chimären Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 zu den rekombinanten Antigenfragmenten CD30A bzw. CD16B durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Auf der Carboxydextran-Oberfläche im Flußkanal 2 wurde CD30A bzw. CD16B mittels Amin-Kopplung wie unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben kovalent immobilisiert, was zu einer Zunahme des Resonanzsignals um 1600 RU führte. Der Flußkanal 1 diente als Referenz. (A) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe von chimärem muHRS3c Fab-Fragment. Jeweils 100 μ l einer 2, 5, 10, 25, 50 und 150 nM Lösung des chimären muHRS3c Fab-Fragments in PBS/P wurden bei einer Flußrate von 5 μ l/min auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle appliziert. Die spezifischen Bindungssignale in Flußkanal 2 wurden um die geringfügigen unspezifischen Signale in Flußkanal 1 korrigiert und in einem Diagramm überlagert dargestellt. Der senkrechte Balken am Ende der Injektionsphase bei ca. 1200 s kennzeichnet die maximal gemessenen Resonanzsignale. Die Dissoziationsphase wurde für 600 s dokumentiert. (B) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von $25,8 \pm 2,8$ nM.

(C) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe von chimärem muA9 Fab-Fragment. Jeweils 100 μ l einer 2, 5, 10, 25, 50, 100 und 200 nM Lösung des chimären muA9 Fab-Fragments in PBS/P wurden bei einer Flußrate von 5 μ l/min auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle appliziert. Weitere Angaben wie unter A. (D) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von $49,1 \pm 2,8$ nM.

Im Fall des chimären muA9 Fab-Fragments war im untersuchten Konzentrationsbereich von 3 bis 200 nM jeweils eine schnelle Assoziations- als auch Dissoziationsphase erkennbar. Die Auswertung der Kinetik mit Hilfe der *BIAevaluation Software* ergab für die Komplexbildung aus chimärem muA9 Fab-Fragment und CD16B eine Geschwindigkeitskonstante k_{on} von $2,4 * 10^5$ s⁻¹ und für die Dissoziation eine k_{off} von $1,5 * 10^{-2}$ s⁻¹ (Bindungsmodell: *1:1 binding with mass transfer*). Daraus errechnet sich eine Dissoziationskonstante von 63 nM ($\chi^2 = 114$). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels der Gleichgewichtsanalyse ergab einen fast identischen Wert von $49,1 \pm 1,8$ nM. Somit ist der K_D -Wert für die Bindung des chimären muA9 Fab-Fragments an CD16B um nahezu Faktor 2 niedriger als die im ELISA-Experiment bestimmte apparente Dissoziationskonstante mit 92 ± 2 nM. Eine Erklärung hierfür ist die schnelle Dissoziation des muA9 Fab-Fragments vom CD16B-Antigen im Zuge der Waschschrte im ELISA, so daß die Annahme kinetisch irreversibler Komplexbildung bei der Auswertung der Bindungskurve nicht mehr gegeben war.

Im Gegensatz dazu zeigen die Meßkurven des chimären muHRS3c Fab-Fragments im Konzentrationsbereich von 2 bis 150 nM eine wesentlich langsamere Assoziations- und Dissoziationsphase. Für die Bildung des Komplexes aus chimärem HRS3c Fab-Fragment und CD30A wurde eine Geschwindigkeitskonstante k_{on} von $8,6 * 10^4$ s⁻¹ und für die Dissoziation eine k_{off} von $2,0 * 10^{-3}$ s⁻¹ bestimmt (Bindungsmodell: *1:1 binding with drifting baseline*). Daraus errechnet sich eine Dissoziationskonstante von 24 nM ($\chi^2 = 47$). Diese K_D stimmt mit dem aus der Gleichgewichtsanalyse ermittelten Wert von $25,8 \pm 2,8$ nM überein.

Die K_D -Werte deuten auf eine höhere Affinität der chimären Fab-Fragmente für die jeweiligen Antigene als die entsprechenden Bindungsstellen des bispezifischen HRS3/A9 mMAk hin (siehe Abschnitt 3.1.3). Möglicherweise ist dies auf eine Inhomogenität in der Präparation des bispezifischen Antikörpers aus der Quadromzelllinie und damit verbundene Konzentrationsfehler zurückzuführen.

Diese Ergebnisse zeigten, daß die beiden chimären Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 in *E. coli* in funktioneller Form produziert werden können und spezifisch an die ebenfalls rekombinanten Antigenfragmente mit hoher Affinität binden. Damit waren die Voraussetzungen für die spätere Humanisierung der variablen Domänen des HRS3-Antikörpers gegeben.

3.3 Chemische Kopplung zweier Fab-Fragmente zur Herstellung bivalenter und bispezifischer F(ab)₂-Antikörperfragmente

Bispezifische F(ab)₂-Fragmente wurden erstmals durch gerichtete chemische Kopplung zweier Fab'-Fragmente hergestellt, nachdem diese durch Proteolyse und milde Reduktion aus monoklonalen Mausantikörpern gewonnen worden waren (Brennan *et al.*, 1985; Glennie *et al.*, 1987). Für die Kopplung der beiden Fab'-Fragmente wurden dementsprechend die freien Cysteinreste aus der Gelenkregion des Immunglobulins am C-Terminus der schweren Kette verwendet. Derzeit gibt es zwei Möglichkeiten, um Fab-Fragmente mit Hilfe von Cysteinresten chemisch miteinander zu koppeln, entweder über Disulfidbrücken (Brennan *et al.*, 1985; Carter *et al.*, 1992b) oder mittels Thioetherbrücken unter Verwendung eines Linkerreagens wie z. B. o-Phenylendimaleimid (Glennie *et al.*, 1987) oder Bismaleimidohexan (Stalteri & Mather, 1995).

Beim ersten Verfahren wird durch Umsetzung der freien Thiolreste eines Fab'-Fragments mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) (DTNB bzw. Ellman's Reagenz; Ellman, 1959) zunächst ein gemischtes, aktiviertes Disulfid generiert (Abb. 23), das in einem zweiten Reaktionsschritt mit äquimolaren Mengen des zweiten Fab'-Fragments umgesetzt wird, wobei durch erneuten Thiol-Disulfidaustausch neben dem freien Thionitrobenzoat (TNB) das gewünschte F(ab)₂-Fragment entsteht. Die Kopplungsreaktion kann anhand der charakteristischen Absorption des in stöchiometrischer Menge gebildeten TNB bei 412 nm photometrisch verfolgt werden.

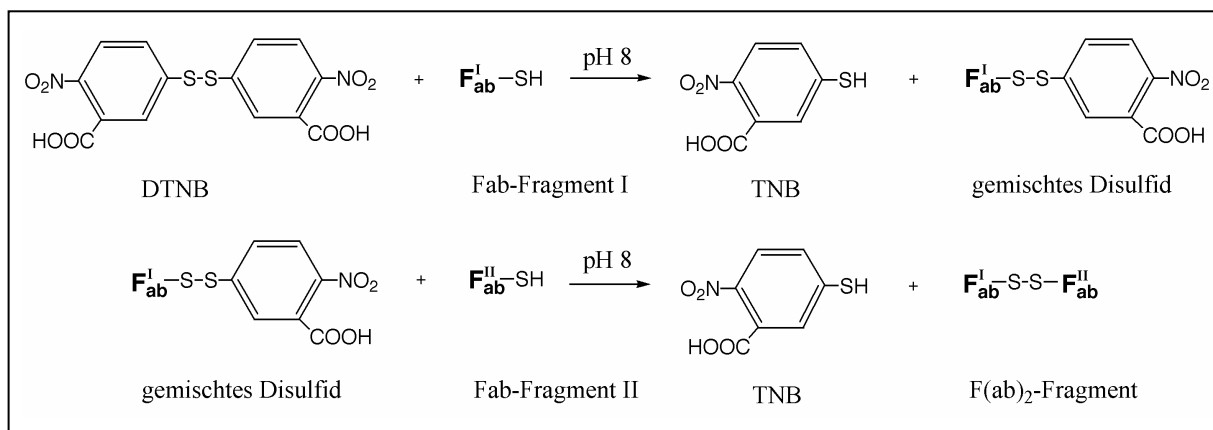


Abbildung 23: Kopplung zweier Fab-Fragmente über eine Disulfidbrücke. 1. Umsetzung des reduzierten Thiolrestes des Fab-Fragments mit einem Überschuß von 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) (DTNB) im leicht alkalischen Milieu. 2. Das entstandene gemischte Disulfid wird isoliert (z. B. durch Gelfiltration) und im zweiten Schritt mit einer äquimolaren Menge des zu koppelnden Fab-Fragments umgesetzt, so daß durch Thiol-Disulfidaustausch neben Thionitrobenzoat (TNB) ein F(ab)₂-Fragment entsteht. Ist das zweite Fab-Fragment identisch mit dem ersten, entsteht ein bivalentes F(ab)₂-Fragment, ist es verschieden, spricht man von einem bispezifischen F(ab)₂-Fragment.

Bei der Kopplung mittels Thioetherbrücke wird zunächst ein Fab-Fragment mit einem Überschuß an Linkerreagens umgesetzt, wodurch dieses durch Michael-Addition eine

Thioetherbindung zu dem freien Thiolrest des Fab-Fragments ausbildet. Dieses derivatisierte Fab-Fragment wird isoliert und in einer erneuten Additionsreaktion mit dem zugesetzten zweiten, noch underivatisierten Fab-Fragment zum F(ab)₂-Fragment gekoppelt (Abb. 24).

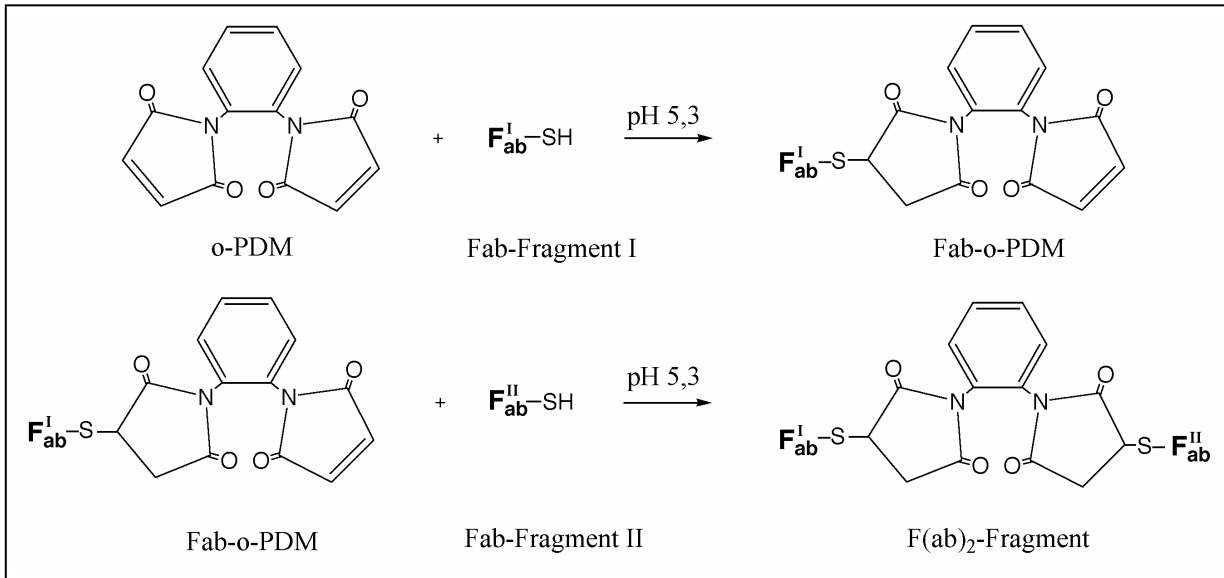


Abbildung 24: Kopplung zweier Fab-Fragmente über Thioetherbrücken. 1. Derivatisierung des reduzierten Thiolrestes des ersten Fab-Fragments mit o-Phenylendimaleimid im schwach sauren Milieu (Michael-Addition). 2. Umsetzung des Fab-o-PDM Derivats mit einer äquimolaren Menge des Kopplungspartners zum F(ab)₂-Fragment.

Inzwischen wurden auch rekombinante Fab-Fragmente mit freien Cysteinresten gezielt in *E. coli* produziert und durch chemische Kopplung zum F(ab)₂-Fragment verknüpft. In einer wegweisenden Arbeit wurde hierzu ein anti-p185^{HER2} Fab'-Fragment verwendet, das eine acht Aminosäuren lange Sequenz (-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys-Ala-Ala) mit einem freien Cysteinrest aus der Gelenkregion eines humanen Antikörpers am C-Terminus der schweren Kette trug (Abb. 25; Carter *et al.*, 1992b). Über diesen freien Cysteinrest, der zu ca. 75-90 % des isolierten Fab-Fragments in der reaktiven Thiolform vorlag, konnte ein bivalentes F(ab')₂-Fragment über eine Disulfidbrücke mit einer Kopplungseffizienz von 82 % gekoppelt werden.

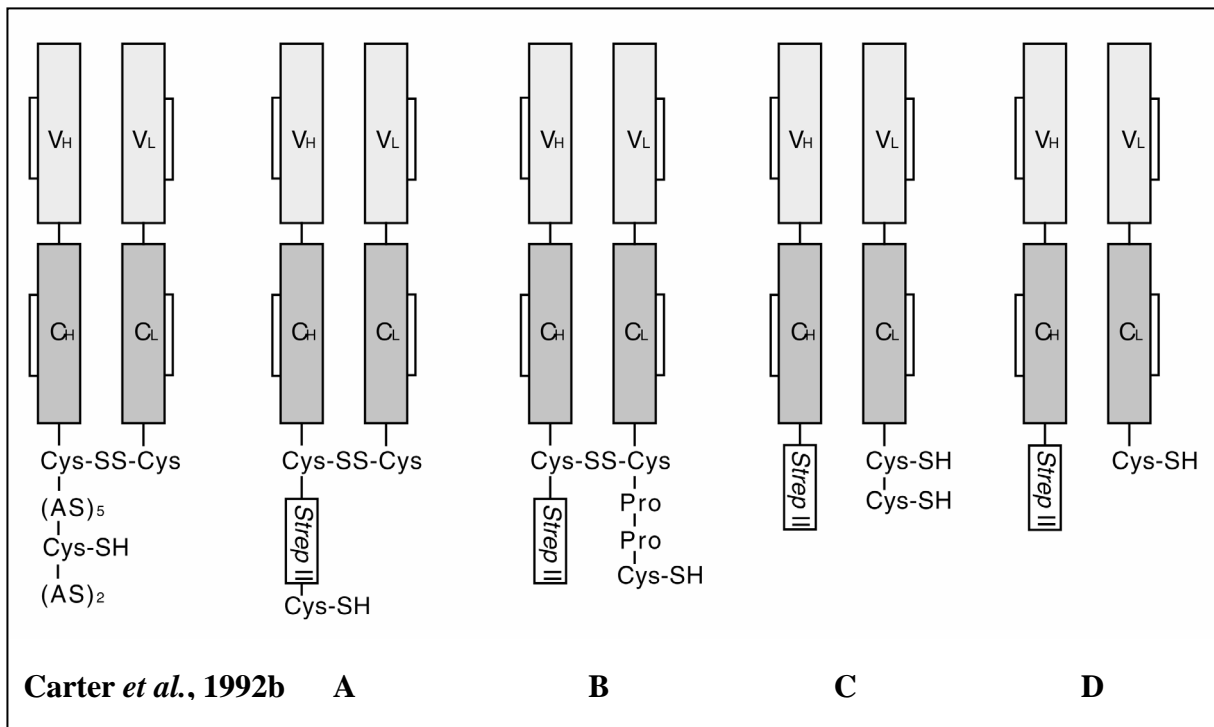


Abbildung 25: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sequenzmotive zur Kopplung zweier rekombinanter Fab-Fragmente. In dem von Carter *et al.* (1992b) beschriebenen Sequenzmotiv befand sich eine 8 Aminosäure lange Sequenz – (AS)₅ = Asp-Lys-Thr-His-Thr; (AS)₂ = Ala-Ala – mit einem freien Cysteinrest aus der Gelenkregion eines humanen IgG1 Antikörpers am C-Terminus der schweren Kette. Im Sequenzmotiv A wurde ein freier Cysteinrest unmittelbar an den C-Terminus des *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel der schweren Kette angehängt. Im Sequenzmotiv B wurde ein freier Cysteinrest über einen Pro₂-Linker am C-Terminus der leichten Kette eingeführt. Im hier neu entwickelten Sequenzmotiv C wurde der Cysteinrest in der schweren Kette deletiert, der für die Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette diente. Zusätzlich wurde ein freier Cysteinrest an den C-Terminus der leichten Kette angehängt, so daß in diesem Sequenzmotiv zwei freie Cysteinreste für die Kopplung zur Verfügung standen. Im Sequenzmotiv D wurde ebenfalls der an der interchenaren Disulfidbrücke beteiligte Cysteinrest in der schweren Kette deletiert, so daß der einzelne freie Cysteinrest am C-Terminus der leichten Kette für die Kopplung zur Verfügung stand. Die Sequenzmotive C und D wurden sowohl mit dem *Strep*-tag II- als auch mit dem His₆-Affinitätsanhängsel realisiert.

In Anlehnung an dieses Sequenzmotiv wurde im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Gresch, 1997; Schäfer, 1998) ein Sequenzmotiv entwickelt, in dem ein einzelner freier Cysteinrest am C-Terminus der schweren Kette, unmittelbar auf das *Strep*-tag II folgend eingeführt wurde. Dabei wurde allerdings festgestellt, daß nach der Isolierung der gentechnisch hergestellten chimären muA9 und muHRS3c Fab-Fragmente mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie nur etwa 5 % der freien Cysteinreste in der reaktiven Thiolform vorlagen und die Kopplungsreaktion extrem geringe Ausbeuten an F(ab)₂-Fragment lieferte. Möglicherweise wechselwirkte der freie Cysteinrest während der Proteinfaltung auf ungünstige Weise mit denjenigen Cysteinresten, die für die Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Immunglobulinkette verantwortlich sind oder er wurde durch Bestandteile des Kulturmediums chemisch modifiziert.

Um die über das *Strep*-tag II vermittelte Beweglichkeit dieses freien Cysteinrestes einzuschränken, wurde die Tripeptidsequenz Pro-Pro-Cys an den C-Terminus der leichten Kette angefügt und der Cysteinrest am *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel entfernt. In diesem Fall lagen weniger als 30 % der freien Cysteinreste in reaktiver Form vor. Durch partielle Reduktion konnte zwar der Anteil der reaktiven Cysteinreste erhöht werden, jedoch führte dies auch zum teilweisen Aufbrechen der interchenaren Disulfidbrücke und somit zur Freisetzung weiterer Cysteinreste, was bei den Kopplungsversuchen zu unerwünschten oligomeren Nebenprodukten führte.

Vorrangiges Ziel war deshalb die Entwicklung eines Sequenzmotivs, in dem ein oder mehrere freie Cysteinreste für die Kopplung zur Verfügung standen und bei dem die Aktivierung mittels partieller Reduktion keine zusätzlichen freien Thiolreste generierte.

3.3.1 Entwicklung eines Sequenzmotivs mit zwei freien Cysteinresten und dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel

Zunächst wurde das Sequenzmotiv C (Abb. 25) mit zwei freien Cysteinresten am C-Terminus der leichten Kette entwickelt, so daß nun im Prinzip zwei Thiolgruppen für die Kopplungsreaktion zur Verfügung standen. Die leichte und schwere Immunglobulinkette sind in diesem Sequenzmotiv aufgrund der Deletion des an der interchenaren Disulfidbrücke beteiligten Cysteinrestes in der schweren Immunglobulinkette nur durch nicht-kovalente Wechselwirkung, aber dennoch stabil assoziiert.

3.3.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pASK119-HRS3c und pASK119-A9 zur Produktion der entsprechenden Fab-Fragmente

Die Deletion des Cysteinrestes am C-Terminus der schweren Kette und die gleichzeitige Insertion eines zweiten Cysteinrestes am C-Terminus der leichten Kette erfolgte ausgehend von dem Plasmid pASK125-HRS3c (siehe Abschnitt 3.2.1) durch ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel *et al.* (1987). Mit Hilfe des Oligodesoxynukleotids MS-1 wurde ein Cysteinrest an den C-Terminus der leichten Kette angefügt und außerdem eine *Sac*II-Restriktionsschnittstelle in der Hybridisierungsregion zur späteren Identifizierung der Mutation deletiert (Abb. 26). Durch das Oligodesoxynukleotid MS-2 wurde parallel der Cysteinrest am C-Terminus der schweren Kette unmittelbar vor dem *Strep*-tag II entfernt. Zusätzlich wurde dabei die *Eco*47III-Schnittstelle zur späteren Identifizierung der Mutation eliminiert (Abb. 26).

Die Plasmid-DNA von 5 der erhaltenen Klone wurde isoliert und der Restriktionsanalyse unterzogen. Bei zwei der Klone trat sowohl beim *Sac*II/*Xho*I- als auch beim *Eco*47III/*Xho*I-Verdau lediglich Linearisierung der Plasmid-DNA aufgrund der deletierten *Sac*II und

Eco47III-Schnittstellen auf. Durch DNA-Sequenzierung mit den Primern PR1 und PR3 wurde die mutagenisierte Region in diesen Klonen verifiziert. Das Plasmid wurde als pASK119-HRS3c bezeichnet.

Primer MS-1

```

                                SacII                      HindIII
AGTTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGTTAATAAGCTTGACCTGTGAAGTG
664 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 725
TCAAGCGGGCAGTGTTCCTCGAAGTTGGCACCTCTCACAATTATTTCGAACTGGACACTTCAC
SerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCysEndEnd
                                TTTCTCGAAGTTGGCaCCTCTCACAacgATTATTTCGAACTGGA MS-1
SerSerProValThrLysSerPheAsnArgGlyGluCysCysEndEnd

```

Primer MS-2

```

                                Eco47III                      NcoI
GACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGCAGCGCTTGGTCTCACCCGCAGTTCGAAAAATAATAACCATGG
652 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 710
CTGTCTTTCAACTCGGGTTTAGAACCTGGCGAACCAGAGTGGGCGTCAAGCTTTTTATTATTGGTACC
AspLysLysValGluProLysSerCysSerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEndEnd
                                TTTCAACTCGGGTTTAGAagaCGAACCAGAGTGGGCGTC MS-2
AspLysLysValGluProLysSerSerAlaTrpSerHisProGlnPheGluLysEndEnd

```

Abbildung 26: DNA-Sequenz für die mutierten Genregionen in der humanen C_{κ} - (Primer MS-1) sowie der C_{H1} -Domäne (Primer MS-2) ausgehend von dem Plasmid pASK125-HRS3c. Restriktionsschnittstellen in der DNA-Sequenz sind kursiv dargestellt und die Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz angegeben. Die durch die Oligodesoxynukleotide MS-1 und MS-2 determinierten Mutationen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, die deletierte *SacII*- und *Eco47III*- Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen. Der mittels Primer MS-1 eingeführte Cysteinrest in C_{κ} ist eingerahmt. Das mit Hilfe des Primers MS-2 deletierte, ursprünglich an Position 676-678 vorhandene Basentriplett für Cystein ist ebenfalls eingerahmt.

Für die Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments mit demselben Sequenzmotiv C wurde das Plasmid pASK119-A9 konstruiert (Abb. 27). Durch Schnitt mit den Restriktionseendonukleasen *XbaI/BstEII* und *NcoI/XhoI* wurden die Genfragmente für die beiden variablen Domänen des muA9 Fab-Fragments zusammen mit den entsprechenden Signalsequenzen aus dem Plasmid pASK88-A9 (siehe Abschnitt 3.2.2) isoliert (V_H : 419 bp; V_L : 394 bp). Der Vektor pASK119-HRS3c wurde mit *XbaI* und *XhoI* geschnitten, um das Vektorrückgrat mit der humanen C_{κ} -Domäne (3231 bp) zu erhalten. Parallel wurde derselbe Vektor mit *BstEII* und *NcoI* verdaut, um das Genfragment für die humane C_{H1} -Domäne (358 bp) zu isolieren. Nach Ligierung dieser vier Fragmente wurde *E. coli* JM83 transformiert. Die Gensequenz der V_H -Domäne des muA9 Fab-Fragments besitzt eine interne *PstI*-Schnittstelle, die der V_L -Domäne eine interne *SstI*-Schnittstelle. *PstI* und *SstI* schneiden im Vektor pASK119-A9 wegen der bereits vorhandenen Standardschnittstellen jeweils zweimal. Der Klon mit dem korrekt zusammengesetzten Plasmid wurde dementsprechend durch

Restriktionsanalyse mit *PstI/XhoI* (202 bp und 878 bp sowie Vektorfragment) und *BstEII/SstI* (160 bp und 453 bp sowie Vektorfragment) ermittelt.

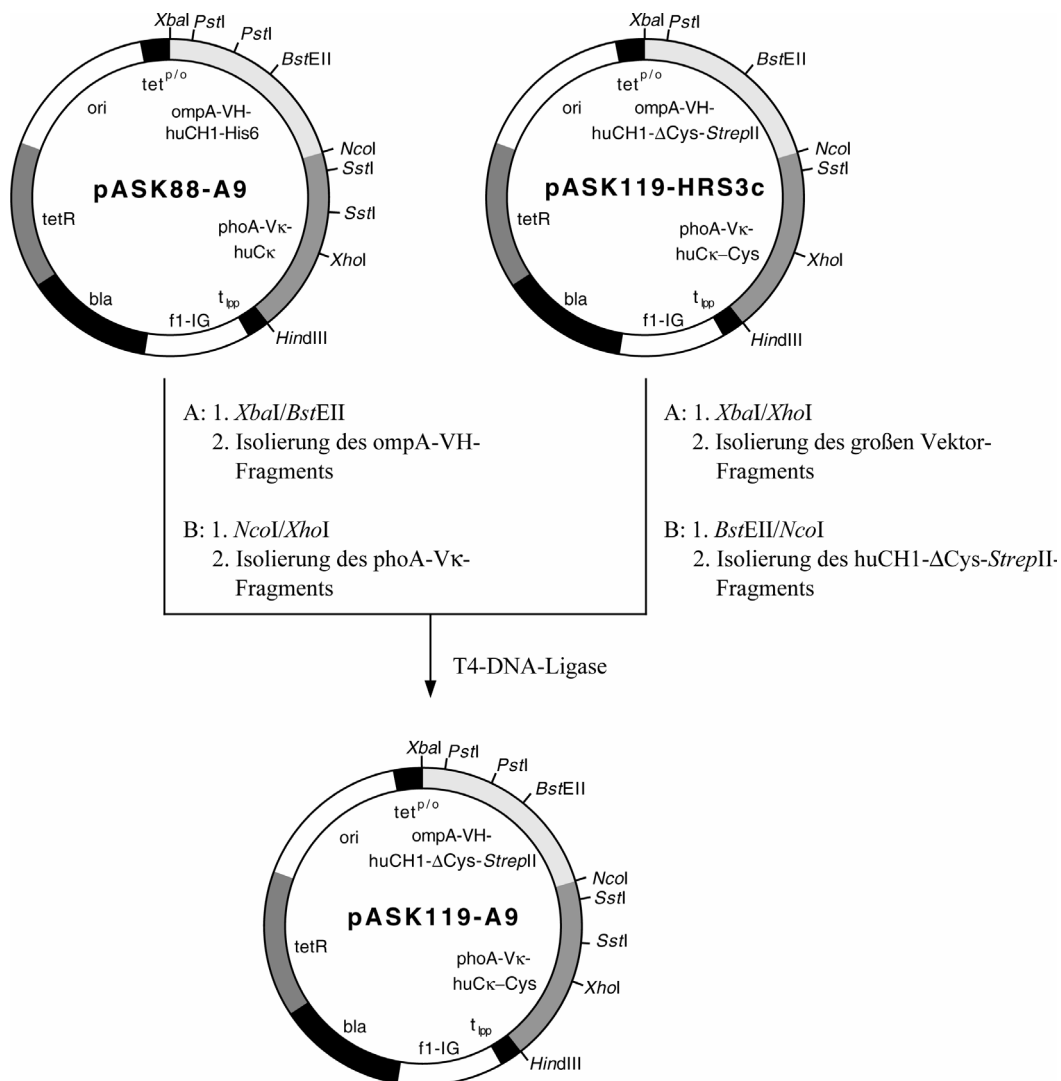


Abbildung 27: Konstruktion des Vektors pASK119-A9. (Erläuterungen siehe Text). Für Erklärungen der genetischen Elemente siehe Abb. 7.

Für die bakterielle Produktion der chimären muHRS3c und muA9 Fab-Fragmente mit Sequenzmotiv C wurde *E. coli* JM83 mit den Expressionsvektoren pASK119-HRS3c bzw. pASK119-A9 transformiert und 2 l-Kulturen unter Standardbedingungen angesetzt. Bei beiden Kulturen konnte nach 3 h Induktionsdauer noch kein Anzeichen von Zellyse beobachtet werden, während die Wachstumskurven einen Übergang zur stationären Wachstumsphase anzeigten (Zellichte zum Zeitpunkt der Zellernte: JM83/pASK119-HRS3c: 1,1; JM83/pASK119-A9: 1,2). Nach Präparation der periplasmatischen Proteinfraction wurden die Fab-Fragmente mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (Skerra & Schmidt, 2000) isoliert. Das chimäre muHRS3c Fab-Fragment mit Sequenzmotiv C konnte

mit typischen Ausbeuten von 0,5 mg pro Liter Kulturmedium produziert werden, das entsprechende muA9 Fab-Fragment dagegen bloß mit 70 µg pro Liter Kulturmedium, was im Einklang mit den Expressionsversuchen zu den einfachen Fab-Fragmenten steht.

Die Analyse der Proteinproduktion und -reinigung mittels SDS-PAGE zeigte, daß bei beiden Fab-Fragmenten die leichte und schwere Immunglobulinkette in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorlagen (Abb. 28). Aufgrund der Deletion der interchenaren Disulfidbrücke werden auch in Abwesenheit eines Reduktionsmittels die beiden Immunglobulinketten aufgetrennt, da diese lediglich durch nicht-kovalente Wechselwirkung im Fab-Fragment assoziiert sind. Dennoch weisen die Immunglobulinketten aufgrund der kompakteren Struktur durch die intakten intrachenaren Disulfidbrücken unter diesen Bedingungen eine erhöhte elektrophoretische Mobilität auf.

Gelfiltrationsexperimente zeigten (ohne Abbildung), daß die Fab-Fragmente mit deletierter interchenarer Disulfidbrücke ein identisches Elutionsvolumen aufwiesen wie die mit intakter. Dies deutet darauf hin, daß die beiden Immunglobulinketten durch nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziiert sind.

Zur Produktion größerer Proteinmengen wurden die beiden Fab-Fragmente im Laborfermenter im 8 l-Maßstab wie unter Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben fermentiert. Für die Produktion des chimären muHRS3c Fab-Fragments wurde der *E. coli* Stamm W3110 verwendet, der mit dem Plasmid pASK119-HRS3c transformiert wurde. Für die Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments wurde *E. coli* JM83/F' mit dem Plasmid pASK119-A9 transformiert. Beide Fermentationskulturen wiesen ein reproduzierbares (insgesamt viermal durchgeführt) exponentielles Wachstum auf. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte betrug bei beiden Kulturen ca. 30, und es waren keine Anzeichen von Zellyse erkennbar. Nach Präparation der periplasmatischen Proteinfraction wurden die rekombinanten Fab-Fragmente mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert und durch Gelfiltration zur Homogenität gereinigt. Die Ausbeuten lagen beim chimären muHRS3c Fab-Fragment bei 15 mg, beim chimären muA9 Fab-Fragment bei 2,4 mg.

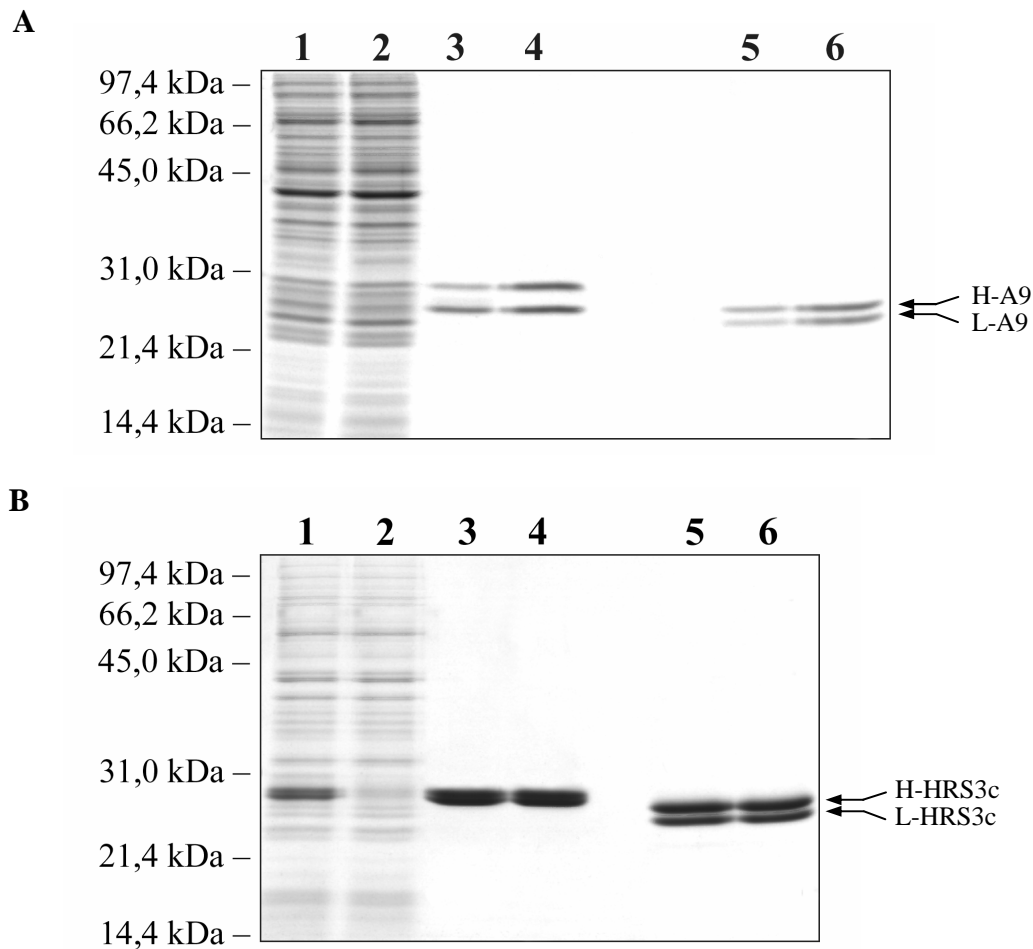


Abbildung 28: SDS-PAGE-Analyse zur Dokumentation der Einschnitt-Reinigung der chimären Fab-Fragmente muA9 (A) und muHRS3c (B) mit dem Sequenzmotiv C aus dem Periplasma von *E. coli*. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2) sowie zweier exemplarischer Eluatfraktionen der Streptavidin-Affinitätschromatographie im reduzierten (Spur 3 und 4) sowie im nicht reduzierten Zustand (Spur 5 und 6) aufgetragen. Die leichten (L-) und schweren (H-) Immunglobulinketten (nicht reduziert) sind gekennzeichnet.

3.3.1.2 Kopplung zweier muHRS3c Fab-Fragmente durch Thioetherbrücke mit *o*-Phenylendimaleimid als Linkerreagens

In einem Pilotversuch wurde die Eignung des Sequenzmotivs C für die Kopplung zweier muHRS3c Fab-Fragmente über Thioetherbrücken zum bivalenten F(ab)₂-Fragment untersucht. Hierzu wurde chimäres muHRS3c Fab-Fragment mit Sequenzmotiv C im Fermenter produziert, mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aufgereinigt und aufkonzentriert. Um sicherzustellen, daß die Cysteinreste am C-Terminus der leichten Kette in der freien Thiolform vorlagen, wurden diese durch milde Reduktion mit 10 mM 2-Mercaptoethanol für 30 min bei 30 °C aktiviert, ohne dabei die intrachenenaren Disulfidbrücken innerhalb der Domänen zu spalten. Die Abtrennung des Reduktionsmittels erfolgte mit einer PD-10 Gelfiltrationssäule, die mit 100 mM Tris/Acetat-Puffer pH 5, 5 mM EDTA äquilibriert war,

um die freien Thiolreste ($pK_s = 8,3-8,6$; Pfeleiderer, 1985) in der protonierten Form zu erhalten und metallkatalysierte Oxidation durch Luftsauerstoff zu vermeiden.

Zur Derivatisierung mit *o*-Phenylendimaleimid wurde das chimäre muHRS3c Fab-Fragment anschließend bei einer Konzentration von 20 μM mit einem 400-fachen molaren Überschuß des Linkerreagens in einem Gesamtvolumen von 1 ml in 100 mM Tris/Acetat-Puffer pH 5, 5 mM EDTA für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abtrennung des überschüssigen Linkerreagens erfolgte wiederum mittels Gelfiltration, wodurch das derivatisierte Fab-Fragment gleichzeitig in 20 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,3, 5 mM EDTA umgepuffert wurde. Nach Aufkonzentrierung auf 20 μM wurden jeweils 15 nmol des derivatisierten muHRS3c Fab-Fragments mit frisch aktiviertem muHRS3c in 1 ml 20 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,3, 5 mM EDTA vereinigt. Dieser Kopplungsansatz wurde unter Stickstoff für 48 h bei 4 °C inkubiert.

Die darauffolgende Analyse des Kopplungsansatzes mittels SDS-PAGE (Abb. 29) zeigte im nicht reduzierten sowie im reduzierten Zustand das Vorhandensein einer Bande bei ca. 48 kDa, die dem über Thioetherbrücken verknüpften Dimer aus den beiden leichten Immunglobulinketten entsprach. Die unveränderte Intensität dieser Bande im reduzierten sowie nicht reduzierten Zustand schließt eine Kopplung zweier leichter Immunglobulinketten über Disulfidbrücken aus. Das Vorhandensein einer Bande bei ca. 27 kDa für die leichte Immunglobulinkette weist auf einen nicht quantitativen Verlauf der Kopplung hin, d. h. es ist noch monomeres, ungekoppeltes Fab-Fragment im Kopplungsansatz vorhanden. Die Bandenintensität der schweren Immunglobulinkette ist im Vergleich zur monomeren leichten Immunglobulinkette deutlich stärker, da sie sich aus dem Anteil aus dem monomeren Fab-Fragment sowie dem Teil zusammensetzt, der mit der leichten Immunglobulinkette des Dimers assoziiert ist.

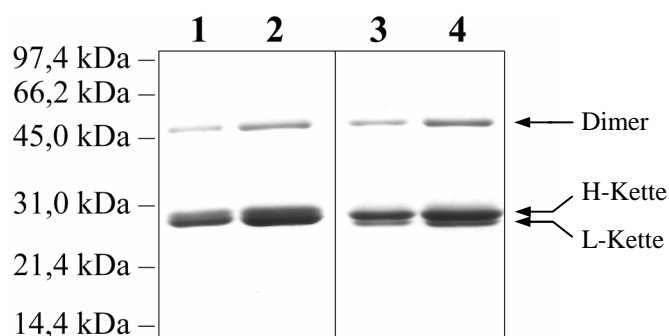


Abbildung 29: Analyse der Kopplung zweier chimärer muHRS3c Fab-Fragmente (Sequenzmotiv C) über Thioetherbrücken. Für die Kopplung wurden jeweils 15 nmol muHRS3c mit freien Thiolgruppen und mit *o*-PDM derivatisiertes muHRS3c in 20 mM Natriumacetat, pH 5,3, 5 mM EDTA unter Stickstoff für 48 h bei 4 °C inkubiert. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 3 μg (Spur 1 und 3) bzw. 6 μg des Kopplungsansatzes (Spur 2 und 5) aufgetragen. Die Proteinproben der Spuren 1 und 2 wurden vor der Auftrennung durch Behandlung mit Mercaptoethanol reduziert, die Proben der Spuren 3 und 4 wurden nicht reduzierend behandelt. Die Bande bei 48 kDa entspricht dem Dimer aus gekoppelten leichten

Immunglobulinketten. Im nicht-reduzierten Zustand weist die leichte Immunglobulinkette (L-Kette) eine höhere elektrophoretische Mobilität als die schwere (H-Kette) auf, unter reduzierenden Bedingungen verhalten sich die Mobilitäten genau umgekehrt.

Somit konnte gezeigt werden, daß die kovalente Kopplung zweier Fab-Fragmente mittels des Linkerreagens o-PDM prinzipiell möglich war. Die Kopplungsausbeute betrug ca. 30-40 % (Abschätzung der Bandenintensität für die dimere und monomere leichte Immunglobulinkette).

3.3.1.3 Kopplung der muHRS3c und muA9 Fab-Fragmente mittels Disulfidbrücke zum bispezifischen F(ab)₂-Fragment, Isolierung und Charakterisierung

Zur Herstellung des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments wurde im Prinzip die Vorgehensweise von Carter *et al.* (1992b) angewendet, wobei hier zwei unterschiedliche Fab-Fragmente über eine Disulfidbrücke miteinander gekoppelt wurden. Hierfür wurden das chimäre muHRS3c und muA9 Fab-Fragment mit Sequenzmotiv C zunächst mittels Fermentation wie in Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben produziert, gereinigt und aufkonzentriert.

Um sicherzustellen, daß die Cysteinreste am C-Terminus der leichten Kette beider Fab-Fragmente in der freien Thiolform vorlagen, wurden diese wie unter Abschnitt 3.3.1.2 beschrieben durch milde Reduktion aktiviert. Zur Erzeugung des aktivierten gemischten Disulfids (Fab-S-S-TNB; Abb. 23) wurde das muHRS3c Fab-Fragment in einer Konzentration von 20 µM mit einem 400-fachen molaren Überschuß an DTNB in 100 mM Tris/Acetat pH 5, 5 mM EDTA (Gesamtvolumen: 1 ml) versetzt, die Thiol/Disulfidaustauschreaktion durch Einstellen von pH 8 mit 1 M Tris-Base unter Deprotonierung der freien Thiolgruppen in Gang gesetzt und für 4 h bei 30 °C inkubiert. Die Derivatisierung wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt und anhand der damit ermittelten Endkonzentration an TNB im Derivatisierungsansatz die Anzahl der freien Cysteinreste im Fab-Fragment bestimmt (Ellman, 1959). Es wurden 37,6 nmol TNB gebildet. Bei insgesamt 40 nmol Cysteinresten (20 nmol Fab-Fragment mit zwei freien Cysteinresten) bedeutet dies, daß 94 % aller freien Cysteinreste am C-Terminus der leichten Kette mit TNB derivatisiert wurden. Daraus wurde gefolgert, daß bei fast allen muHRS3c Fab-Fragmenten beide freie Cysteinreste in der reaktiven Thiolform vorlagen. Durch Abtrennung des überschüssigen DTNB sowie des freigesetzten TNB mittels einer PD-10 Gelfiltrationssäule, die mit 100 mM Tris/Acetat-Puffer pH 5, 5 mM EDTA äquilibriert war, wurde das als gemischtes Disulfid aktivierte Fab-Fragment isoliert. Die photometrische Bestimmung der durch Reduktion mit 2-Mercaptoethanol aus diesem derivatisierten Fab-Fragment freigesetzten TNB-Moleküle bestätigte, daß über 90 % aller freien Cysteinreste mit TNB derivatisiert waren.

Untersuchungen zur Selbstkopplung zweier muHRS3c Fab-Fragmente während der Derivatisierung mit DTNB zeigten, daß keine signifikante Dimerisierung zweier muHRS3c Fab-Fragmente zu diesem Zeitpunkt stattgefunden hatte.

