

1 Einleitung

Konventionelle Behandlungsmethoden von Krebserkrankungen, bei denen ein chirurgischer Eingriff nicht möglich ist oder keine vollständige Entfernung des Tumorgewebes sicherstellt, beruhen auf Bestrahlung oder Darreichung von Chemotherapeutika. Diese Therapien wirken in der Regel auf alle stark proliferierenden Zellen, so dass auch gesunde Gewebe mit hohen Teilungsraten wie Knochenmark, Gastrointestinaltrakt und Haarfolikeln betroffen sind. Alternative Ansätze konzentrieren sich auf die Entwicklung von Medikamenten, welche zielgerichtet die Blutgefäße des Tumors angreifen und daher mit weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu herkömmlichen Krebstherapien verbunden sind [Kerbel and Folkman, 2002; Alessi et al., 2004]. Dies erfordert die Identifikation und Charakterisierung von Zielmolekülen, die spezifisch für die tumorassoziierten Blutgefäße sind oder am Prozess der Gefäßneubildung (Angiogenese) beteiligt sind. Rekombinante Antikörper gewinnen dabei in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung, sowohl für die Identifikation neuer tumorspezifischer Zielstrukturen als auch als Biopharmazeutika für die Krebstherapie [Hudson and Souriau, 2003]. Eine schnelle und effiziente Methode zur Gewinnung solcher spezifischen Antikörper bietet die Phage Display Technologie.

1.1 Funktion von Endothelzellen

Das Gefäßsystem besteht aus Blut- und Lymphgefäßen. Blutgefäße gewährleisten die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Entsorgung von Stoffwechselendprodukten. Lymphgefäße hingegen sammeln Gewebsflüssigkeit (Extravasate), filtern sie durch Lymphknoten und geben sie an das Blutgefäßsystem zurück. Blutgefäße umfassen Arterien, Venen und Kapillaren von unterschiedlicher Architektur. Allen gemeinsam ist die Auskleidung mit einer spezialisierten Schicht aus Endothelzellen. Die Endothelzellen ruhen auf einer Basalmembran und bilden das Gefäßlumen, in dem das Blut fließt. Die Basalmembran wird bei kleinen Gefäßen von Perizyten und bei großen Gefäßen von glatten Muskelzellen oder Herzmuskelzellen umgeben. Die Perizyten werden durch die Endothelzellen rekrutiert und sorgen für eine Stabilisierung und Reifung der Gefäße [Campbell and Campbell, 1986].

Zusätzlich zu seiner Funktion als physiologische Barriere dient das Gefäßsystem als Kommunikations- und Verteidigungssystem, über welches Wachstumsfaktoren, Hormone und Komponenten des Immunsystems transportiert werden [Cleaver and Melton, 2003]. Um den regionalen Anforderungen an Morphologie und Funktion gerecht zu werden, variieren die Endothelzellen auf molekularer Ebene in ihrer Gen- und Proteinexpression [Chi et al., 2003]. Es existieren genetische Expressionsprogramme, die charakteristisch für den Blutgefäßtyp (Arterie oder Vene) und die Gewebeherkunft (z. B. Haut, Lunge, Verdauungstrakt) sind. Aus dieser Spezialisierung der Endothelzellen ergibt sich auch das Konzept der vaskulären Adressen, mit denen die Endothelzellen ähnlich Postleitzahlen auf ihrer Oberfläche markiert sind [Folkman, 1999; Thorpe and Ran, 2002].

1.1.1 Angiogenese

Das Wachstum neuer Blutgefäße aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem wird als Angiogenese bezeichnet und kommt durch Ausstülpung und Verzweigung von Endothelzellen zustande (Abbildung 1). Im Gegensatz hierzu steht die Vaskulogenese, welche die Gefäßneubildung aus endothelialen Vorläuferzellen beschreibt und die hauptsächlich während der Embryonalentwicklung abläuft. Im gesunden adulten Organismus befinden sich die Gefäße größtenteils in einem Ruhezustand, in dem kaum Angiogenese stattfindet. Nur während der Wundheilung und in den weiblichen Reproduktionsorganen (Ovarien, Uterus und Plazenta) findet eine zeitlich begrenzte Kapillarneubildung statt [Reynolds et al., 1992]. Außerdem ist die Angiogenese an einer Reihe pathologischer Situationen beteiligt, z. B. diabetischer Retinopathie, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und Tumorwachstum [Carmeliet, 2003].

