

5 Diskussion

Die Erkennung eines HLA-Klasse I-Moleküls durch einen T-Zell-Rezeptor ist nicht nur von der Struktur des HLA-Moleküls, sondern auch von den Eigenschaften des gebundenen Peptids abhängig. Dabei sind die Rezeptoren der zytotoxischen T-Lymphozyten aufgrund der Selektionsvorgänge im Thymus (von Boehmer, 1994; Nossal, 1994) in der Lage, körpereigene von fremden Peptiden zu unterscheiden. Viele Einzelheiten der Wechselwirkung dieser Moleküle sind jedoch noch nicht genau bekannt. Die Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern mit T-Zell-Rezeptor-ähnlichen Spezifitäten könnte neue Kenntnisse zur Funktion der HLA/Peptid-Komplexe und ihrer Wechselwirkung mit T-Zell-Rezeptoren liefern. Auch für klinische Zwecke könnten HLA/Peptid-Komplex-spezifische Antikörper von großer Bedeutung sein, da sie für Untersuchungen an intakten Zellen bzw. Geweben *in vivo* sowie den Transport von Reagenzien an ihren Zielort herangezogen werden könnten. Die Verwendung dieser Antikörper dürfte zur Entwicklung neuer diagnostischer Präparate und neuer Immuntherapien beitragen.

Es gibt jedoch nur sporadische Publikationen über derartige Antikörper (Uchanska-Ziegler *et al.*, 1993; Dadaglio *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1997; Wolpl *et al.*, 1998), sicherlich deshalb, weil sie mit Hilfe der Hybridoma-Technologie nur schwer zu erhalten sind. Vor allem die Produktion von derartigen humanen Antikörpern für eine therapeutische Anwendung *in vivo* ist auf diesem Wege fast unmöglich. In den letzten Jahren sind Methoden entwickelt worden, ein breitgefächertes Repertoire von einkettigen antigenbindenden Antikörper-Fragmenten aus peripherem Blut zu klonieren und auf der Oberfläche von Phagen zu exprimieren (Winter *et al.*, 1994). Eine so erstellte Phagenbibliothek wird durch die Bindung der Phagenpartikel an ein Antigen selektioniert. Diese Methode erlaubt, aus einer "präimmunisierten" Phagenbibliothek ein scFv-Fragment herzustellen, welches das Maus-MHC-Antigen H-2K^k im Komplex mit dem Hemagglutininpeptid HA₂₅₅₋₂₆₂ erkennt (Andersen *et al.*, 1996). Allerdings werden bei dieser Technologie meistens gereinigte Antigene verwendet. Ein wichtiger Beitrag zur Anwendung von Phagenbibliotheken wäre die Etablierung einer Methode, die es erlaubte, die für HLA/Peptid-Komplexe spezifischen Antikörper mittels direkter Selektion an den antigenexprimierenden Zellen zu gewinnen und dadurch auf die Herstellung gereinigter HLA/Peptid-Komplexe zu verzichten.

5.1 Molekularbiologische Eigenschaften des TÛ165-scFv-Fragments

Antikörper mit einer T-Zellrezeptor-ähnlichen Spezifität mit Hilfe der herkömmlichen Hybridoma-Technik zu erzeugen, stellt eine große Herausforderung dar. Das hat mit den grundsätzlich unterschiedlichen Erkennungsaufgaben von T- und B-Zellen zu tun. Durch den Selektionsprozeß im Thymus werden die T-Zellen dazu “ausgebildet”, antigene Peptide nur im Zusammenhang mit HLA-Molekülen zu erkennen. Im Unterschied dazu sind B-Zellen nicht auf eigene HLA-Komplexe ausgerichtet und B-Zell-Rezeptoren (Antikörper) erkennen, unabhängig davon, ob sie löslich oder membrangebunden sind, nach außen gewölbte Zielstrukturen (McCallum *et al.*, 1996). In diesem Zusammenhang bestehen für beide Molekültypen (Antikörper bzw. T-Zellrezeptoren) fast gegensätzliche strukturelle Erfordernisse (Andersen *et al.*, 1996).

Von Uchanska-Ziegler *et al.* (1993) wurde der mAk TÛ165 hergestellt, der selektiv den Komplex aus HLA-B35-Molekülen und bestimmten, vom Epstein-Barr-Virus (EBV) abgeleiteten Peptiden erkennt. Offenbar tragen die Aminosäuren P1 und P4 des Peptids maßgeblich zum TÛ165-Epitop bei (Uchanska-Ziegler, nicht publizierte Ergebnisse). Das Epitop dieses Antikörpers ist jedoch nicht im Detail bekannt. Um die Grundlage der Wechselwirkung dieser Moleküle zu untersuchen, wurde ein scFv-Fragment hergestellt, wobei die V_H - und V_L -Gene mit universalen Primern (Dübel *et al.*, 1991) aus der RNA des TÛ165-Myelomhybrids amplifiziert wurden. Auf Grund der Vergleichsanalyse mit der Kabat-Datenbank wurde festgestellt, daß die verwendeten Vorwärtsprimer Sequenzänderungen an den Aminotermi der V_H - und der V_L -Fragmente verursachen, was die Affinität eines Antikörpers beeinträchtigen könnte. Deshalb wurden die Vorwärtsprimer auf Basis von jeweils mindestens fünf homologen Sequenzen optimiert.