Für die Kopplung mit dem zweiten Fab-Fragment wurden 10 nmol des aktivierten Fab-Fragments mit der äquimolaren Menge des frisch reduzierten muA9 Fab-Fragments in einem Gesamtvolumen von 1 ml vereinigt und die Kopplungsreaktion durch Einstellen von pH 8 unter Zugabe von 1 M Tris-Base gestartet. Die Kopplungsreaktion war nach 2 h bei 30 °C praktisch vollständig, wie die photometrische Analyse des Reaktionsverlaufs bei 412 nm ergab (Abb. 30).

Aus der Extinktionsänderung während der Reaktion wurde die Kopplungseffizienz abgeschätzt. Die gemessene Endabsorption von $\Delta E_{412} = 0,21$ entsprach einer Menge von 14 nmol freigesetztem TNB. Unter der Annahme, daß bei Ausbildung zweier Disulfidbindungen zwischen den beiden Fab-Fragmenten mit ihren jeweils zwei freien Cysteinresten maximal 20 nmol TNB während der Kopplungsreaktion aus dem aktivierten muHRS3c Fab-Fragment freigesetzt werden konnten, entsprach dies einer mittleren Kopplungseffizienz von 70 %. Möglicherweise ist diese jedoch höher, da sicherlich $F(ab)_2$ -Fragment mit nur einer Disulfidbindung gebildet wurde.

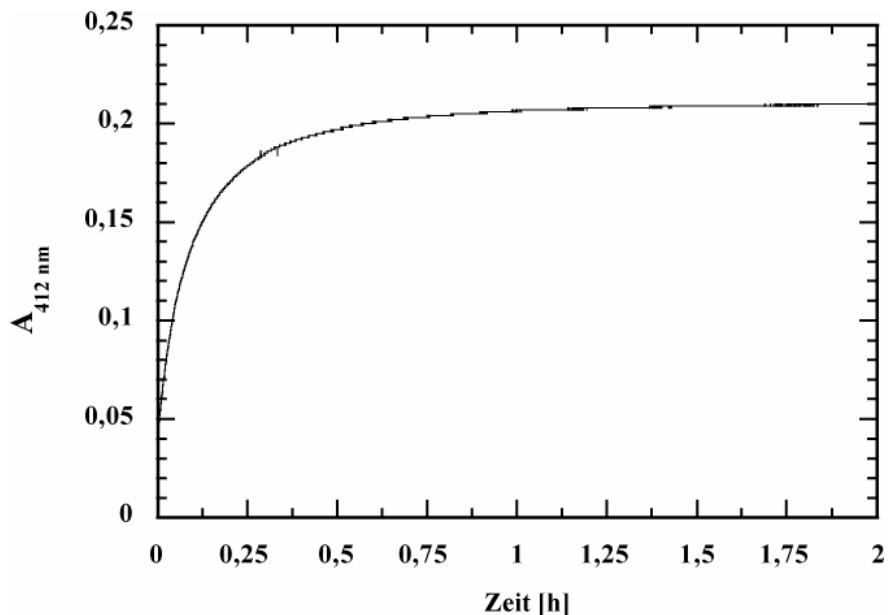


Abbildung 30: Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der Kopplungsreaktion anhand der Zunahme der Absorption von TNB bei 412 nm. Für die Kopplung wurden 10 nmol des als gemischtes Disulfid in 100 mM Tris/Acetat, pH 5, 5 mM EDTA vorliegenden muHRS3c Fab-Fragments sowie 10 nmol des reduzierten muA9 Fab-Fragments (1 ml Reaktionsvolumen bei 20 μ M Gesamtproteinkonzentration) gemischt, die Thiol/Disulfid-Austauschreaktion durch Einstellen von pH 8 unter Zugabe von 1 M Tris-Base gestartet und die Freisetzung von TNB anhand der Absorptionsänderung bei 412 nm für 2 h verfolgt.

Die Isolierung des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments aus dem Kopplungsansatz erfolgte mittels präparativer Gelfiltration auf einer Superdex 200 HiLoad Gelfiltrationssäule mit 50 mM Natriumphosphat pH 7,5, 150 mM NaCl als Chromatographiepuffer. Es wurde der komplette Kopplungsansatz mit einer Gesamtproteinkonzentration von 20 µM aufgetragen und das Elutionsprofil bei 280 nm bestimmt (Abb. 31). Dieses zeigte zwei gut separierte Peaks, wobei der steilere erste Peak dem bispezifischen F(ab)₂-Fragment mit ca. 100 kDa und der demgegenüber verbreiterte zweite Peak der Mischung aus nicht gekoppeltem muHRS3c und muA9 Fab-Fragment mit ca. 50 kDa zuzuordnen war. Das Verhältnis der Integralflächen des ersten und zweiten Peaks beträgt ungefähr 3 zu 2. Dies entspricht einer geschätzten Kopplungsausbeute von 60 % und deckt sich gut mit dem photometrisch bestimmten Wert.

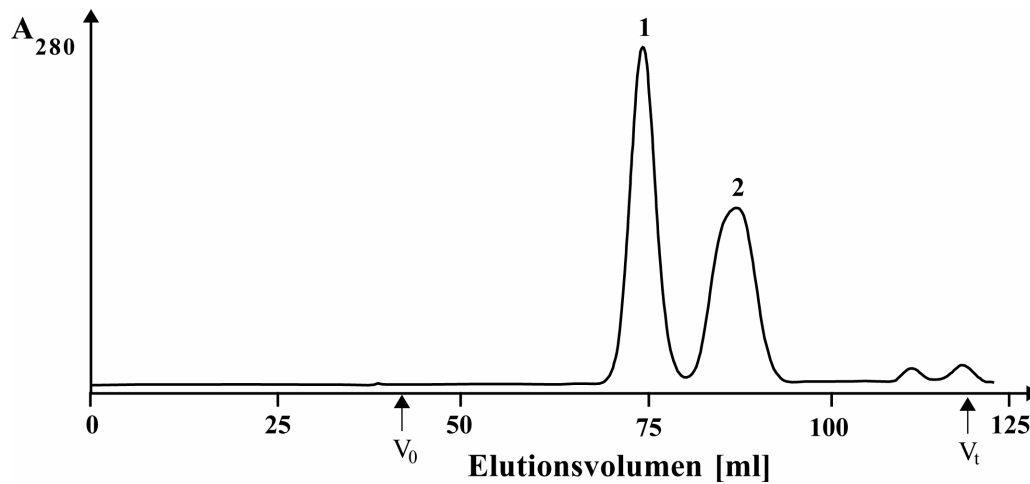


Abbildung 31: Elutionsprofil der präparativen Gelfiltration zur Isolierung des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments. 1 ml des Kopplungsansatzes mit äquimolaren Mengen von muHRS3c und muA9 Fab-Fragment mit Sequenzmotiv C in 100 mM Tris/Acetat, 5 mM EDTA, pH 8, wurde auf eine präparative Gelfiltrationssäule Superdex 200 HiLoad 16/60 (Säulenvolumen: 124 ml) aufgetragen und bei einer Flußrate von 1 ml/min mit 50 mM Na-Phosphat pH 7,5, 150 mM NaCl aufgetrennt. Gleichzeitig wurde die Absorption des Eluats bei 280 nm gemessen und Fraktionen a 4 ml gesammelt.

Für die Analyse des Kopplungsproduktes wurden Proben des zuvor gereinigten muHRS3c und muA9 Fab-Fragments mit dem Sequenzmotiv C sowie des isolierten bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments jeweils unter reduzierenden sowie nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff analysiert (Abb. 32).

Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, daß die Immunglobulinketten des muHRS3c und muA9 Fab-Fragments mit dem Sequenzmotiv C im reduzierten Zustand unterschiedliche Mobilitäten aufwiesen. Dies ermöglichte die eindeutige Identifizierung der vier Immunglobulinketten im bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragment in angenähert stöchiometrischem Verhältnis unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 32A). Unter nicht-

reduzierenden Bedingungen weisen die Immunglobulinketten des muHRS3c Fab-Fragments umgekehrte Mobilitäten auf, während die beiden Immunglobulinketten des muA9 Fab-Fragments ko-migrieren. Weiterhin sind unter nicht-reduzierenden Bedingungen das Dimer aus den kovalent verknüpften leichten Immunglobulinketten der beiden Fab-Fragmente sowie die beiden schweren Immunglobulinketten in ihrer monomeren Form zu sehen, da diese nur durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit den leichten Immunglobulinketten assoziiert sind. Das Vorliegen der beiden schweren Immunglobulinketten in nahezu stöchiometrischem Verhältnis schließt die Bildung größerer Mengen an bivalenten muHRS3c F(ab)₂-Fragmenten aus.

Eine weitere Analyse des Kopplungsproduktes erfolgte mittels Western Blotting. Hierzu wurden die beiden Fab- und das F(ab)₂-Fragment sowohl im reduzierten als auch nicht-reduzierten Zustand auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Auf einem Blot wurden mit einem Anti-Human-C_κ-Antikörper die den einzelnen Fab-Fragmenten entsprechenden leichten Immunglobulinketten nachgewiesen (Abb. 32B). Unter reduzierenden Bedingungen wurde das Dimer als leichten Immunglobulinketten gespalten und die monomeren leichten Immunglobulinketten wurden in angenähert stöchiometrischem Verhältnis sichtbar. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen war das Dimer aus leichten Immunglobulinketten zu sehen. Die zusätzlichen Banden bei 31 kDa entsprechen den schweren Immunglobulinketten von muA9 und muHRS3c, die aufgrund einer Kreuzreaktivität der Detektionsantikörper ebenfalls markiert wurden.

Auf einem zweiten Western Blot mit den gleichen Proben wurden mittels Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugat die beiden schweren Immunglobulinketten des muHRS3c und muA9 Fab-Fragments anhand des *Strep*-tag II nachgewiesen (Abb. 32C). Sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen waren die schweren Immunglobulinketten von muA9 und muHRS3c in angenähert stöchiometrischem Verhältnis sichtbar.

Diese Ergebnisse zeigten, daß das muHRS3c und muA9 Fab-Fragment regiospezifisch über eine Disulfidbrücke zwischen den beiden leichten Immunglobulinketten miteinander verknüpft werden konnten.

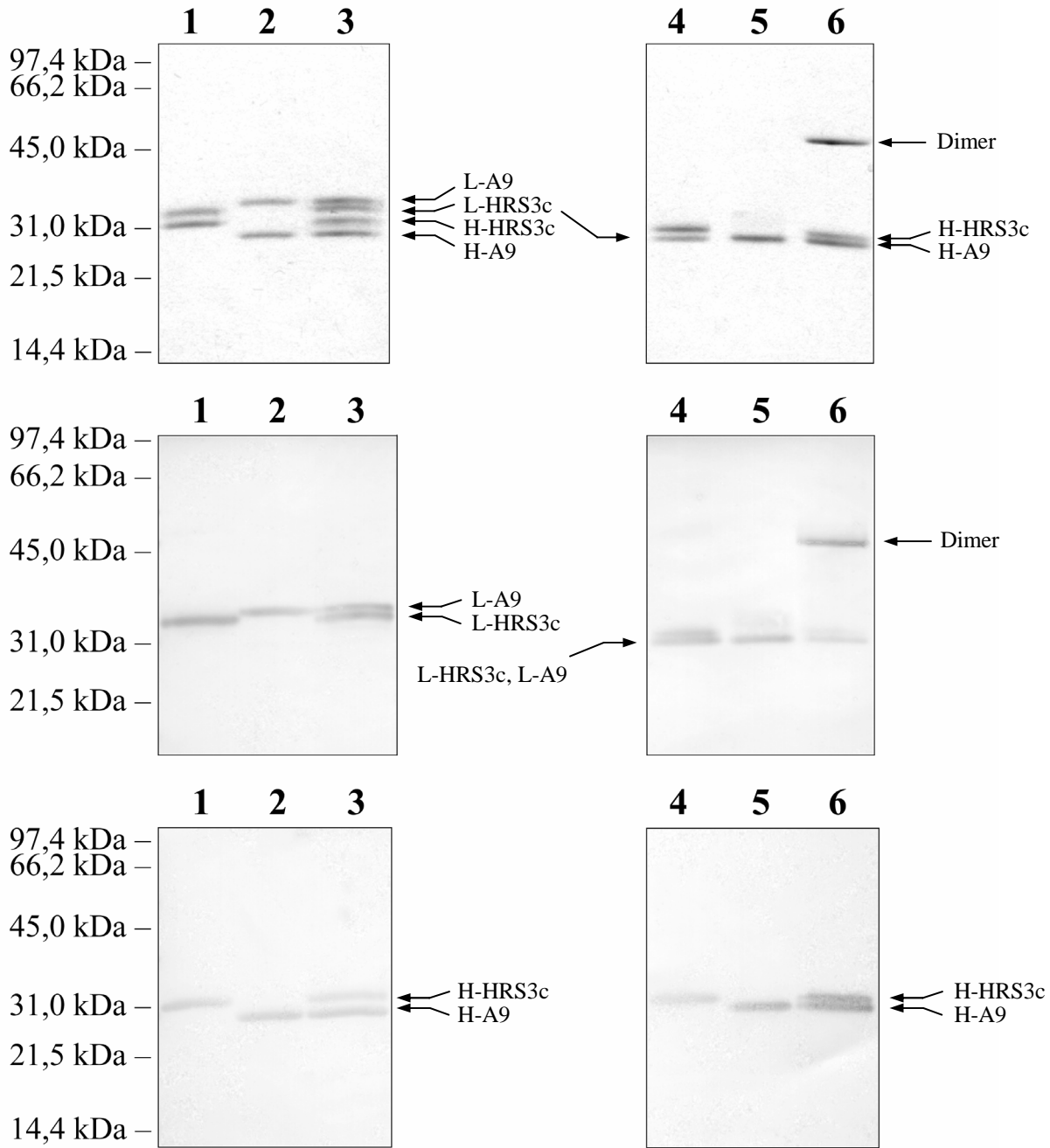


Abbildung 32: Analyse des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments mittels SDS-PAGE und Western Blotting. (A) SDS-PAGE des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments und Vergleich mit monomerem muHRS3c und muA9 Fab-Fragment, jeweils mit dem Sequenzmotiv C. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff wurden jeweils 3 µg des monomeren muHRS3c (Spur 1 und 4) und muA9 (Spur 2 und 5) Fab-Fragments sowie 6 µg des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments (Spur 3 und 6) aufgetragen. Die Proteinproben der Spuren 1 bis 3 wurden vor der Auftrennung durch Behandlung mit 2-Mercaptoethanol reduziert, die Proben der Spuren 4 bis 6 wurden nicht reduzierend behandelt. (B) Analyse des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments durch Western Blotting. Auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff wurde wie unter A beschrieben monomeres muHRS3c und muA9 Fab-Fragment sowie bispezifisches HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragment aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die leichte Immunglobulinkette wurde mittels Anti-human Cκ-IgG (aus Hasen), gefolgt von einem Zweitantikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Anti-Rabbit-IgG AP-Konjugat) nachgewiesen. (C) wie unter B, unter Nachweis der schweren Immunglobulinkette mittels Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat. Die leichten (L-) und schweren (H-) Immunglobulinketten sowie das Dimer aus leichten Ketten sind gekennzeichnet.

Zur Überprüfung der Funktionalität des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments hinsichtlich der Antigenerkennung wurde die Affinität für das rekombinante CD30A- bzw. CD16B-Antigenfragment mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.3). Zur Analyse der CD30A-Antigenerkennung wurde das bispezifische HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragment im Konzentrationsbereich von 12,5 nM bis 250 nM eingesetzt, für die CD16B-Antigenerkennung in Konzentrationen von 10 nM bis 200 nM. Dabei konnte jeweils eine zeitabhängige Komplexbildung des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments mit den beiden Antigenen anhand der Zunahme des Resonanzsignals beobachtet werden (Abb. 33). Die unspezifische Wechselwirkung auf dem Referenzkanal betrug je nach Konzentration zwischen 2 und 8 % der Bindungssignale für das Antigen. Die Bindungssignale wurden bezüglich des Hintergrunds korrigiert, gegen die entsprechende Konzentration an F(ab)₂-Fragment aufgetragen und die Bindungskurven durch nicht-lineare Regression angepasst. Dabei wurde eine Dissoziationskonstante von 58 ± 16 nM im Fall des CD30A-Antigenfragments sowie von 52 ± 4 nM im Fall des CD16B-Antigenfragments bestimmt.

Diese Ergebnisse zeigten, daß das bispezifische HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragment Affinitäten sowohl für CD30- als auch CD16-Antigen aufwies. Im Falle der CD30-Antigenbindung entsprach diese in etwa der des monoklonalen bispezifischen HRS3/A9 Mausantikörpers ($K_D = 82 \pm 9$ nM). Bei der CD16-Antigenbindung war die Affinität des A9-Arms um den Faktor 5 besser als im bispezifischen HRS3/A9 Mausantikörper ($K_D = 320 \pm 42$ nM).

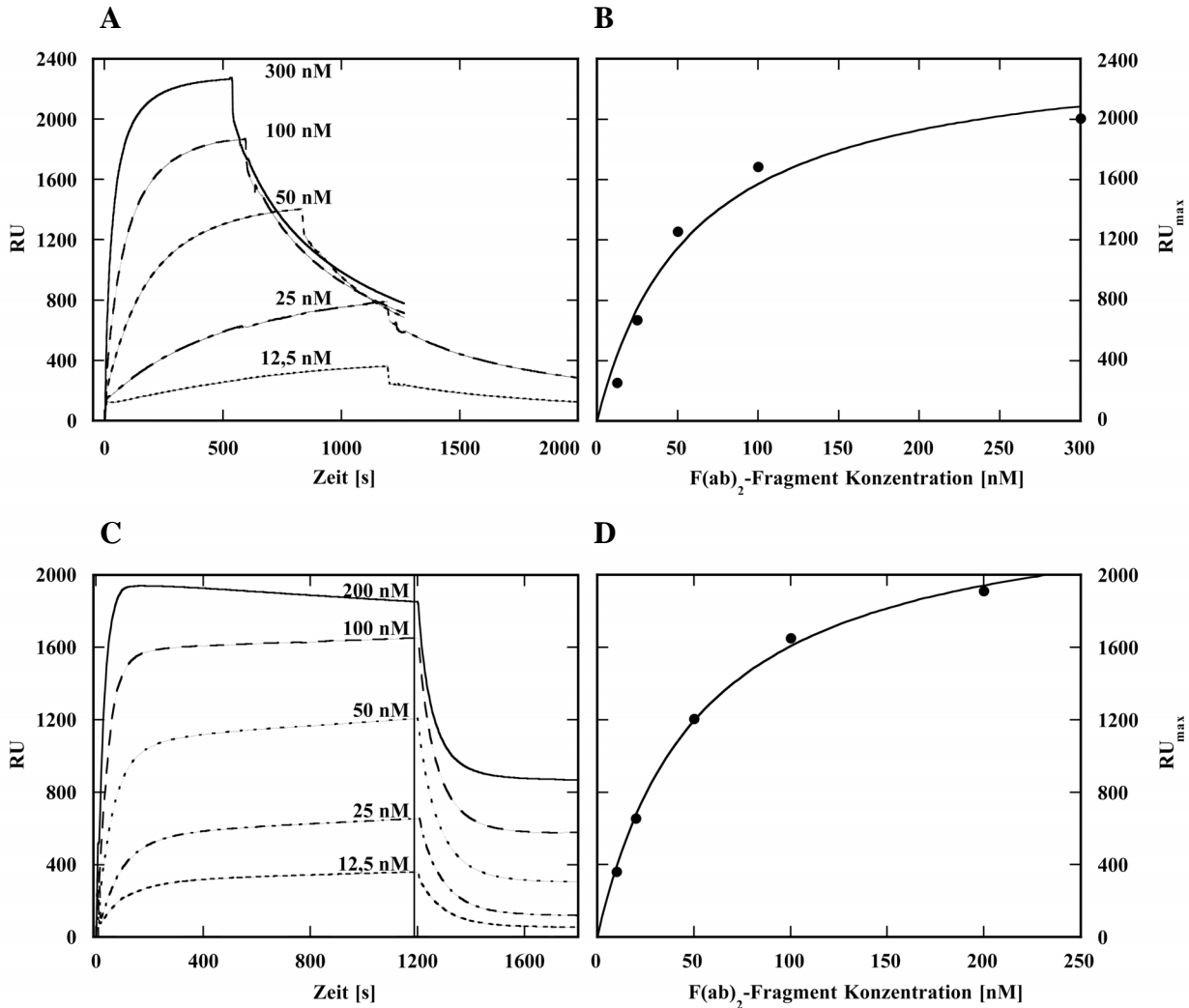


Abbildung 33: Quantitative Analyse der Affinität des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments für die rekombinanten CD30A- bzw. CD16B-Antigenfragmente durch Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Auf der Carboxydextran Oberfläche im Flußkanal 2 wurde CD30A- bzw. CD16B-Antigenfragment mittels Amin-Kopplung kovalent immobilisiert, was zu einer Zunahme des Resonanzsignals um 1600 bzw. 2300 RUs führte. Der Flußkanal 1 diente als Kontrolle zur Analyse unspezifischer Bindungsereignisse. Das F(ab)₂-Fragment lag in PBS/P vor und wurde bei einer Flußrate von 5 µl/min auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle appliziert. (A) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments für die Bindung an das immobilisierte CD30A. Folgende Konzentrationen wurden appliziert: 12,5 und 25 nM (100 µl), 50 nM (70 µl), 100 und 300 nM (32 µl). Die Sensorgrammkurven sind nicht durch die geringfügigen unspezifischen Signale im Referenzkanal korrigiert. (B) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) in der Gleichgewichtsphase gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die maximalen Resonanzsignale sind manuell durch die Signale unspezifischer Bindung korrigiert worden. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von 58 ± 16 nM. (C) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe des bispezifischen HRS3c/A9 F(ab)₂-Fragments für die Bindung an CD16B. Jeweils 100 µl einer 12,5, 25, 50, 100 und 200 nM Lösung des F(ab)₂-Fragments in PBS/P wurden auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle appliziert. Der senkrechte Balken am Ende der Injektionsphase bei ca. 1200 s kennzeichnet die maximalen Resonanzsignale. Weitere Angaben wie unter A. (D) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression ergab einen K_D -Wert von 52 ± 4 nM.

3.3.2 Entwicklung eines Sequenzmotivs mit zwei freien Cysteinresten und einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel

Alternativ zur Verwendung des *Strep*-tag II wurde das Sequenzmotiv C mit zwei freien Cysteinresten und einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel konstruiert. Dabei sollte untersucht werden, ob die Aktivität der freien Thiolreste während der Reinigung mittels Metallchelataffinitätschromatographie erhalten bleibt.

3.3.2.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pASK121-HRS3c und pASK121-A9 zur Produktion der entsprechenden Fab-Fragmente

Als Ausgangsplasmid für die Herstellung des Expressionsvektors, der die Produktion von Fab-Fragmenten mit dem Sequenzmotiv C und einem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel anstelle des *Strep*-tag II ermöglichte, wurde der Vektor pASK116-HRS3c (siehe Abschnitt 3.2.1) gewählt. Analog zur Vorgehensweise in Abschnitt 3.3.1.1 wurde durch ortsgerichtete Mutagenese nach Kunkel mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide MS-3 und MS-1 der Cysteinrest unmittelbar vor der Hexahistidin-Sequenz in der schweren Immunglobulinkette (Abb. 34) sowie eine *Bsp1286I*-Restriktionsschnittstelle vor der Hexahistidin-Sequenz deletiert, und parallel dazu ein zusätzlicher Cysteinrest am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette angefügt sowie eine *SacII*-Restriktionsschnittstelle in der Hybridisierungsregion deletiert (siehe Abb. 26). Nach Transformation von *E. coli* JM83 mit dem Mutagenese-Ansatz wurde die Plasmid-DNA aus 14 der erhaltenen Klone isoliert und eine Restriktionsanalyse mit den Endonukleasen *SacII/XhoI* sowie mit *Bsp1286I* durchgeführt. Ein Klon wies sowohl eine Deletion der *SacII*- als auch der *Bsp1286I*-Restriktionsschnittstelle auf. Durch DNA-Sequenzierung mit den Primern PR1 und PR3 wurde die Einführung der Mutationen verifiziert und das Plasmid als pASK121-HRS3c bezeichnet. Das Plasmid pASK121-A9 für die Produktion des A9 Fab-Fragments in dieser Form wurde analog zu pASK119-A9 in Abschnitt 3.3.1.1 durch Subklonierung der Genkassetten für die variablen Domänen konstruiert.

Primer MS-3

```

                Bsp1286I                                NcoI
ACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGCCATCACCACCATCACCATTAATAACCATGG
643 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----- 708
TGGTTCAGCTGTTCTTTCAACTCGGGTTTAGAACGGTAGTGGTGGTAGTGGTAATTATTGGTACC
ThrLysValAspLysLysValGluProLysSerCysHisHisHisHisHisHisHisEndEnd
      GCTGTTCTTTCAACTCGGaTTTAGAGTAGTGGTGGTAGTGGTA MS-3
ThrLysValAspLysLysValGluProLysSerHisHisHisHisHisHisHis

```

Abbildung 34: DNA-Sequenz für die mutierte Genregion in der humanen C_{H1}-Domäne (Primer MS-3) ausgehend von dem Plasmid pASK116-HRS3c. Restriktionsschnittstellen in der DNA-Sequenz sind kursiv dargestellt und die Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz angegeben. Die durch das Oligodesoxynukleotid MS-3 eingeführten Mutationen sind in Kleinbuchstaben dargestellt, die deletierte *Bsp1286I*-Restriktionsschnittstelle ist unterstrichen. Das mit Hilfe des Primers MS-3 deletierte, ursprünglich an Position 676-678 vorhandene Basentriplett für Cystein ist ebenfalls eingerahmt.

Für die bakterielle Produktion der chimären muHRS3c und muA9 Fab-Fragmente mit dem Sequenzmotiv C und dem His₆-tag im 2 l-Maßstab wurde der *E. coli* Stamm JM83 verwendet, der mit pASK121-HRS3c bzw. pASK121-A9 transformiert worden war. Die Induktion der Fremdgenexpression erfolgte bei einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 0,5 mit 200 µg/l aTc. Nach 3 h Induktion befand sich das Zellwachstum im Übergang zur stationären Phase. Die periplasmatische Proteinfraction wurde jeweils präpariert und die beiden Fab-Fragmente wurden daraus mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie an Zn²⁺/IDA-Sepharose gereinigt. Beide Fab-Fragmente konnten durch diese Einzelschrittreinigung in homogener Form erhalten werden. Das muHRS3c Fab-Fragment wurde mit einer Ausbeute von 0,5 mg pro Liter Kulturmedium (bei einer Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte von OD₅₅₀ = 1,2) isoliert, das entsprechende muA9 Fab-Fragment dagegen bloß mit 0,06 mg pro Liter Kulturmedium (bei OD₅₅₀ = 1 zum Zeitpunkt der Ernte).

Die Analyse der Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE (Abb. 35) zeigte, daß die leichte und schwere Immunglobulinkette der beiden Fab-Fragmente jeweils im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorlag. Wie in Abb. 28 waren bei Abwesenheit eines Reduktionsmittels die leichte und schwere Immunglobulinkette zu erkennen, die aufgrund der Deletion der interchenaren Disulfidbrücke im Fab-Fragment nur durch nicht-kovalente Wechselwirkungen assoziiert sind.

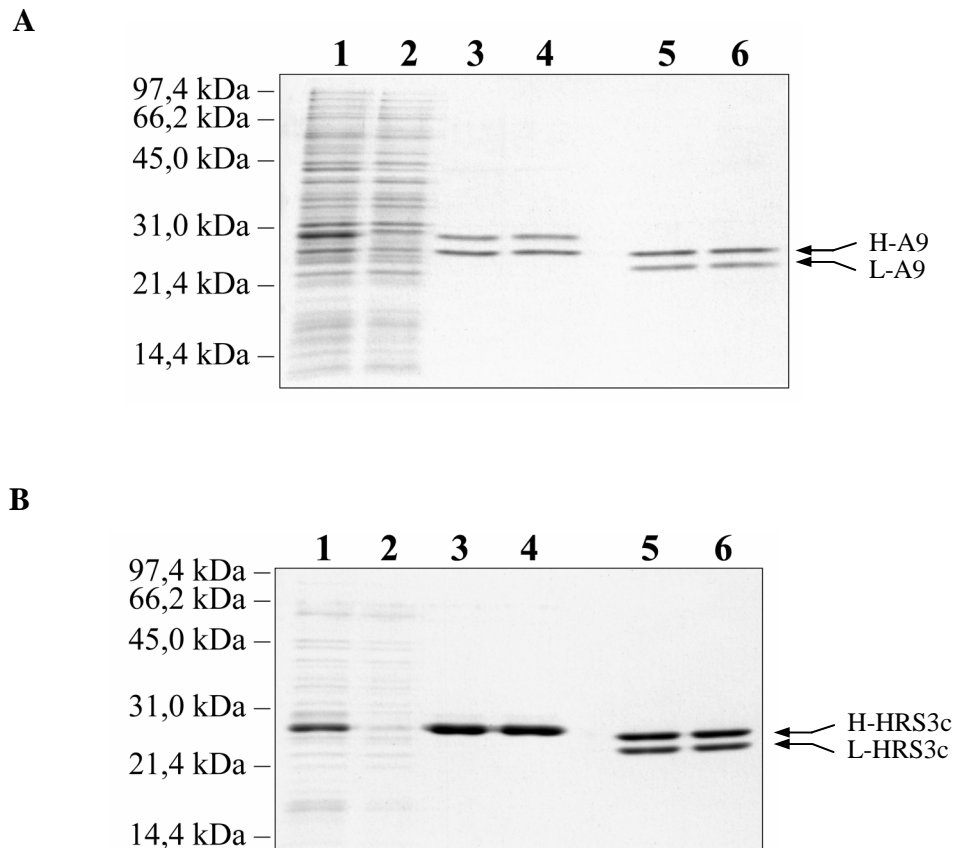


Abbildung 35: SDS-PAGE-Analyse zur Dokumentation der Einschritt-Reinigung der chimären Fab-Fragmente muA9 (A) und muHRS3c (B) mit dem Sequenzmotiv C und His₆-tag aus dem Periplasma von *E. coli*. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2) sowie zweier exemplarischer Eluatfraktionen der Metallchelate-Affinitätschromatographie im reduzierten (Spur 3 und 4) sowie im nicht reduzierten Zustand (Spur 5 und 6) aufgetragen. Die leichten (L-) und schweren (H-) Immunglobulinketten (nicht reduziert) sind gekennzeichnet.

3.3.2.2 Kopplung zweier muHRS3c Fab-Fragmente zum bivalenten F(ab)₂-Fragment

Zur Analyse des Kopplungsverhaltens des Sequenzmotivs C mit dem Hexahistidin-Affinitätsanhängsel wurden zwei chimäre muHRS3c Fab-Fragmente über eine Disulfidbrücke zum bivalenten F(ab)₂-Fragment gekoppelt.

Das muHRS3c Fab-Fragment wurde im 2 l-Maßstab produziert, nach der Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gegen einen Natriumphosphatpuffer (50 mM Natriumphosphat pH 7,5, 150 mM NaCl) dialysiert und aufkonzentriert. Analog zum Vorgehen unter Abschnitt 3.3.1.3 wurden die beiden freien Cysteinreste am C-Terminus der leichten Immunglobulinkette zunächst durch milde Reduktion mit 2-Mercaptoethanol aktiviert. Nach Abtrennung des überschüssigen 2-Mercaptoethanols wurde ein Teil des muHRS3c Fab-Fragments (30 nmol) mit einem 400-fachen molaren Überschuß an DTNB in 1 ml Reaktionsvolumen zum gemischten Disulfid derivatisiert. Die photometrische Verfolgung dieser Umsetzung ergab, daß 90 % der Cysteinreste in der freien Thiolform vorlagen.

Nach Abtrennung des überschüssigen DTNB wurden für die Kopplungsreaktion 20 nmol des gemischten Disulfids mit der gleichen Menge des Fab-Fragments mit freien Thiolgruppen in einem Gesamtvolumen von 1 ml vereinigt und die Thiol/Disulfidaustauschreaktion durch Erhöhung des pH-Wertes von 5 auf 8 mit Tris-Base gestartet. Die gemessene Absorptionsdifferenz $\Delta OD_{412} = 0,25$ nach 1,25 h Reaktionsdauer bei 30 °C entsprach einer Freisetzung von 17,7 nmol TNB. Unter der Annahme, daß maximal 40 nmol TNB bei der Ausbildung zweier Disulfidbrücken im $F(ab)_2$ -Fragment während der Kopplungsreaktion entstehen konnten, weist dies auf eine Kopplungseffizienz von 45 % hin.

Die Analyse des mittels Gelfiltration isolierten $F(ab)_2$ -Fragments auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 36) zeigte bei Abwesenheit eines Reduktionsmittels das gebildete Dimer aus den leichten Immunglobulinketten bei 48 kDa sowie die einzelnen schweren Immunglobulinketten bei 25 kDa. Das Dimer konnte durch Reduktion mit 2-Mercaptoethanol in die beiden Ketten dissoziiert werden.

Diese Ergebnisse belegen, daß die Aktivität der freien Cysteinreste durch die Anwesenheit der Zinkionen während der Reinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie nicht beeinträchtigt wurde und somit die effiziente Kopplung zweier auf diese Weise gereinigter Fab-Fragmente über freie Thiolreste möglich war.

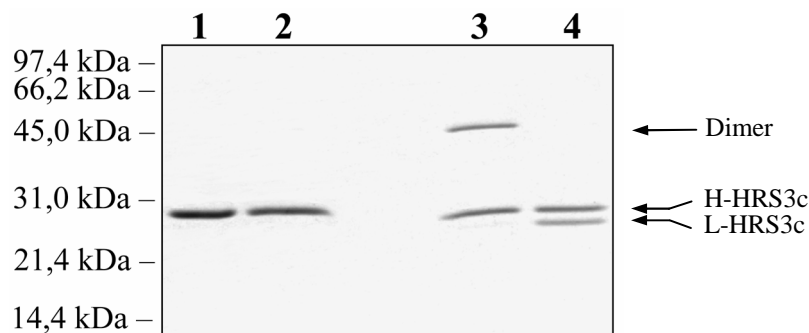


Abbildung 36: Analyse des bivalenten HRS3c $F(ab)_2$ -Fragments mittels SDS-PAGE. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 4 μ g des durch Gelfiltration isolierten bivalenten HRS3c $F(ab)_2$ -Fragments (Spur 1 und 3) und des monomeren μ HRS3c (Spur 2 und 4) aufgetragen. Die Proteinproben der Spuren 1 und 2 wurden vor der Auftrennung durch Behandlung mit 2-Mercaptoethanol reduziert, die Proben der Spuren 3 und 4 wurden nicht reduzierend behandelt. Die leichten (L-) und schweren (H-) Immunglobulinketten sowie das Dimer aus leichten Ketten sind gekennzeichnet.

3.3.3 Entwicklung eines Sequenzmotivs mit nur einem freien Cysteinrest und dem *Strep*-tag II-Affinitätsanhänger

Nachdem die Kopplungschemie im Prinzip etabliert war, sollte ein minimales Strukturmotiv zur Verknüpfung zweier Fab-Fragmente konstruiert und damit eventuelle chemische Inhomogenitäten aufgrund der nicht umgesetzten zweiten Thiolgruppe vermieden werden. Das neue Sequenzmotiv wies nur noch einen freien Cysteinrest am C-Terminus der leichten

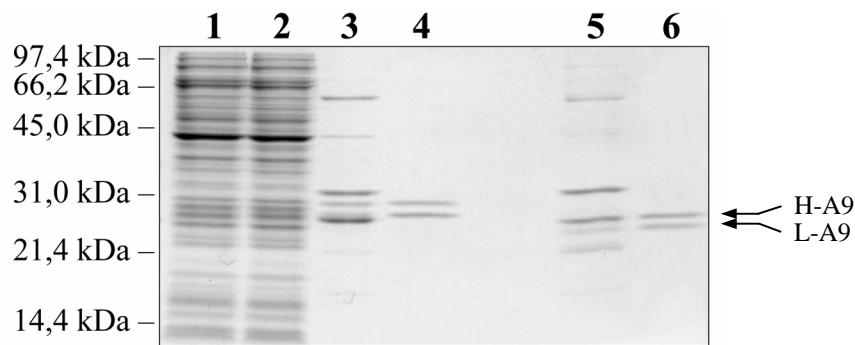
Immunglobulinkette auf. In dieser als Sequenzmotiv D bezeichneten Form war ebenfalls der Cysteinrest unmittelbar vor dem *Strep*-tag II am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette deletiert, so daß keine interchenare Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Immunglobulinkette ausgebildet werden konnte.

3.3.3.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pASK120-HRS3c und pASK120-A9 zur Produktion der entsprechenden Fab-Fragmente

Für die Konstruktion von Expressionsvektoren zur Produktion der beiden Fab-Fragmente mit dem Sequenzmotiv D wurde die Gensequenz für die humane C_κ-Domäne mit dem zusätzlichen freien Cysteinrest auf pASK119-HRS3c bzw. pASK119-A9 durch das native Gen für die C_κ-Domäne ausgetauscht. Hierfür wurde das entsprechende Genfragment mit den Restriktionsenzymen *XhoI/HindIII* aus dem Plasmid pASK119-HRS3c herausgeschnitten und das Vektorfragment (4077 bp) isoliert (analog mit pASK119-A9: 4065 bp). pASK88-HRS3c (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde ebenfalls mit *XhoI/HindIII* geschnitten und das kleine Fragment mit der Gensequenz für die native C_κ-Domäne (337 bp) präpariert. Nach Ligierung dieser beiden Fragmente wurde *E. coli* JM83 transformiert und die Plasmide jeweils zweier Klone isoliert. Der Austausch des C_κ-Gens wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt und die neuen Plasmide mit pASK120-HRS3c bzw. pASK120-A9 bezeichnet.

Für die Produktion der beiden Fab-Fragmente mit dem Sequenzmotiv D im 2 l-Maßstab wurde der *E. coli* Stamm JM83 eingesetzt, der mit den Plasmiden pASK120-A9 bzw. pASK120-HRS3c transformiert war. Die beiden Fab-Fragmente wurden mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert. Im Falle des A9 Fab-Fragments wurde in einem zweiten Reinigungsschritt mittels Gelfiltration (Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade) das Protein zur Homogenität gereinigt. Die gereinigten Fab-Fragmente wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 37), wobei aufgrund der fehlenden Disulfidbrücke im reduzierten wie auch im oxidierten Zustand jeweils die beiden Polypeptidketten der leichten und schweren Immunglobulinkette aufgetrennt erschienen. Weiterhin zeigte sich, daß – im Gegensatz zum Sequenzmotiv C – bei beiden Fab-Fragmenten in der Eluatfraction der Streptavidin-Affinitätschromatographie in geringer Menge Homodimere (ca. 10–15 %) aus den leichten Immunglobulinketten vorhanden waren. Das muHRS3c Fab-Fragment mit dem Sequenzmotiv D konnte mit typischen Ausbeuten von 0,5 mg pro Liter Kulturmedium (bei einer Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte von OD₅₅₀ = 1,2) isoliert werden, das entsprechende muA9 Fab-Fragment dagegen nur mit 50 µg pro Liter Kulturmedium (bei einer OD₅₅₀ = 1 zum Zeitpunkt der Ernte).

A



B

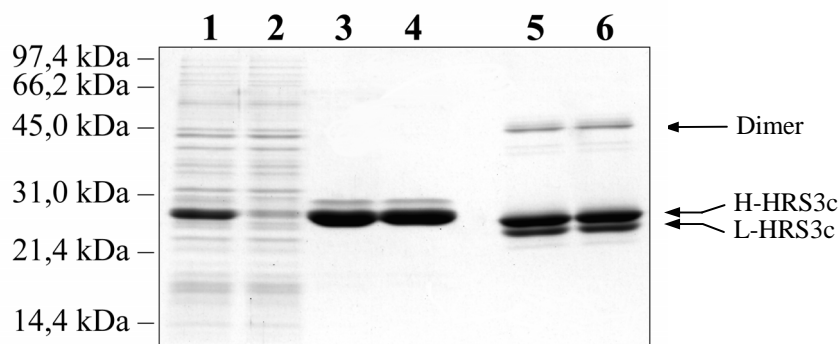


Abbildung 37: SDS-PAGE-Analyse zur Dokumentation der Reinigung der chimären Fab-Fragmente muA9 (A) und muHRS3c (B) mit dem Sequenzmotiv D. *E. coli* JM83/pASK120-A9 bzw. pASK120-HRS3c wurde im 2 l-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus die Fab-Fragmente mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert. (A) muA9. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs der Streptavidin-Affinitätschromatographie (Spur 2) und einer exemplarischen Eluatfraktion der Streptavidin-Affinitätschromatographie und der Gelfiltration im reduzierten (Spur 3 und 4) sowie im nicht reduzierten Zustand (Spur 5 und 6) aufgetragen. (B) muHRS3c. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde jeweils eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs der Streptavidin-Affinitätschromatographie (Spur 2) sowie zweier Eluatfraktion der Streptavidin-Affinitätschromatographie im reduzierten (Spur 3 und 4) sowie im nicht reduzierten Zustand (Spur 5 und 6) aufgetragen. Die leichten (L-) und schweren (H-) Immunglobulinketten (nicht reduziert) sowie das Dimer aus leichten Ketten sind gekennzeichnet.

Für die Produktion größerer Proteinmengen wurden die beiden Fab-Fragmente im 8 l-Maßstab, analog wie unter Abschnitt 3.3.1.1 beschrieben, fermentiert. Für die Produktion des chimären muHRS3c Fab-Fragments mit Sequenzmotiv D wurde der *E. coli* Stamm W3110 eingesetzt und für die Herstellung des chimären muA9 der Stamm JM83/F'. Die Fermentationskulturen wiesen ein exponentielles Wachstum auf, und die Induktion erfolgte bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 20$ für 2,5 h. Die mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Proteinfraction isolierten Fab-Fragmente wurden mittels Gelfiltration zur Homogenität gereinigt. Die Ausbeute für das chimäre muHRS3c Fab-Fragment lag bei 21 mg, für das muA9 Fab-Fragment bei 7 mg.

3.3.3.2 Kopplung der Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 zum bispezifischen F(ab)₂-Fragment

Zur Kopplung der beiden Fab-Fragmente muHRS3c und muA9 mit einem einzelnen freien Cysteinrest am C-Terminus der leichten Kette wurde dieselbe Vorgehensweise wie in Abschnitt 3.3.1.3 angewandt.

Die Thiolreste der beiden Fab-Fragmente wurden zunächst mit 10 mM 2-Mercaptoethanol reduziert und anschließend das muHRS3c Fab-Fragment mit DTNB derivatisiert. Die photometrische Analyse dieser Umsetzung zeigte, daß 95 % der freien Cysteinreste des muHRS3c Fab-Fragments aktiviert werden konnten. Jeweils 40 nmol der beiden Fab-Fragmente wurden im Reaktionsansatz (1 ml Gesamtvolumen; 80 µM Gesamtproteinkonzentration) vereinigt und die Kopplungsreaktion durch Erhöhung des pH-Wertes von 5 auf 8 mit 1 M Tris-Base gestartet. Die Kopplungsreaktion wurde photometrisch bei 412 nm verfolgt (Abb. 38). Nach 2 h Inkubation bei 30 °C betrug die Extinktionsdifferenz $\Delta E = 0,32$, was einer freigesetzten Menge von 22 nmol TNB entsprach. Unter der Annahme, daß pro Kopplungsereignis ein Molekül NTB und somit maximal 40 nmol NTB freigesetzt werden konnten, entsprach dies einer Kopplungseffizienz von 55 %.