Die Angiogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch pro- und anti-angiogenen Faktoren einer sehr strengen Regulation unterliegt [Folkman and Klagsbrun, 1987]. Ruhende Endothelzellen aus dem bestehenden Gefäß durchlaufen proliferierende und migrierende Phasen und kehren schließlich wieder in den tubulären Phänotyp zurück [Conway et al., 2001]. Die Aktivierung der Endothelzellen durch den vaskulären Endothelzellwachstumsfaktor (VEGF) bewirkt eine Umverteilung interzellulärer Adhäsionsmoleküle (z. B. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1/CD31) und *vascular endothelial cadherin* (VE-cadherin)) und führt zu

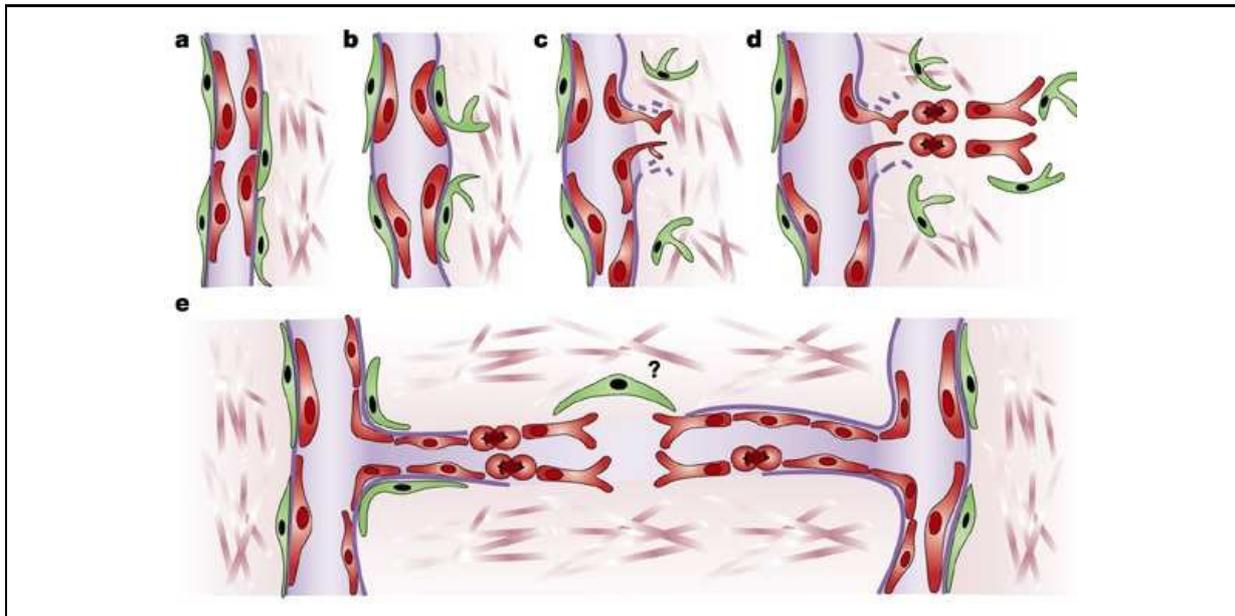


Abbildung 1: ANGIOGENESE. a) Neue Blutgefäße bilden sich in einem mehrstufigen Prozess aus bereits bestehenden Kapillaren. b) Zuerst lösen sich die Perizyten (grün) während der Gefäßerweiterung von der Basalmembran. c) Im nächsten Schritt werden die Basalmembran und die Extrazellulärmatrix degradiert und ermöglichen den Endothelzellen (rot) so die Migration. d) Die Endothelzellen beginnen zu proliferieren und bilden neue Verzweigungen. e) Nach Zusammenschluss der proliferierten Endothelzellen formt sich ein neues Lumen, um das sich eine neue Basalmembran schließt. Der Fusionsmechanismus von Verzweigungen zur Bildung eines neuen Kreislaufs ist noch nicht aufgeklärt [Bergers 2003].