5.1.1 Charakterisierung der Sequenzen

Ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit bestand in der die Bestimmung und Klassifizierung der V_H - und V_L -Sequenzen des Antikörpers TÛ165. Die Zugehörigkeit des klonierten Fragments zu einer Sequenzfamilie wurde durch Vergleichsanalyse der Nukleotidsequenzen der schweren und leichten Kette mit der Kabat-Datenbank untersucht. Die Sequenzen der V_H - und V_L -Region können dann aufgrund der Homologie (>80%) bestimmten Genfamilien zugeordnet werden.

Auch die von Chothia *et al.* (1989, 1992) beschriebenen Hauptkettenkonformationen (*canonical structures*) der hypervariablen Regionen wurden bestimmt. Aufgrund der Strukturanalyse mehrerer Antikörper wurde von den Autoren festgestellt, daß einige antigenbindende Schleifen trotz unterschiedlicher Peptidsequenz die gleichen Peptid-Rückgrat-Konformationen (Hauptkettenkonformationen) aufweisen. Diese werden durch bestimmte Aminosäuren in festgelegten Positionen definiert. Die meisten Schlüsselpositionen befinden sich in β -Faltblatt-Abschnitten und bestimmen nicht nur die Sekundärstruktur, sondern auch die Orientierung der Schleifen zueinander (Tramontano *et al.*, 1990). Die entsprechenden Aminosäuren sind nicht unbedingt konserviert. Es tritt aber in diesen Positionen nur ein ganz bestimmtes Spektrum von Seitengruppen auf, deren Variation untereinander jedoch nur unwesentliche Veränderungen der Hauptkonformation verursacht. Darüber hinausgehende Veränderungen der Primärstruktur können zu einem Verlust der Affinität des Antikörpers führen (Foot und Winter, 1992). Mit anderen Worten, die Hauptkonformationen beschreiben die Struktur der Schleifen bzw. der Antigen-Bindungsstelle im ganzen, wobei Sequenzunterschiede innerhalb der Bindungsstelle ihre Oberfläche modulieren. In Tabelle 5-I sind die nach Kabat *et al.* (1991) bestimmten CDR-Regionen und die strukturellen Schleifen-Regionen nach Chothia *et al.* (1989, 1992) sowie die die Hauptkonformation einer Schleife bestimmenden Reste gezeigt.

Tabelle 5-I. Position der CDR-Regionen (nach Kabat *et al.*, 1991), strukturellen antigenbindenden Schleifen und der Schlüsselpositionen (nach Chlothia *et al.*, 1989, 1992)

	Aminosäurenposition			
	Kabat	Chothia	Schlüsselpositionen	HK
CDR1/H1	31-35b	26-32	24, 26, 27, 29, 34, 94	3
CDR2/H2	50-65	52-56	52a, 54, 55, 71	4
CDR3/H3	95-102	96-101	*	*
CDR1/L1	24-34	26-32	2, 25, 29, 33, 71	4
CDR2/L2	50-56	50-52	48, 64	1
CDR3/L3	89-97	91-96	90, 95	3

HK-Zahl der bekannten Hauptkonformationen, "*" - für die H3-Schleife der schweren Kette sind keine Schlüsselpositionen bekannt.

TÜ165- μ -Kette

Die klonierte TÜ165- μ -Kette gehört zu der Maus-Immunglobulingruppe Ib und weist eine Homologie von 94% in der Peptidsequenz zum mAk H220-22 (Kavalier *et al.*, 1990) auf. Die Hauptkonformationen der CDR1- und CDR2-Regionen (H1 und H2) sind den bekannten

Strukturen verwandt. Die H1-Konformation der TÛ165-V_H wird durch die Aminosäuren Val24, Gly26, Phe27, Leu29, Val34 und Thr94 bestimmt. Das entspricht der von Chothia *et al.* (1989, 1992) beschriebenen Struktur H1.1 (Tab. 5-II). Threonin wurde von diesen Autoren zwar in der Position 94 angetroffen, nicht jedoch in der hier vorgefundenen Kombination von Aminosäuren. Der Rest in der Position 94 ist für die Konformation der ersten Schleife wichtig. Die Vergleichsanalyse der bekannten Immunglobulinsequenzen vom Menschen und von Nagern (Kabat *et al.*, 1991) zeigte, daß in dieser Position am häufigsten die Reste mit einer großen positiv-geladenen Seitenkette wie Arginin oder seltener Lysin vorkommen. Nur vereinzelt werden sie durch Reste wie Ser, Thr oder Ala ersetzt (Chothia *et al.*, 1992). Dies ist dadurch zu erklären, daß der Rest in der Position 94 eine wesentliche Rolle auch in der Konformation der H3-Schleife spielt, die für die Feinspezifität eines Antikörpers maßgeblich verantwortlich ist. Der Argininrest in Position 94 weist eine Wechselwirkung mit dem invarianten Aspartatrest in Position 101 der CDR3-Region durch die Bildung einer Salzbrücke auf. Eine Substitution durch kleinere Aminosäurereste wie z.B. Arg94 durch einen Serinrest (Novotny *et al.*, 1990) oder Asp101 durch Alanin (Chien *et al.*, 1989) kann zu einer drastischen Senkung der Affinität führen.

Tabelle 5-II. Vergleichende Analyse der Schlüsselpositionen der H1.1-Konformation nach Chothia *et al.* (1992) mit TÛ165 und H220-22.