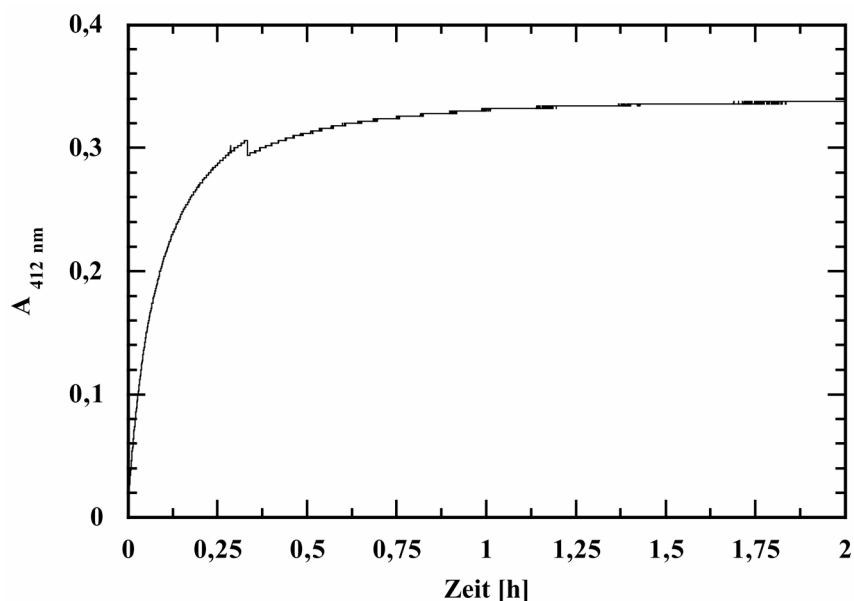


Abbildung 38: Dokumentation des zeitlichen Verlaufs der Kopplungsreaktion anhand der Zunahme der Absorption von TNB bei 412 nm. Für die Kopplung wurden 40 nmol des als gemischtes Disulfid in 100 mM Tris/Acetat, pH 5, 5 mM EDTA vorliegenden muHRS3c Fab-Fragments sowie 40 nmol des reduzierten muA9 Fab-Fragments (1 ml Reaktionsvolumen bei 80 µM Gesamtproteinkonzentration) gemischt, die Thiol/Disulfid-Austauschreaktion durch Einstellen von pH 8 unter Zugabe von 1 M Tris-Base gestartet und die Freisetzung von TNB anhand der Absorptionsänderung bei 412 nm für 2 h verfolgt.

Das bispezifische F(ab)₂-Fragment wurde durch Gelfiltration mit einer Superdex 200 HiLoad Säule aus dem Kopplungsansatz isoliert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 39). Das

Coomassie gefärbte Gel wies das gleiche Bandenmuster auf, wie schon in Abb. 32A zu sehen ist. In Abwesenheit eines Reduktionsmittels wurde eine Bande bei ca. 50 kDa angefärbt, die dem Dimer aus leichten Immunglobulinketten entsprach, und zwei Banden bei 25 kDa mit den entsprechenden beiden schweren Immunglobulinketten des muHRS3c und muA9 Fab-Fragments. Die vier Banden bei 25 kDa im reduzierten Zustand hatten dieselbe Intensität, was zeigt, daß die beiden Fab-Fragmente im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 miteinander gekoppelt wurden.

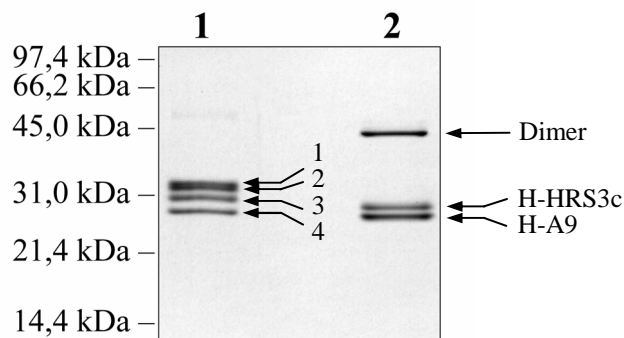


Abbildung 39: Analyse des bispezifischen A9/HRS3c F(ab)₂-Fragments mittels SDS-PAGE. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel mit 6 M Harnstoff wurden 2 µg des durch Gelfiltration isolierten bispezifischen A9/HRS3c F(ab)₂-Fragments im reduzierten (Spur 1) sowie nicht reduzierten Zustand (Spur 2) aufgetragen. Die leichten (L-) und schweren (H-) Immunglobulinketten sowie das Dimer aus leichten Ketten sind gekennzeichnet (1: L-A9; 2: L-HRS3c; 3: H-HRS3c; 4: H-A9).

Somit konnte demonstriert werden, daß eine effiziente und regioselektive Kopplung zweier Fab-Fragmente mit nur einem freien Cysteinrest am C-Terminus der leichten Immunglobulinkette mittels einer Disulfidbrücke möglich war. Für spätere Kopplungsversuche wurde immer das Sequenzmotiv D mit dem *Strep*-tag II verwendet.

3.4 Humanisierung der variablen Domänen des muHRS3c Fab-Fragments mittels CDR-Transplantation

In zwei klinischen Studien an Patienten mit Hodgkin-Lymphom wurde die antitumorale Wirksamkeit des bispezifischen HRS3/A9 monoklonalen Mausantikörpers nachgewiesen (Renner *et al.*, 1997; Renner *et al.*, 2000). Die Anwendung des murinen Immunglobulins über einen Zeitraum von mehreren Wochen führte jedoch zur Entwicklung einer Human-anti-Maus-Antwort (HAMA), wodurch die für eine erfolgreiche Therapie notwendige andauernde Applikation dieses bispezifischen Antikörpers verhindert wurde.

Um dieses immunologische Problem zu beseitigen, sollte ein bispezifisches humanisiertes HRS3/A9 F(ab)₂-Fragment konstruiert werden. Die Humanisierung des HRS3-Arms war Gegenstand dieser Arbeit. Ausgehend vom chimären muHRS3c Fab-Fragment mit humanen

konstanten Domänen wurden die murinen Gerüstregionen in einem als CDR-Transplantation bezeichneten Verfahren (Riechmann *et al.*, 1988) durch entsprechende humane Sequenzen ersetzt. Die generelle Vorgehensweise dazu verläuft in folgenden Schritten (Bending & Jones, 1996):

1. Analyse der Primärsequenz der variablen Domänen des Ausgangsantikörpers (Subtyp, Länge der CDRs und der Gerüstregionen, kanonische Strukturen (Chothia & Lesk 1987), Positionen in der V_L/V_H -Kontaktregion (Johnson & Wu, 2001), "Vernier"-Region (Foote & Winter, 1992) mit CDR-flankierenden Aminosäuren);
2. Auswahl humaner variabler Domänen mit größtmöglicher Sequenzhomologie und Übereinstimmung in den unter 1.) genannten Kriterien mit dem Ausgangsantikörper;
3. Design der Aminosäuresequenzen für die humanisierten variablen Domänen aus den CDR-Sequenzen des ursprünglichen monoklonalen und den Gerüstsequenzen des humanen Antikörpers unter Belassung von Resten an kritischen Positionen ("Vernier"-Region; V_L/V_H -Kontaktregion);
4. Planung der Oligodesoxynukleotide für die Gensynthese der künstlichen variablen Domänen des humanisierten Antikörpers; Gensynthese mittels PCR-*Assembly*;
5. Inserierung der Gene für die humanisierte V_L/V_H -Domänen in einen geeigneten Vektor, Analyse mittels DNA-Sequenzierung;
6. Bakterielle Produktion und Reinigung des künstlichen humanisierten Antikörperfragments;
7. Proteinchemische und funktionelle Analyse des humanisierten Antikörperfragments.

3.4.1 Auswahl der zu humanisierenden Positionen und Synthese der Gene für die V_L - und V_H -Domäne mittels PCR-*Assembly*

Zur Herstellung des sogenannten huHRS3 Fab-Fragments, das aus der Humanisierung des chimären muHRS3c durch CDR-Transplantation resultieren sollte, wurde in einem ersten Schritt eine Datenbank-Recherche (*The Kabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest*; Johnson & Wu, 2001) zur Identifizierung von humanen variablen Domänen mit größtmöglicher Homologie zu muHRS3c durchgeführt. Dabei zeigte der Anti-HER2 hu4D5 Antikörper (Version 8; Carter *et al.*, 1992a), dessen variable Domänen auf Basis humaner Konsensussequenzen humanisiert wurden, eine Sequenzidentität mit muHRS3 im Bereich der Gerüstregionen von 78 % (24 Unterschiede in 107 AS) für die V_L - und 72 % (34 Unterschiede in 123 AS) für die V_H -Domäne. Ein direkter Vergleich mit den für die Humanisierung des murinen 4D5 Antikörpers verwendeten humanen Konsensussequenzen (V_L : V_{κ} -Untergruppe I; V_H : V_H -Untergruppe III; Kabat *et al.*, 1991) ergab im Fall der V_L -Domäne 22 und bei der V_H -Domäne 33 Unterschiede. Aufgrund dieser hohen Homologie

wurden die Konsensussequenzen als Grundlage zur Humanisierung von muHRS3c ausgewählt.

Zur Planung der humanisierten Aminosäuresequenzen für die V_L- und V_H-Domäne wurden die Sequenzabschnitte für die jeweils drei CDRs aus den murinen HRS3 variablen Domänen an den entsprechenden Positionen in die humanen Konsensussequenzen eingesetzt (Abb. 40).

V_H

			xxxxxxx			xxxxxx
	1	10	30	36	49	
muHRS3c	E V K L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T T Y T I H W V R Q R P G H D L E W I G Y I N P S S G Y S D Y N Q					
HCS VHIII	E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S W V R Q A P G K G L E W V S					
hu4D5-8	E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F N I K D T Y I H W V R Q A P G K G L E W V A R I Y P T N G Y T R Y A D					
huHRS3	E V K L Q E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T T Y T I H W V R Q A P G K G L E W V S Y I N P S S G Y S D Y N Q					
	1	10	20	30	40	50 60
						xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
	66			94	103	113
muHRS3c	N F K G K T T L T A D K S N T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A R R A D Y G N Y E Y T W F A Y W G Q G T T V T V S S					
HCS VHIII	R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R W G Q G T L V T V S S					
hu4D5-8	S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C S R W G G D G F Y A M D Y W G Q G T L V T V S S					
huHRS3	N F K G R F T I S A D K S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R A D Y G N Y E Y T W F A Y W G Q G T L V T V S S					
		70	80	90	100	110 120

V_L

			xxxxxxxxxxxx			xxxxxxx
	1	10	23	35	49	57
muHRS3c	D I E L T Q S P K F M S T S V G D R V N V T C K A S Q N V G T N V A W F Q Q K P G Q S P K V L I Y S A S Y R Y S G V P D R F T					
HCS Vki	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G V P S R F S					
hu4D5-8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S					
huHRS3	D I E L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q N V G T N V A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y S G V P S R F S					
	1	10	20	30	40	50 60
						xxxxxxxxxxxx
			88	98	107	
muHRS3c	G S G S G T D F T L T I S N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y H T Y P L T F G G G T K L E I K					
HCS Vki	G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C F G Q G T K V E I K					
hu4D5-8	G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K					
huHRS3	G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H T Y P L T F G Q G T K L E I K					
		70	80	90	100	

Abbildung 40: Vergleich der Primärsequenzen der Gerüstregionen der muHRS3c und hu4D5 (Version 8; Carter *et al.*, 1992a) V_H- und V_L-Domänen zusammen mit der jeweiligen humanen Konsensussequenz (HCS) sowie der Aminosäuresequenz der humanisierten (hu) HRS3 Domänen. Die Aminosäure-Unterschiede zwischen der murinen (mu) HRS3c und humanen Konsensussequenz, die in huHRS3 übernommen wurden, sind in Fettdruck dargestellt. Die Aminosäuresequenzen der muHRS3c und huHRS3 variablen Domänen entsprechen den vektorkodierten Sequenzen. Die durch Einführung standardisierter Restriktionsschnittstellen bedingter Aminosäuresubstitutionen sind unterstrichen. Die CDR-Sequenzen nach Kabat *et al.* (1987) sind eingerahmt und nach der Definition nach Chothia *et al.* (1987.) mit xxx gekennzeichnet. Die Numerierung der Positionen erfolgte nach Kabat *et al.* (1987) (über der muHRS3c Aminosäuresequenz) und sequentiell (unter der huHRS3 Aminosäuresequenz). Aus der murinen Gerüstsequenz in der huHRS3 Sequenz aufgrund struktureller Kriterien übernommene Aminosäurereste sind mit grau unterlegt. Aminosäurepositionen der "Vernier"-Region sind in der

muHRS3c Aminosäuresequenz überstrichen. Aminosäurepositionen der V_H/V_L Kontaktregion sind in der huHRS3 Aminosäuresequenz mit hellgrauem Kursivdruck gekennzeichnet.

In den meisten Fällen führt die Humanisierung mittels CDR-Transplantation zu einer Abnahme der Affinität, teilweise bis hin zu einem völligen Affinitätsverlust (Baca *et al.*, 1997; Morea *et al.*, 2000). Um die Bindungseigenschaft zu bewahren, ist es an bestimmten Stellen nötig, murine Aminosäurereste aus dem ursprünglichen Antikörper zu übernehmen. Dies gilt vor allem an für die Ausbildung der kanonischen Strukturen wichtigen Positionen, um Konformationsänderungen in den humanisierten V_L - und V_H -Domänen zu vermeiden, und für Positionen der "Vernier"-Region (Foote & Winter, 1992), die als Plattform für die Präsentation der CDRs dienen und zu einem großen Teil von CDR-flankierenden Aminosäuren gebildet wird. Weiterhin sind die Positionen in der V_H/V_L -Kontaktregion zu berücksichtigen.

Als hilfreich für die Auswahl solcher mit murinen Aminosäuren zu besetzenden Positionen erwies sich das Vorhandensein einer Kristallstruktur des ebenfalls auf der Basis der beiden humanen Konsensussequenzen V_{HIII} und V_{KI} humanisierten Antikörpers hu4D5 (Version Nr. 8; PDB Code: 1FVC; Eigenbrot *et al.*, 1993; Abb. 41). Damit konnte abgeschätzt werden, inwieweit der Austausch einer Aminosäure in der humanen Konsensussequenz einen Einfluß auf die Gesamtstruktur der variablen Domänen hatte.

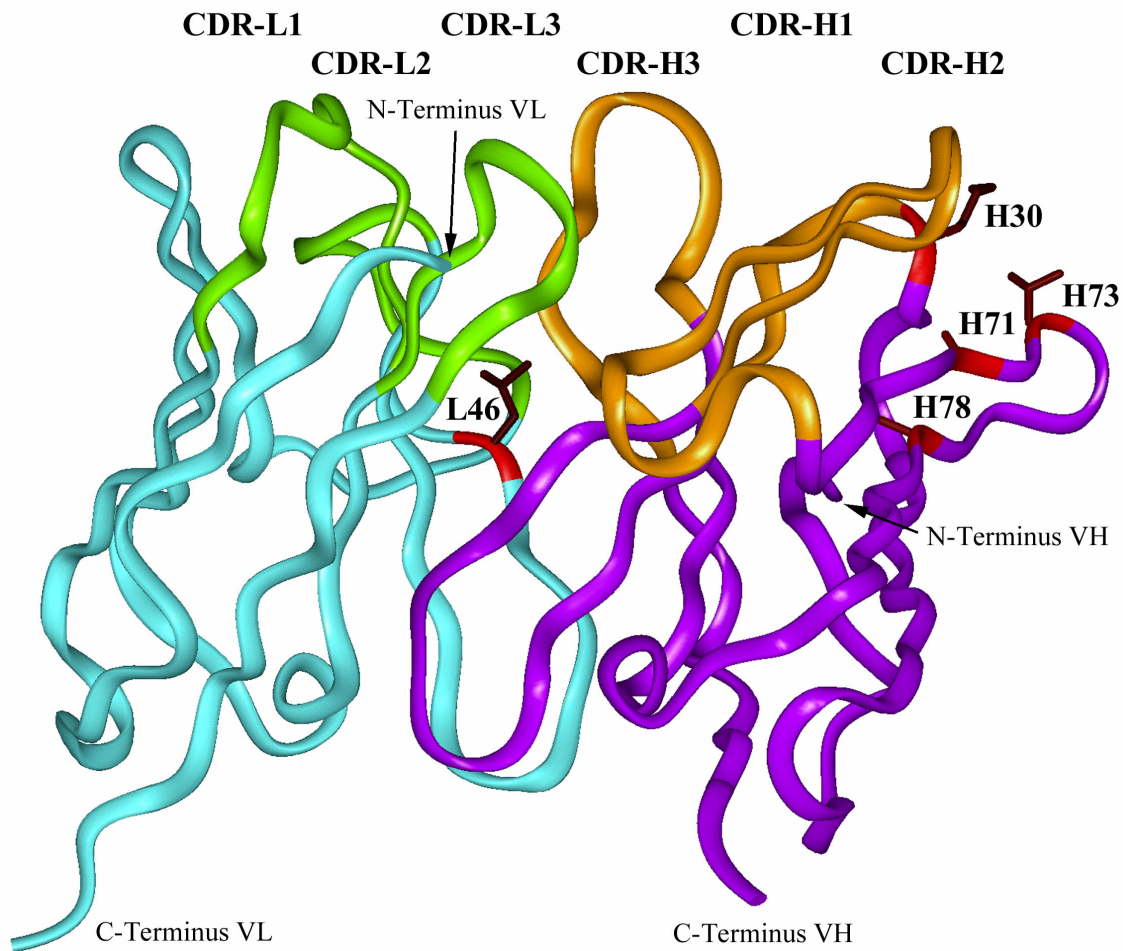


Abbildung 41: Kristallstruktur des humanisierten 4D5 Fv-Fragments; Version Nr. 8 (PDB Code 1FVC). Die Gerüstregion der V_L -Domäne ist in türkisblau dargestellt, die der V_H -Domäne in violett. Die einzelnen CDRs beider variabler Domänen (V_L : grün; V_H : gold) sind beschriftet. Die Aminosäurepositionen, an denen bei der Humanisierung der muHRS3 variablen Domänen die entsprechende Aminosäure aus der murinen Sequenz beibehalten wurde, sind in rot dargestellt (hu4D5: Leu^{L46}; Lys^{H30}; Ala^{H71}; Thr^{H73}; Ala^{H78}; huHRS3: Val^{L46}; Thr^{H30}; Ala^{H71}; Lys^{H73}; Ala^{H78}). Die Numerierung der Aminosäurepositionen erfolgte nach der Definition von Kabat *et al.* (1987).

Bei der Planung der zu synthetisierenden Primärsequenz der künstlichen V_H -Domäne von huHRS3 wurden zunächst die von Chothia & Lesk (1987) definierten Positionen angepaßt, so daß in der huHRS3 V_H -Domäne dieselben kanonischen Strukturen vorlagen wie in muHRS3 (Tabelle 2). Diese Positionen waren in der humanen Konsensussequenz V_{HIII} bis auf V_{H71} identisch mit muHRS3. An jener Position wurde für die huHRS3 Sequenz Ala71 aus der muHRS3c Aminosäuresequenz anstelle von Arg71 aus der humanen Konsensussequenz verwendet.

CDR	Strukturklasse	essentielle Aminosäurepositionen und dort jeweils erlaubte Aminosäuren		Aminosäure in muriner Sequenz
L-1	2	2 (2) 25 (25) 29 (29) 33 (33) 71 (71)	Ile Ala Ile/Val Ile/Leu/Val Phe/Tyr	Ile Ala Val Val Phe
L-2	1	48 (48) 64 (48)	Ile/Val Gly	Ile Gly
L-3	1	90 (90) 95 (95) 97 (97)	Gln/Asn/His Pro Ser/Thr	Gln Pro Thr
H-1	1	24 (24) 26 (26) 27 (27) 29 (29) 34 (34) 94 (97)	Ala/Val/Ser/Thr Gly Phe/Tyr/Ser/Asp Phe/Leu/Ile Met/Val/Ile/Tyr/Trp Arg/Gly/Asn/Lys/Ser	Ala Gly Tyr Phe Ile Arg
H-2	2	52A (53) 55 (56) 71 (72)	Pro/Thr/Ala Gly/Asn/Asp/Ser Ala/Leu/Thr	Pro Gly Ala

Tabelle 2: Kanonische Strukturen der muHRS3c variablen Domänen nach Chothia & Lesk (1987) und wichtige Aminosäurepositionen für die Schleifen-Konformation gemäß dem Sequenzschema von Kabat *et al.* (1987). In Klammern ist die konsekutive Sequenzposition angegeben. In Fettdruck sind Aminosäurepositionen in der Gerüstregion gekennzeichnet, in Normaldruck diejenigen in den CDRs.

Bei der Humanisierung des 4D5 Antikörpers durch Carter *et al.* (1992a) erwies es sich insbesondere für die V_H-Domäne als essentiell, Aminosäurereste aus der murinen Sequenz an bestimmten Positionen der "Vernier"-Region beizubehalten. Die Positionen 28-30 unmittelbar vor CDR-H1 sowie die Positionen 71, 73 und 78 (Kabat-Nomenklatur) in FR-H3 hatten einen entscheidenden Einfluß auf die Affinität des humanisierten 4D5 Antikörpers und wurden deshalb hier bei der Planung der humanisierten Sequenz ebenfalls berücksichtigt. Die Betrachtung der Modellstruktur (Abb. 41) zeigte, daß die genannten Aminosäurepositionen Bestandteil einer die Antigenbindungsstelle flankierenden Schleife sind, die entweder einen stabilisierenden Effekt auf die Antigenbindungsstelle ausüben oder direkt an der Bindung des Antigens beteiligt sein kann.

Bei der V_H-Domäne wurde an Position 30 ("Vernier"-Region), die unmittelbar an CDR-H1 grenzt und für die korrekte Präsentation von CDR-H1 erforderlich scheint, anstelle des in der

humanen Konsensussequenz vorhandenen Serinrestes der Threoninrest aus der murinen Sequenz plaziert.

Die Position 71 (Kabat-Nomenklatur) in der V_H -Domäne ist neben der Aufrechterhaltung der kanonischen Struktur von CDR-H2 auch als Bestandteil der "Vernier"-Region essentiell für die korrekte Präsentation von CDR-H2 (Carter *et al.*, 1992a). Weiterhin wurden die Reste Lys73 und Ala78 (Kabat-Nomenklatur) als Bestandteil der "Vernier"-Region aus der murinen Sequenz übernommen, da sie zusammen mit Ala71 in FR-H3 eine Schleife bilden, die CDR-H2 flankiert und einen stabilisierenden Effekt auf die Antigenbindungsstelle zu haben scheint (Carter *et al.*, 1992a).

Die von Chothia *et al.* (1985) definierten Positionen in der V_H/V_L -Kontaktfläche waren im Fall der V_H -Domäne zwischen der muHRS3 Aminosäuresequenz und der humanen Konsensussequenz identisch.

Schließlich wurde zur Klonierung der V_H -Gensequenz auf dem Expressionsvektor pASK88 am N-Terminus an Position 5 ein Glutaminrest eingefügt, um die Einführung einer *Pst*I-Schnittstelle auf DNA-Ebene zu ermöglichen. Als zweite Schnittstelle wurde am 3'-Ende des Gens die Erkennungssequenz von *Bst*EII eingeplant (s. u.). An sämtlichen weiteren Positionen in der Gerüststruktur der V_H -Domäne, an denen sich die Primärsequenzen unterschieden, wurden die entsprechenden Aminosäuren der humanen Konsensussequenz V_{HIII} eingeplant. Für den Bereich der drei CDRs wurde die Aminosäuresequenz von muHRS3 jeweils vollständig beibehalten (Abb. 40).

Im Falle der künstlichen V_L -Domäne von huHRS3 waren alle für die Aufrechterhaltung der kanonischen Schleifenkonformationen essentiellen Aminosäurepositionen (Tabelle 2) in der humanen Konsensussequenz und der muHRS3 Sequenz mit identischen Aminosäuren besetzt.

Die Analyse der "Vernier"-Positionen anhand der Kristallstruktur des hu4D5 Fv-Antikörperfragments ergab, daß die Aminosäure V_L46 in der V_H/V_L -Kontaktregion positioniert ist und außerdem die Konformation von CDR-H3 beeinflussen kann. Diese Position ist in V_K -Gerüstsequenzen fast immer mit Leucin (Kabat *et al.*, 1991) besetzt, in der muHRS3c V_L -Domäne jedoch mit Valin, was auf eine besondere Rolle dieser hydrophoben Aminosäure evt. für den Kontakt mit der V_H -Domäne hinweist. Deshalb wurde das Val46 aus der murinen Sequenz in die huHRS3 V_L -Domäne übernommen, obwohl die humane Konsensussequenz ein Leucin an dieser Position vorsieht.

Die von Chothia *et al.* (1985) definierten Positionen der V_H/V_L -Kontaktfläche unterschieden sich in der muHRS3c-Sequenz an den Positionen V_L36 und V_L87 von der humanen Konsensussequenz V_{KI} , die dort jeweils ein Tyrosin anstelle eines Phenylalanins aufwies. In der V_L -Domäne des hu4D5 Fv-Fragments waren diese Positionen mit Tyrosin besetzt, was zu einer stabilen Assoziation beider hu4D5 variabler Domänen führte. Deshalb wurden auch bei

der Planung der Primärsequenz der huHRS3 V_L-Domäne an diesen Positionen die Vorgaben der humanen Konsensussequenz V_κI übernommen.

Um auf DNA-Ebene die Erkennungssequenzen für die standardisierten Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Xho*I zur Klonierung des Gens für die humanisierte V_L-Domäne auf dem Expressionsvektor pASK88 einzufügen, wurden am N-Terminus an den Positionen 3 und 4 die Aminosäurereste Glutamin und Methionin aus der humanen Konsensussequenz durch Glutamat und Leucin ersetzt sowie am C-Terminus an Position 104 das Valin aus der Konsensussequenz durch Leucin.

An allen anderen Positionen des Gerüstbereichs der V_L-Domäne wurden wiederum die entsprechenden Aminosäuren der humanen Konsensussequenz V_κI, an denen der CDRs dagegen die aus muHRS3 Aminosäuresequenz.

Die so geplante Aminosäuresequenz für die humanisierten Domänen wurde mit Hilfe des Programms BACKTRANSLATE aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) unter Verwendung effizient translatierter *E. coli*-Codons in eine Nukleotidsequenz übersetzt. Potentielle Sekundärstrukturen auf mRNA-Ebene wurden mit Hilfe der Programme STEMLOOP und SEQUED durch stille Mutation minimiert.

Für die Synthese der beiden Gene mittels PCR-*Assembly* wurden jeweils sechs Oligodesoxynukleotide entworfen (Abb. 42 und 43), deren Sequenzen abwechselnd dem kodierenden und nicht-kodierenden Strang mit Überlappungen von 16-20 bp entsprachen und jeweils die gesamte Gensequenz abdeckten. Über die im Überschuß eingesetzten flankierenden Primer V_HX und V_HY bzw. V_LX und V_LY wurden die assemblierten Gene für die beiden variablen Domänen amplifiziert, mit den flankierenden Sequenzen ergänzt und dabei die für die Klonierung verwendeten singulären Restriktionsschnittstellen *Pst*I/*Bst*EII (V_H) bzw. *Sac*I/*Xho*I (V_L) eingefügt. Um eine Behinderung der Synthese durch das Anhängen von Adeninresten aufgrund der Terminale-Transferase-Aktivität der für die PCR verwendeten *Taq* DNA-Polymerase einzuschränken, wurde die Lage der Oligodesoxynukleotide, die den Hauptstrang kodierten, jeweils so gewählt, daß ihrem 5'-Ende stets Thymin vorausging. Zusätzlich wurde versucht, in Abständen von ca. 50 bp singuläre Schnittstellen einzuführen, um einen eventuell später notwendigen Austausch von Genfragmenten zu ermöglichen.

das V_L -Gen. Die PCR-Produkte wurden isoliert, für die Klonierung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (V_H : *Pst*I und *Bst*EII; V_L : *Sac*I und *Xho*I) geschnitten und anschließend separat auf dem Vektor pASK88-D1.3, der für das D1.3 Fab-Fragment kodierte, subkloniert. Die Ligierung des V_H -Gens mit dem Restvektorfragment wurde durch eine unvorhergesehene Inkompatibilität der *Bst*EII-Schnittstellen im V_H -Gen (5'-GGTTACC-3') und auf dem Plasmid (5'-GGTCACC-3') erschwert, was eine vergleichsweise geringe Anzahl von Transformanten zur Folge hatte.

Aus jeweils zehn Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch DNA-Sequenzierung unter Verwendung des Primers F83 im Fall von V_H und F55 im Fall von V_L analysiert. Aus zwei Klonen mit jeweils einer fehlerfreien V_L - und V_H -Gensequenz wurde in einem einzigen weiteren Klonierungsschritt durch Umklonierung der V_L -Domäne der bakterielle Expressionsvektor pASK88-huHRS3 erhalten, der für das HRS3 Fab-Fragment mit humanisierten variablen und humanen konstanten Domänen kodierte und analog zu pASK88-HRS3c aufgebaut war (siehe Abschnitt 3.2.1).

3.4.2 Produktion und funktionelle Analyse des humanisierten HRS3 Fab-Fragments

Für die bakterielle Produktion des humanisierten HRS3 Fab-Fragments im 2 l-Maßstab wurde der *E. coli*-Stamm JM83 verwendet, der mit dem Plasmid pASK88-huHRS3 transformiert worden war. Bei einer Zelldichte von $OD_{550} = 0,5$ wurde die Fremdgenexpression durch Einstellen einer aTc Konzentration von 200 µg/ml induziert, wobei auch nach drei Stunden Induktionsdauer keine bemerkbare Zellyse auftrat. Die periplasmatische Proteinfraction wurde präpariert und das Fab-Fragment mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie im Einschnittverfahren bis zur Homogenität gereinigt. Die Ausbeute war im Vergleich zum chimären muHRS3c Fab-Fragment mit 0,2 mg pro Liter Kulturmedium (bei einer Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte von $OD_{550} = 1$) deutlich erniedrigt (muHRS3c: 0,5 mg).

Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte im reduzierten Zustand zwei Banden bei 24 und 26 kDa, die der schweren und leichten Immunglobulinkette zuzuordnen waren (Abb. 44). Beide Immunglobulinketten lagen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vor. In Abwesenheit eines Reduktionsmittels war eine Bande bei ca. 46 kDa angefärbt, die dem Fab-Fragment mit der interchenaren Disulfidbrücke entsprach. Im Gegensatz zum chimären muHRS3c Fab-Fragment (siehe Abb. 15) konnten die beiden Polypeptidketten des humanisierten HRS3 Fab-Fragments in Abwesenheit von 6 M Harnstoff mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden.

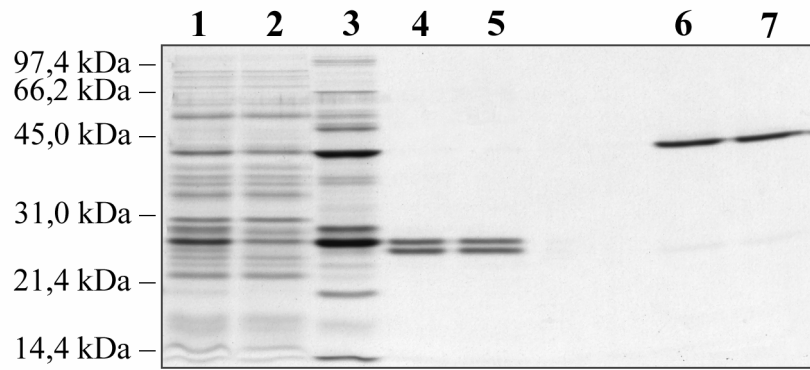


Abbildung 44: SDS-PAGE zur Dokumentation der Einschrittreinigung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Probe des periplasmatischen Proteinextraktes (Spur 1), des Durchlaufs (Spur 2), des bei niedriger Imidazolkonzentration eluierten unspezifisch gebundenen Proteins (Spur 3), sowie zweier Eluatfraktionen im reduzierten (Spur 4 und 5) bzw. im nicht reduzierten Zustand (Spur 6 und 7) aufgetragen.

Die Bindung des humanisierten Antikörperfragments an das rekombinante CD30A-Antigenfragment wurde mittels ELISA mit dem zuvor beschriebenen Aufbau (siehe Abschnitt 3.2.3) überprüft (Abb. 45).

Trotz der umfangreichen Aminosäuresubstitutionen im Gerüstbereich konnte dabei eine konzentrationsabhängige Antigenbindungsaktivität mit einer apparenten Dissoziationskonstanten von 49 ± 16 nM nachgewiesen werden. Die Bindungssignale erwiesen sich als spezifisch, da in der Kontrolle mit BSA nur vernachlässigbare Signale auftraten.

Molmasse [Da]	Isolelektrischer Punkt	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]	relative Ausbeute [mg L ⁻¹ OD ⁻¹]
48533	8,32	73410	0,2

Berechnet mit PEPTIDESORT nach Gill und von Hippel (1989).

Tabelle 3: Proteinchemische Eigenschaften des huHRS3 Fab-Fragments mit His₆-tag, produziert in JM83/pASK88-huHRS3

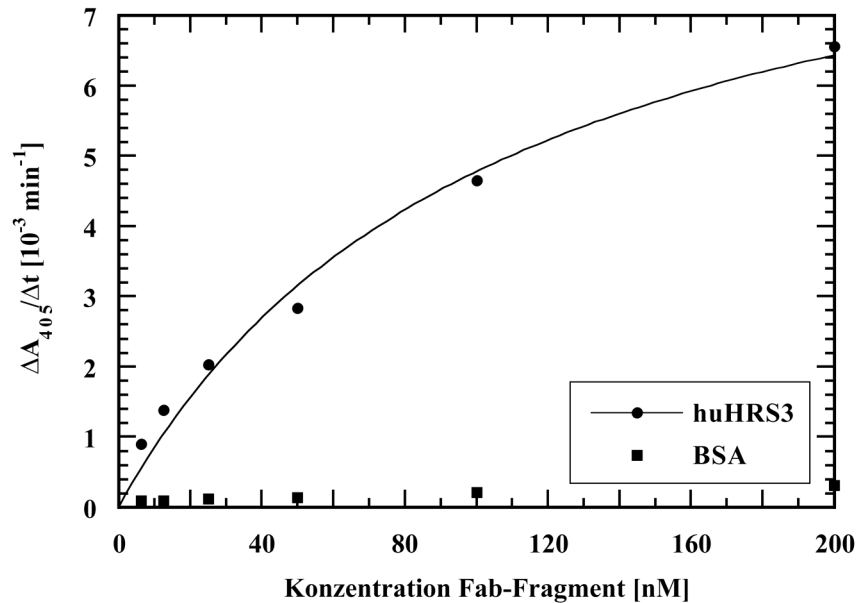


Abbildung 45: ELISA zur Untersuchung der CD30-Antigenbindung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem CD30A-Antigen (25 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/T) beschichtet und anschließend die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* JM83 mit pASK88-huHRS3 produzierten und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigten huHRS3 Fab-Fragments appliziert. Als Kontrolle diente die Belegung der Vertiefungen mit BSA, wiederum gefolgt von der Inkubation mit einer Verdünnungsreihe des huHRS3 Fab-Fragments. Gebundenes Fab-Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines Anti-human C_{κ} IgG/AP-Konjugats durch Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" nach Gleichung (2).

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie für den Komplex aus CD30A und humanisiertem huHRS3 Fab-Fragment wurde wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben verfahren. Die Auswertung der Kinetik mit Hilfe der *BIAevaluation Software* ergab für die Komplexbildung aus huHRS3 Fab-Fragment und CD30A eine Geschwindigkeitskonstante k_{on} von $9,5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ und für die Dissoziation eine k_{off} von $2,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Bindungsmodell: *1:1 binding with drifting baseline*). Daraus errechnet sich eine Dissoziationskonstante von 225 nM ($\chi^2 = 102$). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels der Gleichgewichtsanalyse ergab einen in erster Näherung gut übereinstimmenden Wert von $278 \pm 61 \text{ nM}$ (Abb. 46). Dies entsprach einer Verringerung der Affinität gegenüber dem chimären muHRS3c Fab-Fragment um den Faktor 10 (siehe Abschnitt 3.2.3). Diese Bindungsexperimente ergaben, daß das HRS3 Fab-Fragment im Prinzip erfolgreich humanisiert wurde.

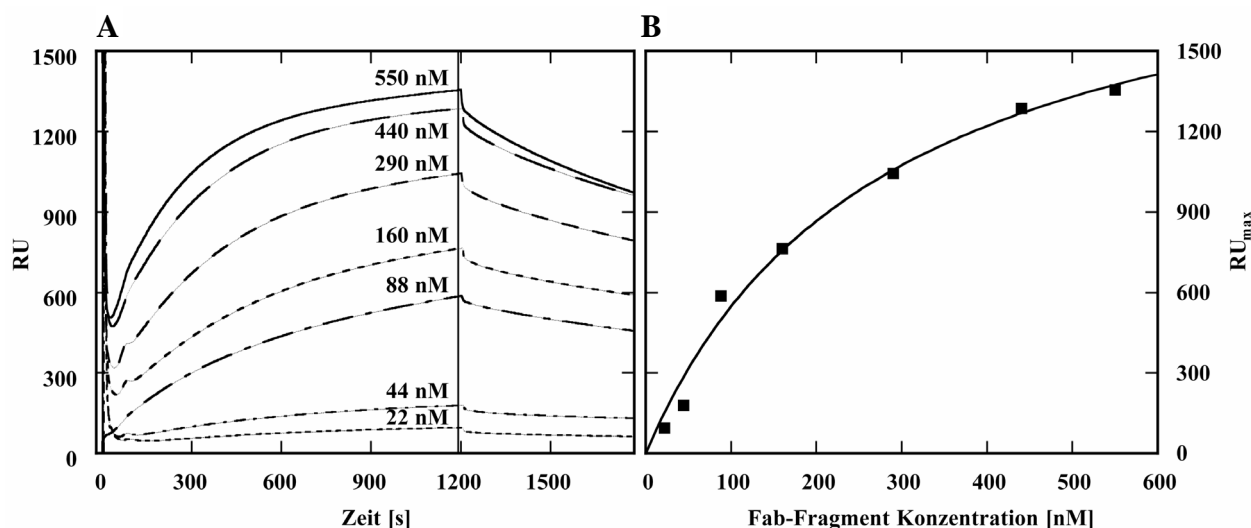


Abbildung 46: Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Komplexes aus CD30A und dem huHRS3 Fab-Fragment mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Gereinigtes CD30A wurde mittels Amin-Kopplung kovalent auf der Oberfläche eines CM-5 *Sensorchips* (Flußkanal 2) immobilisiert. (A) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe des huHRS3 Fab-Fragments. Jeweils 100 µl einer 22, 44, 88, 160, 290, 440 bzw. 550 nM Lösung des Fab-Fragments in PBS/P wurde bei einer Flußrate von 5 µl/min appliziert. Die Sensorgramm-Kurven wurden um die geringfügigen unspezifischen Signale im underivatisierten Flußkanal 1 korrigiert. Die Dissoziationsphase wurde für ca. 600 s dokumentiert. (B) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{\max}) in der angenäherten Gleichgewichtsphase gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von 278 ± 61 nM.

3.5 Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments

Die einfache Transplantation der CDRs ist nicht ausreichend, um die Antigen-Bindungsaktivität zu bewahren (Carter *et al.*, 1992a; Eigenbrot *et al.*, 1994). Es müssen zusätzlich Aminosäuren an Positionen im Gerüstbereich ausgetauscht werden, um die ursprüngliche Affinität wieder zu erreichen. Die Auswahl solcher Positionen geschieht entweder rational mit Hilfe einer Modellstruktur oder nach dem Zufallsprinzip. Da erstere Möglichkeit bereits bei der Planung der humanisierten Aminosäuresequenzen für die V_L - und V_H -Domäne einbezogen war, wurde für die Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments ein evolutiver Ansatz gewählt.

3.5.1 Analyse des Affinitätsverlusts anhand hybrider HRS3 Fab-Fragmente

Vor der Affinitätsmaturierung wurde die Frage geklärt, welche der beiden humanisierten variablen Domänen überwiegend für den Affinitätsverlust verantwortlich war. Hierzu wurden zwei hybride HRS3 Fab-Fragmente aus jeweils einer humanisierten und einer ursprünglichen murinen variablen Domäne hergestellt und das Bindungsverhalten gegenüber dem rekombinanten CD30A-Antigenfragment mit dem chimären muHRS3c und dem vollständig humanisierten huHRS3 Fab-Fragment verglichen.

Die Plasmide pASK88-muHRS3c und pASK88-huHRS3 wurden dazu mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *HindIII* geschnitten und jeweils das große Fragment (3894 bp) mit dem Vektorrückgrat sowie der Gensequenz für die schwere Immunglobulinkette und das kleine Fragment (710 bp) mit der Gensequenz für die leichte Immunglobulinkette isoliert. Nach kreuzweiser Ligierung der entsprechenden Fragmente wurde *E. coli* JM83 transformiert. Aus jeweils 2 Klonen wurde die Plasmid-DNA präpariert und ein Kontrollverdau mit *NcoI* und *HindIII* durchgeführt. Mittels Restriktionsverdau mit *StuI/XhoI* und *SmaI/XhoI* wurden die Plasmide auf das Vorhandensein der gewünschten Kombination aus muriner und humaner variabler Domäne überprüft. *StuI* schneidet nur in huV_L, *SmaI* dagegen nur in huV_H.

Die beiden hybriden Fab-Fragmente wurden im 2 l-Maßstab in *E. coli* JM83 produziert und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie aus der periplasmatischen Proteinfraction isoliert. Die Ausbeute an gereinigtem Fab-Fragment mit der Kombination huV_H/muV_L betrug 0,1 mg pro Liter Kulturmedium (bei OD₅₅₀ = 1), im Falle der Kombination muV_H/huV_L betrug sie 1 mg.

Die Analyse mittels SDS-PAGE (ohne Abbildung) zeigte, daß im Falle des hybriden huV_H/muV_L Fab-Fragments bei Anwesenheit eines Reduktionsmittels die leichte und schwere Immunglobulinkette gut aufgetrennt im mit Coomassie-Blue gefärbten Gel zu sehen waren und im stöchiometrischen Verhältnis vorlagen. Dagegen wiesen die beiden Polypeptidketten der muV_H/huV_L Kombination auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel eine identische elektrophoretische Mobilität auf. Durch Western Blotting (Nachweis der leichten Immunglobulinkette durch Anti-human-C_κ/Alkalische Phosphatase-Konjugat; Nachweis der schweren Immunglobulinkette durch Ni²⁺-NTA-Alkalische Phosphatase-Konjugat) konnte das Vorhandensein beider Ketten nachgewiesen werden. In Abwesenheit eines Reduktionsmittels war im Coomassie-gefärbten SDS-Gel sowie in den Western Blotting-Experimenten bei beiden Kombinationen eine Bande bei ca. 48 kDa angefärbt, die den Fab-Fragmenten mit der interchenaren Disulfidbrücke entsprach.

Die Bindung des CD30A-Antigens wurde mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie qualitativ untersucht und mit der des humanisierten HRS3 und des chimären muHRS3c Fab-Fragments verglichen. Die vier Fab-Fragmente wurden dazu in einer Konzentration von 40 nM auf einem *Sensorchip* appliziert, auf dem rekombinantes CD30A-Antigenfragment kovalent immobilisiert worden war.