erhöhter Durchlässigkeit der Gefäße [DeLisser et al., 1997; Kevil et al., 1998]. Der Ligand Ang2 aus der Angiopoietinfamilie führt nach Bindung an den Endothelzellrezeptor Tie2 zur Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran und den Perizyten und zur Destabilisierung der Gefäße (Übersicht der vaskulären Wachstumsfaktoren in Yancopoulos et al. [2000]).

Auch die Basalmembran, welche von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) gebildet wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation und Regulation der Angiogenese [Kalluri, 2003]. Die Proliferation der Endothelzellen ist mit der Produktion von Proteasen verbunden, die zur Auflösung der Basalmembran und einem Umbau der ECM führen. Dies ermöglicht den aktivierten und proliferierenden Endothelzellen in das umliegende Gewebe zu migrieren und neue Verzwei-

gungen zu bilden. Dabei wird nicht nur Platz für die einwandernden Endothelzellen geschaffen, sondern auch weitere Wachstumsfaktoren wie VEGF, der Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF) sowie der *platelet derived growth factor* (PDGF) aus der ECM freigesetzt.

Die Reifung und Stabilisierung des neuen Blutgefäßes wird schließlich durch die Bildung einer neuen Basalmembran und Anlagerung von Perizyten und glatten Muskelzellen abgeschlossen. An diesen Prozessen sind unter anderem die Schlüsselfaktoren *platelet derived growth factor B* (PDGFB) und Angiopoietin 1 (Ang1) beteiligt [Jain, 2003]. PDGFB wird von den Endothelzellen sekretiert und bindet an den Rezeptor PDGF- β , der auf Stützzellen (Perizyten und glatten Muskelzellen) expremiert wird. Die Signalweiterleitung über den PDGFR- β ist verantwortlich für die Rekrutierung, Proliferation und Migration der Stützzellen, die das neu gebildete Blutgefäß stabilisieren. Die Expression von Ang1 wirkt auch als Rückkopplungskontrolle und schützt vor einer übermäßigen Durchlässigkeit der Gefäße. Ang1, auch als Anti-Permeabilitätsfaktor bekannt, wird von Endothelzellen und Stützzellen gebildet und vermittelt über den Endothelzellrezeptor Tie2 eine Stabilisierung der neu gebildeten Gefäße [Jain and Munn, 2000]. Um sich den jeweiligen Ansprüchen des umliegenden Gewebes anzupassen, beginnen die neu verzweigten Endothelzellen zu differenzieren. Während dieser Reifung kommt es zur Umstrukturierung in ein komplexes Gefäßnetzwerk.

1.1.2 Tumorangiogenese

Durch das extreme Zellwachstum und dem damit einhergehenden Energie- und Nährstoffverbrauch, sind stark proliferierende Gewebe wie Tumore auf eine adäquate Versorgung angewiesen. Ohne Anschluss an ein neues Gefäßsystem kann der Tumor nur bis zu einer Größe von 1-3 mm³ wachsen [Folkman, 1997]. Daher kommt es durch den Tumor zur Anregung einer tumorassoziierten Angiogenese.