	V _H -Aminosäureposition					
	24	26	27	29	34	94
H1.1	Ala, Val	Gly	Tyr, Phe, Gly	Phe, Leu	Met, Leu, Val	Arg, Ala, Thr
TÛ165	Val	Gly	Phe	Leu	Val	Thr
H220-22	Val	Gly	Phe	Leu	Val	Arg

Da die TÛ165-V_H-Region zweimal unabhängig kloniert wurde (siehe Ergebnisse 4.1), handelt es sich bei dem Arg94→Thr-Austausch aller Wahrscheinlichkeit nach um eine somatische Mutation. Diese somatische Mutation könnte durch eine größere konformationelle Flexibilität, eine Veränderung der Ladungsverhältnisse, ein anderes Wasserstoffbrückenmuster oder durch eine Veränderung der Hydrophobizität zu einer Erhöhung der Affinität führen.

In einer V_H-Sequenz besteht CDR2 aus den Resten 50-65 (Kabat *et al.*, 1991). Die Seitenketten in den Positionen 48-52 bilden Wasserstoffbrücken mit den Seitenketten in den Positionen 56-60, wobei eine β -Haarnadelstruktur entsteht. Sequenzvariationen dieser Reste haben nur sehr geringe oder keine Wirkung auf die Hauptkonformation der zweiten (H2) Schleife. Der bestimmende Faktor ist die Haarnadelstruktur (Reste 53-55), die sich bei

verschiedenen Antikörpern durch Sequenz und Länge unterscheidet und drei bis sechs Reste enthalten kann. Die TÛ165-Haarnadelstruktur besteht aus drei Resten und weist das für die Position 55 charakteristische Glycin auf. Die Orientierung der H2-Schleife wird durch die Aminosäure in der Position 71 in FR3 bestimmt, die die Position der H1 und H2-Schleifen zueinander bestimmt (Tramontano *et al.*, 1990). Dabei reagiert die Seitenkette 71 mit der von Gly55 (H2) und Phe29 oder Leu29 (H1). Die meisten Antikörper mit der Tripeptid-Haarnadelstruktur weisen Arginin oder Lysin in der Position 71 auf. Da die TÛ165- μ -Kette die entsprechenden Aminosäuren Gly55 und Lys71 aufwies, konnte sie eindeutig der Konformation H2.1 zugeordnet werden.

TÛ165- κ -Kette

Das Myelomhybrid TÛ165 stellt das Fusionsprodukt von B-Lymphozyten einer mit BM2.2.3-Zellen immunisierten BALB/c-Maus und Maus-Myelomzellen (P3-NS1/1-Ag4-1) dar (Uchanska-Ziegler *et al.*, 1993). Es ist bekannt, daß die Myelomhybride, bei denen einer der Fusionspartner P3-NS1/1-Ag4-1 ist, zusätzlich zur aus der B-Zelle stammenden L-Kette, häufig die MOPC-21- κ -Kette (Ig-Gruppe V κ -21E; Carrol *et al.*, 1988) zur Expression bringen. Dies kann sich auf die Spezifität auswirken. Zum Beispiel zeigten Kipriyanov *et al.* (1996), daß nur die scFv-Fragmente, die die V κ -Kette aus dem B-Lymphozyten enthielten, an das CD19-Molekül spezifisch binden konnten. Im hier vorliegenden Fall gehört die klonierte TÛ165-V κ -Kette nicht zu der Ig-Gruppe 21E, da die Sequenzhomologie nur 60% betrug. Die TÛ165-V κ -Region gehört zur Untergruppe V κ 9 und weist die höchste Homologie (97 %) zum

Tabelle 5-III. Vergleich der Schlüsselpositionen der Hauptkettenkonformationen der leichten Kette L1.2, L2.1 und L3.1 nach Chothia *et al.* (1989) mit TÛ165 und CNJ206.

	Aminosäureposition								
	2	25	29	33	48	64	71	90	95
L1.2	Ile	Ala	Ile, Val	Leu	-	-	Tyr, Phe	-	-
L2.1	-	-	-	-	Ile	Gly	-	-	-
L3.1	-	-	-	-	-	-	-	Gln, His, Asn	Pro
TÛ165	Ile	Ala	Ile	Leu	Ile	Gly	Tyr	Gln	Pro
CNJ206	*	Ala	Ile	Leu	Ile	Gly	Tyr	Gln	Pro

* - diese Aminosäure wurde nicht bestimmt.

V κ -Fragment des Antikörpers CNJ206 auf, der gegen p-Nitrophenylphosphat gerichtet ist. Die L1-Schleife konnte der Hauptkonformation L1.2 zugeordnet werden, die durch die Aminosäuren Ile2, Ala25, Ile29, Leu33 und Tyr71 ausgebildet wird. Die L2-Schleife nimmt die

einzig bekannte Konformation L2.1 (Ile48 und Gly64) ein; die Reste Gln90 und Pro95 entsprechen den beschriebenen Aminosäuren in diesen Positionen und bestimmen die Konformation L3.1. (Tab. 5-III).

Die Vergleichsanalyse zeigte, daß es sich bei den klonierten Genen um die V_H- und V_L-Regionen eines Immunglobulins handelt. Die leichte Kette hat korrekt strukturierte antigenbindende Schleifen. Bei der schweren Kette gibt es nur eine einzige Abweichung in Position 94, die schon oben ausführlich erörtert wurde.