Das hybride Fab-Fragment mit der Kombination aus muV_H/huV_L zeigte dabei eine praktisch identische Bindungskurve wie das chimäre muHRS3c Fab-Fragment, die huV_H/muV_L-Kombination dagegen ergab ähnlich geringe Bindungssignale wie das huHRS3 Fab-Fragment (Abb. 47).

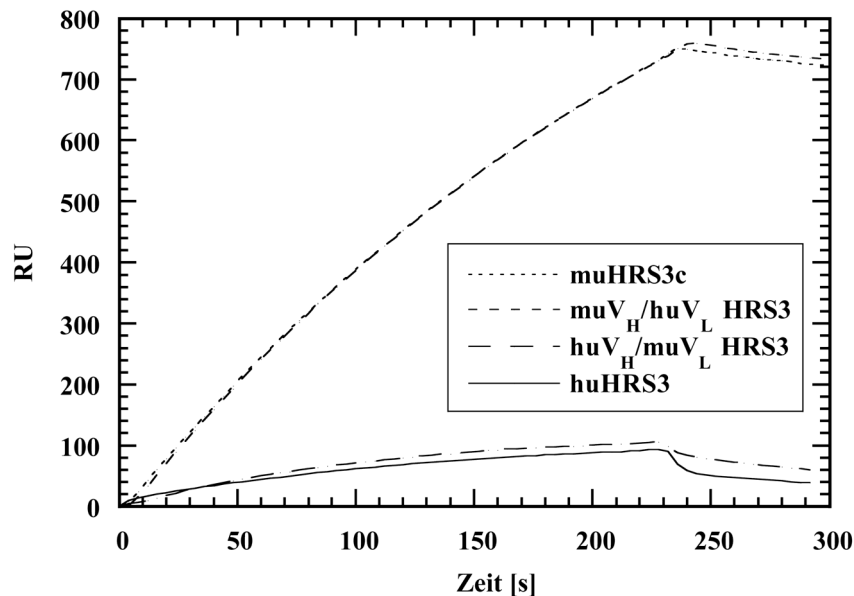


Abbildung 47: Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie-Messungen zur Analyse des Affinitätsverlustes der humanisierten variablen HRS3-Domänen. Gereinigtes CD30A-Antigen wurde mittels Amin-Kopplung auf der Oberfläche eines CM-5 *Sensorchips* immobilisiert, was zu einer Zunahme des Resonanzsignals um 1600 RUs führte. Der Flußkanal 1 diente als Kontrolle zur Analyse unspezifischer Bindungsereignisse. Jeweils 20 µl einer 40 nM Lösung des chimären muHRS3c, des humanisierten HRS3, und der beiden hybriden Fab-Fragmente in PBS/P wurden bei einer Flußrate von 5 µl/min appliziert.

Dieses Ergebnis zeigte, daß der Affinitätsverlust praktisch vollständig auf die humanisierte V_H-Domäne zurückzuführen war und die Sequenz dieser Domäne durch *Protein Engineering* nachgebessert werden mußte.

3.5.2 Optimierung der Antigenbindungseigenschaften der huV_H-Domäne des humanisierten HRS3 Fab-Fragments

Für die Verbesserung der Antigenbindung auf der Seite der humanisierten V_H-Domäne wurden zwei verschiedene evolutive Ansätze verfolgt. Zunächst wurde mittels *DNA-Shuffling* (Stemmer, 1994) versucht, ein hybrides V_H-Gen zu generieren, das sich aus Gensequenzen der humanisierten V_H- wie auch der murinen V_H-Sequenz zusammensetzte. In einem zweiten Ansatz wurden in die humanisierte V_H-Domäne zufällige Aminosäuresubstitutionen mittels *Error Prone PCR* (Casson & Manser, 1995) eingefügt.

3.5.2.1 Versuche zur Generierung eines hybriden hu/mu-V_H-Gens mittels rekombinanter PCR

Die Gensequenzen des humanisierten und des murinen V_H-Gens weisen 70 %ige Homologie zueinander auf. Es war somit vorstellbar, daß sich kleine Fragmente beider Gene (30-50 bp)

über kurze Homologiebereiche aneinanderlagern, und in der PCR ein hybrides V_H-Gen mit murinen und humanen Genabschnitten generiert werden konnte. Dieses Experiment sollte Aufschluß darüber geben, welche spezifischen Bereiche aus der murinen V_H-Domäne gegebenenfalls neben den CDRs für die Antigenbindung essentiell sind. Durch die Fehlerrate der verwendeten *Taq*-DNA Polymerase konnten zusätzliche Mutationen in das V_H-Gen eingefügt werden.

Zur Gewinnung der 30-50 bp großen DNA-Fragmente aus der murinen und humanisierten V_H-Gensequenz wurden zunächst die beiden V_H-Gene aus den Plasmiden pASK88-huHRS3 und pASK88-HRS3c mit den Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Bst*EII isoliert. Um die optimalen Bedingungen für den anschließenden *DNase*I-Verdau (Stemmer, 1994) zu ermitteln, wurde zunächst ein Test mit verschiedenen Enzym-Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Es zeigte sich, daß die eingesetzte DNA-Menge von 0,5 µg im 10 µl Reaktionsansatz bei einer *DNase*I-Konzentration von 0,0015 U/µl und einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur weitestgehend zu Fragmenten zwischen 20 und 100 bp abgebaut worden war. Unter analogen Bedingungen wurde daraufhin 5 µg einer 1:1 Mischung beider V_H-Gene im 100 µl-Reaktionsansatz verdaut und die DNA-Fragmente im Größenbereich zwischen 30 und 50 bp durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Für die folgende *Assembly* PCR wurden die DNA-Fragmente in einer Konzentration von 30 ng/µl unter Zusatz der Primer V_HX und V_HYII eingesetzt und das V_H-Gen amplifiziert. Der Primer V_HYII enthielt im Gegensatz zu V_HY eine mit dem Vektor kompatible *Bst*EII-Erkennungssequenz (5'-GGTCACC-3'). Das verwendete PCR-Programm umfaßte in Anlehnung an die Vorgaben von Stemmer (1994) 40 Zyklen mit den folgenden Temperaturschritten: DNA-Denaturierung: 94 °C für 30 s, Oligodesoxynukleotid-Hybridisierung: 50 °C für 45 s, DNA-Polymerisation: 72 °C für 45 s. Zur Komplettierung der DNA-Syntheseprodukte erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 72 °C. Die Analyse auf einem 1 %igen Agarosegel zeigte eine Bande bei 370 bp (ohne Abbildung), die der Größe des assemblierten V_H-Gens entsprach. Daneben war eine ebenso prominente Bande bei 310 bp zu erkennen, die auch unter Variation der *Hybridisierungs*-Temperatur in weiteren PCR-*Assembly* Reaktionen nicht zurückgedrängt werden konnte. Das 370 bp große PCR-Produkt wurde in einer erneuten PCR unter Verwendung der Primer V_HX und V_HYII bei Standardreaktionsbedingungen (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1,5 min; 25 Zyklen; 5 min 60 °C; siehe Abschnitt 2.2.5.4) reamplifiziert und isoliert.

Zur parallelen Durchmusterung einer größeren Zahl von humanisierten HRS3 Fab-Fragmenten mit der mutierten V_H-Domäne wurde der Kolonie-Filterstapel-Test (Skerra *et al.*, 1991a) verwendet. Für diesen Zweck wurde zunächst der Vektor pASK106-huHRS3 (Abb. 48) hergestellt, der für ein Fab-Fragment kodiert, an dessen leichte Immunglobulinkette am C-Terminus die Albumin-Bindungsdomäne (ABD; König & Skerra, 1998) über einen Pro-Ala-

Ser-Tripeptid-Linker fusioniert ist. Die ABD besteht aus einer einzelnen, 46 Reste umfassenden albuminbindenden Domäne des Protein G von *Streptococcus* G148 (Guss *et al.*, 1986; Akerström *et al.*, 1987; Olsson *et al.*, 1987) und ermöglicht die funktionelle Immobilisierung der rekombinanten Fusionsproteine auf der Oberfläche eines mit humanem Serumalbumin (HSA) beschichteten Membranfilters. Für die Konstruktion von pASK106-huHRS3-abd wurde die komplette Genkassette für das humanisierte HRS3 Fab-Fragment aus pASK88-huHRS3 mittels Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Hind*III isoliert (1511 bp) und mit dem ebenso geschnittenen Vektor pASK106-IN1 (3250 bp; Fiedler, 2001) ligiert.

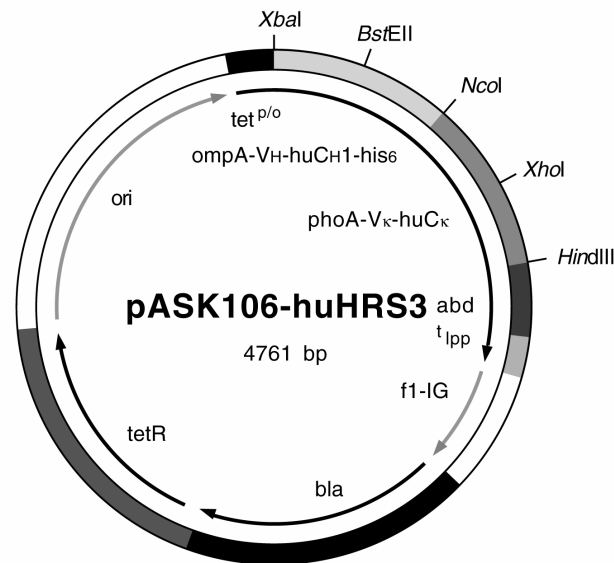


Abbildung 48: Schematische Darstellung des Vektors pASK106-huHRS3. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ($tet^{P/O}$) für das huHRS3 Fab-Fragment mit einer an den C-Terminus der leichten Kette fusionierten Albumin-Bindungsdomäne (ABD). Alle weiteren Abkürzungen entsprechen denen in Abb. 7.

Zur Analyse der modifizierten huV_H-Domänen aus dem DNA-*Shuffling* wurde der Genpool mit *Pst*I und *Bst*EII geschnitten und auf dem analog geschnittenen Vektor pASK106-huHRS3 subkloniert. Nach Transformation von *E. coli* JM83 mit dem Ligierungsprodukt wurde die erhaltene Zellsuspension direkt auf einer hydrophilen Membran ausplattiert und ein Kolonie-Filterstapel-Test (Abb. 49; Skerra *et al.*, 1991a) durchgeführt. Das sekretierte Fusionsprotein, das während der Induktionsphase teilweise von den Bakterienkolonien freigesetzt wurde, wurde am Ort der entsprechenden Kolonie selektiv auf einer darunterliegenden zweiten Membran, welche zuvor mit HSA beschichtet worden war, gebunden. Diese Membran wurde anschließend mit dem rekombinanten CD30A-Antigenfragment, welches zuvor mit Digoxigenin markiert wurde, inkubiert und Bindungssignale unter Verwendung von Anti-Digoxigenin Fab-Alkalische Phosphatase-Konjugat entwickelt.

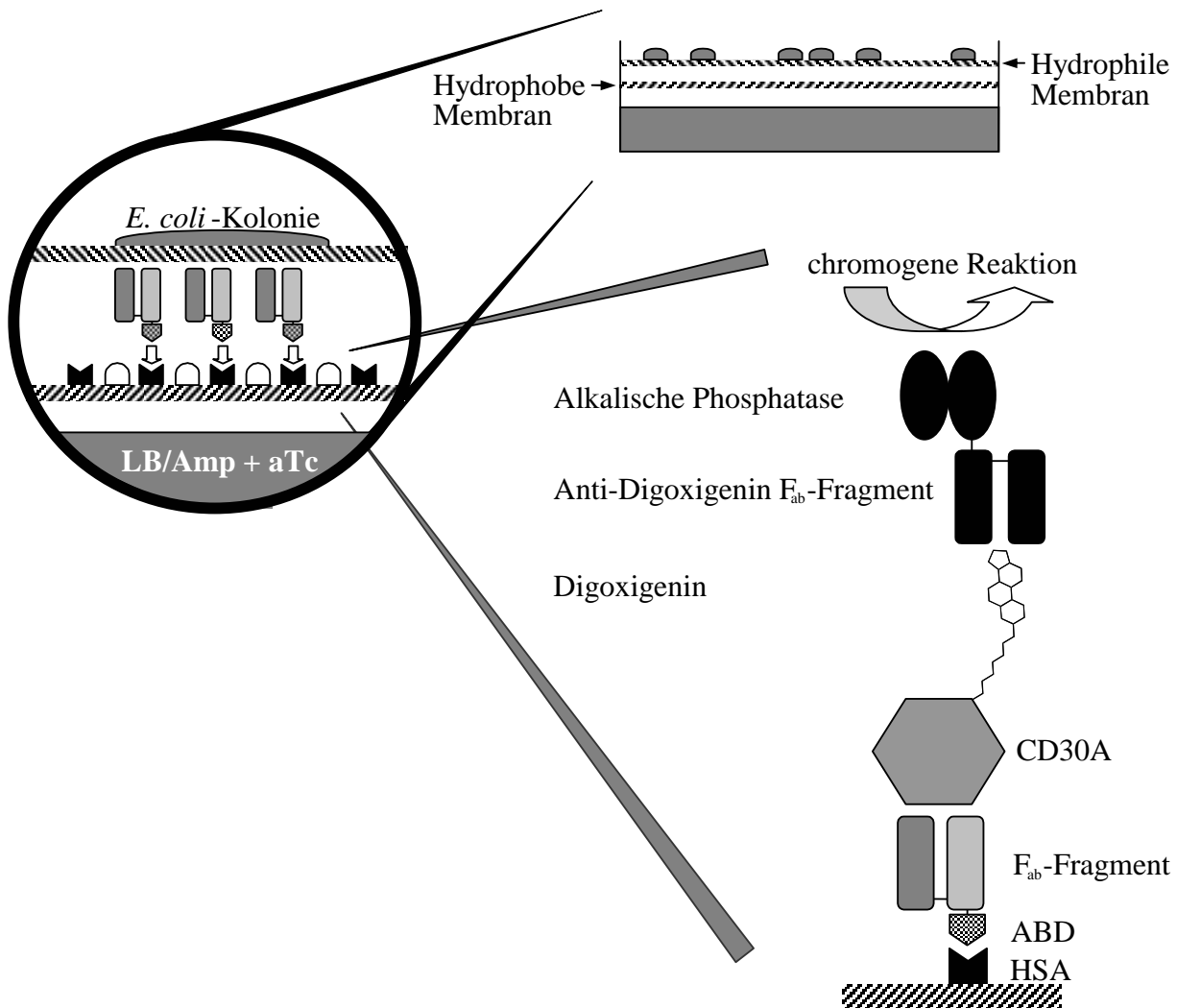


Abbildung 49: Schema des Kolonie-Filterstapel-Tests für die Identifizierung einzelner Varianten des huHRS3 F_{ab}-Fragments mit verbesserter Affinität zu CD30A (in verschiedenen Ausschnitts-Vergrößerungen). Nach der Transformation von *E. coli* JM83 mit dem Ligierungsansatz wurde die Zellsuspension auf einer hydrophilen Membran auf LB/Amp-Agar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Nachdem die Kolonien eine Größe von ca. 0,5 mm erreicht hatten, wurde die Membran auf einer hydrophoben und zuvor mit HSA beschichteten zweiten Membran platziert. Diese lag zur Induktion der Genexpression auf einer LB/Amp-Agarplatte mit Anhydrotetracyclin. Während einer Induktionsperiode von 15 h wurde das Fusionsprotein aus dem F_{ab}-Fragment und der Albumin-Bindungsdomäne (ABD) zunächst in das Periplasma von *E. coli* sekretiert und partiell von den Kolonien freigesetzt. Das Protein diffundiert daraufhin durch die hydrophile Membran und wurde schließlich durch Komplexbildung zwischen ABD und HSA am Ort der *E. coli*-Kolonie auf der Oberfläche der darunterliegenden hydrophoben Membran funktionell immobilisiert, welche anschließend entnommen und mit Puffer gespült wurde. Die hydrophile Membran mit den Bakterienkolonien wurde bei 4 °C gelagert. Die Liganden-Bindungseigenschaften der immobilisierten Varianten wurden durch aufeinanderfolgende Inkubation der hydrophoben Membran mit digoxigeniertem CD30A und mit Anti-Digoxigenin F_{ab}-Alkalische Phosphatase-Konjugat, gefolgt von einer chromogenen Nachweisreaktion, bestimmt. (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Schlehuber, modifiziert).

Von ca. 600 sekretierten huHRS3 Fab-Fragment-Varianten konnten mehr als 95 % der Kolonien auf diese Weise angefärbt werden, wobei sich die individuellen Farbspots sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrer Intensität nur geringfügig voneinander unterschieden. Sieben der Kolonien, die zur Ausbildung der intensivsten Farbspots Anlaß gaben, wurden

ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und der DNA-Sequenzanalyse unter Verwendung des Primers F83 unterzogen. Die von ihnen kodierten huHRS3-Varianten wurden als DS1/1 bis DS1/7 bezeichnet. Die DNA-Sequenzierung ergab, daß keine hybriden mu/hu-V_H-Gene generiert wurden, sondern lediglich drei Mutanten des huV_H-Gens mit Punktmutationen vorlagen (Abb. 51). Die Mutante DS1/1 wies eine Ile69Thr Aminosäuresubstitution (Kabat Nomenklatur) in FR-H3 in der Nähe von CDR-H2 auf, DS1/4 neben einer stillen Mutation einen Tyr100CHis Austausch in CDR-H3 und DS1/6 eine Val37Ile Aminosäuresubstitution in FR-H2. Bei den anderen Klonen wurden keine oder nur stille Mutationen festgestellt (nicht dargestellt).

3.5.2.2 Schrittweise Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments durch Zufallsmutagenese der V_H-Domäne

Im natürlichen Immunsystem wird die Affinität und Spezifität eines Antikörpers im Anschluß an die klonale Selektion durch somatische Hypermutation verbessert. Dieses Prinzip kann teilweise in einem *in vitro* Selektionsprozess auf die Affinitätsverbesserung eines rekombinanten Antikörpers übertragen werden. Dazu wurden hier zufällige Aminosäuresubstitutionen mittels *Error Prone* PCR in die variablen Domänen eingefügt. Die PCR wurde dabei in Gegenwart von Mn²⁺-Ionen und verringerten Konzentrationen an dATP und dGTP durchgeführt, was die Fehlerrate der *Taq* DNA-Polymerase erhöht. Zusätzlich wurde das Basenanalogen Desoxyinosin-Triphosphat verwendet, das sich mit den Basen Thymidin, Cytosin und Adenin paaren kann und damit die Mutationsrate erhöht.

Diese Bibliothek an Mutanten wurde anschließend im Kolonie-Filterstapel-Test auf erhöhte Antigenbindung durchmustert. Die beste Mutante wird einer weiteren Affinitätsmaturierungsrunde unterzogen, bis schließlich die gewünschte Affinität erreicht ist.

Die Einführung der Zufallsmutationen in die der huV_H Gensequenz erfolgte gemäß der in Abschnitt 2.2.5.4 beschriebenen *Error Prone* PCR-Strategie. Die Bedingungen wurden so gewählt, daß etwa zwei bis drei Mutationen pro V_H-Gen auftraten. Der von den Primern V_HX und V_HYII eingeschlossene Sequenzbereich umfaßte die Aminosäurepositionen 19 bis 110 (siehe Abb. 51). Die PCR-Fragmente mit einer Größe von 360 bp wurden unter Standardbedingungen (siehe Abschnitt 2.2.5.4; Annealing Temperatur: 55 °C) mit 1 ng pASK88-huHRS3 als Matrize im Verlauf von 25 Temperaturzyklen erzeugt, gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen *BstEII* und *PstI* gespalten. Das dabei erhaltene huV_H Genfragment mit einer Größe von 340 bp wurde isoliert und zur Herstellung der Mutanten-Bibliothek mit dem analog geschnittenen Vektor pASK106-huHRS3 (siehe Abschnitt 3.5.2.1) ligiert.

Der Ligierungsansatz wurde zur Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli* JM83-Zellen eingesetzt und daraufhin ein Kolonie-Filterstapel-Test mit CD30A als Targetprotein (wie in

Abschnitt 3.5.2.1) durchgeführt. Dabei wurden mehr als 90 % der Kolonien (Gesamtzahl: ca. 600) angefärbt (Abb. 50). Insgesamt acht Kolonien, die die intensivsten Farbspots auf dem Filter hervorriefen, wurden ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und die DNA-Sequenz der V_H-Domäne ermittelt (Abb.51).

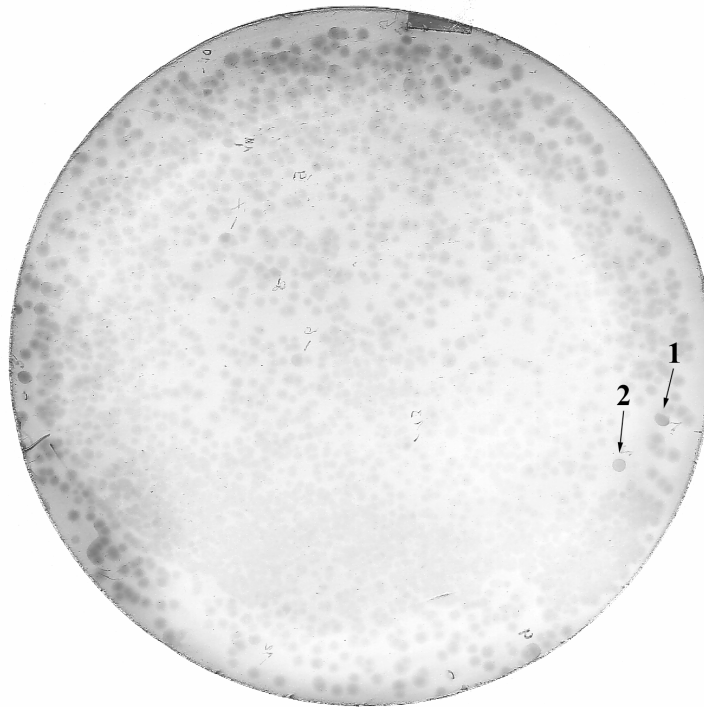


Abbildung 50: Ergebnis des Kolonie-Filterstapel-Tests zur Selektion von huHRS3-Varianten mit erhöhter Affinität zu dem CD30A-Antigen. Die mutagenisierten V_H-Gene aus der *Error Prone* PCR wurden auf pASK106-huHRS3 in Kombination mit dem ursprünglichen huV_L-Gen subkloniert. Entsprechend transformierte *E. coli*-Zellen wurden auf einer hydrophilen Membran ausplattiert. Die im Verlauf der Induktionsphase funktionell auf einer darunterliegenden hydrophoben Membran immobilisierten huHRS3-Varianten wurden auf ihre CD30-Bindungseigenschaften untersucht. Nach Inkubation mit Digoxigenin-CD30A-Konjugat und anschließender Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Fab-alkalische Phosphatase-Konjugat wurde eine chromogene Reaktion durchgeführt. Die auf dieser Membran identifizierten beiden Mutanten EP1/1 und EP1/2 sind durch Pfeile markiert.

In den Varianten EP1/1, EP1/2, EP1/4, EP1/6 und EP1/7 wurde jeweils nur eine Aminosäure substituiert. Ile69 in FR-H3 wurde in drei Mutanten zweimal durch Val (EP1/1 und EP1/4) und einmal durch Thr (EP1/2) ersetzt, wobei letztere Substitution auch in der mittels DNA-*Shuffling* (siehe Abschnitt 3.5.2.1) erhaltenen Mutante DS1/1 aufgetreten war. Die restlichen beiden Mutanten wiesen jeweils eine Substitution in CDR-H3 auf: Ala101Pro (EP1/6) bzw. Glu100BLys (EP1/7). Keine der Aminosäuresubstitutionen entsprach einer Aminosäure aus der ursprünglichen murinen variablen Domäne. Die V_H-Gensequenzen der Varianten EP1/3, EP1/5 und EP1/8 enthielten nur stille Mutationen.

```

huVH: 1 10 20 30 40
GAA GTTCAA CTTCA CAGGAATCCGGTGGTGGTCTGGTTTCAGCCAGGTGGTTCCTCGCGTCTCTCGTCCGCTGCTTCCGGTTTCACCTTACCCACCTACACCATCCACTGGGTACCTCAGGCC
GluValGlnTrpNGITGluSerGlyGlyGlyLeuValGlnProGlyGlySerLeuArgLeuSerCysAlaAlaSerGlyPheThrPheThrThrThrIleHisTrpValArgGlnAla
DS1/1 .....
DS1/4 .....C.....
DS1/6 .....A.....
Ile
EP1/1 .....C.....
EP1/2 .....C.....
EP1/4 .....
EP1/6 .....
EP1/7 .....
EP2/1 .....C.....
EP2/2 .....C.....
EP2/3 .....C.....
EP2/4 .....C.....C.....Thr.....A.....
Pro Val
EP2/5 .....C.....C.....Thr.....
EP2/6 .....CA.....G.....Ala.....
EP2/7 .....C.....C.....
EP2/8 .....C.....G.....Ala.....
EP3/1 .....C.....
EP3/5 .....A.....C.....
EP3/6 .....C.....C.....Thr.....
EP3/7 .....C.....

50 52 A 60 70 79
CCGGTAAAGGTTCTGGAATGGGTTTCCTACATCAACCCATCGTCCGGATACTCCGACTACAACCAGAACTTCAAAGGTCGTTTACCATTCTCAGTGACAAATCCAAAAACACTGCTTAC
ProGlyLysGlyLeuGluTrpValSerTyrIleAsnProSerSerGlyTyrSerAspTyrAsnGlnAsnPheLysGlyArgPheThrIleSerAlaAspLysSerLysAsnThrAlaTyr
DS1/1 .....C.....Thr.....
DS1/4 .....
DS1/6 .....
EP1/1 .....G.....Val.....
EP1/2 .....C.....Thr.....
EP1/4 .....G.....Val.....
EP1/6 .....
EP1/7 .....
EP2/1 .....C.....A.....Thr.....Asn.....
EP2/2 .....C.....Thr.....
EP2/3 .....G.....Val.....C.....Thr.....
EP2/4 .....C.....Thr.....
EP2/5 .....C.....Thr.....
EP2/6 .....C.....Thr.....
EP2/7 .....C.....Thr.....T.....
EP2/8 .....G.....C.....Thr.....
EP3/1 .....C.....A.....Thr.....Asn.....
EP3/5 .....C.....A.....Thr.....Asn.....G.....Arg.....
EP3/6 .....C.....A.....Thr.....Asn.....AG.....Ser.....
EP3/7 .....C.....Thr.....

80 82 A B C 90 100 A B C D E F 101 110
CTCCAGATGAATCCCTCCGCTGCTGAAGACACTGCTGTTTACTATTTGCGCGCTCGTGCCGACTACGGTAACACTACGAATACACCTGGTTTCGCTTACTGGGGTCAGGGCAGCTGGTCACC
LeuGlnMetAsnSerLeuArgAlaGluAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgArgAlaAspTyrGlyAsnTyrGluTyrThrTrpPheAlaTyrTrpGlyGlnGlyThrLeuValThr
DS1/1 .....C.....His.....
DS1/4 .....C.....His.....
DS1/6 .....
EP1/1 .....
EP1/2 .....
EP1/4 .....
EP1/6 .....C.....Pro.....
EP1/7 .....A.....Lys.....
EP2/1 .....A.....Lys.....
EP2/2 .....G.....Ser.....C.....G.....Ser.....
EP2/3 .....
EP2/4 .....
EP2/5 .....
EP2/6 .....
EP2/7 .....C.....Ala.....
EP2/8 .....C.....Pro.....
EP3/1 .....A.....Lys.....C.....Pro.....
EP3/5 .....A.....Lys.....
EP3/6 .....G.....Asp.....A.....Lys.....A.....Gln.....
EP3/7 .....A.....Lys.....

113
GTTTCTCC
ValSerSer

```

Abbildung 51: DNA- und korrespondierende Aminosäuresequenz der mittels *DNA-Shuffling* (DS) sowie dreier *Error Prone* PCR (EP1-3) Affinitätsmaturierungs-Zyklen generierten huV_H-Varianten im Vergleich zur Sequenz der ursprünglichen huV_H-Domäne. Stille Mutationen sind nur durch die mutierten Nukleotide wiedergegeben und unveränderte Basen als Punkte. Unterstreichungen in der Aminosäuresequenz von huV_H kennzeichnen die CDRs. Unterstreichungen in der Gensequenz von huV_H markieren die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Pst*I und *Bst*EII am 5'- bzw. 3'-Ende. In Fettdruck sind die Sequenzbereiche der bei der *DNA-Shuffling* und der *Error Prone* PCR verwendeten Oligodesoxynukleotide V_HX und V_HYII am 5'- bzw. 3'-Ende dargestellt. Die Numerierung erfolgte nach Kabat *et al.* (1987).

Für die gentechnische Herstellung der Varianten EP1/1, EP1/2, EP1/6 und EP1/7 aus der *Error Prone* PCR sowie der Mutanten DS1/4 und DS1/6 aus dem *DNA-Shuffling* (siehe Abschnitt 3.5.3.1) ohne die ABD Domäne wurden entsprechende Expressionsvektoren konstruiert. Dazu wurden die V_H-Gene der Varianten durch Restriktionsverdau mit *Xba*I und *Bst*EII isoliert, mit dem Vektorfragment des entsprechend geschnittenen Expressionsplasmids pASK88-huHRS3 ligiert und *E. coli* JM83 transformiert. Aus jeweils 2 Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalyse mit *Xba*I und *Bst*EII überprüft. Die resultierenden Plasmide wurden als pASK88-huV_H-EP1/2/huV_L usw. bezeichnet.

Anschließend wurden die einzelnen Varianten im 2 l-Maßstab produziert und durch Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Die erhaltenen Ausbeuten betragen für die Varianten jeweils ca. 0,2 mg pro Liter Kulturvolumen (Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte OD₅₅₀ = 1). Die Analyse der gereinigten Fab-Fragmente auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel ergab ein stöchiometrisches Verhältnis von schwerer und leichter Kette sowie die quantitative Ausbildung der interchenaren Disulfidbindung zwischen den beiden Polypeptidketten (ohne Abbildung).

Die insgesamt sechs Mutanten aus der *Error Prone* PCR und dem *DNA-Shuffling* wurden in zwei ELISA-Experimenten mit dem ursprünglichen humanisierten HRS3 Fab-Fragment auf Bindung des rekombinanten CD30A-Antigenfragments überprüft (Abb. 52).

Es zeigte sich, daß die Mutante EP1/2 (Ile69Thr), die bis auf eine stille Mutation mit der Mutante DS1/1 aus dem *DNA-Shuffling* identisch war, von allen untersuchten Mutanten die höchsten Bindungssignale aufwies. Diese waren ca. doppelt so hoch wie die für das huHRS3 Fab-Fragment. Für die Mutanten EP1/1, EP1/7 und DS1/4 konnten ebenfalls im Vergleich zum huHRS3 Fab-Fragment höhere Bindungssignale beobachtet werden. Die restlichen Mutanten zeigten entweder keine bzw. bloß geringfügig verbesserte Affinität.

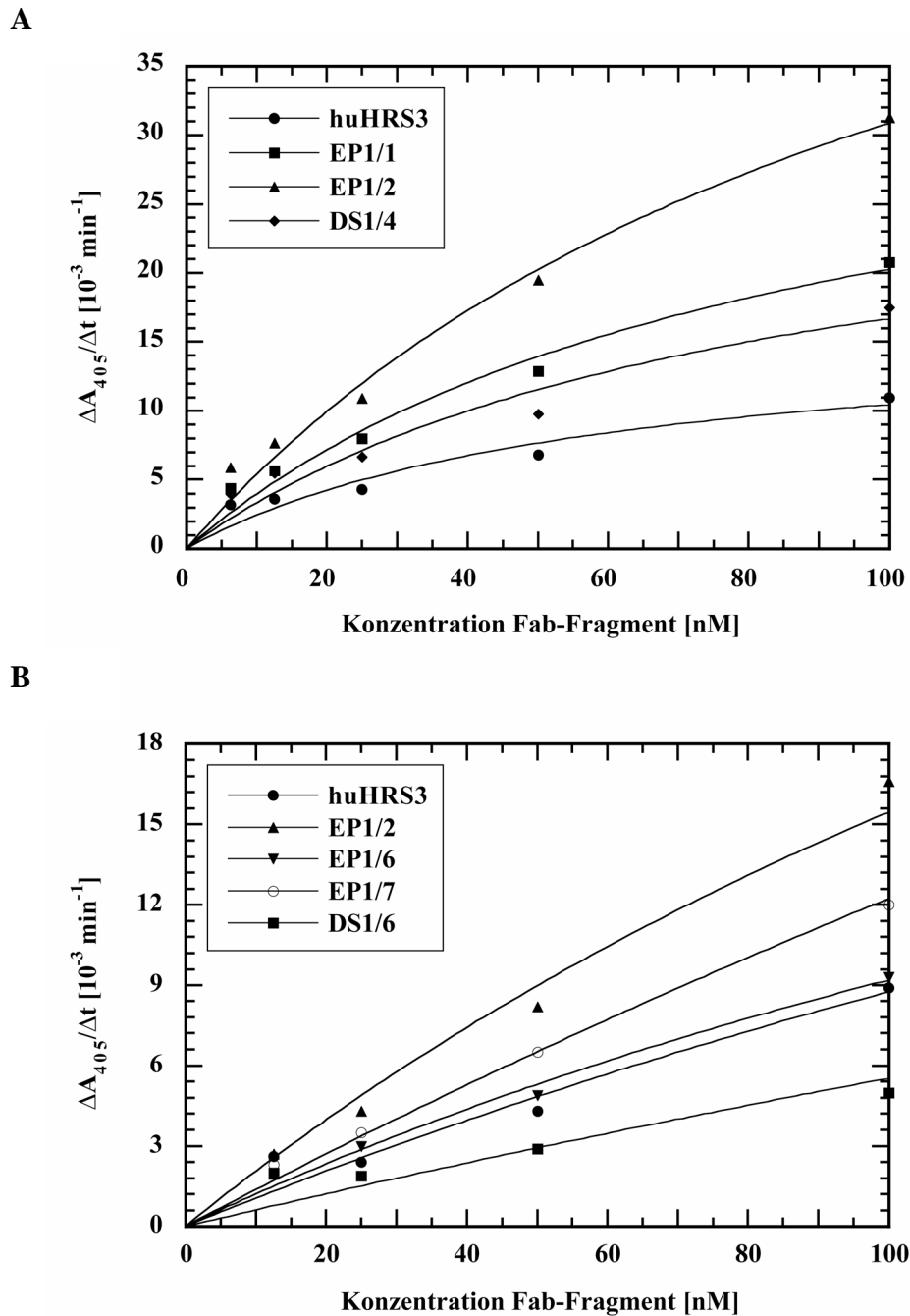


Abbildung 52: ELISA-Experimente zur Untersuchung der CD30A-Antigenbindungsaffinität der humanisierten HRS3-Varianten aus der ersten *Error Prone* PCR. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem CD30A-Antigen (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/T) beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurden Vertiefungen nur mit BSA beschichtet. Danach wurde eine Verdünnungsreihe der in *E. coli* JM83 produzierten und mittels IMAC gereinigten huHRS3-Varianten appliziert. Gebundenes Fab-Fragment wurde mit Hilfe eines Anti-Human- C_{κ} IgG/AP-Konjugats durch Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzyms ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" nach Gleichung (2). Im ELISA-Experiment (A) wurden die Varianten EP1/1, EP1/2, DS1/4 und das ursprüngliche huHRS3 Fab-Fragment untersucht. Im zweiten ELISA-Experiment (B) wurden die Varianten EP1/6, EP1/7 und DS1/6 mit dem huHRS3 Fab-Fragment sowie der Variante EP1/2, die im ELISA-Experiment (A) die höchsten Bindungssignale zeigte, verglichen.

Ausgehend von der Mutante EP1/2 wurde eine zweite Affinitätsmaturierung durchgeführt, bei der wiederum mittels *Error Prone* PCR zufällige Aminosäuresubstitutionen in die huV_H-Domäne aus der Mutante EP1/2 eingeführt wurden. Hierzu wurde – wie oben beschrieben – eine *Error Prone* PCR mit den Primern V_HX und V_HYII und pASK88-huV_H-EP1/2/huV_L als Matrize durchgeführt. Die mutierten V_H-Gene wurden auf pASK106-huHRS3 kloniert und *E. coli* JM83 mit dieser Bibliothek transformiert. Diese wurde anschließend einer Affinitätsselektion mittels des Kolonie-Filterstapel-Tests unterworfen.

Wiederum konnten bei mehr als 90 % der Kolonien die sekretierten huHRS3-Varianten angefärbt werden (> 500), wobei sich die individuellen Farbsignale sowohl in ihrer Intensität als auch in ihrer Morphologie teilweise voneinander unterschieden (ähnlich wie in Abb. 50). Acht Kolonien, die für die Ausbildung der intensivsten Farbspots verantwortlich waren, wurden ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und der DNA-Sequenzanalyse unterzogen. Die von ihnen kodierten huHRS3-Varianten wurden als EP2/1 bis EP2/8 bezeichnet.

Die DNA-Sequenzierung ergab, daß Mutanten generiert wurden, die zusätzlich zu der Ile69Thr Substitution aus der Mutante EP1/2 ein oder sogar zwei weitere Aminosäuresubstitutionen aufwiesen (Abb. 51). Diese lagen vor allem in der Gerüstregion um CDR-H1, in CDR-H1, in FR-H3 nahe CDR-H2 und in CDR-H3. Interessanterweise enthielt die Mutante EP2/1 neben der Aminosäuresubstitution Ile69Thr eine weitere Aminosäuresubstitution Asp72Asn in FR-H3 (in der Nähe zu CDR-H2) sowie eine Aminosäuresubstitution Glu100BLys innerhalb des CDR-H3, die bereits in der Mutante EP1/7 aus dem ersten Affinitätsmaturierungszyklus aufgetreten war. Wiederum führten die Aminosäuresubstitutionen nicht zum Auftreten von Aminosäuren aus der murinen Sequenz.

Für die Produktion der Varianten EP2/1 – EP2/6 ohne die albuminbindende Domäne wurden die Gensequenzen für die mutierten huV_H-Domänen auf dem Vektor pASK88-huHRS3 subkloniert. Die Plasmide wurden mit pASK88-huV_H-EP2/1/huV_L usw. bezeichnet. Die einzelnen Varianten wurden im präparativen Maßstab produziert und anschließend mittels Metallchelate-Chromatographie gereinigt. Die erhaltenen Ausbeuten lagen jeweils bei ca. 0,2 mg pro Liter Kulturvolumen (Zelldichte zum Zeitpunkt der Ernte OD₅₅₀ = 1). Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, daß beide Immunglobulinketten im stöchiometrischen Verhältnis vorlagen und die interchenare Disulfidbindung quantitativ ausgebildet war (ohne Abbildung).

Die Antigenbindung der isolierten Varianten wurde zunächst qualitativ mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie mit der Mutante EP1/2 und dem ursprünglichen huHRS3 Fab-Fragment verglichen. Hierzu wurde das rekombinante CD30A-Antigenfragment kovalent auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert und die Fab-Fragmente in einer Konzentration von 100 nM appliziert (Abb. 53). Die Mutante EP2/1 wies dabei die höchsten Bindungssignale aller untersuchten Mutanten auf. Daneben konnte lediglich für die Mutanten EP2/5 und EP2/6 eine im Vergleich zu EP1/2 schwach verbesserte Affinität beobachtet werden.

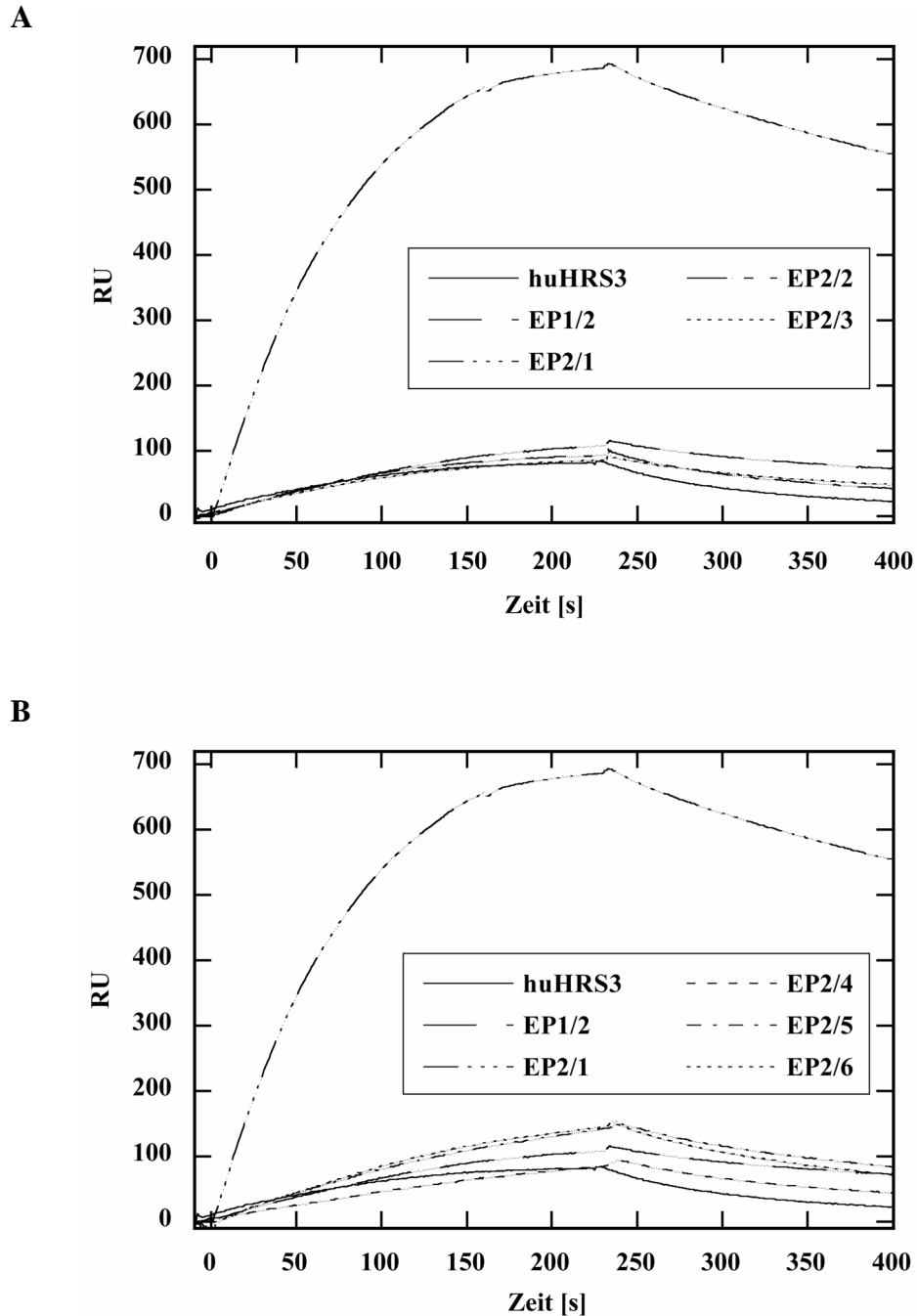


Abbildung 53: Qualitative Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie-Messungen zur Analyse der Bindungsaktivität der huHRS3-Varianten aus der zweiten *Error Prone* PCR. Gereinigtes CD30A-Antigen wurde mittels Amin-Kopplung auf der Oberfläche eines CM-5 *Sensorchips* kovalent immobilisiert. Jeweils 100 μ l einer 100 nM Lösung der huHRS3-Varianten aus der zweiten *Error Prone* PCR (EP2/1-6), der Variante EP1/2 aus der ersten Affinitätsmaturierungsrunde und des ursprünglichen huHRS3 Fab-Fragments wurden bei einer Flußrate von 25 μ l/min appliziert. Wegen der Übersichtlichkeit wurden die Sensorgramme in zwei Diagrammen (A) und (B) zusammengefaßt.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Komplexes aus der Mutante EP2/1 und dem CD30A-Antigen mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie wurden Bindungskurven für eine Konzentrationsreihe des Fab-Fragments aufgenommen (Abb. 54A) und die maximalen Resonanzsignale am Ende der Gleichgewichtsphase gegen die

entsprechende Konzentration der Mutante EP2/1 aufgetragen. Durch nicht-lineare Regression wurden die Meßpunkte angepaßt und die Dissoziationskonstante K_D zu 101 ± 30 nM bestimmt (Abb. 54B), was einer Verbesserung der Affinität gegenüber dem ursprünglich humanisierten HRS3 Fab-Fragment um den Faktor 3 entsprach.