Die angiogenen Blutgefäße im Tumor unterscheiden sich qualitativ von ruhenden Blutgefäßen. Während der normalen, physiologischen Angiogenese reifen die neuen Blutgefäße schnell und bilden ein stabiles Netzwerk. Im Gegensatz dazu scheinen die tumorassoziierten Blutgefäße nicht zur Ruhe zu kommen und sichern so die ständige Blutversorgung des wachsenden Tumors [Ber-

gers and Benjamin, 2003]. Ein weiteres Charakteristikum ist die relativ ungeordnete Architektur des neuen Gefäßsystems, bei dem es sogar zu Sackgassen kommen kann. Dabei werden keine Venen, Arterien und Kapillaren gebildet, sondern ein chaotisches Netz aus allem. Bedingt durch die Überproduktion von VEGF durch die Tumorzellen besitzt dieses Gefäßsystem außerdem häufig Löcher und ist hämorrhagisch [Dvorak et al., 1988].

Die blutgefäßbildenden Endothelzellen gehören normalerweise zu den langlebigsten und genetisch stabilsten Zellen [Folkman and D'Amore, 1996]. In normalen Blutgefäßen befindet sich nur eine von 10000 Endothelzellen (0,01 %) in Zellteilung [Engerman et al., 1967; Hobson and Denekamp, 1984]. Während der tumorassoziierten Angiogenese können Endothelzellen jedoch genauso schnell proliferieren wie Knochenmarkzellen, womit eine ausgeprägte Veränderung der Genexpression einhergeht. Viele angiogeneseassoziierte Gene (z. B. Ang2 u. $TGF\alpha$) werden dabei speziell von mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert [Ho et al., 2003].

Die Abhängigkeit des Tumorwachstums von der Ausbildung neuer Blutgefäße bildet die Grundlage für Tumorgefäß-gerichtete Therapiekonzepte [Folkman, 1997; Denekamp, 1982]. Einer der Vorteile gegenüber der konventionellen, Tumorzell-gerichteten Therapie besteht in der besseren Zugänglichkeit der Gefäße gegenüber soliden Tumoren für Pharmazeutika. Durch ihre Stabilität sind Endothelzellen außerdem sensitiver für Chemotherapeutika, da sich nicht so leicht Resistenzen ausbilden können.

1.1.3 Antiangiogene Strategien

Als Angriffspunkte für antiangiogene Strategien dienen sowohl Oberflächenmarker auf Endothelzellen, die hauptsächlich in tumorassoziierten Blutgefäßen vorkommen, als auch Angiogenese-stimulierende Faktoren [Molema et al., 1998; Marme, 2003; Alessi et al., 2004]. Einige der bekannten Zielstrukturen mit ihren Angiogeneseinhibitoren sind hier im folgenden dargestellt.

EDB-Fibronectin Die EDB-Domäne von Fibronectin ist ein onkofetales Antigen das mit Angiogenese assoziiert ist. Diese 91 Aminosäure lange Domäne wurde durch Zardi et al. [1987] entdeckt und als Zielstruktur für Tumorangiogenese untersucht. Der Antikörper L19 gegen die

EDB-Domäne zeigt eine Akkumulation um neovaskuläre Strukturen sowie eine tumorspezifische Lokalisation in Patienten [Tarli et al., 1999; Santimaria et al., 2003]. Neben seiner Anwendungen in bildgebenden Verfahren kann L19 als Vehikel zum zielgerichteten Transport von TNF- α und Zytokinen wie IL-2 und IL-12 an Tumorgefäße benutzt werden [Borsi et al., 2003; Carnemolla et al., 2002; Halin et al., 2002].

Integrine Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle, die durch ihre Funktion in der Vermittlung von Zell-Zell und Zell-Substrat Interaktionen auch an einigen pathologischen Prozessen wie Entzündung und Metastasierung beteiligt sind. Die Zusammensetzung der aus α und β Unter-einheiten aufgebauten Integrine bestimmt ihre Ligandenspezifität [Albelda and Buck, 1990]. Die Expression von $\alpha\nu\beta3$ Integrine auf humanen Melanomzellen hängt z. B. mit deren Tumorprogression zusammen [Albelda et al., 1990]. Auf Endothelzellen sind insbesondere die $\alpha\nu\beta3$ und $\alpha\nu\beta5$ Integrine als angiogeneseassoziierte Marker bekannt [Brooks et al., 1994; Brooks, 1996]. Der humanisierte, monoklonale Antikörper Vitaxin (MedImmune) blockiert $\alpha\nu\beta3$ Integrine in angiogenen Blutgefäßen und führt in Tiermodellen zur Unterdrückung des Tumorwachstums [Brooks et al., 1995] und wird derzeit in einer klinischen Studie der Phase II geprüft.