5.1.2 Probleme der Expression des TÛ165-scFv-Fragments in *E. coli*

Das Antikörperfragment wurde im *E.coli*-Stamm JM109 exprimiert. Die Expression in das Bakterienperiplasma ist inzwischen eine weitverbreitete Methode für die Herstellung löslicher funktioneller scFv-Fragmente geworden. Das am N-Terminus des Fragments fusionierte Signalpeptid steuert die Sekretion des Proteins in das Periplasma, wo die Ausbildung der für die native Konformation charakteristischen Disulfidbrücken stattfindet. Diese Methode imitiert die Sekretion der vollständig gefalteten Antikörper in Vertebraten. Jedoch unterscheiden sich die Mengen löslichen Proteins im Periplasma für verschiedene scFv-Fragmente drastisch. Im Falle von TÛ165 hat die Analyse der Zellfraktionen gezeigt, daß nur sehr geringe Mengen löslicher TÛ165-scFv-Fragmente im Periplasma vorhanden sind. Der größte Teil des exprimierten Fragments wird in Form von periplasmatischen *inclusion bodies* akkumuliert. Es ist bekannt, daß manche Proteine nach der Sekretion in das Periplasma unlösliche Aggregate bilden, sogenannte periplasmatische *inclusion bodies* (Bowden *et al.*, 1991; Denzin *et al.*, 1991; Malby *et al.*, 1993; George *et al.*, 1994; Kypriyanov *et al.*, 1994; de Jonge *et al.*, 1995; Nieba *et al.*, 1997). Die Umstände, die diesen Prozeß auslösen und bestimmen, können ganz unterschiedlich sein. Bei weniger stabilen rekombinanten Proteinen spielt die Konzentration des exprimierten Proteins im Periplasma eine große Rolle (Plückthun, 1992). Wenn der Promotor überaktiviert ist, wird das Protein in großen Mengen produziert. Das führt zur Erhöhung der Proteinkonzentration im Periplasma und zur Aggregation des nicht stabilen Produktes. Um eine Aggregation zu verhindern, muß die Induktion bei niedrigeren Temperaturen durchgeführt werden. Mit dem Ziel, den Anteil von löslichem scFv-Fragment im Periplasma zu erhöhen, wurde die Wirkung der Temperatur und IPTG-Konzentration untersucht. Höhere Konzentrationen von IPTG (100 µM) und eine Inkubation bei 37°C führten zu einer höheren Produktion von Protein, nicht aber zu einer Erhöhung des Anteils löslichen Proteins.

Außerdem wurde bei diesen Bedingungen eine größere Menge der nicht prozessierten Form im Zytoplasma akkumuliert. Das kann dadurch erklärt werden, daß wegen der Überaktivierung des Promotors zuviel Protein produziert wird und dadurch Zellmembran und Periplasma „überlastet“ sind. Bei niedrigeren Konzentrationen und Temperaturen wird alles Vorläufer-Protein in das Periplasma sezerniert, aber trotzdem fast vollständig als *inclusion bodies* abgelagert. Das könnte darauf hinweisen, daß das TÛ165-scFv-Fragment, bedingt durch seine Primärstruktur, zur Bildung von periplasmatischen *inclusion bodies* neigt.

Der molekulare Mechanismus des Sekretionsprozesses ist, trotz zahlreicher Studien (Plückthun *et al.*, 1996), noch nicht vollständig geklärt. Sicherlich wird der Prozeß durch solche Faktoren wie Proteinstabilität, Proteaselabilität und Toxizität des rekombinanten Proteins beeinflusst. In jüngster Zeit wurde aber berichtet, daß der bestimmende Faktor des Faltungsprozesses im Periplasma die Sequenz des Fragments ist (Nieba *et al.*, 1997; Knappik und Plückthun, 1995). Es wurde gezeigt, daß die Primärstruktur einen entscheidenden Einfluß auf die Stabilität eines scFv-Fragments ausübt. Untersucht man die Struktur eines Fab-Fragments, so zeigt sich, daß es eine komplette selbständige Untereinheit eines Antikörpers ist, die mit dem Rest durch einen flexiblen Scharnierabschnitt verbunden ist, zwischen denen es keine Protein-Protein-Wechselwirkung gibt. In einem Fab-Fragment interagieren die variablen Domänen mit den konstanten Domänen vor allem durch hydrophobe Reste. Bei einem scFv-Fragment ist die variable Domäne jedoch von den konstanten Domänen getrennt, und die hydrophoben Reste sind solvatisiert. Diese exponierten hydrophoben Reste können den Faltungsweg durch die Bildung von Zwischenprodukten beeinflussen und zur Aggregation der Fragmente führen. Eine Optimierung bestimmter Teile, die nicht an der Wechselwirkung mit dem Antigen beteiligt sind und die beschriebenen unerwünschten Effekte auslösen, kann die Expression der löslichen Fragmente erhöhen. So führte die Substitution einiger dieser Reste durch hydrophilere zur Erhöhung der Ausbeute an löslichem Fragment auf das 25-fache (Nieba *et al.*, 1997).

Die periplasmatischen *inclusion bodies* wurden bei stark denaturierenden Bedingungen gelöst und die scFv-Fragmente mittels IMAC gereinigt. Das Protein wurde durch Dialyse rekonstituiert. Die Ausbeute an Protein fiel niedriger aus als bei Kypryanov *et al.* (1994) und betrug etwa 1 mg rekonstituiertes Protein je 1 l Bakterienkultur. Eine höhere Produktion war nicht möglich, weil diese Bedingungen zur Ablagerung der nicht prozessierten Form im Cytoplasma führten. Diese kann jedoch nicht durch das verwendete Reinigungsverfahren von periplasmatischen *inclusion bodies* getrennt werden.