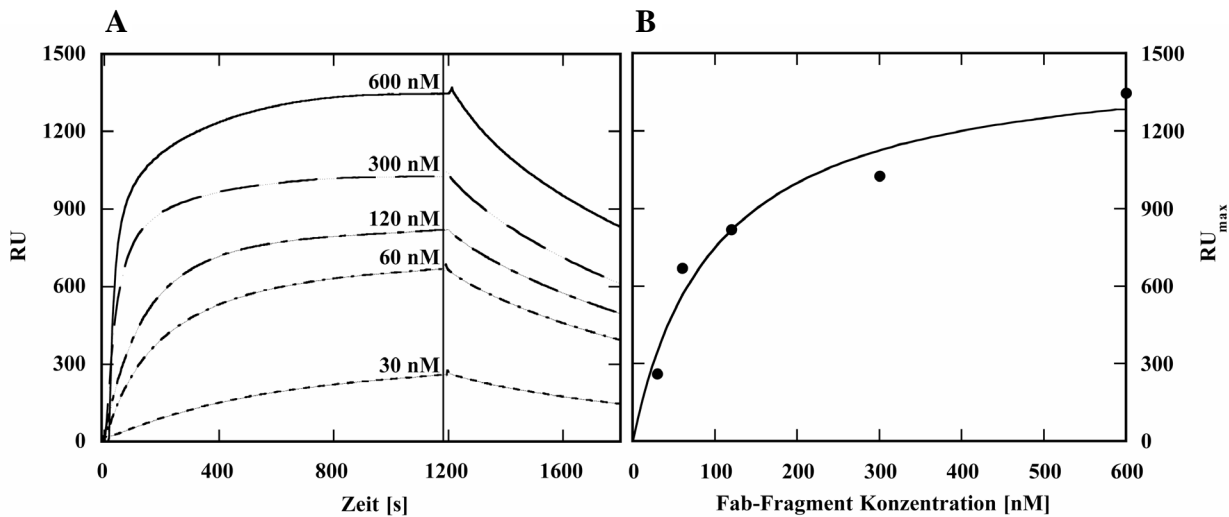


Abbildung 54: Bestimmung der Dissoziationskonstante für den Komplex aus CD30A und der Variante EP2/1 des humanisierten huHRS3 Fab-Fragments mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Gereinigtes rekombinantes CD30A wurde durch Amin-Kopplung kovalent auf der Oberfläche eines CM-5 *Sensorchips* immobilisiert, was zu einer Zunahme des Resonanzsignals um 1600 RU führte. (A) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe der Variante EP2/1 für die Bindung an das immobilisierte CD30A. Jeweils 100 μ l einer 30, 60, 120, 300 und 600 nM Lösung des Fab-Fragments in PBS/P wurden bei einer Flußrate von 5 μ l/min auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle appliziert. Die Sensorgrammkurven wurden um die geringfügigen unspezifischen Signale in Flußkanal 1 korrigiert. Die Dissoziationsphase wurde für ca. 600 s dokumentiert. (B) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) in der Gleichgewichtsphase gegen die entsprechende Konzentration des Fab-Fragments. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von 101 ± 30 nM.

In einem ELISA-Experiment wurde die Affinität der Mutante EP2/1 bezüglich des CD30A-Antigens mit dem chimären muHRS3c und dem ursprünglichen humanisierten HRS3 Fab-Fragment verglichen (Abb. 55). Das huHRS3 Fab-Fragment zeigte in diesem Konzentrationsbereich nur marginale Bindungsaktivität, das chimäre muHRS3c und die Mutante EP2/1 zeigten dagegen klare konzentrationsabhängige Bindungssignale, die im Fall des chimären Fab-Fragments etwa doppelt so hoch waren wie für die Mutante EP2/1.

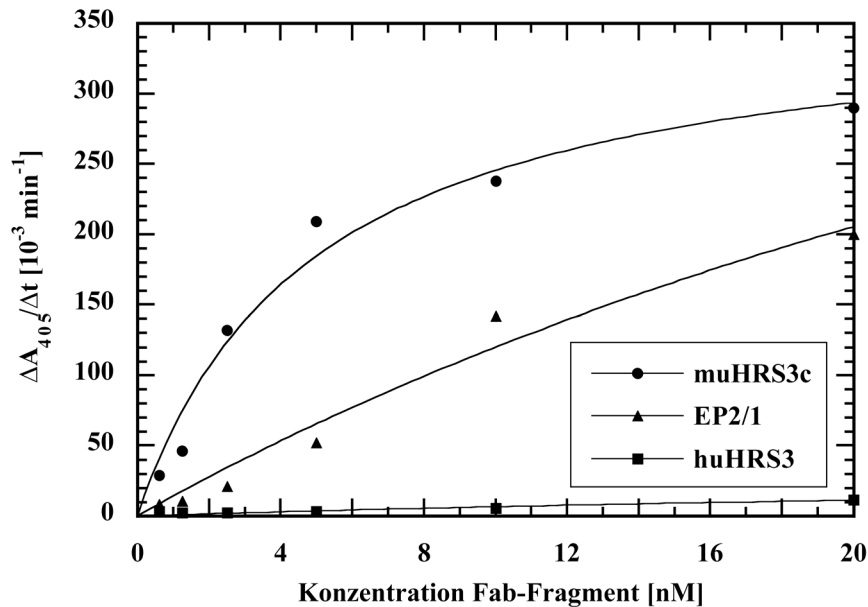


Abbildung 55: ELISA-Experiment zur Untersuchung der Antigen-Bindungsaffinität der Variante EP2/1 im Vergleich mit dem ursprünglichen huHRS3 und dem chimären muHRS3c Fab-Fragment. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem CD30A-Antigen (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/T) beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurden Vertiefungen nur mit BSA beschichtet. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* JM83 produzierten und durch IMAC gereinigten Fab-Fragments appliziert. Gebundenes Fab-Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines Anti-Human- C_{κ} IgG/AP-Konjugats nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzyms ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" nach Gleichung (2).

Um den Effekt der Asp72Asn Aminosäuresubstitution auf die Affinität der Mutante EP2/1 näher zu untersuchen, wurde eine Mutante konstruiert, in der dieser Aminosäureaustausch rückgängig gemacht wurde und somit gegenüber der ursprünglich humanisierten Version nur noch die Substitutionen Ile69Thr und Glu100BLys vorhanden waren. Dazu wurde in pASK88-huV_H-EP1/2/huV_L unter Verwendung der singulären *Eco*RI-Schnittstelle zusammen mit der *Xho*I-Schnittstelle am 3'-Ende des V_L-Gens die Gensequenz für die C-terminalen Aminosäuren der huV_H-Domäne ab Met82 durch die entsprechende Sequenz aus pASK88-huV_H-EP1/7/huV_L ersetzt (siehe Abb. 42 und 51). Nach Ligierung der beiden Fragmente wurde *E. coli* JM83 transformiert, die Plasmid-DNA präpariert und mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Der Vektor wurde als pASK88-huV_H-EP1/2+7/huV_L bezeichnet.

Nach Produktion und Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde die Bindungsaktivität des Fab-Fragments in einem ELISA-Experiment mit der Mutante EP2/1 und der des ursprünglichen humanisierten HRS3 Fab-Fragments verglichen (Abb. 56). Die beobachteten Bindungssignale für die Mutante EP1/2+7 waren deutlich niedriger als für die Mutante EP2/1, was auf einen günstigen Effekt der Asp72Asn-Aminosäuresubstitution in der zu CDR-H2 flankierenden Schleife für die Antigenbindung hindeutete.

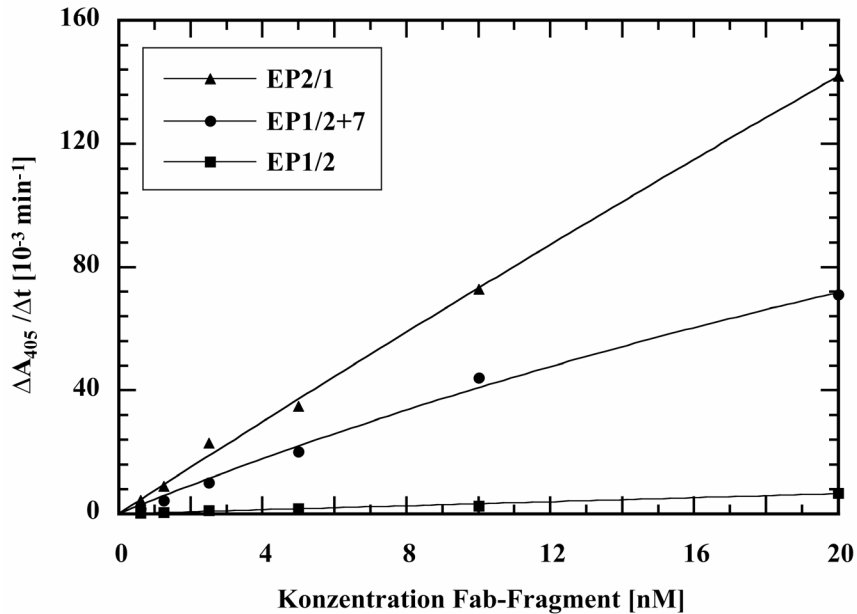


Abbildung 56: ELISA-Experiment zur Untersuchung der Antigen-Bindungsaffinität der Variante EP1/2+7 im Vergleich zu EP1/2 und EP2/1. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem CD30A-Antigen (50 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/T) beschichtet und die Oberfläche anschließend mit BSA abgesättigt. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität wurden Vertiefungen nur mit BSA beschichtet. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* JM83 produzierten und mittels IMAC gereinigten Fab-Fragments appliziert. Gebundenes Fab-Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines Anti-Human- C_{κ} IgG/AP-Konjugats nachgewiesen. Die gemessene Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" nach Gleichung (2).

Im Rahmen eines dritten Affinitätsmaturierungszyklus wurde die Gensequenz der huV_H -Domäne der Mutante EP2/1 erneut einer *Error Prone* PCR unterzogen, wobei pASK88- huV_H -EP2/1/ huV_L als Matrize unter Verwendung der Primer V_{HX} und V_{HYII} diente. Die Bibliothek mit den mutagenisierten huV_H -Gensequenzen wurde wie zuvor beschrieben auf pASK106- $huHRS3$ subkloniert. Nach Transformation von *E. coli* JM83 wurde ein Kolonie-Filterstapel-Test durchgeführt. Zur Erhöhung der Stringenz wurde bei der Entwicklung der hydrophoben Membran eine – im Vergleich zu den Affinitätsmaturierungs-Zyklen eins und zwei – nur halb so hohe Konzentration (7,5 $\mu\text{g/ml}$) des mit Digoxigenin markierten CD30A-Antigenfragments eingesetzt. Wiederum wurden bei mehr als 90 % der Kolonien (insg. > 500) die sekretierten Varianten angefärbt (ähnlich wie in Abb. 50). Insgesamt 10 Kolonien, die die intensivsten Farbsignale auf dem Filter hervorgerufen hatten, wurden ausgewählt, ihre Plasmid-DNA isoliert und die DNA-Sequenz ermittelt (Abb. 51). Sechs Varianten (EP3/2, EP3/3, EP3/4, EP3/8, EP3/9 und EP3/10) wiesen entweder keine oder nur stille Mutationen auf (nicht dargestellt). Vier Varianten (EP3/1, EP3/5, EP3/6 und EP3/7) enthielten – mit Ausnahme von EP3/7 – neben den Aminosäuresubstitutionen der Mutante EP2/1 ein bis zwei weitere Austausche in der Aminosäuresequenz.

Interessanterweise traten bei den Mutanten EP3/1 und EP3/6 Aminosäuresubstitutionen in CDR-H1 bzw. CDR-H3 auf, die bereits in Mutanten aus dem ersten (EP1/6: Ala101Pro) bzw.

zweiten (EP2/3 und EP2/5: Ile34Thr) Affinitätsmaturierungszyklus beobachtet wurden. Die Mutante EP3/6 wies weiterhin eine Asn82Asp-Aminosäuresubstitution in der FR-H3 Region und eine Leu108Gln-Aminosäuresubstitution in der FR-H4 Region auf. In der Mutante EP3/5 trat an Position 75 in der zu CDR-H2 flankierenden Schleife der FR-H3 Region eine konservative Substitution von Lysin gegen Arginin auf. In der Mutante EP3/7 wurde die in EP2/1 vorhandene Asp72Asn-Aminosäuresubstitution zu Serin weiter ersetzt. Die Gensequenzen der huV_H-Domänen der Varianten EP3/1, EP3/5-7 wurden auf dem Vektor pASK88-huHRS3 subkloniert, die entsprechenden Fab-Fragmente damit ohne die ABD-Domäne in *E. coli* JM83 produziert und mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Analyse durch SDS-PAGE zeigte, daß beide Immunglobulinketten in einem stöchiometrischen Verhältnis vorlagen und die interchenare Disulfidbrücke quantitativ ausgebildet wurde (ohne Abbildung).

In einem ELISA-Experiment wurden die Affinitäten der vier Mutanten aus dem dritten Affinitätsmaturierungszyklus mit der Mutante EP2/1 und der des chimären muHRS3c Fab-Fragments verglichen (Abb. 57). Für die Mutante EP3/1 konnte ein mit dem für das chimäre muHRS3c Fab-Fragment vergleichbares konzentrationsabhängiges Bindungssignal mit deutlichem Sättigungsverhalten bei Konzentrationen an Fab-Fragment oberhalb von 10 nM beobachtet werden. Auch die Mutante EP3/5 wies eine verbesserte Affinität im Vergleich zur Mutante EP2/1 auf. Bei den Mutanten EP3/6 und EP3/7 konnte dagegen keine erhöhte Antigenbindung festgestellt werden.

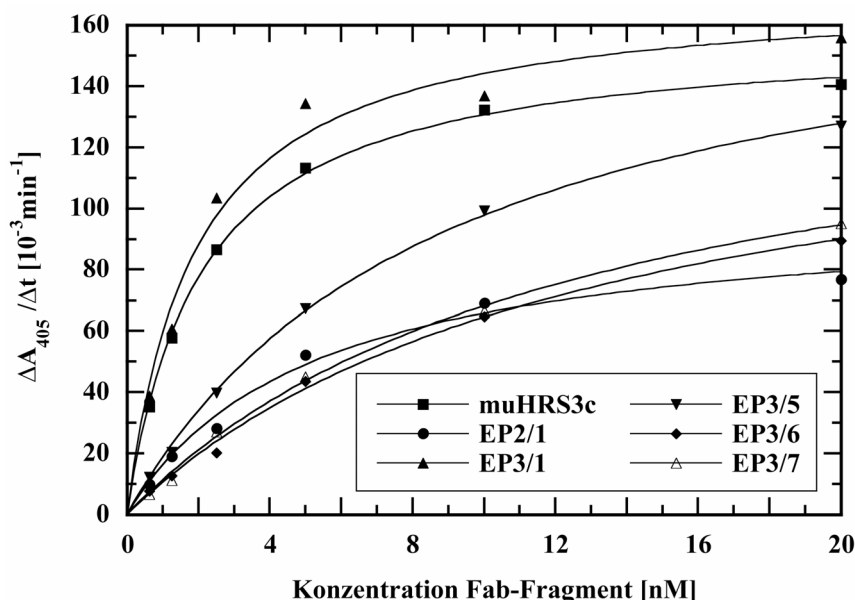


Abbildung 57: Untersuchung der Affinität der Varianten aus der dritten *Error Prone* PCR und Vergleich mit EP2/1 und dem chimären muHRS3c Fab-Fragment im ELISA. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit gereinigtem CD30A-Antigen (50 µg/ml in PBS/T) beschichtet und anschließend die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Zur Kontrolle wurden Vertiefungen nur mit BSA beschichtet. Danach wurde eine Verdünnungsreihe des in *E. coli* JM83 produzierten und mittels IMAC gereinigten Fab-Fragments appliziert. Gebundenes Fab-Fragment wurde anschließend mit Hilfe eines Anti-human-C_κ IgG/AP-Konjugats nachgewiesen. Die gemessene

Aktivität des Reporterenzym ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die jeweilige Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Die Anpassung der Meßwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms "Kaleidagraph" nach Gleichung (2).

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie wurde wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben verfahren. Die Auswertung der Kinetik mit Hilfe der *BIAevaluation Software* ergab für die Komplexbildung eine Geschwindigkeitskonstante k_{on} von $5,1 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ und für die Dissoziation eine k_{off} von $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Bindungsmodell: *1:1 binding with drifting baseline*). Daraus errechnet sich eine Dissoziationskonstante von 40 nM ($\chi^2 = 1020$). Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels der Gleichgewichtsanalyse ergab $58 \pm 10 \text{ nM}$ (Abb. 58). Diese war somit im Vergleich zum chimären muHRS3c Fab-Fragment mit $25,8 \pm 2,8 \text{ nM}$ bloß noch um den Faktor zwei erhöht. Somit wurde in dem humanisierten Fab-Fragment nahezu die ursprüngliche Affinität durch insgesamt vier Aminosäureaustausche – zwei in einer zu CDR-H2 flankierenden Schleife in FR-H3 und zwei in CDR-H3 – wieder hergestellt. Verglichen mit der K_D des HRS3-Arms des bispezifischen HRS3/A9-mMAk mit $82 \pm 9 \text{ nM}$ (siehe Abschnitt 3.1.3) war die Affinität der Variante EP3/1 sogar höher.

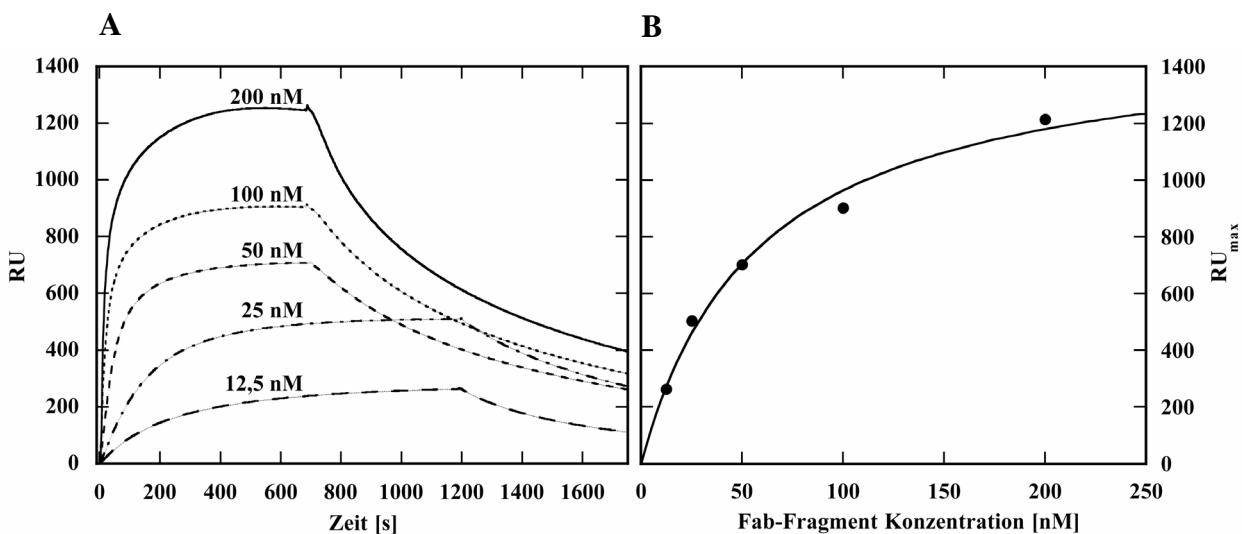
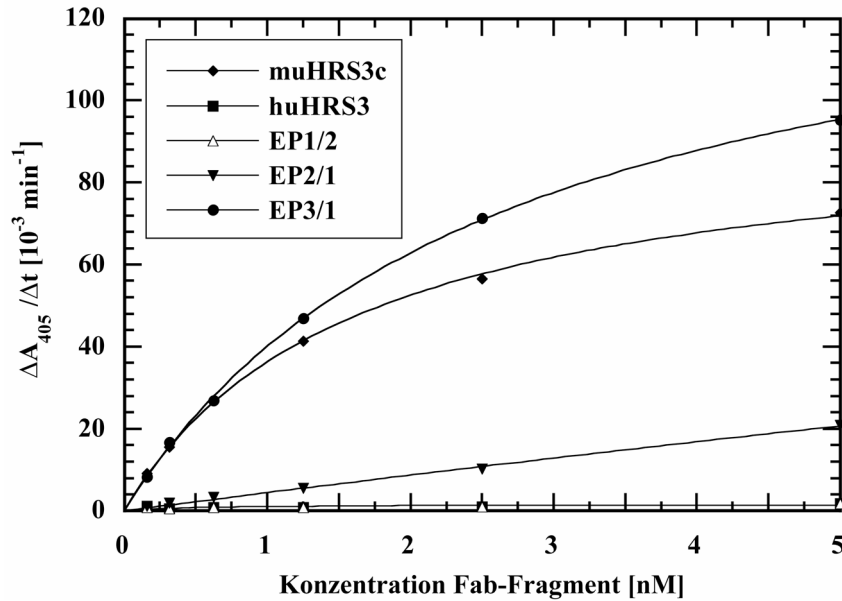


Abbildung 58: Bestimmung der Dissoziationskonstante für den Komplex aus CD30A und der Variante EP3/1 des humanisierten HRS3 Fab-Fragments mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie. Gereinigtes CD30A wurde durch Amin-Kopplung kovalent auf der Oberfläche eines CM-5 *Sensorchips* immobilisiert, was zu einer Zunahme des Resonanzsignals um 1700 RU führte. (A) Überlagerung der Sensorgramme einer Konzentrationsreihe der Variante EP3/1. Jeweils 100 μl einer 12,5 oder 25 bzw. 60 μl einer 50, 100 oder 200 nM Lösung des Fab-Fragments in PBS/P wurden bei einer Flußrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die beiden in Reihe geschalteten Flußkanäle des *Sensorchips* appliziert. Die Sensorgrammkurven wurden um die geringfügigen unspezifischen Signale in Flußkanal 1 korrigiert. Die Dissoziationsphase wurde für 600 bis 1100 s dokumentiert. (B) Ermittlung der Dissoziationskonstanten K_D durch Auftragung der maximalen Resonanzsignale (RU_{max}) in der Gleichgewichtsphase (nach 600 s bzw. 1100 s) gegen die entsprechende Antikörperkonzentration. Die Kurvenanpassung durch nicht-lineare Regression nach Gleichung (2) ergab einen K_D -Wert von $58 \pm 10 \text{ nM}$.

Zur zusammenfassenden Dokumentation der schrittweisen Affinitätsmaturierung wurden jeweils die besten Mutanten mit dem ursprünglichen humanisierten HRS3 und dem chimären muHRS3c Fab-Fragment in einem ELISA bezüglich ihrer Affinität zu dem CD30A-Antigenfragment miteinander verglichen (Abb. 59A). Das ursprüngliche humanisierte HRS3 Fab-Fragment sowie dessen Mutante EP1/2 zeigten im untersuchten Konzentrationsbereich von 0 bis 5 nM nur geringe Bindungssignale, während für die Mutante EP3/1 und für das chimäre HRS3c Fab-Fragment ähnlich hohe Signale erhalten wurden. Die nach Anpassung der Meßwerte abgeschätzten apparenten Dissoziationskonstanten der Antikörper/Antigen-Komplexe stimmten mit $1,62 \pm 0,08$ nM für das chimäre muHRS3c bzw. $2,63 \pm 0,11$ nM für die Mutante EP3/1 beinahe überein.

Die hohe Reinheit der gentechnisch hergestellten Fab-Fragmente und die Auswirkung der einzelnen Aminosäuresubstitutionen auf ihr elektrophoretisches Laufverhalten ist in Abb. 59B dokumentiert. Auffallend ist der Effekt der Aminosäuresubstitutionen Asp72Asn und Glu100BLys in der Mutante EP2/1, die eine erhöhte Mobilität der schweren Kette bewirkt, welche jedoch durch eine zusätzliche Aminosäuresubstitution Ala101Pro in der Mutante EP3/1 kompensiert wurde.

A



B

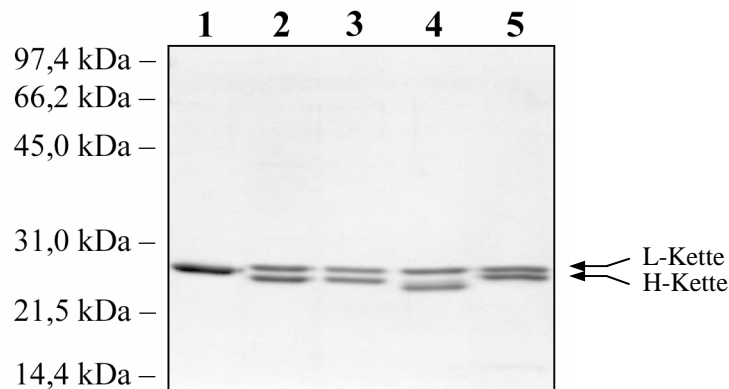


Abbildung 59: Vergleich der durch Affinitätsmaturierung erhaltenen Fab-Fragmente des HRS3 MAK in ELISA und SDS-PAGE. (A) Vergleich der Varianten EP1/2, EP2/1 und EP3/1 mit dem ursprünglichen huHRS3 und dem muHRS3c Fab-Fragment im ELISA bezüglich Bindung an CD30A. Details wie in Abb. 57. (B) SDS-PAGE der in (A) untersuchten Fab-Fragmente. Auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel wurde je eine Probe (2 μg) des muHRS3c (Spur 1), des huHRS3 (Spur 2), der Varianten EP1/2 (Spur 3), EP2/1 (Spur 4) und EP3/1 (Spur 5) in reduziertem Zustand aufgetragen. *E. coli* JM83/pASK88-muHRS3c usw. wurde im 2 l-Maßstab bei 22 °C kultiviert, die periplasmatische Proteinfraction gewonnen und daraus das Fab-Fragment durch IMAC isoliert.

Um zu untersuchen, ob die Mutante EP3/1 auch das native CD30-Antigen als Teil der vollständigen extrazellulären Region des Rezeptors auf HRS-Zellen erkennt, wurden *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) Messungen durchgeführt (mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. C. Renner, Universitätsklinik des Saarlandes). Zellen der CD30-positiven Hodgkin-Zelllinie L540CY (Hombach *et al.*, 1993) wurden jeweils mit dem gereinigten chimären muHRS3c Fab-Fragment, dem ursprünglichen huHRS3 Fab-Fragment sowie dessen Mutante EP3/1 inkubiert und anschließend die Verteilung der Zellpopulation

mit gebundenem Immunglobulinfragment mittels eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zweitantikörpers quantifiziert.

Das Messergebnis ist in Abb. 60 dargestellt und zeigt tendenziell höhere Fluoreszenzintensitäten für die Mutante EP3/1 und das chimäre muHRS3c Fab-Fragment im Vergleich zum ursprünglich humanisierten HRS3 Fab-Fragment. Mit diesem Experiment konnte daher gezeigt werden, daß die Version EP3/1 des humanisierten HRS3 Fab-Fragments vergleichbare Bindungsaktivität bezüglich des nativen CD30-Antigens auf HRS-Zellen aufweist wie das entsprechende Fab-Fragment des ursprünglichen monoklonalen Antikörpers der Maus.

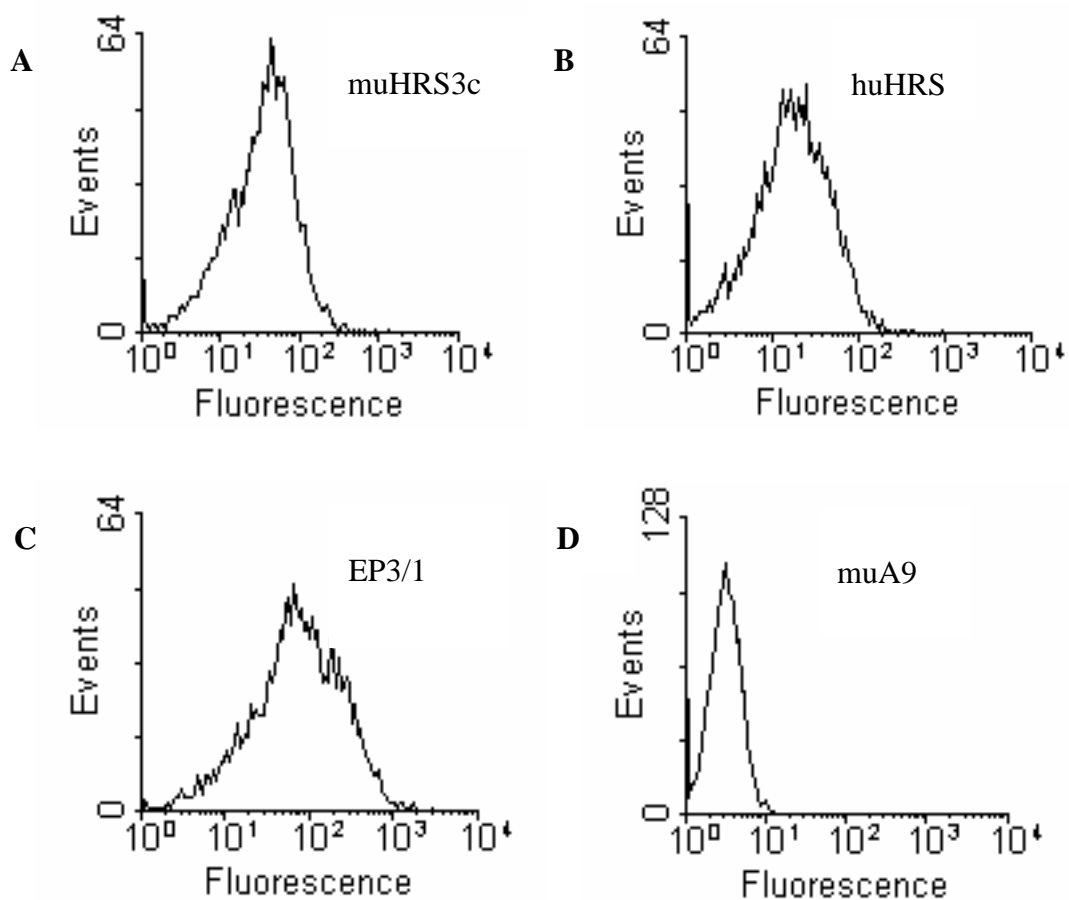


Abbildung 60: FACS-Analyse der Bindung des muHRS3c und huHRS3 Fab-Fragments sowie der affinitätsmaturierten Variante EP3/1 an CD30-positive L540 CY-Zellen. (A) muHRS3c Fab-Fragment. 1×10^6 L540 CY-Zellen in PBS wurden mit $0,5 \mu\text{g}$ des gereinigten rekombinanten Fab-Fragments in einem Gesamtvolumen von $50 \mu\text{l}$ für 30 min bei 4°C inkubiert. Gebundenes Fab-Fragment wurde mit biotinyliertem anti-human-Light Chain- κ Serum und Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat (jeweils $0,1 \text{ mg/ml}$ in PBS) in einem FACScan™ Cytofluorometer detektiert. (B) wie in (A) mit huHRS3. (C) wie in (A) mit EP3/1. (D) Negativkontrolle mit muA9 Fab-Fragment.

4 Diskussion

4.1 Heterologe Produktion von sekretorischen Proteinen in *E. coli*

Das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* ist einer der am häufigsten in der modernen Biotechnologie benutzten Wirtsorganismen für die Produktion rekombinanter Proteine. Seine Fähigkeit zu raschem Wachstum und hohen Zelldichten in preiswerten Substratmedien, seine gut charakterisierte Genetik (Koonin, 1997) und die Verfügbarkeit einer steigenden Anzahl von Klonierungsvektoren und Mutanten-Stämmen ermöglichen die gentechnische Herstellung zahlreicher Proteine in hoher Quantität und Qualität (Baneyx, 1999; Swartz, 2001). Zudem bietet *E. coli* die Möglichkeit, die vektorkodierten Gene mittels molekularbiologischer Standardmethoden zielgerichtet zu modifizieren und damit die Eigenschaften des kodierten Proteins zu verändern (Sambrook & Russel, 2001). Mit der erstmaligen Sekretion eines eukaryontischen Polypeptids (Proinsulin aus der Ratte) als Fusionsprotein mit einer prokaryontischen Signalsequenz in den periplasmatischen Raum von *E. coli* (Talmadge *et al.*, 1980) konnte gezeigt werden, daß Proteine, die ihre Funktion im extrazellulären Milieu haben und Disulfidbindungen aufweisen, in nativer Form bakteriell produziert werden können. Zahlreiche Signalsequenzen wirtseigener sekretorischer Proteine (z. B. OmpA, OmpT, PelB, Bla und PhoA) ermöglichen den effizienten heterologen Transport von Polypeptiden über die innere Bakterienmembran (Baneyx, 1999). Diese Sekretionsstrategie wurde in dieser Arbeit zur gentechnischen Herstellung von Antikörperfragmenten (Skerra & Plückthun, 1988) sowie von extrazellulären Domänen membranständiger Rezeptoren in *E. coli* verwendet.

4.1.1 Rekombinante Antikörperfragmente

Die heterologe Produktion von Antigen bindenden Immunglobulinfragmenten wurde mit der von Skerra & Plückthun (1988) sowie parallel dazu von Better *et al.* (1988) entwickelten Sekretionsstrategie realisiert. Ein von Schiweck & Skerra (1995) etabliertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von Antikörperfragmenten bietet unter Verwendung des dicht reprimierten Tetracyclin-Promotor/Operator-Systems die Möglichkeit, Immunglobulinfragmente in relativ großen Mengen auch im Labormaßstab zu produzieren.

Schon bei den grundlegenden Arbeiten zur funktionellen Sekretion (Skerra, 1989; Better *et al.*, 1988) traten verschiedene Schwierigkeiten zu Tage. So wurde beobachtet, daß sich üblicherweise nur der kleinere Teil der beiden sekretierten Polypeptidketten zum funktionellen Antikörperfragment im Periplasma von *E. coli* zusammenlagerte, während sich erhebliche Mengen des rekombinanten Proteins dort in denaturierter Form als periplasmatische Aggregate (Skerra, 1989; Bowden & Georgiou, 1990; Chan *et al.*, 1996) ansammeln. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit insbesondere bei der bakteriellen Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments beobachtet. Die treibende Kraft für die Aggregation im Periplasma scheinen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen

Faltungsmoleküle zu sein (Dill, 1990; Knappik & Plückthun, 1995), wobei die Aggregatbildung durch langsame Proteinfaltung begünstigt wird (Wall & Plückthun, 1995).

Zur Minimierung der Aggregation sekretorischer Proteine im Periplasma von *E. coli* wurde von Bowden & Georgiou (1988) bei der Überproduktion der β -Lactamase ein simples Verfahren beschrieben. Durch Supplementierung des Nährmediums mit 0,3 M des nicht metabolisierbaren Disaccharids Saccharose konnte eine vierfache Ausbeutesteigerung an löslicher β -Lactamase erhalten und die Aggregation im Periplasma reduziert werden. Die Autoren führten diese Beobachtung einerseits auf die langsamere Prozessierung der β -Lactamase aus dem Vorläuferprotein sowie auf die erhöhte thermodynamische Stabilität des korrekt gefalteten Proteins in Anwesenheit von Saccharose zurück. Möglicherweise spielte aber auch die Volumenzunahme des Periplasmas infolge des geschrumpften Spheroplasten und die damit verbundene niedrigere Konzentration der periplasmatischen Proteine in *E. coli* eine Rolle. Ein ähnlich positiver Einfluß der Saccharose konnte leider bei der Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments nicht beobachtet werden.

Ferner wurden bei der Produktion sekretorischer Antikörperfragmente mitunter Lyse und Wachstumsdefekte der plasmidtragenden *E. coli*-Zellen während der Wachstums- und vor allem Induktionsphase der Bakterienkulturen beschrieben (Plückthun & Skerra, 1989). Möglicherweise sind diese toxischen Effekte im Verlauf der Fremdgenexpression auf das im Periplasma anfallende denaturierte Protein zurückzuführen, dessen exponierte hydrophobe Oberflächenbereiche vergleichbar der Wirkung von Peptiden mit amphiphilen Eigenschaften eine Permeabilisierung der äußeren und ggf. auch der inneren Zellmembran bewirken (Skerra, 1989). Empirische Erfahrungen lassen vermuten, daß die Toxizität des Fremdproteins von dessen individueller Polypeptidsequenz und Struktur abhängt. Der toxische Effekt kann bei unterschiedlichen Antikörperfragmenten verschieden stark ausgeprägt sein, was sich dementsprechend auf die Proteinausbeute bei der Produktion in *E. coli* auswirkt (Knappik & Plückthun, 1995). So übte das chimäre muA9 Fab-Fragment in dieser Arbeit einen deutlichen toxischen Effekt während der Induktionsphase auf die Zellstabilität von *E. coli* aus, was nach 2,5 h Induktionsdauer zum Auftreten erheblicher Zellyse führte. Dagegen konnte bei der Produktion des chimären muHRS3c Fab-Fragments auch nach 3 h Induktion noch keine Zellyse und somit kein nennenswerter toxischer Einfluß des muHRS3c Fab-Fragments auf Zellwachstum bzw. -stabilität festgestellt werden. Eine genauere Analyse der Zellyse wäre z. B. durch Messung der β -Lactamase-Aktivität im Medium möglich gewesen (Plückthun & Skerra, 1989).

Zur Optimierung der Ausbeute des rekombinanten chimären muA9 Fab-Fragments wurde der Einfluß des als Selektionsmarker verwendeten Antibiotikums auf die Zell- und Plasmidstabilität untersucht. Da die äußere Bakterienmembran im Verlauf der Sekretion des Fremdproteins schneller permeabel (*leaky*) wird als die Cytoplasmamembran (Skerra, 1989), kann die Freisetzung der im periplasmatischen Raum vorliegenden β -Lactamase schon zu

einem relativ frühen Zeitpunkt erfolgen. Dies führt damit zum schnellen Abbau des Bakteriostatikums im Kulturmedium. Auf diese Weise erlischt der Selektionsdruck für plasmidtragende Zellen, und plasmidlose Zellen können ungehindert heranwachsen. Dieser Effekt wurde aufgrund der Toxizität des chimären muA9 Fab-Fragments und der damit verbundenen partiellen Zellyse unter Verwendung von Ampicillin als Selektionsmarker verstärkt beobachtet. Die Reduktion des Selektionsdruckes machte sich in einem starken Plasmidverlust von bis zu 99 % im Verlaufe einer Fermentation im 4 l-Maßstab bemerkbar (Gresch, 1997).

Der Plasmidverlust konnte in der vorliegenden Arbeit durch Verwendung von Chloramphenicol als Selektionsmarker auf 20 % reduziert werden, was zu erhöhten und reproduzierbaren Ausbeuten führte. Eine ähnliche Reduktion des Plasmidverlustes wurde von M. Fiedler bei der Produktion des chimären IN1 Fab-Fragments unter Verwendung von Chloramphenicol anstelle von Ampicillin beobachtet (Fiedler & Skerra, 2001). Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung von Chloramphenicol auch die Tendenz zur Zellyse erniedrigt werden, was im Vergleich zu Ampicillin als Selektionsmarker in einer bis zu 30 Minuten längeren möglichen Induktionsdauer resultierte.

Die Wahl des Bakterienstammes für die Produktion heterologer Proteine in Schüttel- oder Fermentationskulturen wird in der Literatur als wichtiger Faktor hinsichtlich der Ausbeute diskutiert (Zabrinskie & Acuri, 1986; Sambrook *et al.*, 1989). Hier trat bei Verwendung von *E. coli* JM83 im Gegensatz zu *E. coli* W3110 bei der Produktion des chimären muA9 Fab-Fragments im Fermenter die toxische Wirkung weniger zutage. Der Einsatz des für Prolin auxotrophen *E. coli*-Stammes JM83 für die Fermentation wurde durch Komplementierung der Δ proAB-Deletion durch das F'-Plasmid aus *E. coli*-XL1-Blue ermöglicht (Schäfer, 1998).

Im Vergleich zum chimären muA9 Fab-Fragment gestaltete sich die Herstellung des chimären muHRS3c Fab-Fragments und seiner humanisierten Varianten wesentlich einfacher. Das chimäre muHRS3c Fab-Fragment hatte keinen toxischen Effekt auf die Zellstabilität von *E. coli*, und selbst bei Verwendung von Ampicillin als Selektionsmarker war eine hohe Plasmidstabilität mit 90-95 % zum Zeitpunkt der Ernte gegeben. Die relative Ausbeute an korrekt gefaltetem chimärem muHRS3c Fab-Fragment war im Fermenter unter Verwendung des *E. coli*-Stammes W3110 nahezu identisch mit der im Schüttelkolben und somit offensichtlich nur von der Faltungseffizienz des Fab-Fragments im Periplasma von *E. coli* bestimmt. Dieser Befund steht im Einklang mit der beschriebenen stammunabhängigen Regulation der Genexpression durch den *tet*-Promotor/Operator (Skerra, 1994b).

Für das auf der Basis humaner Konsensussequenzen humanisierte HRS3 Fab-Fragment wurden bei der bakteriellen Produktion Anzeichen von Zellyse beobachtet und eine im Vergleich zum chimären muHRS3c Fab-Fragment geringere relative Ausbeute erzielt. Diese Beobachtung ist überraschend, da für das Fab-Fragment des auf der Basis der gleichen

Konsensussequenzen humanisierten Antikörpers 4D5 sehr hohe Ausbeuten mit bis zu 2 g/l Kulturmedium ($OD_{550} = 1$) des gereinigten Proteins bei der Hochzelllichtfermentation beschrieben wurden (Carter *et al.*, 1992b). Den Autoren zufolge war dies weniger auf die bei der fermentativen Herstellung des Fab-Fragments gewählten Bedingungen zurückzuführen als auf die außergewöhnlich hohe Faltungseffizienz dieses Antikörperfragments.

Dagegen wurde im Fall des ebenfalls auf der Basis der humanen Konsensussequenzen humanisierten huA9 Fab-Fragments ein deutlicher positiver Einfluß auf die Faltungseigenschaften beobachtet. Zum einen konnte dadurch die Toxizität vermindert und zum anderen die Ausbeute mit fast 2 mg aus einer 2 l-Kultur im Vergleich zum chimären muA9 Fab-Fragment mit 80 µg um den Faktor 25 gesteigert werden (Helga Gruber, persönliche Mitteilung).

4.1.2 Extrazelluläre Domänen des CD16- und des CD30-Antigens

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Affinitätsmessungen sowie die Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments war die gentechnische Herstellung löslicher und biologisch aktiver Fragmente der extrazellulären Domänen des FcγRIII-Rezeptors (CD16; Gessner *et al.*, 1998) sowie des CD30-Antigens (Dürkop *et al.*, 1992) essentiell.