VEGF und der VEGF-Rezeptor VEGF ist einer der Hauptmediatoren der Vaskularisierung von Tumoren. Über seine Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor wird die Signalweiterleitung in den Endothelzellen vermittelt, so dass sowohl VEGF als auch der Rezeptor wichtige Zielstrukturen für Angiogeneseinhibitoren darstellen. Bevacizumab (Genentech), ein neutralisierender, humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen den Wachstumsfaktor VEGF, hat bereits die klinische Phase III für die Behandlung von Kolorektalkarzinom durchlaufen [Hurwitz et al., 2004] und wurde von der *Food and Drug Administration* (FDA) 2004 zugelassen. Der VEGF-Rezeptor Kinase-Inhibitor PTK787/ZK222584 (Novartis/Schering) richtet sich gegen die Signalweiterleitung in den Endothelzellen und wird momentan in der klinischen Phase III geprüft [Wood et al., 2000; Dreys et al., 2000].

Die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen [Croix et al., 2000] zeigen, dass eine große Anzahl tumorassoziiierter Endothelzellmarker bisher noch nicht identifiziert oder charakterisiert sind. Das größte Problem mit den bisher gefundenen Markern ist, dass sie auch auf nicht-

tumorassoziierten Endothelzellen vorkommen. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Kultivierung von primären Endothelzellen und tumorassoziierten Endothelzellen. Zum einen verändern sich die Endothelzellen während der Kultur und verändern ihren Phänotyp, zum anderen lassen sich tumorassoziierte Endothelzellen nur äußerst schwierig isolieren und kultivieren. Die Identifikation weiterer tumorspezifischer Angiogenesemarker kann durch komplementäre Selektionsverfahren mit Bibliotheken für rekombinante Liganden ermöglicht werden. Als Selektionsmethode eignet sich besonders gut die Phage Display Technologie (Übersicht in Smith et al. [2005]).

1.2 Phage Display

Phage Display ist ein Verfahren zur Selektion von Polypeptiden, welche als Fusionsproteine mit einem der Hüllproteine auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert (*displayed*) werden. Die genetische Information für das Fusionsprotein wird in die Phagenpartikel verpackt. Es wurde mit dem *E. coli* spezifischen Bakteriophagen M13 und der Präsentation von Fragmenten der Endonuklease *EcoR I* entwickelt [Smith, 1985]. Die Stärke dieser Technologie beruht auf der Klonierung von Phagenbibliotheken mit einer möglichst hohen Gesamtgröße und Diversität. Aus einer Phagenbibliothek lassen sich wie bei einer Affinitätsreinigung Phagen mit einem spezifischen Liganden anreichern.

In einem als *Panning* bezeichneten Selektionsverfahren (Abbildung 2) wird die Phagenbibliothek auf eine immobilisierte Zielstruktur (z. B. Protein, Zucker, synthetisches Molekül) gegeben, und die nichtgebundenen Phagen werden gewaschen. Die Phagen, deren Ligand das Zielprotein bindet, können vom Zielprotein wieder gelöst und durch Infektion von Bakterien in diesen vermehrt und für weitere Selektionsrunden eingesetzt werden. Bei der Verwendung von Antikörperfragmenten als Fusionsproteine stellt diese Technologie eine schnelle und effiziente Methode zur Selektion rekombinanter Antikörper mit spezifischen Bindungseigenschaften dar [McCafferty et al., 1990; Winter et al., 1994].