5.1.3 Spezifitätsunterschiede zwischen dem monoklonalen Antikörper TÜ165 und dem TÜ165-scFv-Fragment

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Spezifität des erhaltenen TÜ165-scFv-Fragments zu charakterisieren und mit der des ursprünglichen Antikörpers zu vergleichen. Die Spezifität des hergestellten Fragmentes wurde an menschlichen HLA-typisierten Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie getestet. Bei der Analyse ergab sich, daß sich das Fragment in seinem Verhalten vom ursprünglichen Antikörper unterschied. Das scFv-Fragment war zwar HLA-B35-spezifisch, erkannte aber diese Moleküle auf peptidunabhängige Weise.

Die Auswahl geeigneter Analysebedingungen für das scFv-Fragment erwies sich schwieriger als erwartet. Der wichtigste Analyse-Parameter, den es zu optimieren galt, war die Konzentration des angesetzten Fragments, da festgestellt wurde, daß bei höheren Konzentrationen das Fragment unspezifisch an alle getestete Zellen bindet. Hohe Konzentrationen des Fragments führten dazu, daß gemäß dem Massenwirkungsgesetz selbst Moleküle mit niedriger Affinität banden. Je niedriger jedoch die Konzentration eines oder beider Reaktionspartner lag, desto höher muß die Bindungskonstante sein, um eine Assoziation an das Antigen zu gewährleisten. Damit verringerte sich die Wahrscheinlichkeit von unspezifischer Aggregation ohne optimalen, spezifischen Antigen-Antikörper-Kontakt. Bei einer Konzentration von 25 µg/ml (80 nM) reagierte das Fragment nur mit der HLA-B35-positiven Zelllinie BM28.7.

Der ursprüngliche Antikörper TÜ165 erkennt das HLA-B35-Molekül spezifisch. TÜ165 bindet nur dann, wenn bestimmte Peptide an die B35-Moleküle gebunden sind. Diese Peptide stammen aus Produkten der Genexpression des EB-Virus', die durch die Transformation der Zelle mit dem Virus induziert wurde (Uchanska-Ziegler *et al.*, 1993). Die Untersuchung des Fragments an B35-positiven und B35-negativen lymphoblastoiden B-Zelllinien hat gezeigt, daß das hergestellte Fragment nur mit HLA-B35-positiven Zelllinien reagierte. Im Unterschied zu TÜ165 erkannte das scFv-Fragment sowohl mit EBV transformierte als auch nichttransformierte Zelllinien. Hervorzuheben ist, daß TÜ165 strikt spezifisch mit bestimmten B35/Peptid-Komplexe reagiert, während das scFv zwar B35 erkennt (auch unbeladen), aber ein bestimmtes Peptid nicht mehr benötigt wird. Das deutet darauf hin, daß das Fragment ein Epitop erkennt, das unabhängig von einer Transformation mit EBV exprimiert ist. In Frage kommen sowohl unbeladene HLA-B35-Moleküle, die auf der Zelloberfläche in geringer Menge vorhanden sind, als auch Komplexe zwischen B35-Molekülen und nicht aus EBV-stammenden

Peptiden. Dafür spricht auch die Tatsache, daß das TÛ165-scFv-Fragment einerseits mit BM36.1-Zellen reagierte, andererseits aber keinen Unterschied in der Reaktion mit dem B35/EBV-Peptid- und B35/nef-Peptid-Komplex gezeigt hat. Die Reaktivität des TÛ165-scFv-Fragments ist, obwohl HLA-B35 spezifisch, eindeutig breiter als die des Originalantikörpers. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Feinspezifität eines scFv-Fragments nicht notwendig identisch mit der des mAk sein muß, von dem es abgeleitet wurde.

Es wird allgemein angenommen, daß ein scFv-Fragment die gleiche Spezifität für das Antigen aufweist, wie der vollständige Antikörper oder das Fab-Fragment. Das stimmt sowohl für die meisten scFv-Fragmente mit einem $(\text{Glu}_4\text{Ser})_3$ - als auch für die mit dem hier verwendeten YOL-Linker (Glockshuber *et al.*, 1990; Kipriyanov *et al.*, 1994; Kipriyanov *et al.*, 1996). In der Literatur ist allerdings eine Verringerung der Affinität von scFv-Fragmenten im Vergleich mit dem entsprechenden Fab-Fragment und dem kompletten Antikörper schon beschrieben worden. Bei Tavladoraki *et al.* (1993) lag die Affinität des scFv-Fragments (spezifisch für das Hüllprotein eines Pflanzenvirus) um zwei Größenordnungen niedriger. Bruyns *et al.* (1996) fanden eine 80-fache Verringerung für den anti-Kreatinkinase-mAk vor. Roggenbuck *et al.* (1994) beobachteten 800-fach geringere Affinität des scFv-Fragments eines polyreaktiven IgM (spezifisch für RNase A, humanes Myoglobin und κ -Kasein). Diese Veränderung der Affinität könnte durch Konformationsänderungen verursacht werden, die mit dem Verlust der konstanten Domäne in Zusammenhang stehen, falls die Bindungsstelle im Fab-Fragment durch die Disulfidbrücke zwischen den konstanten Domänen stabilisiert ist. Eine Lösung des Problems wäre, ein Fab-Fragment von TÛ165 herzustellen und seine biochemischen Eigenschaften zu untersuchen. Eine Verbesserung könnte auch durch eine Optimierung der Linkerlänge erreicht werden.