Der FcγRIII-Rezeptor gehört zur Immunglobulin-Superfamilie mit zwei extrazellulären Domänen des C2-Typs (Gessner *et al.*, 1998). Die Kristallstruktur des FcγRIII-Rezeptors als Komplex mit dem menschlichen IgG1 Fc-Fragment wurde kürzlich von Sondermann *et al.* (2000) gelöst. Das für die Kristallisation verwendete CD16-Fragment umfaßte nahezu die gesamte extrazelluläre Region und wurde in *E. coli* cytoplasmatisch in Form von Einschlußkörpern produziert und anschließend *in vitro* rückgefaltet. Lediglich 10 % des rekombinanten CD16-Fragments konnten mit dem beschriebenen Rückfaltungsprotokoll in löslicher bzw. korrekt gefalteter Form gewonnen werden. Versuche zur löslichen Produktion in eukaryontischen Systemen lieferten nur geringe Mengen eines inhomogenen und für die Kristallisation nicht verwendbaren Materials (Sondermann & Jacob, 1999).

Für die Herstellung der extrazellulären Domäne des CD16 wurde zudem die Konstruktion eines Immunadhäsins beschrieben (Mandelboim *et al.*, 1999). Hierbei ist die extrazelluläre Domäne an die Gelenkregion und den Fc-Teil der schweren Immunglobulinkette eines IgG1 fusioniert. Durch Spaltung mit Papain konnte daraus ein lösliches funktionelles Rezeptorfragment ohne Fc-Teil hergestellt werden (Chamow & Ashkenzai, 1996). Die Produktion in COS-7-Zellen ermöglichte zudem die Herstellung eines glycosylierten Immunadhäsins, das ins Medium sekretiert und mittels Protein-G-Affinitätschromatographie daraus im Einschnittverfahren isoliert werden konnte.

Aufgrund der prinzipiellen Ähnlichkeit der extrazellulären Domäne von CD16 mit den beiden Domänen in der Immunglobulinkette eines Fab-Fragments wurde in der vorliegenden Arbeit dessen bakterielle Produktion im Periplasma von *E. coli* in Betracht gezogen. Die periplasmatische Sekretion eines Rezeptorfragments aus der Immunglobulin-Superfamilie wurde bislang nur für die Herstellung der variablen Domänen der α - und β -Kette des T-Zellrezeptors in Form eines scFv-Fragments beschrieben (Ward, 1992; 1993; Wülfing & Plückthun, 1994). In der zuletzt genannten Arbeit konnten die variablen Domänen dreier verschiedener T-Zellrezeptoren unter Verwendung des *lac*-Promotor/Operatorsystems mit Ausbeuten zwischen 0,05 bis 0,5 mg/l Kulturmedium im Schüttelkolben gewonnen werden, wobei mehr als 95 % der produzierten Fragmente in löslicher Form vorlagen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des auf dem *tet*-Promotor basierenden Expressionssystems ein CD16-Fragment mit den Aminosäuren 3-176 (CD16B; siehe Abschnitt 3.1.2) mit praktisch der vollständigen extrazellulären Domäne mittels der OmpA-Signalsequenz in *E. coli* sekretiert und durch das am C-Terminus fusionierte *Strep*-tag aus der periplasmatischen Proteinfraction im Einschnittverfahren isoliert werden (Ausbeute: 100 μ g aus 2 l-Kultur). Ein erster Versuch ein CD16-Fragment mit dem Aminosäurebereich 3-165 (CD16A) herzustellen, erbrachte wesentlich geringere Ausbeuten. Nach Publikation der Kristallstruktur von Sondermann *et al.* (2000) wurde ersichtlich, daß die C-terminale Domäne erst an Position 171 mit einem β -Faltblattstrang endet, worauf das gentechnisch herzustellende CD16-Fragment am C-Terminus bis zur Aminosäure 176 verlängert wurde (siehe Abschnitt 3.1.2).

Das isolierte CD16B-Fragment erwies sich in Lösung als relativ instabil. Sowohl bei der Lagerung als auch bei der Aufkonzentrierung neigte das rekombinante Protein zur Aggregation. Wülfing & Plückthun (1994) beobachteten bei den drei von ihnen produzierten T-Zellrezeptorfragmenten eine Abhängigkeit der Löslichkeit und damit Tendenz zur Aggregatbildung von der Anzahl möglicher N-Glycosylierungsstellen. Fragmente von extrazellulären Domänen mit nur einer Glycosylierungsstelle waren in Lösung stabil, während ein Fragment mit zwei zur Aggregation neigte. Dies deutet darauf hin, daß – falls beide Glycosylierungsstellen in Eukaryonten überhaupt verwendet werden – dieses in *E. coli* produzierte T-Zellrezeptorfragment den von den polaren Zuckerseitenketten ausgehenden stabilisierenden Effekt (Machamer & Rose, 1988; Dube *et al.*, 1988; Matzuk & Boime, 1988) für seine Löslichkeit benötigt. Aufgrund der Präsenz von fünf potentiellen N-Glycosylierungsstellen könnte eine ähnliche Ursache für die ausgeprägte Tendenz zur Aggregation des rekombinanten CD16B-Fragments verantwortlich sein. Die geringen Rückfaltungsausbeuten der von Sondermann & Jakob (1999) in Einschlußkörpern produzierten extrazellulären CD16-Domäne deuten ebenfalls auf Aggregationsprobleme hin. Eine Stabilisierung des CD16B-Fragments gelang in der vorliegenden Arbeit durch Lösung bei pH 3,85.

Das Antigen des HRS3-Antikörpers, CD30, ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-(TNFR)-Familie. Kennzeichnend für diese Rezeptoren sind repetitive cysteinreiche Domänen (CRD) innerhalb der extrazellulären Region mit jeweils sechs Cysteinresten, die drei Disulfidbrücken bilden. Die Anzahl der CRD variiert normalerweise zwischen einer und vier, wohingegen CD30 wegen einer partiellen Duplikation fünf CRD aufweist (Bodmer *et al.*, 2002). Die extrazelluläre Domäne läßt sich daher in zwei Subdomänen unterteilen, die zueinander 64 %ige Homologie aufweisen (Dürkop *et al.*, 1992). Die Subdomäne 1 umfaßt drei CRD mit insg. 18 Cysteinresten, die Subdomäne 2 zwei CRD mit 14 Cysteinresten. Wie die Strukturaufklärung des nicht in komplexierter Form mit TNF kristallisierten TNFR-1 ergab (Naismith *et al.*, 1996), verleiht die sich wiederholende und regelmäßige Anordnung der CRD den Rezeptoren dieser Familie eine langgestreckte Form, welche durch eine leicht verdrehte Leiter von Disulfidbrücken stabilisiert wird.

Die extrazelluläre Domäne von CD30 wurde bisher nur in eukaryontischen Expressionssystemen löslich produziert. Smith *et al.* (1993) beschrieben die Herstellung der gesamten extrazellulären Region als Fusionsprotein mit dem Fc-Teil der schweren Kette eines humanen IgG1 in Form eines Immunadhäsins. Dieses in Säugetierzellen produzierte Rezeptorfusionsprotein wurde für die Identifizierung des physiologischen CD30-Liganden eingesetzt. Die Isolierung des Immunadhäsins erfolgte mittels Protein-G-Affinitätschromatographie und lieferte das in der Fc-Region disulfidverbrückte Homodimer aus extrazellulären Domänen.

In einer anderen Arbeit wurde die Produktion der gesamten extrazellulären Region von CD30 mit einem N-terminal fusionierten Hexahistidinhängsel beschrieben (Barth *et al.*, 2000). Das unter Verwendung der CD30-eigenen Signalsequenz von COS-Zellen (Hamster) in das Medium sekretierte Protein wurde mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Funktionalität wurde im ELISA unter Verwendung eines scFv-Fragments des CD30-spezifischen Antikörpers Ki-4 (Schwab *et al.*, 1992) bestätigt.

Wie bereits bei der Herstellung der extrazellulären Domäne von CD16 wurde die bakterielle Produktion eines funktionellen Fragments des CD30-Rezeptors in der vorliegenden Arbeit mit dem C-terminalen *Strep*-tag realisiert. Die Produktion der gesamten extrazellulären Region mit insg. 362 Aminosäuren und 17 Disulfidbrücken durch Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* ließ geringe Effizienz erwarten, weshalb lediglich Teile davon produziert wurden. Da das vom anti-CD30 Antikörper HRS3 erkannte Epitop in der extrazellulären Region bisher nicht lokalisiert war, wurde die Lösungsmittelzugänglichkeit der einzelnen Aminosäurereste nach Kyte & Doolittle (1982) analysiert, um Hinweise auf besonders exponierte Bereiche und somit potentielle Epitope zu erhalten. Die zweite Subdomäne mit 7 Disulfidbrücken weist demzufolge einen höheren Anteil exponierter Bereiche auf. Deshalb wurden vier überlappende Fragmente, die jeweils den Aminosäurebereich der zweiten Subdomäne mit unterschiedlich langen flankierenden C- und N-terminalen Bereichen

umfaßten, für die Produktion in *E. coli* ausgewählt. Interessanterweise wurden Fragmente mit den Aminosäuren 336-357 am C-Terminus (CD30B und CD30D; siehe Abschnitt 3.1.1) – das entspricht der Region zwischen der zweiten Subdomäne und der Transmembrandomäne im nativen CD30 – nur in geringen Mengen ($< 1 \mu\text{g/L}$ Kulturmedium; $\text{OD}_{550} = 1$) produziert. Dagegen wirkte sich ein 22 Aminosäuren langer N-terminaler Aminosäurebereich (Aminosäuren 185-205) positiv auf die Ausbeute aus. So konnte das Fragment CD30A immerhin mit typischen Ausbeuten von $100 \mu\text{g/L}$ Kulturmedium ($\text{OD}_{550} = 1$) hergestellt werden.

Das Vorhandensein von 14 Cysteinresten und damit die Ausbildung der 7 korrekten Disulfidbrücken kann während des Faltungsvorgangs des CD30A-Fragments problematisch sein. So wurde das Vorliegen mehrerer oligomerer Formen und eines Disulfidisomers beobachtet (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Oligomere konnten durch Größenausschlußchromatographie abgetrennt werden. Die Analyse der monomeren Proteinfraction mittels SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen deutete jedoch auf die Präsenz zweier Formen mit höherer bzw. niedrigerer elektrophoretischer Mobilität im Verhältnis 10:1 hin. Da diese beiden Formen mittels Massenspektrometrie nicht unterscheidbar waren, wurde auf die Existenz zweier Proteindisulfidisomere geschlossen, wobei dasjenige mit der höheren Mobilität vermutlich aufgrund der korrekten Ausbildung seiner Disulfidbrücken eine kompaktere Form aufwies.

Unter reduzierenden Bedingungen war auf einem SDS-Polyacrylamidgel bei der gleichen Proteinprobe nur eine einzelne Bande bei ca. 28 kDa zu sehen. Diese Molmasse ist fast doppelt so hoch wie die anhand der Aminosäuresequenz berechnete und mittels Massenspektrometrie bestätigte. Dieses Phänomen eines abnormalen elektrophoretischen Laufverhaltens des CD30-Rezeptors wurde bereits von Dürkop *et al.* (1992) beschrieben und scheint charakteristisch für cysteinreiche Rezeptormoleküle zu sein, da es auch von Johnson *et al.* (1986) für den niedrig affinen NGF-Rezeptor bzw. von Kohno *et al.* (1990) für den TNF-Rezeptor II beobachtet wurde.

Die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Proteindisulfidisomeren ist bei insgesamt 14 Cysteinresten relativ hoch. Neben kinetischen Ursachen (Creighton, 1986) sind falsche Quervernetzungen vermutlich dann begünstigt, wenn nur marginale Unterschiede in der freien Enthalpie der unterschiedlichen Faltungsisomere vorliegen. Folglich könnte die Wirkung eines Faltungskatalysators hilfreich sein, um den Isomerisierungsprozess abzuschließen. Dies konnte bei der Überexpression der Proteindisulfid-Oxidoreduktasen DsbA und DsbC im Fall der bakteriellen Produktion des apo-RBP mit insg. 3 Disulfidbindungen gezeigt werden (Schmidt *et al.*, 1998; Müller & Skerra, 1993). Qiu *et al.* (1998) berichtete sogar die erfolgreiche Produktion des humanen *Tissue Type Plasminogen Activators* mit insg. 17 Disulfidbindungen im Periplasma von *E. coli* unter Überexpression der Proteindisulfid-Oxidoreduktase DsbC. Ein ähnlich positiver Effekt auf die korrekte Ausbildung der 7

Disulfidbrücken im CD30A-Fragment konnte hier nicht beobachtet werden. Die Überexpression der Disulfid-Oxidoreduktasen DsbC und DsbA zeigte weder einen signifikanten Effekt auf das Verhältnis der beiden Proteindisulfid-Isomere noch auf die Ausbeute an löslichem Protein insgesamt. Die Überexpression der Disulfid-Oxidoreduktasen DsbA bzw. DsbC kann allerdings auch einen negativen Effekt auf die Faltungseffizienz ausüben, wie bei der Produktion des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors I (IGF-I) mit drei Disulfidbindungen im Periplasma von *E. coli* beobachtet wurde (Joly *et al.*, 1998).

4.2 Kopplung von Fab-Fragmenten zum bispezifischen F(ab)₂-Fragment

Bispezifische F(ab)₂-Fragmente wurden erstmals durch chemische Kopplung zweier Fab-Fragmente mittels einer Disulfidbrücke (Brennan *et al.*, 1985) oder einer Linkerreagens (Glennie *et al.*, 1987) hergestellt. Die dabei verwendeten Fab-Fragmente wurden zuvor aus den entsprechenden Antikörpern durch Pepsinspaltung und anschließende Reduktion der Disulfidbrücken in der Gelenkregion gewonnen. Probleme aufgrund unspezifischer Proteolyse und Reduktion führten jedoch zu heterogenen Präparationen. Eine Möglichkeit, diese Probleme zu beheben, besteht in der hier realisierten Produktion rekombinanter Fab-Fragmente mit freien Thiolresten in *E. coli* und anschließender *in vitro*-Kopplung zum F(ab)₂-Fragment.

Ein solcher Ansatz wurde zuerst von Carter *et al.* (1992b) beschrieben. Das dabei mittels Fermentation produzierte humanisierte Fab-Fragment 4D5 trug am C-Terminus der schweren Kette einen 8 Aminosäuren langen Bereich aus der IgG1-Gelenkregion mit einem freien Cysteinrest, über den die Kopplung zum bivalenten F(ab)₂-Fragment erfolgte. In Anlehnung an dieses Sequenzmotiv wurde von Gresch (1997) ein Expressionsvektor konstruiert, der die Produktion von Fab-Fragmenten mit einem freien Cysteinrest am C-Terminus der schweren Kette unmittelbar nach dem *Strep*-tag-II-Affinitätsanhängsel (Sequenzmotiv A; siehe Abschnitt 3.3) ermöglichte. Die Untersuchung des Kopplungsverhaltens von in dieser Form hergestellten Fab-Fragmenten zeigte allerdings, daß nur etwa 5 % der Cysteinreste in der reaktiven Thiolform vorlagen.

Carter *et al.* (1992b) berichtete, daß nach Isolierung des humanisierten 4D5 Fab-Fragments aus der periplasmatischen Proteinfraction durch Protein-G-Affinitätschromatographie 75 bis 90 % der Cysteinreste in der reaktiven Thiolform vorlagen. Den Autoren zufolge ist dies möglicherweise auf eine durch die ungewöhnlich hohe Konzentration an Fab-Fragment mit freien Cysteinresten im Periplasma bedingte Verschiebung des Thiol/Disulfid-Redoxpotentials zurückzuführen.

Einen Einfluß auf die Reaktivität hatte vermutlich auch der pH-Wert, bei dem die Reinigung erfolgte. Carter *et al.* (1992b) isolierten ihr Fab-Fragment bei pH 5, um die Thiolgruppe in der

weniger reaktiven protonierten Form zu halten. Die Reinigung bei pH 8 mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie hingegen begünstigt die Luftoxidation der reaktiven Thiolat-Form.

Eine mögliche Erklärung für den geringen Anteil reduzierter Thiolreste im Falle des Sequenzmotivs A ist, daß der freie Cysteinrest aufgrund seiner Flexibilität am C-Terminus des *Strep*-tag II während der Proteinfaltung auf ungünstige Weise mit denjenigen Cysteinresten wechselwirkt, die für die Ausbildung der räumlich benachbarten interchenaren Disulfidbrücke zwischen leichter und schwerer Kette verantwortlich sind.

Um die über das *Strep*-tag II vermittelte Beweglichkeit des freien Cysteinrestes einzuschränken, wurde die Tripeptidsequenz Pro-Pro-Cys an den C-Terminus der leichten Kette angefügt und der Cysteinrest am *Strep*-tag-II-Affinitätsanhängsel deletiert (Sequenzmotiv B; Fiedler, unveröffentlicht). Alle bisher in der Literatur beschriebenen Sequenzmotive trugen in Analogie zu den natürlichen Antikörpern die für die Kopplung relevanten Cysteinreste am C-Terminus der schweren Kette. Im Fall des Sequenzmotivs B war der Anteil der reaktiven Thiolreste auf 30 % erhöht. Durch milde Reduktion mit 10 mM 2-Mercaptoethanol konnte dieser Anteil nochmals gesteigert werden, jedoch führte dies auch zum teilweisen Aufbrechen der interchenaren Disulfidbrücke und somit zur Freisetzung zusätzlicher Cysteinreste, die bei den Kopplungsversuchen zu unerwünschten oligomeren Nebenprodukten führten.

Basierend auf diesen Vorarbeiten, wurden hier die Sequenzmotive C und D entwickelt, in denen die interchenare Disulfidbrücke des Fab-Fragments deletiert war und unmittelbar am C-Terminus der leichten Immunglobulinkette zwei bzw. ein freier Cysteinrest für die Kopplung zur Verfügung standen. Die Deletion der interchenaren Disulfidbrücke wirkte sich sowohl beim muHRS3c als auch muA9 Fab-Fragment praktisch nicht auf die Expressionsausbeute aus. Daß die Deletion der interchenaren Disulfidbrücke nahezu keinen Einfluß auf die Produktion von Fab-Fragmenten hat, wurde bereits von Skerra & Plückthun (1989) und Humphreys *et al.* (1997) beobachtet. Die leichte und schwere Immunglobulinkette assoziieren durch nicht kovalente Wechselwirkungen zum intakten Fab-Fragment, wie mittels Gelfiltration in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde.

Die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blotting zeigte, daß die leichte und schwere Immunglobulinkette im stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 vorlagen. Die Stabilität der nicht kovalenten Wechselwirkung im Fab-Fragment ist überraschend hoch. Rodrigues *et al.* (1993) konnten eine Dissoziation der beiden Immunglobulinketten des hu4D5 Fab-Fragments ohne die interchenare Disulfidbrücke erst in Gegenwart von 8 M Harnstoff und bei niedrigem pH-Wert (< 4) erreichen.

Ein toxischer Effekt auf die *E. coli*-Zellen, wie von Humphreys *et al.* (1997) mit steigender Anzahl von freien Cysteinresten in der Gelenkregion rekombinanter Fab-Fragmente

beobachtet, konnte bei keinem der hier konzipierten Sequenzmotive festgestellt werden. Auch eine Quervernetzung mit *E. coli*-eigenen Proteinen wurde nicht beobachtet.

Bei der periplasmatischen Produktion rekombinanter Fab-Fragmente mit freien Cysteinresten in *E. coli* ist generell auch die Möglichkeit zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen zwei Fab-Fragmenten gegeben. Allerdings wurde in dieser Arbeit die Bildung bivalenter $F(ab)_2$ -Fragmente *in vivo* durch Dimerisierung zweier leichter Immunglobulinketten nur bei Fab-Fragmenten mit dem Sequenzmotiv D beobachtet. Der Anteil an der Gesamtausbeute lag bei ca. 10-15 %. Im Gegensatz dazu berichtete Carter *et al.* (1992b) von einer bloß geringfügigen Neigung des hu4D5 Fab-Fragments, welches einen freien Cysteinrest am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette (CAA-Motiv) trug, zur Dimerisierung, obwohl das Expressionsniveau und damit die Konzentration des Fab-Fragments im Periplasma dort außerordentlich hoch war.

Rodrigues *et al.* (1993) wiederum konnten unter Verwendung von Sequenzmotiven mit zwei (CPPC-Motiv) bzw. drei (CPPCPPC-Motiv) Cysteinresten am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette eine direkte Kopplung des hu4D5 Fab-Fragments *in vivo* von 5 bzw. 70 % bei der fermentativen Produktion beobachten. Jedoch erwiesen sich diese Kopplungsausbeuten als variabel, und die Anordnung der Disulfidbrücken war unklar. Diesbezüglich scheint das hier konstruierte Sequenzmotiv D eine interessante Alternative zu den bisher beschriebenen Sequenzmotiven zur Herstellung bivalenter $F(ab)_2$ -Fragmente *in vivo* zu sein.

Für die selektive *in vitro* Kopplung zweier Fab-Fragmente stehen prinzipiell zwei Verfahren zur Verfügung:

- a) die Kopplung über eine oder mehrere Disulfidbrücken mittels Thiol/Disulfidaustausch-Reaktion,
- b) über Thioetherbindungen mittels eines Linkerreagens wie z. B. o-PDM oder BMH durch Michael-Addition.

Für $F(ab)_2$ -Fragmente, die über eine Thioetherbindung verknüpft sind, wurde eine zwei- bis dreifach höhere Halbwertszeit im Blutserum nachgewiesen (Rodrigues *et al.*, 1993), was auf eine höhere Stabilität der Thioether- gegenüber der Disulfidbindung *in vivo* schließen läßt. Diesem Vorteil steht jedoch eine potentielle Immunogenität des Linkerreagens entgegen (Carter *et al.*, 1995). Zudem beobachteten Rodrigues *et al.* (1993) bei der Kopplung zweier Fab-Fragmente mittels o-PDM anhand eines freien Cysteinrests am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette (Sequenzmotiv nach Carter *et al.*, 1992b; siehe Abschnitt 3.3) auch die kovalente Verknüpfung von leichten und schweren Immunglobulinketten untereinander. Nach Pfeleiderer (1985) ist die Maleimid-Gruppe nicht absolut spezifisch für Sulfhydryl-Gruppen, sondern kann ebenso mit Aminogruppen reagieren. Hochreaktive ϵ -Aminogruppen können sogar schneller mit Maleimiden reagieren als Thiolgruppen.

In Pilotversuchen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß die Kopplung zweier Fab-Fragmente mittels o-PDM prinzipiell sowohl mit dem Sequenzmotiv C als auch D möglich war. Jedoch waren im Vergleich zur Kopplung via Disulfidbrücken die Kopplungsausbeuten mit 30-40 % wesentlich niedriger. Aufgrund dieses Befunds und der angeführten Problematik wurde im Hinblick auf die Herstellung eines nicht immunogenen und vollständig humanisierten F(ab)₂-Fragments die Kopplung mittels Disulfidbindung favorisiert.

Eine wesentliche Voraussetzung für hohe Kopplungseffizienz ist das Vorliegen der freien Cysteinreste in der reaktiven Thiolform. Um dies zu gewährleisten und Dimere der schweren Immunglobulinketten zu spalten, wurden die Präparationen der Fab-Fragmente mit dem Sequenzmotiv C und D vor der Kopplung einer milden Reduktion mit 10 mM β -Mercaptoethanol unterzogen. Die Reduktionsbedingungen wurden in Anlehnung an eine von Glennie *et al.* (1987) durchgeführte Studie gewählt, in der gezeigt wurde, daß bei Verwendung von 10 mM β -Mercaptoethanol ein proteolytisch erzeugtes F(ab)₂-Fragment nahezu zu 100 % in die beiden Fab-Monomere gespalten wurde, ohne die interchenare Disulfidbrücke zu beeinträchtigen. Dadurch wurde die Freisetzung zusätzlicher Cysteinreste vermieden, was bei der Kopplungsreaktion zu unerwünschten Nebenprodukten geführt hätte. Die hier durchgeführte Quantifizierung der Thiolgruppen nach der Reduktion im Ellman's Assay ergab bei beiden Sequenzmotiven einen Anteil von 90-95 % reaktiven Cysteinresten. Um die vorzeitige Oxidation der reduzierten Thiolreste durch Luftsauerstoff zu verhindern, erwies es sich – wie schon von Carter *et al.* (1992b) und Brennan *et al.* (1985) beschrieben – als hilfreich, die Fab-Fragmente in einem mit Stickstoff gesättigten Puffer bei pH 5 in Gegenwart von EDTA aufzubewahren. Das saure Milieu führt zur weniger reaktiven Thiol-Form der Cysteinreste, und eine durch Schwermetallkationen katalysierte Oxidation wird durch EDTA unterbunden.

Zur Aktivierung der freien Thiol-Gruppen wurden diese zunächst in gemischte Disulfide mit dem Ellman's-Reagenz (DTNB) überführt. Um eine Eigenkopplung des Fab-Fragments zum bivalenten F(ab)₂-Fragment während dieser Umsetzung zu verhindern, wurde das DTNB zuerst in einem 400-fachen molaren Überschuß zugesetzt und die Reaktion anschließend durch Einstellen eines leicht alkalischen pH-Wertes gestartet. Unabhängig vom verwendeten Sequenzmotiv wurde nur eine geringfügige Bildung bivalenter F(ab)₂-Fragmente (< 1 %) beobachtet. Dieses Nebenprodukt konnte mittels Gelfiltration leicht entfernt werden.

Brennan *et al.* (1985) beobachteten bei Verwendung eines durch Proteolyse und Reduktion gewonnenen murinen Fab-Fragments ebenfalls die Bildung geringer Mengen (< 5 %) an F(ab)₂-Fragment in diesem Aktivierungsschritt. Genaue Untersuchungen über das optimale Verhältnis von Fab-Fragment zu Aktivierungsreagenz liegen jedoch nicht vor. Die photometrische Bestimmung der TNB-Gruppen in den als gemischte Disulfide vorliegenden Fab-Fragmenten nach Reduktion mit 2-Mercaptoethanol ergab eine nahezu stöchiometrische Korrelation mit der Anzahl der in Sequenzmotiv C bzw. D jeweils vorliegenden Anzahl freier

Cysteinreste. Dies spricht auch für die hohe Selektivität des milden Reduktionsschritts. Somit standen im Fall des Sequenzmotivs C zwei freie Cysteinreste bzw. im Fall des Sequenzmotivs D ein freier Cysteinrest für die eigentliche Kopplungsreaktion zur Verfügung.

Die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen den schweren Immunglobulinketten in einem vollständigen Antikörper wird durch die Dimerisierung der C_H2- und C_H3-Domänen zwischen den beiden Ketten wesentlich begünstigt. Im Falle von Fab-Fragmenten fehlt diese Wechselwirkung, so daß die Ausbildung von Disulfidbrücken bei der *in vitro*-Kopplung zum F(ab)₂-Fragment auf der diffusiven Wechselwirkung eines freien Thiolrestes mit einem in Form eines gemischten Disulfids vorliegenden Cysteinrestes erfolgt. Somit sollte die eingesetzte Konzentration der Fab-Fragmente die Kopplungsgeschwindigkeit beeinflussen. In der Literatur wurden bislang keine Untersuchungen diesbezüglich beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Konzentration im Kopplungsansatz in Anlehnung an die Arbeit von Carter *et al.* (1992b) im Bereich von 1 bis 4 mg/ml (entsprechend 20-80 µM) gewählt.

Basierend auf der Beobachtung, daß die freien Cysteinreste in den Sequenzmotiven C und D nahezu vollständig in der freien Thiolform – bzw. mit TNB derivatisiert als gemischtes Disulfid – vorlagen, wurden die beiden zu koppelnden Fab-Fragmente im stöchiometrischen Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Carter *et al.* (1992b) wiesen explizit auf das stöchiometrische Verhältnis der zu koppelnden Fab-Fragmente bezüglich des Gehalts freier Thiol-Gruppen bzw. mit TNB derivatisierter Cysteinreste hin. Morimoto & Innouye (1999) verwendeten bei der Kopplung zweier Fab-Fragmente, die proteolytisch aus IgM Antikörpern gewonnen worden waren, einen 2,5-fachen molaren Überschuß des Fab-TNB gegenüber dem Fab-SH. Die Autoren gingen davon aus, daß eine Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten des Anteils an Fab-TNB zu einer Steigerung der Kopplungsausbeute führen könnte.

Die Kopplungsreaktion wurde wiederum ausgehend von pH 5 durch Einstellen von pH 8 gestartet. Die Freisetzung des gefärbten TNB-Anions bei der Thiol-Disulfidaustauschreaktion ermöglichte die photometrische Verfolgung der Umsetzung und die Analyse der Kopplungseffizienz. Im Fall der Kopplung zweier Fab-Fragmente mit dem Sequenzmotiv C wurden zwei Drittel der im Fab-TNB gebundenen Gruppen freigesetzt (siehe Abschnitt 3.3.1.3). Die Intergration der Elutionspeaks aus der anschließenden Gelfiltration ergab ebenfalls einen ca. 60 %igen Anteil an F(ab)₂-Fragment. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß im gebildeten F(ab)₂-Fragment die beiden Fab-Fragmente hauptsächlich über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft vorliegen. Dies ist ein beachtenswerter Gesichtspunkt, weil mit zunehmender Anzahl von Disulfidbrücken zwischen den miteinander gekoppelten Fab-Fragmenten die Halbwertszeit im Serum zunimmt (Rodrigues *et al.*, 1993).

Mit ähnlich guten Kopplungsausbeuten (ca. 55 %) gelang auch die gerichtete Kopplung zweier Fab-Fragmente mit dem Sequenzmotiv D mit nur einem freien Cysteinrest (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Dagegen erreichte Carter *et al.* (1992b) mit einem Sequenzmotiv, das

ebenso einen freien Cysteinrest hatte, der aber am C-Terminus der schweren Immunglobulinkette hing, eine Kopplungsausbeute von 82 %. Möglicherweise erfährt dieser über einen fünf Aminosäuren langen Linker einen gewissen Grad an Beweglichkeit und optimaler Zugänglichkeit, wohingegen in den Sequenzmotiven C und D der bzw. die freien Cysteinreste unmittelbar am C-Terminus der leichten Kette fusioniert vorlagen. Aus Kristallstrukturen verschiedener Fab-Fragmente ist ersichtlich, daß die Zugänglichkeit dieser Positionen im gefalteten Zustand leicht eingeschränkt ist.

Die Größenausschluß-Chromatographie zur Isolierung des F(ab)₂-Fragments aus der Reaktionsmischung erwies sich aufgrund des Größenunterschieds zum Monomer als besonders effektive Methode. Alternativ wurde von Morimoto & Innouye (1999) die hydrophobe Interaktions-Chromatographie als Trennverfahren zur Isolierung des F(ab)₂-Fragments beschrieben, was hinsichtlich der höheren Trennkapazität von Vorteil ist.

Die Bispezifität des ausgehend von den beiden Fab-Fragmenten muHRS3c und muA9 mit dem Sequenzmotiv C hergestellten F(ab)₂-Fragments wurde anhand der Bestimmung der Affinitäten der beiden Bindungsstellen für das jeweilige Antigen nachgewiesen. Die Kopplung führte im Fall des muHRS3c Fab-Fragments zu einer Abnahme der Affinität um den Faktor zwei im Vergleich zum Monomer. Dagegen blieb die Affinität bei dem muA9 Fab-Fragment nahezu unverändert. Da die Kopplung im Bereich der konstanten Domänen und somit relativ weit entfernt von der Antigenbindungsstelle erfolgt, sollte diese an sich keinerlei Effekt auf die Affinität haben. So beobachteten Rodrigues *et al.* (1993) sowie Brennan *et al.* (1985) keinen nennenswerten Unterschied in der Affinität zwischen dem als Monomer und nach Kopplung als F(ab)₂-Fragment vorliegenden Antikörperfragment. Die Abnahme der apparenten Affinität des muHRS3c-Arms in dem hier konstruierten F(ab)₂-Fragment ist somit möglicherweise auf die Stabilität des Proteins oder auf chemische Modifizierung (z. B. durch pH oder DTNB) im Laufe des Kopplungsprozesses zurückzuführen.

4.3 Humanisierung als Methode zur Herstellung therapeutischer Antikörper

Die Entwicklung einer humanen anti-Maus-Antikörper (HAMA) Immunantwort bei Versuchen mit dem bispezifischen anti-CD16/anti-CD30 Antikörper murinen Ursprungs (Renner *et al.*, 1997; 2000) verdeutlichte die Notwendigkeit zur Humanisierung des verabreichten Antikörpers. Für das in der vorliegenden Arbeit konstruierte anti-CD16/anti-CD30 F(ab)₂-Fragment wurden dazu in einem ersten Schritt unter Beibehaltung der murinen variablen Domänen die murinen konstanten Domänen durch menschliche Domänen des Typs IgG1 im Falle der schweren und der Kappa-Subklasse im Falle der leichten Immunglobulinkette ersetzt. Für solche als Maus/Mensch-Chimäre bezeichneten Antikörper

wurde allerdings in anderen Fällen aufgrund der immer noch murinen variablen Domänen ein immunogener Effekt beobachtet (Lo Buglio *et al.*, 1989; Bruggemann *et al.*, 1989).

Zur Reduktion der Immunogenität der murinen variablen Domänen gibt es im Prinzip zwei unterschiedliche Ansätze. In einem als *Resurfacing* bezeichneten Verfahren (Pedersen *et al.*, 1994; Roguska *et al.*, 1994) werden lediglich die dem Lösungsmittel zugänglichen Aminosäurereste an der Oberfläche des murinen Immunglobulin-Gerüsts durch solche ersetzt, die an den entsprechenden Positionen in menschlichen variablen Domänen vorkommen. Dabei wird angenommen, daß exponierte Oberflächenreste eine bestimmende Rolle für die Antigenität eines Proteins spielen (Morea *et al.*, 2000), jedoch keinen Einfluß auf die Antigenbindung ausüben, solange sie außerhalb des Paratops gelegen sind. Mit Hilfe dieser Methode konnten Roguska *et al.* (1994) die variablen Domänen zweier CD19-spezifischer muriner Antikörper durch Austausch von neun bzw. 13 Aminosäureresten in der V_L- bzw. V_H-Domäne unter Beibehaltung der ursprünglichen Affinität humanisieren. Klinische Daten über die Immunogenität liegen allerdings bislang nicht vor (Stand Winter 2003).

Dagegen gibt es für Antikörper, die mittels CDR-Transplantation – d. h. Übertragung der murinen CDRs auf ein humanes Antikörpergerüst – humanisiert wurden, inzwischen eine Reihe von klinischen Studien (Übersicht in Ross *et al.*, 2003; Hudson & Souriau, 2003), in denen ein Ausbleiben der Immunogenität gezeigt wurde, z. B. für Herceptin[®] (anti-ERBB2; Cobleigh *et al.*, 1999), Mylotarg (anti-CD33; Nabhan & Tallman, 2002) und Campath 1H (anti-CD52; Pangalis *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Studien und zahlreicher in der Literatur beschriebener Beispiele (z. B. Riechmann *et al.*, 1988; Kettleborough *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1992a; Wu *et al.*, 1999) wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit für die Humanisierung der variablen Domänen des HRS3-Antikörpers angewandt.

Da die präzise relative Stellung der hypervariablen Schleifen zueinander durch die Assoziation der V_L- und V_H-Domänen sowie die Konformation der β -Faltblätter innerhalb jeder Domäne bestimmt wird, erweist sich die Auswahl eines geeigneten menschlichen Gerüsts als entscheidender Faktor für den Erfolg einer Humanisierung. Das humane Gerüst wird deshalb meist nach maximaler Sequenzhomologie der murinen Gerüstregionen der V_L- und V_H-Domänen zu humanen Gerüstenregionen ausgewählt. Dabei müssen die beiden humanen Domänen nicht notwendigerweise von demselben Antikörper stammen, allerdings hat dies den Vorteil, daß eine korrekte Assoziation der beiden variablen Domänen gewährleistet ist (Roguska *et al.*, 1996). Ein Vergleich mehrerer mittels CDR-Transplantation humanisierter Antikörper ergab, daß die Affinität für das jeweilige Antigen mit steigender Sequenzhomologie zwischen humanem und murinem Gerüst zunimmt (Singer *et al.*, 1993). Dementsprechend wurde für die vorliegende Arbeit in der Kabat-Immunglobulin-Sequenzdatenbank (Kabat *et al.*, 1991; Martin, 1996) nach humanen Antikörpersequenzen gesucht, die in den Gerüstbereichen eine hohe Homologie zu den variablen Domänen des

murinen HRS3-Antikörpers aufwiesen. Als weiteres Kriterium diente die Verfügbarkeit einer Kristallstruktur zum Zweck des *Molecular Modellings*.

Aufgrund der 80 %igen Homologie der V_L-Domäne von HRS3 im Gerüstbereich mit der Konsensussequenz der humanen Subklasse V_KI sowie der 70 %igen Homologie im Fall der V_H-Domäne mit der Konsensussequenz der humanen Subklasse V_HIII (Kabat *et al.*, 1991) wurden diese als Gerüstsequenzen für die Humanisierung ausgewählt. Diese beiden am häufigsten vorkommenden humanen Subklassen minimieren die Immunogenität eines humanisierten Antikörpers (Baca *et al.*, 1997) und wurden bereits für die Humanisierung verschiedener Antikörper verwendet, unter anderem für anti-p185^{HER2} (4D5; Carter *et al.*, 1992a), der seit drei Jahren als Herceptin[®] zugelassen ist, anti-CD3 (Shalaby *et al.*, 1992) und anti-CD18 (Eigenbrot *et al.*, 1994). Für anti-p185^{HER2} und anti-CD18 wurde zudem die Kristallstruktur (Eigenbrot *et al.*, 1993; Eigenbrot *et al.*, 1994) bestimmt. Die Strukturen weisen eine hohe Ähnlichkeit in der Gerüstregion auf, was auf eine relative Unabhängigkeit von Gerüst- und CDR-Regionen und auf genügend Flexibilität in diesem System schließen läßt (Eigenbrot *et al.*, 1994). Außerdem konnten Antikörper, die auf Basis dieser Gerüstregionen humanisiert wurden, mit guten Ausbeuten sowohl in *E. coli* als auch in eukaryontischen Expressionssystemen produziert werden, was ein wichtiger praktischer Gesichtspunkt im Hinblick auf die bei der therapeutischen Anwendung benötigten Substanzmengen ist (Baca *et al.*, 1997).

In der Literatur wurden bislang nur wenige Fälle beschrieben, bei denen durch einfache CDR-Transplantation die Affinität des ursprünglichen Antikörpers erhalten blieb, was jeweils auf die hohe Sequenzhomologie zwischen murinem und humanem Gerüst zurückzuführen war (Roguska *et al.*, 1996). In den meisten Fällen führte die CDR-Transplantation jedoch zu einer mehr oder weniger starken Abnahme der Affinität (Beispiele in Baca *et al.*, 1997; Morea *et al.*, 2000).

Um die Affinität wieder herzustellen, war es nötig (z. B. Carter *et al.*, 1992a), zusätzliche murine Aminosäurereste aus dem ursprünglichen Antikörper zu übernehmen. Kristallstrukturen von Antikörper-Antigen-Komplexen zeigten, daß Aminosäurereste in der Gerüstregion mitunter direkt mit dem Antigen wechselwirken (Mian *et al.*, 1991). Foote & Winter (1992) identifizierten 30 Aminosäure-Reste (die sogenannte "Vernier"-Region), die zudem einen Einfluß auf die Struktur und Ausrichtung der CDRs haben, indem sie eine strukturelle Plattform innerhalb der Gerüstregion bereitstellen, auf denen die antigenbindenden Schleifen präsentiert werden. Obwohl im Prinzip eine höhere Affinität für ein Antigen zu erwarten wäre, wenn alle Reste der "Vernier"-Region in den humanisierten variablen Domänen an den entsprechenden Positionen durch die murinen ersetzt werden, würde dies allerdings den Effekt der Humanisierung weitestgehend zunichte machen. Baca *et al.* (1997) gehen davon aus, daß bereits die Positionierung einiger ausgewählter muriner

Aminosäurereste in der "Vernier"-Region ausreichend ist, um die Affinität des humanisierten Antikörpers zu erhalten.

Die humane Konsensussequenz für die V_L -Domäne wies im Vergleich zur murinen Sequenz lediglich zwei Unterschiede an Positionen in der "Vernier"-Region auf (V_L36 : Konsensussequenz: Tyr; muHRS3: Phe; V_L46 : Konsensussequenz: Leu; muHRS3: Val). Über die Rolle der Position V_L36 als Bestandteil der "Vernier"-Region sind in der Literatur keine Angaben gemacht, weshalb an dieser Position das humane Tyrosin gegenüber dem murinen Phenylalanin in der endgültigen Version für die hu V_L -Aminosäuresequenz vorgezogen wurde. Dagegen ergab die Analyse der Position V_L46 anhand der Kristallstruktur des humanisierten 4D5 Fv-Antikörperfragments (Version 8; Eigenbrot *et al.*, 1993), daß die Aminosäure V_L46 (Leucin) in der V_H/V_L -Kontaktregion positioniert ist und damit die Konformation von CDR-H3 beeinflussen kann. Weiterhin ist diese Position in V_K -Gerüstsequenzen fast immer mit Leucin besetzt (Kabat *et al.*, 1991), in der murinen HRS3 V_L -Domäne jedoch mit Valin, was auf eine funktionelle Rolle hinweist.

Baca *et al.* (1997) beobachteten bei der Humanisierung der variablen Domänen eines anti-EGF-Antikörpers durch Substitution des humanen Leucins an Position 46 in der V_L -Domäne durch das ursprünglich im murinen Antikörper vorkommende Valin eine Verbesserung der Affinität um den Faktor 6. Diese war vor allem auf eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation zurückzuführen. Die Autoren nehmen an, daß die Aminosäureposition V_L46 wichtig für die zur Antigenbindung geeignete Konformation ist. Aufgrund dieser Beobachtung wurde an Position V_L46 die murine Aminosäure Valin in die Aminosäuresequenz für die humanisierte HRS3 V_L -Domäne aufgenommen.

Die humane Konsensussequenz für die V_H -Domäne wies im Vergleich zur murinen Sequenz insgesamt 9 Unterschiede an Positionen der "Vernier"-Region auf, vor allem im N-terminalen Bereich unmittelbar vor CDR-H1 und auf der C-terminalen Seite von CDR-H2. Die Aminosäurepositionen 27 bis 30 sind nach Foote & Winter (1992) Bestandteil der größeren Schleife, die CDR-H1 (Aminosäurepositionen 31 bis 35; Kabat *et al.*, 1991) beherbergt und somit deren korrekte Ausrichtung beeinflußt. Nach der strukturellen Definition der CDRs nach Chothia & Lesk (1987) bilden die Positionen 26 bis 32 insgesamt eine hypervariable Schleife. Diese ist vor allem an einem Ende an der Aminosäureposition 24 und am anderen an Position 34 sowie in der Mitte durch die Reste V_H27 und V_H29 in der Gerüstregion verankert. Die Schleife liegt in einer Grube, umgeben von den Aminosäureresten 4, 24, 27, 29, 34, 71, 78 und 94. Deshalb wurde bei Sequenzunterschieden zwischen der Aminosäuresequenz der murinen HRS3 V_H -Domäne und der humanen Konsensussequenz der Subklasse V_{HIII} an diesen Positionen – mit Ausnahme von V_H27 – die murine Aminosäure übernommen. Carter *et al.* (1992a) und Baca *et al.* (1997) verwendeten bei der Humanisierung der V_H -Domäne auf Basis der humanen Konsensussequenz der Subklasse V_{HIII} an diesen Positionen ebenfalls die murinen Aminosäurereste.