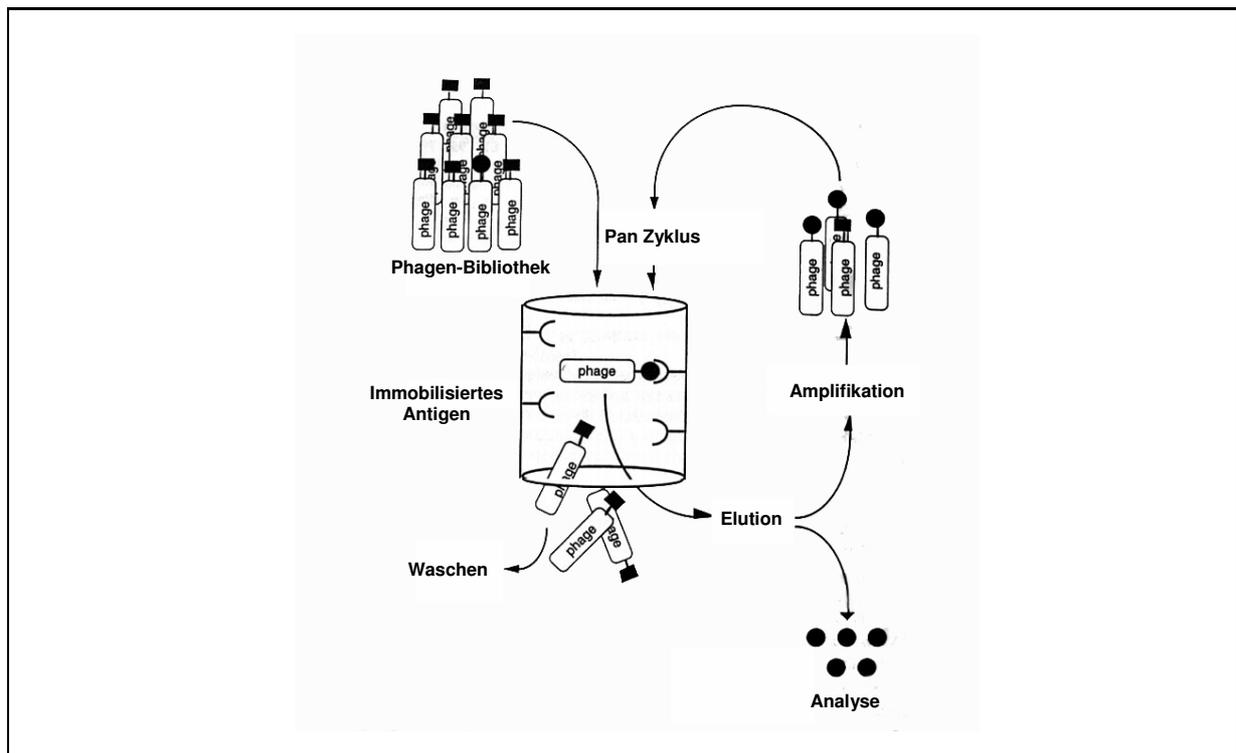


Abbildung 2: PANNING PROZEDUR. Schematische Darstellung des Panning Vorgangs. [Nach Viti et al. 2000]

1.2.1 Phagenbiologie

Für die Präsentation von Polypeptiden werden meistens die Bakteriophagen M13 und fd verwendet. Diese filamentösen Bakteriophagen gehören zu einer Virengruppe mit zirkulärem, einzelsträngigem DNA-Genom, haben einen Durchmesser von 6 nm, und sind 900 nm lang (Abbildung 3). Das etwa 6400 kb große Genom kodiert für 11 Proteine, welche die Hülle (pIII, pVI, pVII, pVIII, und pIX) bilden, am Zusammenbau (pI, pIV und pXI) oder der DNA-Replikation (pII, pV und pX) beteiligt sind. In dem als Intergenische Region (IR) bezeichneten Bereich der DNA befindet sich der Replikationsursprung sowie eine 78-Nukleotid lange Haarnadelstruktur, welche das Verpackungssignal enthält. Der Kapsidzylinder besteht aus fünf verschiedenen Proteinen (pIII, pVI, pVII, pVIII und pIX), wobei die Länge des Filaments aus ca. 2700 Kopien des Haupthüllproteins pVIII gebildet wird. Die Enden des Phagen werden an der einen Seite von je fünf Proteinen pIII und pVI und am anderen Ende von je fünf Proteinen pVII und pIX abgedeckt [Kay et al., 1996].