Eine geringere Affinität gegenüber HLA-B35 Molekülen mag auch durch den Wegfall des Aviditätseffekts, der für pentamere IgM-Moleküle typisch ist, verursacht werden (Roggenbuck *et al.*, 1994). Der native pentamere Antikörper kann prinzipiell mit mehreren Epitopen gleichzeitig reagieren, wodurch IgM-Moleküle antigene Determinanten mit höherer Gesamtaffinität (Avidität) als einfache scFv erkennen. Der Affinitätsverlust beim Übergang vom vollständigen Antikörper zum scFv-Fragment kann hier nicht abgeschätzt werden, da weder für das Fragment noch für den Antikörper exakte Daten vorliegen.

5.2 Methodische Aspekte einer Selektion von scFv-Fragmenten mit intakten Zellen

Die Expression von Antikörperfragment-Repertoires auf der Oberfläche filamentöser Phagen und die Selektion der Phagen durch Bindung an ein Antigen eröffnete vor einigen Jahren neue Möglichkeiten für die Herstellung hochspezifischer rekombinanter Antikörper (Winter und Milstein, 1991). Diese Methode sollte es auch prinzipiell erlauben, hochspezifische humane Antikörper ohne Anwendung der aufwendigen Hybridomatechnologie zu erzeugen. Außerdem gelingt es mit dieser Methode, Toleranzmechanismen des Immunsystems zu umgehen und scFv-Fragmente menschlicher Immunglobuline herzustellen (Griffiths *et al.*, 1993). Die Anreicherung der spezifischen Phagen wird durch mehrmals wiederholte Selektionsrunden mit dem entsprechenden Antigenen erzielt. Die Herausforderung der vorliegenden Arbeit bestand in der Selektion von monoklonalen Reagenzien aus einer Phagenbibliothek unter Verwendung von Zellen als Matrix. Ziel war es, scFv-Fragmente, die für HLA-B35/Peptid-Komplexe spezifisch sind, zu gewinnen. Die Chancen, ein hochspezifisches Reagenz aus einer Bibliothek zu gewinnen, hängen von verschiedenen Faktoren ab. In erster Linie wird dies von der Komplexität der angewendeten Phagenbibliothek sowie von der Anreicherungs-methode bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine semisynthetische Phagenbibliothek eingesetzt, die über 10^8 verschiedene Klone umfaßt (Nissim *et al.*, 1994). Aus dieser Bibliothek sind bereits scFv-Fragmente mit Spezifitäten gegen verschiedene Proteine, einschließlich p53 und T-Zell-Rezeptoren aus der Maus, isoliert worden. Die gewonnenen Fragmente erkannten die Antigene im ELISA sowie auf intakten Zellen. Entsprechende Ergebnisse wurden auch in unserem Labor mit rekombinanten NK (*natural killer*)-Zellrezeptoren erhalten (Uchanska-Ziegler *et al.*, 1998). Eine Selektion besteht aus Bindungs-, Wasch- und Elutionschritten, gefolgt von der Reinfektion der Bakterien mit eluierten Phagen und der Anzucht der angereicherten Phagenpopulation. Die Selektion mit gereinigten Antigenen ist bereits gut etabliert, wobei das Antigen auf einer Festphase, z.B. Plastikröhrchen oder Latexkügelchen absorbiert wird (Winter *et al.*, 1994; Hoogenboom, 1997). In diesem Fall wird die Bibliothek lediglich mit einem einzelnen, in großer Menge vorhandenen Antigen konfrontiert.

Die Selektion einer Phagenbibliothek mit Eukaryonten-Zellen stellt eine bei weitem größere Herausforderung dar: Im Unterschied zu gereinigten Antigenen ist das entsprechende Oberflächenantigen nur ein Protein aus einer Vielzahl anderer auf der Zelloberfläche. Deshalb wird bei jeder Selektionsrunde die Phagenpopulation nicht nur mit den für das gewünschte

Antigen spezifischen Phagen, sondern auch mit Phagen, welche irrelevante Antigene erkennen, angereichert. Somit ist der Erfolg einer solcher Selektion davon abhängig, ob es möglich ist, die gewünschte Spezifität getrennt zu selektionieren. Um dies zu erreichen, wurde mit Hilfe einer Präabsorption der Phagen versucht, Partikel, die an irrelevante Antigene binden, aus der Population zu entfernen. Die Methode der Präabsorption wurde erfolgreich von Marks *et al.* (1993) angewendet. Die Autoren präinkubierten die Bibliothek mit Zellen, die das Zielantigen nicht trugen. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden mutierten Zelllinien BM19.7 (HLA-A2, B13, Bw4) und BM28.7 (HLA-A1, B35 und Bw6) ausgewählt. Die beiden Zelllinien stammen aus der gleichen Mutterzelle BJAB-B95.8.6 und unterscheiden sich, soweit bekannt, lediglich in der Expression polymorpher HLA-Moleküle (Volz *et al.*, 1992). Die Phagenbibliothek wurde auf den HLA-B35 exprimierenden BM28.7-Zellen selektioniert. Vor jeder Selektionsrunde wurde die Phagenpopulation mit BM19.7-Zellen präabsorbiert.