Obwohl die Aminosäure an Position 94 (Arg in der muHRS3 und der Konsensussequenz) in der linearen Sequenz weit von CDR-H1 entfernt liegt, ist sie wichtig für die korrekte Ausbildung der Schleifenkonformation (Studnicka *et al.*, 1994). Nach Morea *et al.* (1998) wechselwirkt der lange hydrophobe Teil der Argininseitenkette mit den aromatischen Seitenketten an Position 27 (Phe in Konsensussequenz, Tyr in muHRS3) und 32 (Tyr in muHRS3) in CDR-H1. Der enge Kontakt dieser Aminosäure mit CDR-H1 in nahezu jedem Antikörper weist darauf hin, daß die Größe und Form der Seitenkette des Restes 94 die Affinität beeinflussen kann, sofern CDR-H1 an der Antigenbindung beteiligt ist. Position 94 wird daher auch als *High-Risk-Position* im Antikörper-*Engineering* bezeichnet (Studnicka *et al.*, 1994).

Die zweite Anhäufung von unterschiedlichen Aminosäurepositionen befindet sich mit den Positionen 66 bis 80 in einem zu CDR-H2 flankierenden Bereich. Die Analyse anhand der Kristallstruktur des hu4D5 Fv-Fragments zeigt, daß dieser Bereich eine Haarnadelschleife in unmittelbarer Nachbarschaft zur Antigenbindungsstelle ausbildet. Somit ist eine stabilisierende Wirkung auf die benachbarte CDR-H2 Schleife oder auch ein direkter Kontakt mit dem Antigen möglich (Baca *et al.*, 1997). In der humanen Konsensussequenz für die V_HIII Subklasse sind die Positionen V_H71 und V_H73 mit Arginin und Aspartat besetzt (Kabat *et al.*, 1991). In der Aminosäuresequenz für die humanisierte HRS3 V_H-Domäne wurden diese durch die entsprechenden murinen Reste, Alanin und Lysin, ersetzt. Tramontano *et al.* (1990) beobachteten, daß die Seitenkette an Position 71 die Konformation der hypervariablen Schleifen CDR-H2 und CDR-H3 entscheidend beeinflussen kann. CDR-H2 lagert sich an CDR-H3 in Abhängigkeit von der Seitenkette an Position V_H71 in unterschiedlicher Weise an. Eine große Seitenkette wie Arginin in der murinen Aminosäuresequenz separiert die beiden CDRs, während eine kleine Seitenkette, wie Alanin in der humanen Konsensussequenz, die Annäherung der beiden CDRs ermöglicht.

Aufgrund der Analyse von Chothia & Lesk (1987) bzw. Chothia *et al.* (1989) nehmen die hypervariablen Schleifen – mit Ausnahme von CDR-H3 – eine begrenzte Anzahl von definierten Hauptkettenkonformationen ein. Verantwortlich für diese sogenannten kanonischen Strukturen sind neben der Länge der CDR-Schleifen bestimmte Aminosäurereste (kanonische Aminosäuren) an definierten Positionen, und zwar sowohl innerhalb der CDRs als auch in der Gerüstregion. Der Großteil der Aminosäuren in einer CDR-Schleife ist dagegen variabel, was hauptsächlich zur Topographie im Detail sowie zu den physikochemischen Eigenschaften der Antigenbindungsstelle beiträgt (Morea *et al.*, 2000).

Im Fall der humanisierten HRS3 V_L-Domäne sind die kanonischen Aminosäuren zwischen der murinen Originalsequenz und der humanen Konsensussequenz der Subklasse I in der Gerüstregion identisch (siehe Abschnitt 3.4.1). Die CDR Schleifen lassen sich folgenden kanonischen Strukturklassen zuordnen: L1 (κ): Klasse 2, L2 (κ): Klasse 1 und L3 (κ): Klasse 1.

Bei der humanisierten V_H -Domäne unterscheiden sich die kanonischen Aminosäuren zwischen der murinen Originalsequenz und der humanen Konsensussequenz der Subklasse V_{HIII} an den Positionen 27 (Phe in Konsensussequenz, Tyr in muHRS3) und 71 (Arg in Konsensussequenz, Ala in muHRS3). Im Fall der Position 27 kann diese sowohl mit Tyrosin als auch mit Phenylalanin besetzt sein ohne daß sich die kanonische Strukturklasse von CDR-H1 (Klasse 1) ändert. Deshalb wurde in der humanisierten V_H -Domäne an Position 27 das humane Phenylalanin gesetzt. Position 71 ist wichtig für die kanonische Strukturklasse von CDR-H2. Durch Positionierung des murinen Alanins wird dieselbe kanonische Strukturklasse (Klasse 2) wie in der murinen Originalsequenz erhalten.

CDR-H3 stellt ganz allgemein einen Spezialfall dar. Diese Schleife ist extrem variabel was Länge, Sequenz und Struktur betrifft, weshalb bislang auch kein geeigneter Katalog von kanonischen Strukturen dafür aufgestellt werden konnte. Nach Morea *et al.* (1998) bestimmen insgesamt die Aminosäuren zwischen Cys92 und Gly104 die Konformation der CDR-H3 Region. Diese gliedert sich in eine Rumpf-Region bestehend aus 10 Aminosäureresten (4 am N-Terminus beginnend mit Cys92 und 6 am C-Terminus endend mit Gly104), die an die Gerüstregionen angrenzen, und einer Kopf-Region mit den dazwischenliegenden Aminosäurepositionen. Lediglich die Konformation der Rumpf-Region kann in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Arginin und Aspartat an den Positionen 94 bzw. 101 in eine gewölbte (*Bulge*; beide oder nur Arg94 anwesend) und nicht gewölbte (*Non-Bulge*; Asp101 anwesend, Arg94 abwesend) Konformation eingeteilt werden.

Die erstere Konformation macht sich durch eine Auswölbung an Position 101 bemerkbar und kann nach Morea *et al.* (1998) als vorherrschende Standardkonformation für die CDR-H3 Schleife angesehen werden. Über die Konformation der Kopf-Region ist allerdings *a priori* keine Aussage möglich. Aufgrund der Anwesenheit von Arginin und Alanin an Position 94 und 101 in der murinen sowie in der humanisierten Aminosäuresequenz für die HRS3 V_H -Domäne ist in beiden Fällen die Standardkonformation der Rumpf-Region gegeben.

Schleifen derselben kanonischen Strukturklasse haben eine identische Hauptkettenkonformation (Lesk & Tramontano, 1990). Jedoch kann ihre relative Stellung zueinander und zum Antikörpergerüst variieren (Morea *et al.*, 2000). Basierend auf den Überlegungen zu den Aminosäuren der "Vernier"-Region als Plattform für die Präsentation der CDRs ist in den humanisierten V-Domänen eine ähnliche Ausrichtung wie in den murinen also durchaus möglich.

Dies wird durch eine Beobachtung von Holmes & Foote (1997) zusätzlich unterstützt. Ein Vergleich der Kristallstrukturen der murinen und humanisierten Version eines anti-Lysozym-Antikörpers zeigte, daß die transplantierten CDRs strukturelle Veränderungen in der humanisierten Version induzieren. Dies bewirkt, daß die Konformation der Gerüstregion der humanisierten Version – vor allem in der Region des Übergangsbereiches Gerüst/CDR – eher dem murinen Antikörpergerüst als demjenigen humanen Ausgangsantikörper entspricht, auf

dessen Gerüst die murinen CDRs transplantiert wurden. Diese offenbare Plastizität der Gerüstregionen ermöglicht es somit, Spannungen zu eliminieren, die aufgrund struktureller Diskontinuität im Übergangsbereich entstehen. Verhoeyen *et al.* (1988) zogen zudem in Erwägung, daß sich die Form der Antigenbindungsstelle bei Bindung des Antigens entsprechend anpaßt. Somit ist eine Selbstkorrektur kleiner Unregelmäßigkeiten, die bei der Transplantation muriner CDRs auf ein humanes Gerüst entstehen, bei Bindung des Antigens möglich (Holmes & Foote, 1997). Entsprechend CDR induzierte Veränderungen in der Gerüstregion könnten allerdings ungewöhnliche Epitope in einem humanisierten Antikörper erzeugen und somit die Immunogenität des Moleküls erhöhen (Holmes & Foote, 1997). Es ist jedoch zu festzuhalten, daß jede Art von *Induced Fit* mit Energieaufwand und damit einem Verlust an Affinität verbunden ist.

Weiterhin entscheidend für die Ausbildung einer funktionellen Antigenbindungsstelle ist die Assoziation der humanisierten V_L - und V_H -Domäne. Die von Chothia *et al.* (1985) definierten Positionen in der V_L/V_H -Kontaktregion sind hoch konserviert und zum Großteil in murinen und humanen Antikörpern mit identischen Aminosäuren besetzt. Die Aminosäuresequenzen für die humanisierten und murinen V_L - und V_H -Domänen des HRS3-Antikörpers unterscheiden sich diesbezüglich lediglich an den Positionen 36 und 87 in der V_L -Domäne, wo jeweils das murine Phenylalanin durch das humane Tyrosin ersetzt wurde. Die 90 %ige Sequenzhomologie an den insgesamt 20 Positionen der V_L/V_H -Kontaktregion und die 100 %ige Homologie an den von Chothia *et al.* (1987) definierten sechs Positionen, die den Kernbereich der V_L/V_H -Kontaktregion im Fv-Fragment bilden, sollten zu einer korrekten Assoziation der beiden humanisierten variablen Domänen führen.

Das Vorhandensein einer – wenn auch um Faktor 10 geringeren – Affinität im ursprünglich humanisierten HRS3 Fab-Fragment spricht für die im Prinzip korrekte Ausbildung der Antigenbindungsstelle. Die leichte Abnahme der Affinität ist vermutlich auf einzelne Aminosäurereste in der Gerüstregion zurückzuführen, deren Einfluß auf die Antigenbindung anhand theoretischer Überlegungen an einem Modell nicht vorhergesagt werden kann (Baca *et al.*, 1997). In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß sogar der Austausch eines einzelnen relevanten Aminosäurerestes in der Gerüstregion einen entscheidenden Einfluß auf die Antigenbindung haben kann, wie Kettleborough *et al.* (1991) bei der Humanisierung der variablen Domänen des murinen anti-EGFR-Antikörpers 425 mittels CDR-Transplantation beobachteten.

4.4 Optimierung der CD30-Antigenerkennung durch *in vitro*-Affinitätsmaturierung

In Anlehnung an die evolutiven Prozesse in der Natur – Rekombination, Mutagenese und Selektion – wurden in dieser Arbeit zwei evolutive *in vitro* Verfahren, DNA-*Shuffling* und

Error Prone PCR, in Kombination mit dem Filterstapel-Test als effizientes Screening-Verfahren für die Affinitätsmaturierung herangezogen. Die Technik des DNA-*Shufflings* imitiert die *in vivo* Gen-Rekombination (Stemmer, 1994). Durch dieses Verfahren werden nicht nur homologe DNA-Fragmente rekombiniert sondern zusätzlich Punktmutationen in geringer Anzahl eingefügt (Zhao & Arnold, 1997). DNA-*Shuffling* wurde bereits erfolgreich im *Antibody-Engineering* eingesetzt, sowohl bei der Affinitätsmaturierung (Huls *et al.*, 2001) als auch bei der Verbesserung der Expressionsausbeute (Cramer *et al.*, 1996) von rekombinanten Antikörperfragmenten.

In dieser Arbeit wurde mittels DNA-*Shuffling* versucht, für die Antigenbindung wichtige Regionen in der humanisierten V_H-Domäne zu identifizieren. Aufgrund der 69 %igen Homologie der murinen und humanisierten V_H-Gensequenzen waren die Voraussetzungen für die Generierung einer hybriden V_H-Genbibliothek mittels PCR-*Assembly* aus einer Mischung von DNA-Fragmenten, die durch DNase-I-Verdau des murinen und humanisierten HRS3 V_H-Gens erhalten wurden, im Prinzip gegeben. Ein Rekombinationsereignis kann bei dieser Methode dann stattfinden, wenn ein PCR-Fragment sich mit dem 3'-Ende an eine homologe Position eines verwandten, aber nicht identischen Matrizen-DNA-Strangs anlagert. Die bevorzugte Länge der hierfür eingesetzten DNA-Fragmente hängt von der beabsichtigten Anzahl von *Crossovers* ab.

Zur selektiven und parallelen Identifizierung von Fab-Fragmenten mit optimierten Bindungseigenschaften aus dieser Bibliothek wurde der sogenannte Kolonie-Filterstapel-Test (Skerra *et al.*, 1991a; siehe Abschnitt 3.5.2.1) angewandt. Diejenigen Kolonien, die für die Ausbildung der intensivsten Farbsignale verantwortlich waren, wurden somit auf einfache Weise identifiziert. Dabei ist jedoch anzumerken, daß die Farbintensität eines Spots nicht allein auf die Affinität des entsprechenden Fab-Fragments zurückzuführen ist. Daneben spielen auch die Expression, die Faltungseffizienz und die Toxizität des rekombinanten Antikörperfragments eine wichtige Rolle. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Farbintensität in den meisten Fällen mit höher affinen Fab-Fragmenten korrelierte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere, höher affine Varianten in der V_H-Genbibliothek vorhanden waren, die jedoch beispielsweise aufgrund geringer Faltungseffizienz weniger intensiv gefärbte Farbspots lieferten.

Die Anwendbarkeit des DNA-*Shufflings* in Kombination mit dem Kolonie-Filterstapel-Test zur Optimierung der Antigenbindung eines Fab-Fragments konnte mit den isolierten Varianten jedoch nicht gezeigt werden. Mit der Mutante DS1/1 wurde zwar eine im Vergleich zur ursprünglichen humanisierten Version besser bindende Variante isoliert (siehe Abschnitt 3.5.2.2), die eine Aminosäuresubstitution Ile69Thr in der Gerüstregion FR-H3 in einer zu CDR-H2 flankierenden Schleife aufwies, die Einführung dieser Punktmutation war aber auf die hohe Fehlerrate der verwendeten *Taq*-DNA Polymerase zurückzuführen. Nach Zha &

Arnold (1997) enthalten zwischen 33 und 98 % der Amplifizierungsprodukte eines 1 kb langen Produkts aus 20 PCR-Zyklen eine oder mehrere Mutationen.

Ein hybrides V_H -Gen mit murinen und humanen Gensequenzabschnitten trat in den isolierten Varianten nicht auf. Generell ist jedoch nicht auszuschließen, daß *Crossovers* stattgefunden haben, die entsprechenden Varianten jedoch eine geringere Affinität aufwiesen und deshalb nicht selektiert wurden. Ein möglicher Grund für das Ausbleiben von Rekombinationsergebnissen kann die – trotz einer hohen Homologie von 69 % der murinen und der humanen Gensequenz – kurze durchschnittliche Länge an Sequenzidentität mit 8 bp sein. Nach Stemmer (1994) schließt dies die Generierung von *Crossovers* nicht aus, allerdings wird bei kurzen Bereichen der Sequenzidentität eine relativ niedrige *Annealing*-Temperatur im Bereich von 25-35 °C empfohlen. So verwendete Stemmer (1994) für die Assemblierung eines 800 bp langen chimären Gens aus Fragmenten zweier verwandter Gene, die durchschnittlich 4,1 Basen lange Bereiche an Sequenzidentität aufwiesen, eine *Annealing*-Temperatur von 25 °C. Unter Verwendung des hitzelabilen Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I und einer Polymerisationstemperatur von 25 °C konnte ein chimäres Gen mit 17 *Crossovers* synthetisiert werden. Die Verwendung der *Taq*-DNA Polymerase schied aufgrund des höheren Temperaturoptimums von 72 °C aus, da dies bereits wieder zum Aufschmelzen der kurzen Hybridisierungsbereiche führte.

Alternativ zum *DNA-Shuffling* wurde die wesentlich einfacher durchführbare *Error Prone* PCR als evolutives Verfahren zur Optimierung der Antigenbindung herangezogen. In Anlehnung an die *in vivo*-Affinitätsmaturierung von Antikörpern im Immunsystems (Skerra, 2003) wird bei diesem Verfahren die Affinität schrittweise optimiert. Durch die sukzessive Anhäufung von Mutationen, von denen im Idealfall jede einen kleinen Beitrag zur Verbesserung der Affinität leistet, werden dort diejenigen Varianten mit der höchsten Affinität selektiert (Klonale Selektionstheorie).

Genbibliotheken mit Zufallsmutanten können *in vitro* mittels PCR-Amplifizierung unter Bedingungen, die den Einbau falscher Nukleotide begünstigen, leicht hergestellt werden. Zugabe von Mn^{2+} -Ionen und/oder limitierenden Mengen an dATP und dCTP ermöglichen eine vernünftige Kontrolle über die Anzahl der Nukleotidaustausche pro Gen (Cadwell & Joyce, 1992). Auf diese Weise können bei der PCR Mutationshäufigkeiten von bis zu 5 % erreicht werden, was unter Verwendung von Nukleotidanaloga sogar noch gesteigert werden kann (Zaccolo & Gherardi, 1999). In Studien zur Affinitätsmaturierung von Antikörpern wurden bislang Genbibliotheken bei niedriger Mutationshäufigkeit mit typischerweise 1 bis 5 Mutationen innerhalb der Gensequenz für die variable Domäne generiert. Hawkins *et al.* (1992) zum Beispiel beschrieben die Isolierung eines scFv-Fragments mit 4-fach verbesserter Affinität aus einer kleinen Bibliothek von 4×10^4 Klonen mit durchschnittlich 1,7 Basenaustauschen lediglich im V_H -Gen.

Oft ist der Effekt von Mutationen aus aufeinanderfolgenden Zyklen von Mutation und Selektion additiv, d. h. die Kombination zweier oder mehrerer Mutationen, von denen jede für sich allein eine Verbesserung der Affinität bewirkt, führt insg. zu einer proportional höheren Affinität (Wells, 1990). Aminosäuresubstitutionen können die Affinität direkt durch die Bereitstellung neuer Kontaktreste – besonders wenn sie innerhalb oder in der Nähe der Antigenbindungsstelle lokalisiert sind – beeinflussen (Hoogenboom, 1997).

Es scheint jedoch, daß viele Mutationen, die durch somatische Hypermutation *in vivo* (Sharon, 1990) auftraten oder auch durch Mutagenese *in vitro* eingeführt wurden (Hawkins *et al.*, 1993), ihren Effekt auf die Affinität eines Antikörpers indirekt ausüben, d. h. durch präzise Ausrichtung der Seitenketten von mit dem Antigen in Kontakt stehenden Aminosäuren für optimale van der Waals und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Wasserstoff-Brücken (Mian *et al.*, 1991). Der Austausch von Aminosäureresten in CDRs, die nicht mit dem Antigen in Kontakt stehen, aber zu hochaffinen Resten in den CDRs benachbart sind, könnte demnach einen solchen indirekten Effekt bewirken.

Die Bedingungen für die *Error Prone* PCR wurden in der vorliegenden Arbeit so gewählt, daß ungefähr ein Basenaustausch pro 100 bp stattfand, was in etwa derjenigen Mutationshäufigkeit *in vivo* entspricht, die bei V-Genen in B-Zellen nach der primären Immunantwort beobachtet wird (Berek & Milstein, 1987). In drei Mutagenese- und Selektionszyklen wurden insgesamt 17 Mutanten isoliert, wobei jeweils die beste Mutante aus einem Experiment als Ausgangspunkt für den folgenden Zyklus diente, so daß insg. günstige Mutationen angehäuft wurden. In den isolierten Mutanten wurden überwiegend T/C- und A/G Transitionen generiert, was in der bevorzugten Einführung von Aminosäuren mit G/C-reichen Codons, wie z. B. Pro, Ala, Arg, Thr, resultierte. Die Einführung von Cytosin in den kodierenden Strang schließt die Generierung von Stopcodons in der mutagenen PCR aus, was zu einem hohen Anteil funktioneller Mutanten in der V_H -Genbibliothek führt. Dies wurde durch die Beobachtung bestätigt, daß alle für die weitere Analyse ausgewählten Klone aus den drei Affinitätsmaturierungs-Zyklen für Fab-Fragmente mit ununterbrochenem Leserahmen kodierte.

Überraschenderweise wies die im ersten Affinitätsmaturierungszyklus isolierte Mutante EP1/2 dieselbe Aminosäuresubstitution Ile69Thr auf wie die Mutante DS1/1 aus dem DNA-*Shuffling*. Beide Mutanten ergaben auf den jeweiligen Membranen des Kolonie-Filterstapel-Tests die intensivsten Farbsignale. Der positive Einfluß dieser Mutation auf die Antigenbindung, verglichen mit dem ursprünglichen humanisierten huHRS3 Fab-Fragment, spiegelte sich im ELISA in höheren Bindungssignalen wieder. Qualitative Bindungsanalysen mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie bestätigten die verbesserte Bindungsaktivität der Mutante EP1/2. Aus der Analyse der Kristallstruktur des humanisierten 4D5 Fv-Fragments (Eigenbrot *et al.*, 1993) ist bekannt, daß die Aminosäuren 66-80 von V_H Bestandteil einer zur Antigenbindungsstelle flankierenden Schleife sind, der bereits beim

Entwurf der Aminosäuresequenz für die humanisierte V_H-Domäne das Augenmerk galt (siehe Abschnitt 3.4.1) und die hier auch direkt an der Antigenbindung beteiligt sein könnte. Die Substitution des hydrophoben und räumlich voluminösen Isoleucins durch das hydrophile und kompaktere Threonin bewirkt möglicherweise eine Neuausrichtung dieses Segments bzw. des benachbarten CDR-H2.

Ähnliches gilt für die im zweiten Affinitätsmaturierungszyklus generierte Aminosäuresubstitution Asp72Asn in der Mutante EP2/1. Neben dieser Aminosäuresubstitution in der Gerüstregion FR-H3 besitzt die Mutante EP2/1 noch eine Glu100BLys Substitution in CDR-H3. Interessanterweise wurde die Glu100BLys Aminosäuresubstitution bereits in der Mutante EP1/7 aus dem ersten Affinitätsmaturierungszyklus gefunden. Diese Mutante wies im Vergleich zum humanisierten huHRS3 Fab-Fragment ebenfalls höhere Bindungsaktivität im ELISA auf.

Durch gerichtete Kombination der Aminosäuresubstitutionen Ile69Thr und Glu100BLys in der Mutante EP1/2+7 erwies sich der Effekt der Additivität der günstigen Beiträge der einzelnen Aminosäuresubstitutionen zur Antigenbindung. Die Mutante EP1/2+7 hatte eine deutlich gesteigerte Bindungsaktivität im ELISA im Vergleich zu den beiden Ausgangsmutanten EP1/2 und EP1/7.

Im dritten Affinitätsmaturierungszyklus wurde die Mutante EP3/1 isoliert, deren – im Vergleich zu Mutante EP2/1 – zusätzliche Aminosäuresubstitution Ala101Pro in CDR-H3 eine weitere Verbesserung der Affinität um den Faktor 2 bewirkte, so daß durch insgesamt vier Aminosäuresubstitutionen – jeweils zwei in FR-H3 und zwei in CDR-H3 – die Antigenaffinität um Faktor 10 gegenüber dem ursprünglichen humanisierten huHRS3 Fab-Fragment gesteigert werden konnte (Stammbaum der Variante in Abb. 61). Die Aminosäuresubstitution Ala101Pro war bereits in der Mutante EP1/6 beobachtet worden, jedoch zeigte diese für sich allein keine Verbesserung der Antigenbindung. Erst in Kombination mit den drei Aminosäureaustauschen der Mutante EP2/1 wirkte sich diese zusätzliche Aminosäuresubstitution stärker auf die Antigenbindung aus. Das starre Prolin führt möglicherweise zu einer Konformationsänderung innerhalb der CDR-H3 Schleife.

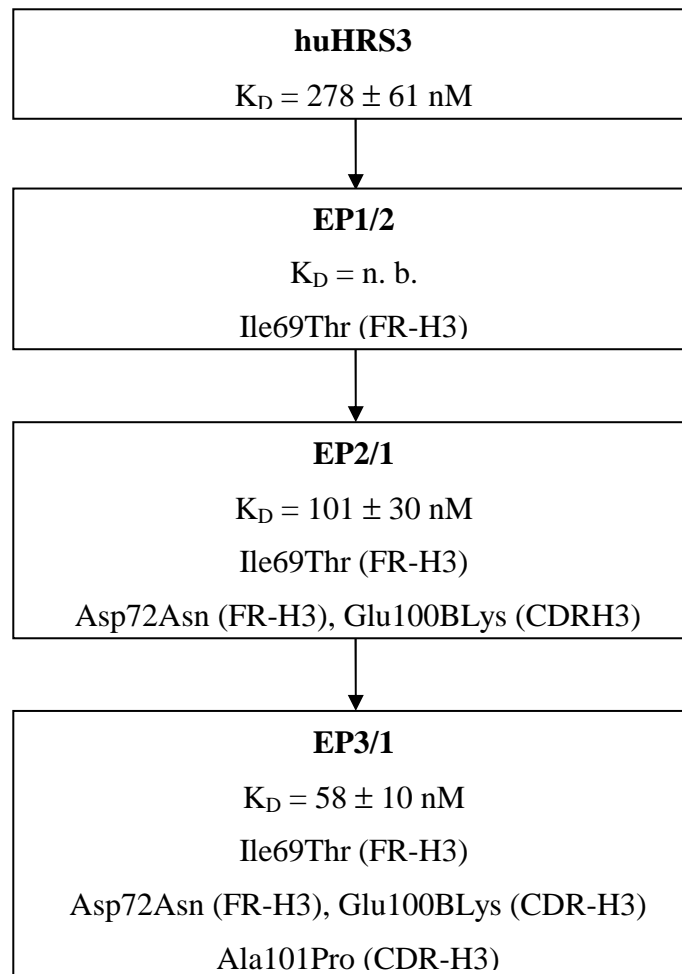


Abbildung 61: Stammbaum der affinitätsmaturierten Variante EP3/1 des humanisierten HRS3 Fab-Fragments. Ein Pfeil symbolisiert jeweils eine der drei Affinitätsmaturierungs-Zyklen.

Die Relevanz von Aminosäureaustauschen in der CDR-H3 Schleife, also dem zentralen Bereich der Antigenbindungsstelle, wurde bereits früher bei der Affinitätsmaturierung von Antikörpern beschrieben (de Haard *et al.*, 1998). Daneben führten Mutationen in der CDR-L3 Schleife, die ebenfalls in allen bekannten Strukturen von Antikörper/Antigen-Komplexen direkt mit dem Antigen wechselwirkt, zu weiteren Verbesserungen der Affinität (Schier *et al.*, 1996; Hemminki *et al.*, 1998). Eine Erklärung für den besonderen Einfluß von Mutationen in den CDR3-Schleifen beider variabler Domänen liefern die theoretischen Voraussagen von Novotny *et al.* (1989), denzufolge die Zahl derjenigen Aminosäurereste, die den größten Teil zur freien Enthalpie der Antigen/Antikörper-Komplexbildung beisteuern, auf ca. fünf bis sechs Reste beschränkt ist, obwohl insg. 15 bis 22 Aminosäuren mit dem Antigen in Kontakt stehen. Diese wenigen Aminosäurereste sind häufig im Zentrum der Antigenbindungsstelle, das durch CDR-L3 und CDR-H3 gebildet wird, angeordnet und bilden damit den Kernbereich des Paratops eines Antikörpers.

Wie wichtig die Mutagenese der CDR3-Regionen bei der Optimierung der Affinität ist, wurde von Yang *et al.* (1995) gezeigt, die verschiedene Bibliotheken herstellten, in denen entweder CDR-L1-, CDR-L3-, CDR-H1- oder CDR-H3 mutagenisiert wurden. Die größte Zunahme an Affinität konnte durch Mutagenese von CDR-H3 erreicht werden, was insgesamt in einer 63-fachen Verbesserung der Affinität gegenüber dem ursprünglichen Fab-Fragment resultierte. Die Mutagenese in CDR-L3 führte ebenfalls zu Mutanten mit höherer Affinität. Für die Mutation längerer Gensequenzen wurden in diesem als "Kassetten-Mutagenese" bezeichneten Verfahren Oligodesoxynukleotide mit degenerierten Basentriplets verwendet. Diese Methode hätte in der vorliegenden Arbeit auch zur Mutagenese des zu CDR-H2 flankierenden FR-H3 Bereiches angewendet werden können. Zwei für die Antigenaffinität von EP3/1 wichtige Aminosäuresubstitutionen (Ile69Thr, Asp72Asn) befinden sich in dieser Region, die möglicherweise ein *Hot Spot* ist.

Abschließend kann festgehalten werden, daß sich die Strategie aus der Kombination von *Error Prone* PCR und Kolonie-Filterstapel-Test als effektive Methode für die Affinitätsmaturierung des humanisierten HRS3 Fab-Fragments erwies. Die einfache Durchführbarkeit der Mutagenese PCR und die schnelle und parallele Identifizierung besserbindender Varianten mit Hilfe des Kolonie-Filterstapel-Tests machen dieses Verfahren für die Affinitätsmaturierung weiterer Antikörperfragmente interessant.

5 Zusammenfassung

Zur Immuntherapie von Tumorerkrankungen wurden in den letzten Jahren vermehrt bispezifische Antikörper oder F(ab)₂-Fragmente entwickelt. Diese Strategie wird insbesondere verfolgt, um cytotoxische Effektorzellen durch Vermittlung eines spezifischen Kontakts mit dem tumorassoziierten Antigen lokal zu aktivieren. Beispielsweise wurde die Therapie des Hodgkin-Lymphoms mit einem Quadrom-Antikörper untersucht, wobei der Fab-Arm HRS3 einerseits das Reed-Sternberg-Antigen CD30 auf den lymphatischen Tumorzellen erkennt und der Fab-Arm A9 andererseits den Fc γ -Rezeptor III (CD16) auf natürlichen Killerzellen bindet und aktiviert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die proteinchemischen Grundlagen für die Konstruktion eines humanisierten bispezifischen F(ab)₂-Fragments zum Zweck der Tumorthherapie refraktärer Hodgkin-Lymphome zu schaffen.

Um die unterschiedlichen Antigene CD16 und CD30 in ausreichender Quantität und Qualität zu produzieren, wurden Vektoren für die Expression ihrer extrazellulären Domänen als Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag-Affinitätsanhängsel im Periplasma von *E. coli* konstruiert. Im Fall des CD16-Antigens ließ sich auf diese Weise der die Aminosäuren 3-176 umfassende Bereich, entsprechend der kompletten extrazellulären Domäne, mit Ausbeuten von 50 μ g/L Kulturmedium (bezogen auf OD₅₅₀ = 1) in löslicher und funktioneller Form gewinnen. Im Fall des CD30-Antigens mit seiner in zwei Subdomänen untergliederten extrazellulären Region wurde ein Fragment mit der zweiten Subdomäne (Aminosäuren 185-335) für die gentechnische Herstellung ausgewählt, welches sich mit Ausbeuten von 100 μ g/L Kulturmedium (bezogen auf OD₅₅₀ = 1) produzieren ließ.

Mit Hilfe des etablierten Quadrom-Antikörpers A9/HRS3 konnte sowohl im ELISA als auch mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) gezeigt werden, daß die rekombinanten Antigenfragmente von CD30 und CD16 jeweils dasjenige Epitop trugen, welches vom entsprechenden Fab-Arm des bispezifischen Antikörpers erkannt wird. Ebenso wurde die Bindungsaktivität der in *E. coli* funktionell hergestellten chimären Fab-Fragmente muA9 und muHRS3c gegenüber den entsprechenden rekombinanten Antigenfragmenten nachgewiesen. Durch SPR-Gleichgewichtsanalyse wurden folgende Dissoziationskonstanten ermittelt: muA9: $49,1 \pm 2,8$ nM; muHRS3c: $25,9 \pm 2,8$ nM. In guter Übereinstimmung dazu waren die aus der kinetischen SPR-Analyse ermittelten Dissoziationskonstanten.

Zum Zweck der kovalenten Kopplung der beiden Fab-Fragmente zum F(ab)₂-Fragment wurden zwei Sequenzmotive mit zwei bzw. einem freien Cysteinrest am C-Terminus der leichten Immunglobulinkette entwickelt. Mit Hilfe des Sequenzmotivs mit zwei freien Cysteinresten konnten die beiden Fab-Fragmente muA9 und muHRS3c anhand von Disulfidbrücken mit einer Kopplungsausbeute von 70 % zum F(ab)₂-Fragment verknüpft werden. Im ersten Schritt des zweistufigen Kopplungsverfahrens wurden die freien Cysteinreste des muHRS3c Fab-Fragments in einer Thiol/Disulfidaustauschreaktion mit

Ellman's Reagenz derivatisiert. Nach Isolierung des aktivierten gemischten Disulfids wurde dieses mit dem muA9 Fab-Fragment in einer weiteren Thiol/Disulfidaustauschreaktion umgesetzt. Im Fall des Sequenzmotivs mit nur einem freien Cysteinrest gelang die Kopplung nach diesem Verfahren mit einer Ausbeute von 55 %. Außerdem gelang es, zwei Fab-Fragmente über eine Thioetherbindung mit Hilfe des Linkerreagens o-Phenylendimaleimid regioselektiv mit Ausbeuten von 30 - 40 % zum bivalenten F(ab)₂-Fragment zu koppeln.

Um die Immunogenität der murinen variablen Domänen des Fab-Fragments zu reduzieren, wurde der HRS3-Antikörper zudem mittels CDR-Transplantation humanisiert. Das resultierende künstliche Fab-Fragment wurde in *E. coli* durch Fermentation produziert und mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie gereinigt. Die durch SPR bestimmte Dissoziationskonstante war mit 278 ± 61 nM um den Faktor 10 höher als die des zugrundeliegenden chimären muHRS3c Fab-Fragments.

Untersuchungen zur Ursache des Verlustes an Antigenaffinität anhand hybrid gepaarter variabler Domänen ergaben, daß dieser Effekt hauptsächlich auf die humanisierte V_H-Domäne zurückzuführen war. Diese wurde daher einer *in vitro*-Affinitätsmaturierung unterzogen. Mittels *Error Prone* PCR wurde eine huV_H-Genbibliothek mit Zufallsmutationen präpariert und diese in Form eines modifizierten rekombinanten Fab-Fragments im Kolonie-Filterstapel-Test auf verbesserte Bindung des markierten CD30-Antigens durchmustert. Nach dreimaligem Durchlaufen des Affinitätsmaturierungszyklus wurde die Variante EP3/1 isoliert, welche insgesamt vier Aminosäuresubstitutionen – zwei in FR-H3 und zwei in CDR-H3 – aufwies.

Im ELISA bzw. FACS zeigte dieses mutierte Fab-Fragment ein nahezu identisches Bindungsverhalten gegenüber dem rekombinanten CD30-Antigen wie auch gegenüber CD30-positiven L540 CY-Zellen wie das ursprüngliche nicht-humanisierte muHRS3c Fab-Fragment. Die mittels SPR-Gleichgewichtsanalyse für die Variante EP3/1 ermittelte Dissoziationskonstante betrug 58 ± 10 nM und war somit im Vergleich zum ursprünglich humanisierten HRS3 Fab-Fragment um den Faktor 5 verbessert. Die Auswertung der Kinetik ergab für die Komplexbildung eine Geschwindigkeitskonstante k_{on} von $5,1 \times 10^4$ s⁻¹ und für die Dissoziation eine k_{off} von $2,0 \times 10^{-3}$ s⁻¹, woraus sich eine Dissoziationskonstante von 40 nM errechnet. Die Parameter sind also innerhalb eines Faktors 2 mit dem nicht-humanisierten Fab-Fragment identisch.

Damit sind die Voraussetzungen geschaffen, um in Kombination mit einem humanisierten anti-CD16 Fab-Fragment ein vollständig humanisiertes bispezifisches anti-CD16/anti-CD30 F(ab)₂-Fragment in ausreichenden Mengen und zu ökonomischen Bedingungen zu präparieren und für Tierversuche oder spätere therapeutische Anwendungen bereitzustellen.

6 Abkürzungen

A_x	Absorption bei x nm
Å	Angström (1×10^{-10} m)
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
bla	β-Lactamase
BMH	Bismaleimidohexan
bp	Basenpaar
BSA	Rinder-Serumalbumin
c	Konzentration
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
Cat	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	Circulardichroismus
CDR	<i>Complementarity Determining Region</i>
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
C _{H1}	erste konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
C _L	Konstante Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
(k)Da	(kilo-)Dalton
E _x	Extinktion bei x nm
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ε _x	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
Fab-Fragment	antigenbindendes Fragment aus den variablen und ersten konstanten Domänen eines Antikörpers
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FR	<i>Framework</i>
Fv-Fragment	antigenbindendes Fragment aus den beidvariablen Domänen eines Antikörpers
Ig	Immunglobulin
IMAC	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>

K_D	Komplexdissoziationskonstante
moi	<i>Multiplicity of Infection</i>
M_r	Molmasse
MRW	<i>Mean Residue Weight</i>
OD ₅₅₀	optische Dichte bei 550 nm
OmpA	<i>Outer Membrane Protein A</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PhoA	bakterielle Alkalische Phosphatase
Θ	Elliptizität
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette
V _L	variable Domäne der leichten Kette
Wt	Wildtyp
w/v	<i>Weight per Volume</i>

7 Literatur

- Åkerström, B., Nielsen, E. & Björck, L. (1987) Definition of the IgG-and the albumin-binding regions of streptococcal protein G. *J. Biol. Chem.* **262**, 13388-13391.
- Al-Lazikani, B., Lesk, L. M. & Chothia, C. (1997) Standard Conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **273**, 927-948.
- Baca, M., Presta, L. G., O'Conner, S. J. & Wells, J. A. (1997) Antibody humanization using monovalent phage display. *J. Biol. Chem.* **272**, 10678-10684.
- Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.* **36**, 525-557.
- Baeuerle, P. A., Kufer, P. & Lutterbüse, R. (2003) Bispecific antibodies for polyclonal T-cell engagement. *Curr. Opin. Mol. Thep.* **5**, 413-419.
- Bandtlow, C., Schiweck, W., Tai, H. H., Schwab, M. E. & Skerra, A. (1996) The *Escherichia coli*-derived Fab fragment of the IgM/kappa antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Eur J. Biochem.* **241**, 468-475.
- Baneyx, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 411-421.
- Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. & Engert, A. (2000) Compatible-Solute-Supported Periplasmic Expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl. Environmen. Microbiol.* **66**, 1572-1579.
- Beiboer, S. H., Reurs, A., Roovers, R. C., Arends, J. W., Whitelegg, N. R., Rees, A. R. & Hoogenboom, H. R. (2000) Guided selection of a pan carcinoma specific antibody reveals similar binding characteristics yet structural divergence between the original murine antibody and its human equivalent. *J. Mol. Biol.* **296**, 833-849.
- Bendig, M. M. & Jones, T. (1996) Rodent to human antibodies by CDR grafting. in: "Antibody Engineering. A Practical Approach" McCafferty, J., Hoogenboom, H. R. & Chiswell, D. J. (Eds.), Oxford University Press. Oxford, NY, Tokio.
- Bengtsson, A. (2001) The role of CD30 in atopic disease. *Allergy* **56**, 593-603.
- Berek, C. & Milstein, C. (1987) Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immuno.l Rev.* **96**, 23-41.
- Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R. & Horwitz, A. H. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**, 1041-1043.

- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, R., Lee, S. M., Pope, H. S., Riordan, G. S. & Whitlow, M.** (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.
- Bird, R. E. & Walker, B. W.** (1991) Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol.* **9**, 132-137.
- Birnboim, C. & Doly, J.** (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C.** (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175-179.
- Bodmer, J. L., Schneider, P. & Tschopp, J.** (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 74-79.
- Bowden, G. A. & Georgiou, G.** (1990) Folding and Aggregation of β -lactamase in the periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 16760-16766.
- Brennan, M., Davison, P. F. & Paulus, H.** (1985) Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G₁ fragments. *Science* **229**, 81-83
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S. H., Lee, B. & Pastan, I.** (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv-Fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7538-7542.
- Brosamle, C., Huber, A. B., Fiedler, M., Skerra, A. & Schwab, M. E.** (2000) Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat induced by a recombinant, humanized IN-1 antibody fragment. *J. Neurosci.* **20**, 8061-8068.
- Bruggemann, M., Winter, G., Waldmann, H. & Neuberger, M.** (1989) The immunogenicity of chimeric antibodies. *J. Exp. Med.* **170**, 2153-2157.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-379.
- Caldwell, R. C. & Joyce, G. F.** (1992) Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl.* **2**, 28-33.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J. & Longecker, R.** (1998). Epstein-Barr virus LPM2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**, 405-411.

- Carde, P., Da Costa, L., Manil, L., Pfreundschuh, M., Lumbroso, D. L., Saccavini, J. C., Caillou, B., Ricard, M., Boudet, F., Hayat, M., Diehl, V. & Parmentier, C.** (1990) Immunoscintigraphy of Hodgkin's disease: in vivo use of radiolabelled monoclonal antibodies derived from Hodgkin cell lines. *Eur. J. Cancer* **26**, 474-479.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. & Shepard, H. M.** (1992a) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4285-4289.
- Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L. T., Rowland, A. M., Kotts, C. E., Carver, M. E., Yang, M., Bourell, J. H., Shepard, H. M. & Henner, D.** (1992b) High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Biotechnology* **10**, 163-167.
- Carter, P., Ridgway, J. & Zhu, Z.** (1995) Toward the production of bispecific antibody fragments for clinical applications. *J. Hematotherapy* **4**, 463-470.
- Carter, P.** (2001) Bispecific human IgG by design. *J. Immunol.* **248**, 7-15.
- Carter, P. & Merchant, A. M.** (1997) Engineering antibodies for imaging and therapy. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 449-454.
- Casson, L. P. & Manser, T.** (1995) Evaluation of loss and change of specificity resulting from random mutagenesis of an antibody V_H region. *J. Immunol.* **155**, 5647-5654.
- Chamow, S. M. & Ashkenzai, A.** (1996) Immuno adhesins: principles and applications. *Trends Biotechnol.* **14**, 52-60.
- Chan, W., Helms, L. R., Brooks, I., Lee, G., Ngola, S., McNulty, D., Maleeff, B., Hensley, P. & Wetzel, R.** (1996) Mutational effects on inclusion body formation in the periplasmic expression of the immunoglobulin VL domain REI. *Fold. Des.* **1**, 77-89.
- Chang, K. L., Albuja, P. F., Chen, Y.Y. Johnson, R. M. & Weiss, L. M.** (1993). High incidence of Epstein-Barr virus in the Reed Sternberg cells of Hodgkin's disease occurring in Peru. *Blood* **81**, 496-501.
- Chen, E.Y. & Seeburg, P. H.** (1985) Supercoil sequencing. A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**, 165-170.
- Chester, K. A. & Hawkins, R. E.** (1995) Clinical issues in antibody design. *Trends Biotechnol.* **13**, 294-300.
- Chien, A., Edgar, D. B. & Trela, J. M.** (1976) Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1555.