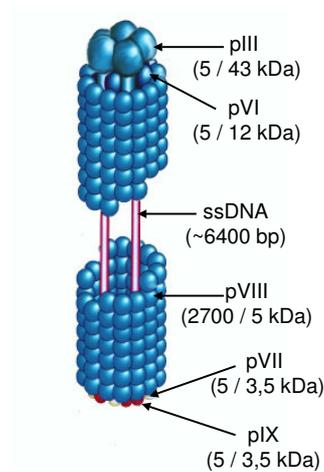


Abbildung 3: PHAGE M13. Schematische Darstellung eines filamentösen Bakteriophagen. Die Hülle besteht aus verschiedenen Oberflächenproteinen und enthält die genomische, einzelsträngige DNA.

Die filamentösen Phagen infizieren bakterielle Stämme, welche das F-konjugative Plasmid enthalten. Die Infektion läuft über den auf diesem Plasmid kodierten F-Pilus der Bakterien, indem die Phagenpartikel mit ihrem Protein pIII an diesem Pilus andocken und das Phagen genom ins bakterielle Zytoplasma übertragen wird. Das Genom wird durch Phagenproteine, und bakteriell kodierte Proteine repliziert und in neue Phagen verpackt. Neusynthetisierte Hüllproteine werden ins Periplasma transportiert und in die bakterielle Membran eingebaut. Der periplasmatische Raum von *E. coli* ermöglicht dabei durch das oxidierende Milieu sowie das Vorhandensein von Chaperonen auch die korrekte Faltung und Bildung von Disulfidbrücken in Fusionsproteinen für das Phage Display. Die einzigen Phagenproteine, die im Cytoplasma verbleiben, sind die drei an der Replikation beteiligten Proteine pII, pX und pV. Es gibt somit keine intrazelluläre Akkumulation von Virusproteinen. Der Zusammenbau reifer Viruspartikel läuft an der Innenseite der Cytoplasmamembran ab und ist direkt an deren Freisetzung gekoppelt. Die Phagen haben die interessante Eigenschaft, dass sie von der Wirtszelle freigesetzt werden, ohne diese zu töten. Somit kann eine mit dem Phagen infizierte Zelle weiterwachsen, während sie ständig neue Viruspartikel freisetzt.

1.2.2 Antikörper Phage Display

Das Immunsystem ist das Abwehrsystem des Körpers gegen von außen eindringende Fremdstoffe. Antikörper sind dabei die Erkennungselemente der humoralen Immunantwort von Wirbeltieren. Sie haben die Aufgabe, die als Antigene bezeichneten körperfremden Substanzen zu erkennen und für das restliche Immunsystem zu markieren [Janeway et al., 1999]. Insbesondere in der Krebstherapie gewinnen Antikörper immer mehr an Bedeutung und bieten neue Möglichkeiten zur Erkennung tumorspezifischer Zielstrukturen [Carter, 2001].

Die klassische Art Antikörper herzustellen beruht auf der Immunisierung von Säugern wie Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege oder Pferd. Dabei wird den Tieren das gereinigte Antigen gespritzt, gegen das die Antikörper gebildet werden sollen. Im Immunsystem werden B-Lymphozyten nach Antigen-Kontakt zur Proliferation und Differenzierung in Antikörperproduzierende Plasmazellen angeregt. Dabei können ein oder mehrere spezifische B-Zellen aus einem Repertoire von $< 10^{12}$ selektiert werden. Im Blut dieser Tiere zirkulieren dann die entsprechenden Antikörper, die sich als heterogenes Antiserum verwenden lassen [Janeway et al., 1999]. Aus den immunisierten Tieren lassen sich auch monoklonale Antikörper gewinnen, indem die Milzzellen der immunisierten Maus mit Mäusemyelomazellen verschmolzen werden. Die entstehenden Hybridomazellen lassen sich klonal vereinzeln und stellen dann eine Quelle homogener Antikörper dar [Köhler and Milstein, 1975].