Die Selektion wurde mit fixierten Zellen durchgeführt. Der Vorteil von auf diese Weise präparierten Zellen besteht darin, daß sie tiefgefroren aufbewahrt werden können und dadurch immer verfügbar sind. Außerdem können sie bei hoher Geschwindigkeit abzentrifugiert werden, ohne zu lysieren. Diese Eigenschaft erleichtert den Waschschriff, bei dem die nichtgebundenen Phagen abgetrennt werden. In einem Kontrollexperiment mit spezifischen Antikörpern wurde überprüft, ob die fixierten Zellen über intakte HLA-Klasse I-Determinanten verfügen. Sowohl der für die schweren Ketten der HLA-B- und C-Moleküle spezifischen mAk HC10 als auch der mAk W6/32.HL, welcher den Komplex von Klasse I-schweren Kette und β_2m erkennt, reagierten mit beiden Zelllinien. Das zeigte, daß die mit Glutaraldehyd behandelten Zellen auf ihrer Oberfläche auf erwartete Weise HLA-Klasse I-Moleküle exprimieren.

Da die fixierten Zellen durch Glutaraldehyd kovalent agglutiniert werden, bilden sie Klumpen und sind damit für die Durchflußzytometrie nicht geeignet. Für die Analyse der Bindung selektionierter Phagen wurde ein ELISA mit fixierten Zellen verwendet. Wie die Ergebnisse zeigen, erlaubt diese Methode eine schnelle Bestimmung der Bindung einer Phagenpopulation an die Zellen. Von Nachteil ist, daß im Unterschied zur FACS-Analyse die Zellen bei der Detektion nicht genau gezählt werden können. Um zuverlässige Daten zu erhalten, muß man von jeder Probe drei Ansätze vorbereiten, wofür insgesamt $1,5 \times 10^6$ Zellen benötigt werden. Diese Menge liegt wesentlich über dem Verbrauch einer üblichen FACS-Analyse (5×10^5).

Wie in Abschnitt 4.6 gezeigt wurde, war es nicht möglich, aus der semisynthetischen Phagenbibliothek monoklonale Phagen der gewünschten Spezifität zu erhalten. Nach der

vierten Runde der Selektion wurde die Population mit Phagen angereichert, die zwar auf zufriedenstellende Weise an BM28.7 banden, aber immer noch eine Reaktivität mit BM19.7 aufwiesen. Es wurden insgesamt vier verschiedene scFv-Fragmente isoliert. Hierbei gehört scFv3 zur Hauptgruppe, die etwa die Hälfte der ganzen Population ausmachte und die Reaktion der Population dominierte. Das scFv-Fragment 1 zeigte eine starke Reaktion mit beiden Zelllinien und stellt einen Einzelklon dar. Auch zwei schwächer bindende Fragmente, nämlich scFv4 und scFv22, wurden isoliert. Es war jedoch nicht möglich, ein scFv-Fragment zu isolieren, das ausschließlich mit BM28.7 reagierte.

Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in den schwierig anzupassenden Bedingungen für die Selektion. Die Komplexität von Zellen als Antigen verlangt die Anwendung eines Präabsorptionsschrittes, dessen Wirkungsgrad von der Affinität jedes einzelnen scFv-Fragments und von der Antigendichte auf der Zelloberfläche abhängt. Die Geschwindigkeit der Bindung des Phagen (*on rate*) an ein Oberflächenantigen ist niedrig, da dieser Vorgang diffusionsgesteuert ist. Je höher die Dichte der Bindungsstellen auf der Zelloberfläche, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines produktiven Zusammenstoßes. Die Methode der Präabsorption ist somit besonders wirksam bei der Entfernung von hochaffinen Phagen, die an besonders stark auf der Oberfläche vertretene Antigene binden (Marks *et al.*, 1993). Damit ist eine Präabsorption "blind" im Sinne der vom Anwender beabsichtigten Auswahl. Die Wahrscheinlichkeit des Gelingens einer Selektion von Phagen mit Hilfe von Zellen hängt von der relativen Dichte der "anvisierten" Moleküle ab (Anzahl der "Zielmoleküle" im Vergleich zur Anzahl der antigenen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche). Marks *et al.* (1993) setzten als Untergrenze für die Verwendbarkeit einer auf Zellen basierten Selektion 2000-5000 "Zielmoleküle" pro Zelle an. Hughes-Jones *et al.* (1994) isolierten scFv, die spezifisch für menschliche Blutgruppen-Antigene sind. Die scFv erkannten 17 000-40 000 Moleküle pro Zelle mit einer mittleren Bindungskonstante von 10^7 M^{-1} . Die in dieser Arbeit verwendete mutante Zelllinie BM28.7 exprimiert von jedem HLA-A oder B-Molekül etwa 50.000 je Zelle (persönliche Mitteilung von Prof. Dr. A. Ziegler). Damit liegt die Antigendichte höher als die gesetzte Untergrenze. Das Hauptproblem für diese Selektion war somit wahrscheinlich in der unzureichenden Affinität begründet.

Ein wichtiger Faktor für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Selektion, nämlich die Antigenität (Novotny, 1991) der unterschiedlichen Zelloberflächen-Moleküle im Vergleich zu der der HLA-Moleküle, läßt sich nur schwer einschätzen. Die beiden oben beschriebenen Aspekte, Dichte und Antigenität der "Zielmoleküle", sind wichtige Parameter für Auswahl der

Konzentrationsverhältnisse, das heißt, der absoluten Konzentration von Phagen und Zellen sowie deren Verhältnis. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt liegt darin, daß ein gegebener HLA-B35/Peptid-Komplex nur eine Subpopulation der vorhandenen B35/Peptid-Komplexe darstellt (maximal zirka 10%). In dieser Arbeit konnte bei der Auswahl der Konzentrationsbedingungen nur auf Schätzungen zurückgegriffen werden.