- Chothia, C., Novotny, J., Bruccoleri, R. & Karplus, M.** (1985) Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J. Mol. Biol.* **186**, 651-663.
- Chotia, C. & Lesk, A. M.** (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **196**, 901-917.
- Chotia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Lavitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M. & Poljak, R. J.** (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* **342**, 877-883.
- Creighton, T. E.** (1997) *Protein Structure: A Practical Approach*. 2nd Edition, Oxford University Press.
- Cobleigh, M. A. Vogel, C. L., Tripathy, D., Robert N. J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J. M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. & Slamon, D. J.** (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J. Clin. Oncol.* **17**, 2639-2648.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L.** (1972) Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2110-2114.
- Cole, P. A.** (1999) Chaperone-assisted protein expression. *Structure* **15**, 239-242.
- Corchero, J. L. & Villaverde, A.** (1997) Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 621-632.
- Courtenay Luck, N. S., Epenetos, A. A., Moorre, R., Larche, M., Pectasides, D., Dhokia, B. & Ritter, M.** (1986) Development of primary and secondary immune responses to mouse monoclonal antibodies used in the diagnosis and therapy of malignant neoplasms. *Cancer Res.* **46**, 6489-6493.
- Crameri, A., Cwirla, S. & Stemmer, W. P. C.** (1996) Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat. Med.* **2**, 100-102.
- Crameri, A., Raillard, S., Bermudez, E. & Stemmer, W. P. C.** (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**, 288-291.
- Creighton, T. E.** (1986) Disulfide bonds as probes of protein folding pathways. *Methods Enzymol.* **131**, 83-106.

- DaCosta, L., Carde, P., Lumbroso, J. D., Ricard, M., Pfreundschuh, M., Bosq, J., Manil, V., Diehl, V. & Parmentier, C.** (1992) Immunoscintigraphy in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphomas. Results in 18 Patients using the iodine radiolabeled monoclonal antibody HRS-3. *Ann. Oncol.* **3** (Suppl.4), 53-58.
- Daugherty, P. S., Olsen, M. J., Iverson, B. L. & Georgiou, G.** (1999) Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng.* **12**, 613-621.
- De Haard, Henderikx, P. & Hoogenboom H. R.** (1998) Creating and engineering human antibodies for immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **31**, 5-31.
- De Haard, H. J., van Neer, N., Reurs, A. Hufton, S. E., Roovers, R. C., Henderikx, P., de Bruine, A. P., Arends, J. W. & Hoogenboom, H. R.** (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J. Biol. Chem.* **274**, 18218-18230.
- DeVita, V.T.** (1987) The consequences of chemotherapy of Hodgkin's disease: the 10th David A. Karnofsky Memorial Lecture. *Cancer* **47**, 1-43.
- Desplancq, D., King, D. J., Lawson, A. D. G. & Mountain A.** (1994) Multimerization behaviour of single chain Fv variants for tumour-binding antibody B 72.3. *Protein Eng.* **7**, 1027-1033.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O.** (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Diehl, V., Kalle, C., Fonatsch, C., Tesch, H., Jüecker, M. & Schaadt, M.** (1990) The cell of origin in Hodgkin's disease. *Sem. Oncol.* **17**, 660-672.
- Dill, K. A.** (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
- Dougan, D. A., Malby, R. L., Gruen, L. C., Kortt, A. A., & Hudson, P. L.** (1998) Effects of substitutions in an antibody binding surface on antigen affinity. *Protein Eng.* **11**, 65-74.
- Dreier, T., Lorenczewski, G., Brandl, C., Hoffmann, P., Syring, U., Hanakam, F., Kufer, P., Riethmuller, G., Bargou, R. & Baeuerle, P. A.** (2002) Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *Int. J. Cancer* **100**, 690-697.
- Dubé, S., Fisher, J. W. & Powell, J. S.** (1988) Glycosylation at specific sites of erythropoetin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *J. Biol. Chem.* **263**, 17516-17521.

- Dürkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B. & Stein, H.** (1992) Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* **68**, 421-427.
- Eigenbrot, C., Randal, M., Presta, L., Carter, P. & Kossiakoff, A. A.** (1993) X-ray structures of the antigen-binding domains from three variants of humanized anti-p185^{HER2} antibody 4D5 and comparison with molecular modeling. *J. Mol. Biol.* **229**, 969-995.
- Eigenbrot, C., Gonzalez, T., Mayeda, J., Carter, P., Werther, W., Hotaling, T., Fox, J. & Kessler, J.** (1994) X-ray structures of fragments from binding and nonbinding versions of a humanized anti-CD18 antibody: structural indications of the key role of V_H residues 59 to 65. *Proteins* **18**, 49-62.
- Ellman, G. L.** (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77.
- Engert, A., Martin, G., Pfreundschuh, M., Amlot, P., Hsu, S. M., Diehl, V. & Thorpe, P.** (1990) Antitumor effects of ricin A chain immunotoxins prepared from intact antibodies and Fab'fragments on solid human Hodgkin's disease tumors in mice. *Cancer Res.* **50**, 2929-2935.
- Engert, A., Pohl, C. & Diehl, V.** (1992) Experimental therapy in Hodgkin's disease. *Ann. Oncol.* **3** (Suppl. 4), 97-100.
- Essen, L. O. & Skerra, A.** (1994) The *de novo* design of an antibody combining site: Crystallographic analysis of the V_L domain confirms the structural model. *J. Mol. Biol.* **238**, 226-244.
- Fanger, M. W., Shen, L., Graziano, R. F. & Guyre, P. M.** (1989) Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol. Today* **10**, 92-97.
- Fendly, B. M., Winget, M., Hudziak, R. M., Lipari, M. T., Napier, M. A. & Ullrich, A.** (1990) Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res.* **50**, 1550-1558.
- Fiedler, M. & Skerra, A.** (1999) Use of Thiophilic Adsorption Chromatography for the one-step purification of a bacterially produced antibody Fab fragment without the need for an affinity tag. *Protein Expr. Purif.* **17**, 421-427.
- Fiedler, M. & Skerra, A.** (2001) Purification and characterisation of His-tagged antibody fragments. In: Kontermann, R. & Dübel, S. (Hrsg.) "Antibody Engineering." Springer Verlag, Heidelberg.

- Fiedler, M. & Skerra, A.** (2001) proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene* **274**, 111-118.
- Fiedler, M.** (2002) Neutralisierung eines Inhibitors der neuronalen Regeneration im ZNS: Optimierung des Anti-NogoA Antikörpers IN-1 durch Protein Engineering Dissertation. *Life Science Zentrum Weihenstephan der Technischen Universität München*.
- Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M. E. & Skerra, A.** (2002) An engineered IN-1 Fab fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng.* **15**, 931-941.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S.** (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris-buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**, 83-88.
- Foote, J. & Winter, G.** (1992) Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* **224**, 487-499.
- Forrer, P., Jung, S. & Plückthun** (1999) Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 514-520.
- Forsberg, G., Forsgren, M., Jaki, M., Norin, M., Sterky, C., Enhorning, A., Larsson, K., Ericsson, M. & Bjork, P.** (1997) Identification of framework residues in a secreted recombinant antibody fragment that control production level and localization in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**, 12430-12436.
- Geisselsoder, J., Witney, F. & Yuckenberg, P.** (1987) Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis. *BioTechniques* **5**, 786-791.
- Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A. & Schmidt, R. E.** (1998) The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.* **76**, 231-248.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Glennie, M. J., McBride H. M., Worth A. T. & Stevenson G. T.** (1987) Preparation and performance of bispecific (Fab')₂ antibody containing thioether-linked Fab'γ fragments. *J. Immunol.* **139**, 2367-2375.
- Gregory, C. D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C. A., Williams, G. T., Gordon, J. & Rickinson, A. B.** (1991) Activation of Epstein-Barr virus latent proteins protects human B-cells from death and apoptosis. *Nature* **349**, 612-614.

- Gresch, O.** (1997) Gentechnische Herstellung eines bispezifischen (F_{ab})₂-Fragments für die Zelloberflächenantigene CD16 und CD30. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Gruber, M., Schodin, B. A., Wilson, E. R. & Kranz, D. M.** (1994) Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol.* **152**, 5368-5374.
- Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlen, M., Freij, A.-K., Jörnvall, H., Flock, J.-I. & Lindberg, M.** (1986) Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. *EMBO J.* **5**, 1567-1575.
- Hanes, J., Schaffitzel, C. Knappik, A. & Plückthun, A.** (2000) Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display. *Nature Biotechnology* **18**, 1287-1292.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J. & de Cock, H.** (2001) The early interaction of the outer membrane protein phoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **276**, 18804-18811.
- Hartmann, F., Renner, C., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M., Eichentopf, B., Kloft, M. & Pfreundschuh, M.** (1997) Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Blood* **89**, 2042-2047.
- Hawkins, R. E., Russell, S. J. & Winter, G.** (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J. Mol. Biol.* **226**, 889-896.
- Hawkins, R. E., Russel, S. J. Baier, M. & Winter, G.** (1993) The contribution of contact and non-contact residues of antibody in the affinity of binding to antigen. *J. Mol. Biol.* **234**, 958-964.
- Hayden, M. S., Gilliland, L. K. & Ledbetter, J. A.** (1997) Antibody engineering. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 201-212.
- Hayhurst, A. & Harris, W.** (1999) *Escherichia coli* Skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Express. Purif.* **15**, 336-343.
- Heinrich, P.** (1987) Klonierung und Sequenzierung von Rifamicin-Resistenzgenen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hemminki, A., Niemi, S., Hoffren, A. M., Hakalahti, L., Soderlund, H. & Takkinen, K.** (1998) Specificity improvement of a recombinant anti-testosterone Fab fragment by CDRIII mutagenesis and phage display selection. *Protein. Eng.* **11**, 311-319.

- Herbst, H., Steinbrecher, E., Niedobitek, G., Young, L.S., Brooks, L., Muller-Lantzsch, N. & Stein, H.** (1992). Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus harbouring cells in Hodgkin's disease. *Blood* **80**, 484-491.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch N. & Stein, H.** (1991) Epstein-Barr virus latent membran protein expression in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 4766-4770.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, R., Gentz, R. & Stüber, D.** (1988) Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with novel metal chelate adsorbent. *Biotechnology* **6**, 1321-1325.
- Hodgkin, T.** (1832) On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions* **17**, 68-114.
- Holck, A. & Kleppe, K.** (1988) Cloning and sequencing of the gene for the DNA-binding 17K protein of *Escherichia coli*. *Gene* **67**, 117-124.
- Holliger P. & Winter, G.** (1993) Engineering bispecific antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**, 446-449.
- Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G.** (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibodies. *Proc. Natl. Sci. USA* **90**, 6444-6448.
- Holliger, P., Brissinck, J., Williams, R. L., Thielemans, K. & Winter, G.** (1996) Specific killing of lymphoma cells by cytotoxic T-cells mediated by a bispecific diabody. *Protein Eng.* **9**, 299-305.
- Holliger, P., Wing, M., Pound, J. D., Bohlen, H. & Winter, G.** (1997) Retargeting serum immunoglobulin with bispecific diabodies. *Nat. Biotechnol.* **15**, 632-636.
- Holmes, M. A. & Foote, J.** (1997) Structural consequences of humanizing an antibody. *J. Immunol.* **158**, 2192-2201.
- Hombach, A., Jung, W., Pohl, C., Renner, C., Sahin, U., Schmits, R., Wolf, J., Kapp, U., Diehl, V. & Pfreundschuh, M.** (1993) A CD16/CD30 bispecific monoclonal antibody induces lysis of Hodgkin's cells by unstimulated natural killer cells *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Cancer*, **55**, 830-836.
- Hombach, A., Heuser, C., Sircar, R., Tillmann, T., Diehl, V., Pohl, C. & Abken, H.** (1999) Characterization of a chimeric T-cell receptor with specificity for the Hodgkin's Lymphoma-associated CD30 antigen. *J. Immunotherapy* **22**, 473-480.
- Hoogenboom, H. R.** (1997) Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *TIBTECH.* **15**, 62-70.

- Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W. & Roovers, R. C.** (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* **4**, 1-20.
- Huber A., Demartis, S. & Neri D.** (1999) The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *J. Mol. Recognit.* **12**, 198-216.
- Hudson, P. J. & Souriau, C.** (2003) Engineered antibodies. *Nature Medicine* **9**, 129-134.
- Huls, G., Gestel, D., van der Linden, J., Moret, E. & Logtenberg, T.** (2001) Tumor cell killing by in vitro affinity-matured recombinant human monoclonal antibodies. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 163-171.
- Humphreys, D. P., Chapman, A. P., Reeks, D. G., Lang, V. & Stephens, P. E.** (1997) Formation of dimeric Fabs in *Escherichia coli*: effect of hinge size and isotype, presence of interchain disulphide bond, Fab' expression levels, tail piece sequences and growth conditions. *J. Immunol. Methods* **209**, 193-202.
- Hurle, M. & Gross, M.** (1994) Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**, 428-433.
- Irving, R. A., Coia, G., Roberts, A., Nuttall, S. D. & Hudson, P. J.** (2001) Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J. Immunol. Methods* **248**, 31-45.
- Jackson, T., Morris, B. A., Martin, A. C. R., Lewis, D. F.V. & Sanders, P. G.** (1992) Molecular modelling and site-directed mutagenesis on a bovine anti-testosterone monoclonal antibody. *Protein Eng.* **5**, 343-350.
- Janeway, C. A. & Traves, P.** (1995) "Immunologie" Spektrum Akademischer Verlag GmbH; Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Janin J.** (1979) Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature* **277**, 491-492.
- Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. & Chao, M.** (1986) Expression and structure of the NGF receptor. *Cell* **47**, 545-554.
- Johnson, W. C. Jr.** (1988) Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 145-166.
- Johnson, G. & Wu, T.T.** (2001) The Kabat Database and its application: future directions. *Nucleic Acid Research* **29**, 205-206.
- Joly, J. C., Leung, W. S. & Swartz, J. S.** (1998) Overexpression of *Escherichia coli* oxidoreductases increases recombinant insulin-like growth factor I accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2773-2777.

- Jung, W., Giner, H., Fadle, N., Arnold, G. & Pfreundschuh, M.** (1995) Reactivity of antibodies (mAbs) from the activation antigen clusters against native and recombinant human CD30 expressed on eukariotic cells and selected peptide sequences of the CD30-antigen. Schlossman et al. (Eds): *Leucocyte typing V*, Oxford University Press, Oxford.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M. & Gottesmann, K. S.** (1987) Sequences of Proteins of immunological interest. Natl. Inst. Health, Bethesda, MD, USA.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C.** (1991) Sequences of proteins of immunological interest (5th edn). US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H.** (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* **369**, 31-37.
- Kane, J. F.** (1995) Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494-500.
- Kanzler, H., Küpper, R., Hansmann, M. L. & Rajewsky, K.** (1996). Hodgkin and Reed Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* **184**, 1495-1505.
- Kaplan, H.S.** (1980) Hodgkin's disease: Unfolding concepts concerning its nature, management and prognosis. *Cancer* **45**, 2439-2474.
- Kast, P. & Hilvert, D.** (1997) 3D structural information as a guide to protein engineering using genetic selection. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 470-479.
- Kettleborough, C. A., Saldanha, J., Heath, V. J., Morrison, C. J. & Bendig, M. M.** (1991) Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting the importance of framework residues on loop conformation. *Prot. Eng.* **4**, 773-783.
- King, D. J., Mountain, A., Adair, J. R., Owens, R. J., Harvey, A., Weir, N., Proudfoot, K. A., Phipps, A., Lawson, A., Rhind, S. K., Pedley, B., Boden, J., Boden, R., Begent, R. H. J. & Yarranton, G. T.** (1992) Tumor localization of engineered antibody fragments. *Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals* **5**, 159-170.
- Kipriyanov, S. M., Dübel, S., Breitling, F., Kontermann, R. E. & Little, M.** (1994) Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. *Mol. Immunol.* **31**, 1047-1058.

- König, T. & Skerra, A.** (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilization of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J. Immunol. Methods* **218**, 73-83.
- Köhler, G. & Milstein, C.** (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497.
- König, T. & Skerra, A.** (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J. Immunol. Meth.* **218**, 73-83.
- Kohno, T., Brewer, M. T., Baker, S. L., Schwartz, P. E., King, M. W., Hale, K. K., Squires, C. H., Thompson, R. C. & Vannice, J. L.** (1990) A second tumor necrosis factor receptor gene product can shed a naturally occurring tumor necrosis factor inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8331-8335.
- Kontermann, R. & Dübel, S.** (Editoren) (2001) "Antibody Engineering" Springer Verlag, Heidelberg.
- Koonin, E. V.** (1997) Genome sequences: genome sequence of a model prokaryote. *Curr. Biol.* **7**, 656-659.
- Kostelny, S. A., Cole, M. S. & Tso, J. Y.** (1992) Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol.* **148**, 1547-1553.
- Knappik, A., Krebber, C. & Plückthun, A.** (1993) The effect of folding catalysts on the folding process of different antibody fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **11**, 77-83.
- Knappik, A. & Plückthun, A.** (1995) Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **8**, 81-89.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B.** (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.*, **296**, 57-86.
- Kranz, D. M., Gruber, M. & Wilson, E. R.** (1995) Properties of bispecific single chain antibodies expressed in *Escherichia coli*. *J. Hematotherapy* **4**, 403-408.
- Küppers, R. & Rajewsky, K.** (1998). The origin of Hodgkin and Reed Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 471-493.
- Küppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L. & Rajewsky, K.** (1993). Tracing B-cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J.* **12**, 4955-4967.

- Kunkel, T. A., Roberts, J. D. & Zakour, R. A.** (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Meth. Enzym.* **154**, 367-382.
- Kyte, J. & Doolittle, R. F.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **329**, 268-270.
- Lamers, C. H., Gratama, J. W., Warnaar, S. O., Stoter, G. & Bolhuis, R. L.** (1995) Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb) targeted cytolysis by human anti mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb targeted activated T lymphocytes. *Int. J. Cancer* **60**, 450-457.
- Lesk, A. M. & Tramantano, A.** (1990) in *Antibody Engineering: A Practical Guide* (Borrebaeck, C., Ed.), Freeman, New York, 1-38.
- Lichtenheld, O., Olsen, K. J., Lu, P., Lowrey, D.M., Hameed, A., Hengartner, H. & Podack, E. R.** (1988) Structure and function of human perforin. *Nature* **335**, 448-451.
- Liu, Y. J., Mason, D.Y., Johnson, G. D., Abbot, S., Gregory, C. D., Hardie, D. L., Gordon, J. & MacLennan, I. C.** (1991). Germinal center cells express BCL-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* **21**, 1905-1910.
- LoBuglio, A. F., Wheeler, R. H., Trang, J., Haynes, A., Rogers, K., Harvey, E. B., Sun, L., Ghrayeb, J. & Khazaeli, M. B.** (1989) Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4220-4224.
- Longo, D. L.** (1990) Biologic agents and approaches in the management of patients with lymphoma. A critical appraisal. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* **5**, 1067-1087.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W. W., Short, J. M., Sorge, J. A. & Mathur, E. J.** (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- MacCallum, R. M., Martin, A., C., R. & Thornton, J. M.** (1996) Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography. *J. Mol. Biol.* **262**, 732-745.
- Machamer, C. E. & Rose, J. K.** (1988) Vesicular stomatitis virus G proteins with altered glycosylation sites display temperature-sensitive intracellular transport and are subject to aberrant intermolecular disulfide bonding. *J. Biol. Chem.* **263**, 5955-5960.
- Makrides, S. C.** (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Echerichia coli*. *Microbiol. Reviews* **60**, 512-538.

- Mandelboim, O., Malik, P., Davis, D. M., Jo, C. H., Boyson, J. E. & Strominger, J. L.** (1999) Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5640-5644.
- Martin, A. C. R.** (1996) Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by computer. *Proteins* **25**, 130-133.
- Martineau, P., Jones, P. & Winter, G.** (1998) Expression of an antibody fragment at high levels in the bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol.* **280**, 117-127.
- Matzuk, M. M. & Boime, I.** (1988) The role of asparagine-linked oligosaccharides of the α subunit in the secretion and assembly of the human chorionic gonadotropin. *J. Cell. Biol.* **106**, 1049-1059.
- Mavrangelos, C., Thiel, M., Adamson, P. J., Millard, D. J., Nobbs, S., Zola, H. & Nicholson, I. C.** (2001) Increased yield and activity of soluble single-chain antibody fragments by combining high-level expression and the Skp periplasmic chaperonin. *Protein Express. Purif.* **23**, 289-295.
- McPherson, A.** (1990) Current approaches to macromolecular crystallisation. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.
- Mian, I. S., Bradwell, A. R. & Olson, A. J.** (1991) Structure, function and properties of antibody binding sites. *J. Mol. Biol.* **217**, 133-151.
- Milstein, C. & Cuello, A. C.** (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* **305**, 537-540.
- Milstein, C. & Cuello, A. C.** (1984) Hybrid hybridomas and the production of bi-specific monoclonal antibodies. *Immunol. Today* **5**, 299-304.
- Morea, V., Tramontano, A., Rustici, M., Chothia, C. & Lesk, A. M.** (1998) Conformation of the third hypervariable region in the V_H domain of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **275**, 269-294.
- Morea, V., Lesk, A. M. & Tramontano, A.** (2000) Antibody modelling: Implications for engineering and design. *Methods* **20**, 267-279.
- Moretta, A., Ciccone, E., Pantaleo, G., Tambussi, G., Bottino, C., Melioli, G., Mingari, M.C. & Moretta, L.** (1989) Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans. *Immunol. Rev.* **111**, 145-175.
- Morimoto, K. & Inouye, K.** (1999) Method for the preparation of bispecific F(ab)' 2μ fragments from mouse monoclonal antibodies of the immunoglobulin M class and characterization of the fragments. *J. Immunol. Methods* **224**, 43-50.

- Morrison, S. L. & Oi, V. T. (1989)** Genetically engineered antibody molecules. *Adv. Immunol.* **44**, 65-92.
- Movva, N. R., Nakamura, K. & Inouye, M. (1980)** Amino acid sequence of the signal peptide of ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 27-29.
- Müller, K. M., Arndt, K. M., Strittmatter, W. & Plückthun, A. (1998)** The first constant domain (C_H1 and C_L) of an antibody used as heterodimerization domain for bispecific miniantibodies. *FEBS Letters* **422**, 259-264.
- Müller, H. N. & Skerra, A. (1993)** Functional expression of the uncomplexed serum retinol-binding protein in *Escherichia coli*: ligand binding and reversible unfolding characteristics. *J. Mol. Biol.* **230**, 725-732.
- Nabhan, C. & Tallman, M. S. (2002)** Early phase I/II trials with gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in acute myeloid leukemia. *Clin. Lymphoma.* **2 Suppl. 1**, 19-23.
- Naismith, J. H., Devine, T. Q., Kohno, T. & Sprang, S. R. (1996)** Structures of the extracellular domain of the type I tumor necrosis factor receptor. *Structure* **4**, 1251-1262.
- Nakajima, H. & Henkart, P.A. (1994)** Cytotoxic lymphocyte granzymes trigger a target cell internal disintegration pathway leading to cytolysis and DNA breakdown. *J. Immunol.* **152**, 1057-1063.
- Neri, D., Montigiani, S. & Kirkham, P. M. (1996)** Biophysical methods for the determination of antibody-antigen affinities. *Trends Biotechnol.* **14**, 465-470.
- Niedobitek, G., Kremmer, E., Herbst, H., Whitehead, L., Dawson, C. W., Niedobitek, E., von Ostau, C., Rooney, N., Grasser, F. A. & Young, L. S. (1997)** Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood* **90**, 1664-1672.
- Novotny, J., Bruccoleri, R. E. & Saul, A. F. (1989)** On the attribution of binding energy in antigen-antibody complexes McPc603, D1.3 and HyHEL-5. *Biochemistry* **28**, 4735-4749.
- Olsson, A., Eliasson, M., Guss, B., Nilsson, B., Hellman, U., Lindberg, M. & Uhlén, M. & Nygren, P. Å. (1997)** Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain. *Nature Biotechnol.* **15**, 772-777.
- O'Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M. & Peck, K. (1992)** Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Anal. Biochem.* **205**, 132-136.

- Pack, P. & Plückthun, A.** (1992) Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**, 1579-1584.
- Padlan, E. A.** (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* **31**, 169-217.
- Pangalis, G. A., Dimopoulou, M. N., Angelopoulou, M. K., Tsekouras, C., Vassilakopoulos, T. P., Vaiopoulos, G. & Siakantaris, M. P.** (2001) Campath-1H (anti-CD52) monoclonal antibody therapy in lymphoproliferative disorders. *Med. Oncol.* **18**, 99-107.
- Parham, P.** (1983) On the fragmentation of monoclonal IgG1, IgG2a, and IgG2b from BALB/c mice. *J. Immunol.* **131**, 2895-2902.
- Patten, P. A., Howard, R. J. & Stemmer, W. P. C.** (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 724-733.
- Pedersen, J. T., Henry, H. A., Searle, S. J., Guild, B. C., Roguska, M. A. & Rees, A. R.** (1994) Comparison of surface accessible residues in human and murine immunoglobulin Fv domains. Implication for humanization of murine antibodies. *J. Mol. Biol.* **235**, 959-973.
- Peipp, M. & Valerius, T.** (2002) Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 507-511.
- Perez-Perez, J., Marquez, G., Barbero, J. L. & Gutierrez, J.** (1994) Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. *Biotechnology* **12**, 178-80.
- Pfleiderer** (1985) Chemical modification of proteins. In: *Modern Methods in Protein Chemistry* Vol. 2, 201-268.
- Plückthun, A. & Skerra, A.** (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **178**, 497-515.
- Plückthun, A.** (1992) Mono- and bivalent antibody fragments produced in *Escherichia coli*: engineering, folding and antigen binding. *Immunol. Rev.* **130**, 151-188.
- Plückthun, A. & Pack, P.** (1997) New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* **3**, 83-105.
- Poppema, S., Potters, M., Emmens, R., Visser, L. & van den Berg, A.** (1999) Immune reactions in classical Hodgkin's disease. *Sem. Hematol.* **36**, 253-259.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Pfreundschuh, M., Schoppe, W. D., Fuchs, R., Pflüger, K. H., Löffler, M. & Diehl, V.** (1987) Lomustine, etoposide, vindesine and dexamethasone (CEVD) for Hodgkin's

- lymphoma refractory to COPP and ABVD. A multicenter trial of the German Hodgkin Study Group. *Cancer Treat. Rep.* **71**, 1203-1209.
- Pfreundschuh, M., Lathan, B., Löffler, M., Rüdfler, U., Hansenclever, D. & Diehl, V.** (1992) Recommendations for future clinical trials. *Ann. Oncol.* **3** (Suppl. 4), 101-104.
- Powell, M. S., Barton, P. A., Emmanouilidis, D., Wines, B. D., G. M. Neumann, Peitersz, G. A., Maxwell, K. F., Garrett, T. P. J. & Hogarth, P. M.** (1999) Biochemical analysis and crystallisation of FcγRIIa, the low affinity receptor for IgG. *Immunology Letters* **68**, 17-23.
- Qiu, J. Swartz, J. R. & Georgiou, G.** (1998) Expression of active human tissue type plasminogen activator in *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**, 4891-4896.
- Raag, R. & Whitlow, M.** (1995) Single-chain Fvs. *FASEB J.* **9**, 73-80.
- Perussia, B. & Ravetch, J. V.** (1991) Fc γRIII (CD16) on human macrophages is a functional product of the Fc γRIII-2 gene. *Eur. J. Immunol.* **21**, 425-429.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B. & Pastan, I.** (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: Disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnol.* **14**, 1239-1245.
- Renner, C., Jung, W., Sahin, U., Denfeld, R., Pohl, C., Trümper, L., Hartmann, F., Diehl, V., Van Lier, R. & Pfreundschuh, M.** (1994) Cure of xenografted human tumors by bispecific monoclonal antibodies and human T cells. *Science* **264**, 833-835.
- Renner, C. & Pfreundschuh, M.** (1995) Treatment of heterotransplanted Hodgkin's tumors in SCID mice by a combination of human NK or T cells and bispecific antibodies. *J Hematother.* **4**, 447-451.
- Renner, C., Hartmann, F. & Pfreundschuh, M.** (1997) Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/30 bispecific antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* **45**, 184-186.
- Renner, C., Hartmann, F., Jung, W., Deisting, C., Juwana, M. & Pfreundschuh, M.** (2000) Initiation of humoral and cellular immune responses in patients with refractory Hodgkin's disease by treatment with anti-CD16/CD30 bispecific antibody. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 173-180.
- Renner, C., Stehle, I., Lee, F. T., Hall, C., Catimel, B., Nice, E. C., Mountain, A., Rigopoulos, A., Brechbiel, M. W., Pfreundschuh, M. & Scott, A. M.** (2001) Targeting properties of an anti-CD16/anti-CD30 bispecific antibody in an in vivo system. *Cancer Immunol. Immunother.* **50**, 102-108.

- Ridgway, J. B., Ng, E., Kern J. A., Lee, J., Brush, J., Goddard, A. & Carter, P.** (1999) Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a phage library using tumor and nontumor cell lines. *Cancer Res.* **59**, 2718-2723.
- Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter G.** (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323-327.
- Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Chen, C., Wong, W. L. T., Garg, S., Blank, G. S., Maneval, D. & Carter, P.** (1993) Engineering Fab' fragments for efficient F(ab)₂ formation in *Escherichia coli* and for improved *in vivo* stability. *J. Immunol.* **151**, 6954-6961.
- Rodrigues, M. L., Shalaby, M. R., Werther, W., Presta, L. & Carter, P.** (1992) Engineering a humanized bispecific F(ab')₂ fragment for improved binding to T cells. *Int. J. Cancer Supplement* **7**, 45-50.
- Roguska, M. A., Pedersen, J. T., Keddy, C. A., Henry, A. H., Searle, S. J., Lambert, J. M., Goldmacher, V. S., Blättler, W. A., Rees, A. R. & Guild, B. C.** (1994) Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 969-973.
- Roguska, M. A., Pedersen, J. T., Henry, A. H., Searle, S. M. J., Roja, M. C., Avery, B., Hoffee, M., Cook, S., Lambert, J. M., Blättler, W. A., Rees, A. R. & Guild, B. C.** (1996) A comparison of two monoclonal antibodies humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing. *Prot. Eng.* **9**, 895-904.
- Rosenblum, B. B., Lee, L. G., Spurgeon, S. L., Khan, S. H., Menchen, S. M., Heiner, C. R. & Chen, S. M.** (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4500-4504.
- Ross, J. S., Gray, K., Gray, G. S., Worland, P. J. & Rolfe, M.** (2003) Anticancer antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* **119**, 472-485.
- Rousseaux, J., Rousseau-Prevost, R. & Bazin, H.** (1986) Optimal conditions for the preparation of proteolytic fragments from monoclonal IgG of different rat IgG subclasses. *Methods Enzymol.* **121**, 663-669.
- Sahin, U., Kraft-Bauer, S., Ohnesorge, S., Pfreundschuh, M. & Renner, C.** (1996) Interleukin-12 increases bispecific-antibody-mediated natural killer cell cytotoxicity against human tumors. *Cancer Immunol Immunother.* **42**, 9-14.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J. & Russel, D. W.** (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T. Mullis, K. B. & Ehrlich, H. A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Schäfer, C.** (1998) Engineering und bakterielle Produktion der Antikörperfragmente HRS3c und A9 zwecks Herstellung eines bispezifischen F(ab)₂-Fragments. Diplomarbeit. Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt.
- Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C. & Marks, J. D.** (1996) Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementary determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* **263**, 551-567.
- Schiweck, W. & Skerra, A.** (1995) Fermenter production of an artificial Fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallisation through constant domain shuffling. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **23**, 561-565.
- Schiweck, W. & Skerra, A.** (1997) The rational construction fo an antibody against cystain: Lessons from the crystal structure of an artificial Fab fragment. *J. Mol. Biol.* **268**, 934-951.
- Schlapschy, M. & Skerra, A.** (2001) Purification and analysis of Strep-tagged antibody fragments. In: Kontermann, R. & Dübel, S. (Hrsg.) "Antibody Engineering." Springer Verlag, Heidelberg.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A.** (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J. Mol. Biol.* **297**, 1105-1120.
- Schmidt, A. M.** (1989) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In: *Protein structure, a practical approach* (Creighton, T. E., ed.) TRL Press, Oxford, chapter 11, 251-286
- Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A.** (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766.
- Schmidt, A. M., Bloß, I. & Skerra, A.** (1998) Improved folding of apo-retinol-binding protein in the periplasm of *E. coli*: positive influences of *dsbC* coexpression and of an amino acid exchange in the vitamin A binding site. *Protein Eng.* **11**, 601-607.

- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A.** (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Prot. Eng.* **6**, 109-122.
- Schmidt, T. G. M.** (1994) Generierung und Charakterisierung künstlicher Peptid-Streptavidinerkennung: Entwicklung eines C-terminalen Affinitätspeptids für den Nachweis und die Reinigung rekombinanter Proteine. Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/M.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A.** (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep Tag" and immobilized recombinant core streptavidin. *J. Chromatogr.* **676**, 337-345.
- Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H. H., Schaadt, M. & Diehl, V.** (1982) Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* **299**, 65-67.
- Segal, D. M., Urch, C. E., George, A. J. T. & Jost, C. R.** (1992) Bispecific antibodies in cancer treatment. In: *The biologic therapy of cancer*. Vol.2. No. 4 Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1-35.
- Segal, D. M., Weiner, G. J. & Weiner, L. M.** (2001) Introduction: bispecific antibodies. *J. Immunol. Methods* **248**, 1-6
- Shalaby, M. R., Shepard, H. M., Presta, L., Rodrigues, M. L., Beverley, P. C. L., Feldmann, M. & Carter, P.** (1992) Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the *HER2* protooncogene. *J. Exp. Med.* **175**, 217-225.
- Sharon, J.** (1990) Structural correlates of high antibody affinity: three engineered amino acid substitutions can increase the affinity of an anti-p-azophenylarsonate antibody 200-fold. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 4814-4817.
- Simmons, L. C. & Yansura, D. G.** (1996) Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **14**, 629-634.
- Singer, I. I., Kawka, D. W., DeMartino, J. A., Daugherty, B. L., Elliston, K. O., Alves, K., Bush, B. L., Cameron, P. M., Cuca, G. C., Davies, P., Forrest, M. J., Kazazis, D. M., Law, M.-F., Lenny, A. B., MacIntyre, D. E., Meurer, R., Padlan, E. A., Pandya, S., Schmidt, J. A., Seamans, T. C., Scott, S., Silberklang, M., Williamson, A. R. & Mark, G. E.** (1993) Optimal humanization of 1B4, an anti-CD18 murine monoclonal antibody, is achieved by correct choice of human V-region framework sequences. *J. Immunol.* **150**, 2844-2857.

- Skerra, A. & Plückthun, A.** (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041.
- Skerra, A. & Schmidt, T. G. M.** (2000) Use of the *Strep*-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271-304.
- Skerra, A.** (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Skerra, A., Dreher, M. L. & Winter, G.** (1991a) Filter screening of antibody Fab fragments secreted from individual bacterial colonies: Specific detection of antigen binding with a two-membrane system. *Anal. Biochem.* **196**, 151-155.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A.** (1991b) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology* **9**, 273-278.
- Skerra, A.** (1992) Phosphothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* **20**, 3551-3554.
- Skerra, A.** (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 256-262.
- Skerra, A.** (1994a) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* **141**, 79-84.
- Skerra, A.** (1994b) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A.** (2003) Imitating the humoral immune response. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 683-693.
- Smith C. A., Gruss, H.-J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Grabstein, K. H., Gliniak, B., McAlister, I. B., Fanslow, W., Alderson, M., Falk, B., Gimpel, S., Gillis, S., Din, W. S., Goodwin, R. G. & Armitage, R. J.** (1993) CD30 antigen, a marker for Hodgkin's Lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* **73**, 1349-1360.
- Sondermann, P., Huber, R. & Jacob, U.** (1999) Crystal structure of the soluble form of the human Fc γ -receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. *EMBO J.* **18**, 1095-1103.
- Sondermann, P. & Jacob, U.** (1999) Human Fc receptor IIb expressed in *Escherichia coli* reveals IgG binding capability. *Biol. Chem.* **380**, 717-721.

- Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V. & Jacob, U.** (2000) The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγTIII complex. *Nature* **406**, 267-273.
- Stalteri, M. A. & Mather, S. J.** (1995) A cross-linked monoclonal antibody fragment for improved tumor targeting. *Bioconjugate Chem.* **6**, 179-186.
- Stein, H., Mason, D.Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G., Gatter, K., Falini, B., Delsol, G., Lemke, H., Schwarting, R. & Lennert, K.** (1985) The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue. Evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* **66**, 848-858.
- Stemmer, W. P. C.** (1994) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10747-10751.
- Strachan, G., Williams, S., Moyle, S. P., Harris, W. J. & Porter A. J. R.** (1999) Reduced toxicity of expression, in *Escherichia coli*, of antipollutant antibody fragments and their use as sensitive diagnostic molecules. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 410-417.
- Studnicka, G. M., Soares, S., Better, M., Williams R. E., Nadell, R. & Horwitz, A. H.** (1994) Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementary-modulating residues. *Prot. Eng.* **7**, 805-814.
- Suresh, M. R., Cuello, A. C. & Milstein C.** (1986a) Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. *Methods Enzymol.* **121**, 210-228.
- Suresh, M. R., Cuello, A. C. & Milstein C.** (1986b) Advantages of bispecific hybridomas in one-step immunocytochemistry and immunoassays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7989-7993.
- Swartz, J. R.** (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 195-201.
- Tabor, S. & Richardson, C. C.** (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4767-4771.
- Tabor, S. & Richardson, C. C.** (1995) A single residue in DNA polymerase of *Escherichia coli* polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6339-6343.
- Talmadge, K., Kaufman, J. & Gilbert, W.** (1980) Bacteria mature preproinsulin to proinsulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3988-3992.
- Tamura, M., Milenic, D. E., Iwahashi, M., Padlan, E., Schlom, J. & Kashamiri, S. V.** (2000) Structural correlations of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-

- determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only. *J. Immunol.* **164**, 1432-1441.
- Tramontano, A., Chothia, C. & Lesk, A. M.** (1990) Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the V_H domains of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **215**, 175-182.
- Tso, J. Y., Wang, S. L., Levin, W. & Hakimi, J.** (1995) Preparation of bispecific F(ab')₂ targeted to the human IL-2 receptor. *J. Hematotherapy* **4**, 389-394.
- Vaughan, T. J., Osbourn, J. K. & Tempest, P. R.** (1998) Human antibodies by design. *Nature Biotechnology* **16**, 535-539.
- Verhoyen, M. E., Milstein, C. & Winter, G.** (1988) Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity. *Science* **239**, 1534-1536.
- Viera, J. & Messing, J.** (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Vogt, M. & Skerra, A.** (2001) Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J. Mol. Recognit.* **14**, 79-86.
- Voss, S. & Skerra, A.** (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.*, **10**, 975-982.
- Wall, J. G. & Plückthun, A.** (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 507-516.
- Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E.** (1985) An EBV membrane proteine expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**, 831-840.
- Ward, E. S.** (1992) Secretion of T cell receptor fragments from recombinant *Escherichia coli* cells. *J. Mol. Biol.* **224**, 885-890.
- Weiss, L. M., Chen, Y. Y., Liu, X. F. & Shibata, D.** (1991) Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am. J. Pathol.* **139**, 1259-1265.
- Wells, J. A.** (1990) Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry*, **29**, 8509-8517.
- Wels, W., Harwerth, I. M., Müller, M., Groner, B. & Hynes, N. E.** (1992) Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res.* **52**, 6310-6317.
- Wilson, I. A. & Stanfield, R. L.** (1993) Antibody-antigen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 113-118.

- Winkler, U., Gottstein, C., Schön, G., Kapp, U., Hansmann, M. L., Thorpe, P., Diehl, V. & Engert, A.** (1994) Successful treatment of disseminated human Hodgkin's disease in SCID mice with deglycosylated ricin A-chain immunotoxins. *Blood* **83**, 466-475.
- Winter, G. & Milstein, C.** (1991) Man-made antibodies. *Nature* **349**, 293-299.
- Winter, G. & Harris, W. J.** (1993) Humanized antibodies. *Immunol. Today* **14**, 243-246.
- Winter, G.** (1998) Synthetic human antibodies and a strategy for protein engineering. *FEBS Lett.* **430**, 92-94.
- Wright, A., Shin, S. U. & Morrison, S. L.** (1992) Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Critical Rev. Immunol.* **157**, 1156-1162.
- Wu, T. C., Mann, R. B., Charache, P., Hayward, S. D., Staal, S., Lambe, B. C. & Ambinder, R.F.** (1990) Detection of EBV gene expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* **46**, 801-804.
- Wülfing, C. & Plückthun, A.** (1994) Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli*. Influence of folding catalysts. *J. Mol. Biol.* **242**, 655-669.
- Wu, H., Nie, Y., Huse, W. D. & Watkins, J. D.** (1999) Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues. *J. Mol. Biol.* **294**, 151-162.
- Yang, W. P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R. & Barbas, C. F. 3rd** (1995) CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* **254**, 392-403.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J.** (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Young, L. S. & Rowe, M.** (1992). Epstein-Barr virus, lymphomas and Hodgkin's disease. *Semin. Cancer Biol.* **3**, 273-284.
- Zabriskie, D. W. & Arcuri, E. J.** (1986) Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. *Enzyme Microbiol. Technol.* **8**, 706-717.
- Zaccolo, M. & Gherardi, E.** (1999) The effect of high frequency random mutagenesis on in vitro protein evolution: a study on TEM-1 beta lactamase. *J. Mol. Biol.* **285**, 775-783.
- Zhao, H. & Arnold, F. H.** (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nuclei Acids Res.* **25**, 1307-1308.

-
- Zhu, Z., Lewis, G. D. & Carter, P.** (1995) Engineering High affinity humanized anti-p185her2/anti-CD3 bispecific F(ab')₂ for efficient lysis of p185HER2 overpressing tumor cells. *Int. J. Cancer* **62**, 319-324.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. A. Skerra danke ich für die Möglichkeit unter seiner Ägide meine Doktorarbeit anzufertigen. Sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft haben mich auf meinem Weg zum wissenschaftlichen Arbeiten ein entscheidendes Stück vorangebracht.

Ich danke allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München sowie der Abteilung Proteinchemie der Technischen Universität Darmstadt für ihre Kollegialität und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen langjährigen Mitstreitern Helga Gruber, Markus Fiedler, Marton Fogarasi, Steffen Schlehuber und Martin Vogt für die gemeinsame Zeit inner- und außerhalb des Labors.

Jan Anderl, Adam Chwistek, Nicole Haider und Kamyar Hadian bin ich dankbar für die wissenschaftlichen Beiträge, die im Rahmen eines Praktikums zu dieser Arbeit geleistet wurden.

Prof. Dr. Christoph Renner und Dr. Matthias Germer danke ich für ihre wissenschaftlichen Anregungen und ihre experimentelle Unterstützung.

Lebenslauf

Name Martin Schlapschy
Geburtsdatum 01. November 1972
Geburtsort Eichstätt, Landkreis Eichstätt

Schulbildung/Zivildienst

1979 – 1983 Grundschule Am Graben, Eichstätt
1983 – 1992 Willibald-Gymnasium, Eichstätt
1992 Abitur
1992 – 1993 Zivildienst als Rettungsdiensthelfer beim
Bayerischen Roten Kreuz in Eichstätt
Oktober 1993 Ausbildung zum Rettungssanitäter

Akademische Ausbildung

1993 – 1998 Biochemiestudium an der Universität Regensburg
August – Oktober 1994 Englisch-Sprachkurs an der University of California
at Berkeley, USA
Mai 1997 – Februar 1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. Jaenicke am Lehrstuhl für
Physikalische Biochemie der Universität Regensburg
Februar 1998 Abschluß des Studiums als Diplom-Biochemiker
ab Mai 1998 Promotion bei Prof. Dr. A. Skerra am Institut für Biochemie
der Technischen Hochschule Darmstadt
Dezember 1998-Mai 2002 Fortsetzung der Promotion bei Prof. Dr. A. Skerra am
Lehrstuhl für Biologische Chemie der TU München
ab August 2002 wissenschaftlicher Angestellter am Lehrstuhl für
Biologische Chemie der TU München

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit in der Abteilung Proteinchemie der Technischen Universität Darmstadt bzw. am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. A. Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Martin Schlapschy

Freising, 02. März 2004