Daß die erhaltenen Antikörper trotz der Präabsorption mit BM19.7 noch über eine Reaktivität mit dieser Zelllinie verfügen, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die HLA-Moleküle für diese Methode in zu geringer Menge vorhanden waren und Phagen selektioniert wurden, die andere Antigene banden, welche auf beiden Zellen vertreten sind. Die gewonnenen scFv-Fragmente wurden an lebenden Zellen in der Durchflußzytometrie getestet. Es konnte keine Abhängigkeit der Reaktivität von der Expression bestimmter HLA-Moleküle auf verschiedenen Zelllinien festgestellt werden. Das scFv-Fragment 4, das am schwächsten im ELISA reagierte, besaß keine Reaktivität mit lebenden Zellen. Die Reaktion der anderen drei Klone war schwach. Mit Hilfe der vorliegenden Daten war es demzufolge nicht möglich, die genaue Spezifität der Fragmente zu bestimmen.

Die "Nissim-Bibliothek" besitzt ein relativ kleines Repertoire von scFv-Klonen (10^8), so daß erwogen werden muß, ob diese Bibliothek überhaupt eine Spezifität für HLA-B35-Moleküle enthält. Selbst durch eine Selektion mit einem gereinigten rekombinanten B35/Peptid-Komplex ist es nicht gelungen, aus dieser Bibliothek ein scFv-Fragment zu gewinnen, das den Komplex auch auf der Zelloberfläche spezifisch erkennt (Menßen, 1997). Von Andersen *et al.* (1996) wurde eine aus einer präimmunisierten Maus stammende Phagenbibliothek mit einem MHC/Peptid-Komplex selektioniert. Trotz der Präimmunisierung konnte nur ein einziges spezifisches Fab-Fragment isoliert werden. Die Herstellung derartiger humaner scFv- oder Fab-Fragmente ist jedoch wegen des erforderlichen Präimmunisierungsschritts nicht möglich. Wahrscheinlich müssen für derartig komplexe Antigene größere Phagenbibliotheken verwendet werden, wie z.B. die von Vaughan *et al.* (1996) vor kurzem konstruierte synthetische Phagenbibliothek mit einem Repertoire von $1,4 \times 10^{10}$ Klonen.

Alle bisher bekannten Arbeiten über Selektionen, bei denen ausschließlich auf Zellen als selektionierendem Antigen zurückgegriffen wurde, beschreiben die Herstellung von menschlichen scFv-Fragmenten gegen bestimmte Zellpopulationen. De Kruif *et al.* (1996) gelang es, aus einer synthetischen Bibliothek ($3,6 \times 10^8$ Klone) scFv-Fragmente zu isolieren, die Zellsubpopulationen von Blutleukozyten färben. Cai und Garen (1995) selektionierten melanomspezifische scFv-Fragmente aus einer Bibliothek, die aus B-Lymphozyten von

Melanompatienten abgeleitet wurde. Die Patienten wurden vorher mit genetisch veränderten Melanomzellen immunisiert, um eine Immunantwort zu provozieren. Somit war die entsprechende Bibliothek "präimmunisiert". In diesen Arbeiten wurden scFv-Fragmente selektioniert, die ein auf der Oberfläche sehr stark vertretenes Markermolekül erkennen. In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig zu verstehen, daß, wie Hoogenboom (1997) unterstrich, die Anreicherung scheinbar spezifischer Reagenzien an sich noch kein Beweis für den Erfolg einer subtraktiven Selektion ist.

Systematische Untersuchungen verschiedener Anreicherungsverfahren sind nötig, um eine zuverlässige Selektionsmethode unter Verwendung von Zellen zu etablieren. Die bekannten Selektionsmethoden können, wie die vorliegende Arbeit zeigt, nicht einfach auf HLA/Peptid-Komplexe übertragen werden. Besonders, wenn, wie hier, die Selektion auf kleine Antigenunterschiede ausgerichtet ist. Andersen *et al.* (1996) haben eine hybride Selektion vorgeschlagen, bei der die Bibliothek abwechselnd unter Verwendung der Zellen, die den HLA/Peptid-Komplex präsentieren und des gereinigten HLA/Peptid-Komplexes selektioniert wird. Auf diese Weise könnte es möglich sein, den oben genannten Zellmatrix-Effekt zu unterdrücken. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß sie eine aufwendige Herstellung eines HLA/Peptid-Komplexes *in vitro* oder eine Reinigung der Moleküle aus Zell-Lysaten einschließt. Eine Möglichkeit für die Gewinnung eines HLA-B35/Peptid-Komplex-spezifischen scFv-Fragments bestünde in der hybriden Selektion einer hochkomplexen Bibliothek. Dabei könnten die Phagen abwechselnd auf den lebenden, mit dem Peptid LPPLDITPY beladenen BM36.1-Zellen und auf dem rekombinanten HLA-B35/Peptid-Komplex (Menßen *et al.*, 1999) selektioniert werden.

Wie neuere Studien zeigen, ist es grundsätzlich möglich, mit Hilfe von Phagenbibliotheken nicht nur HLA-spezifische scFv-Fragmente (Pistillo *et al.*, 1997) herzustellen, sondern auch solche, die mit HLA/Peptid-Komplexen auf peptidabhängige Weise reagieren (Andersen *et al.*, 1996). Derartige Reagenzien könnten in der serologischen Analyse, z.B. für die Typisierung der Zellen in der Transplantationsmedizin, für die Diagnostik sowie für therapeutische Zwecke (*in vivo*-Szintigraphie und -Therapie) verwendet werden.