Das Antikörper Phage Display verwendet Antikörper oder Antikörperfragmente als präsentierte Proteine, mit denen Bibliotheken aufgebaut werden können, die der Diversität des menschlichen Immunsystems nahe kommen. Diese Technologie stellt deshalb eine schnelle und effiziente *in vitro* Methode zur Selektion rekombinanter Antikörper mit spezifischen Bindungseigenschaften dar [Hoogenboom et al., 1998; Bradbury and Marks, 2004]. Das Zielantigen muss dabei im Gegensatz zur traditionellen Hybridomatechnologie nicht immunogen sein und macht auch die Selektion von Antikörpern gegen toxische Substanzen möglich. Des Weiteren werden durch diese *in vitro* Methode routinemäßig Antikörper humanen Ursprungs zugänglich.

Antikörper gehören zu Gruppe der Immunglobuline, die aus je zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Proteinketten bestehen. Die beiden schweren Ketten sind dabei über Disulfidbrücken miteinander verbunden und lassen sich schematisch mit einer Y-förmigen Struktur darstellen. Je eine leichte Kette ist an einem Ende mit einem Ende der schweren Kette über eine Disulfidbrücke und nicht-kovalente Bindungen assoziiert. Diese symmetrische Struktur bildet konstante (C) und variable (V) Domänen, die für die Funktion des Antikörpers verantwortlich sind. Jede Domäne besteht aus ca. 110 Aminosäuren und besitzt eine intramolekulare Disulfidbrücke. Die Vielfalt der Antikörper beruht auf ihrem modularen Aufbau, der zu einer geschätzten Zahl von mehr als 10^{11} möglichen Antikörperspezifitäten führt [Janeway et al., 1999]. Der konstante sowie der variable Teil der L- und der H-Kette eines Antikörpers wird dabei von Genen kodiert, die aus unterschiedlichen Segmenten gebildet werden. Die Segmente werden in den B-Zellen durch somatische Rekombination zusammengeführt und bilden so die fertigen Immunglobuline.

Die variablen Domänen befinden sich an den Enden der leichten und schweren Ketten und bilden die Antigenbindungsstelle. Diese räumliche Struktur passt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zu dem spezifischen Antigen. Die eigentlichen für die Bindung verantwortlichen Stellen in dieser Domäne sind hypervariabel und werden von drei je 5-10 Aminosäuren kurzen Polypeptiden gebildet, die als Schleifen aus der übrigen Struktur herausstehen. Diese Regionen heißen Komplementarität-determinierende Regionen (CDR), da sie zur antigenen Determinante komplementär sind.

Mit molekularbiologischen Techniken lassen sich verschiedene Antikörperformate erzeugen (Abbildung 4): a) vollständige Immunglobuline (IgG), b) $F(ab)_2$ -Fragmente, welche mit ihren zwei Antigenbindungsdomänen dem Antigen gegenüber bivalent sind, c) Fab-Fragmente die nur noch eine Antigenbindungsstelle enthalten und somit monovalent sind, d) Fv-Fragmente und e) scFv-Fragmente, deren Antigenbindungsstelle nur aus den variablen Domänen der schweren und leichten Ketten bestehen und die sich nur in der kovalente Verbindung der Domänen im Fall des scFv-Fragmentes unterscheiden.

Die Wahl des Antikörperformats beim Phage Display wird von folgenden Überlegungen bestimmt: Fab-Fragmente bestehen aus zwei Ketten, der VH+CH1 und der VL+CL Kette, die as-

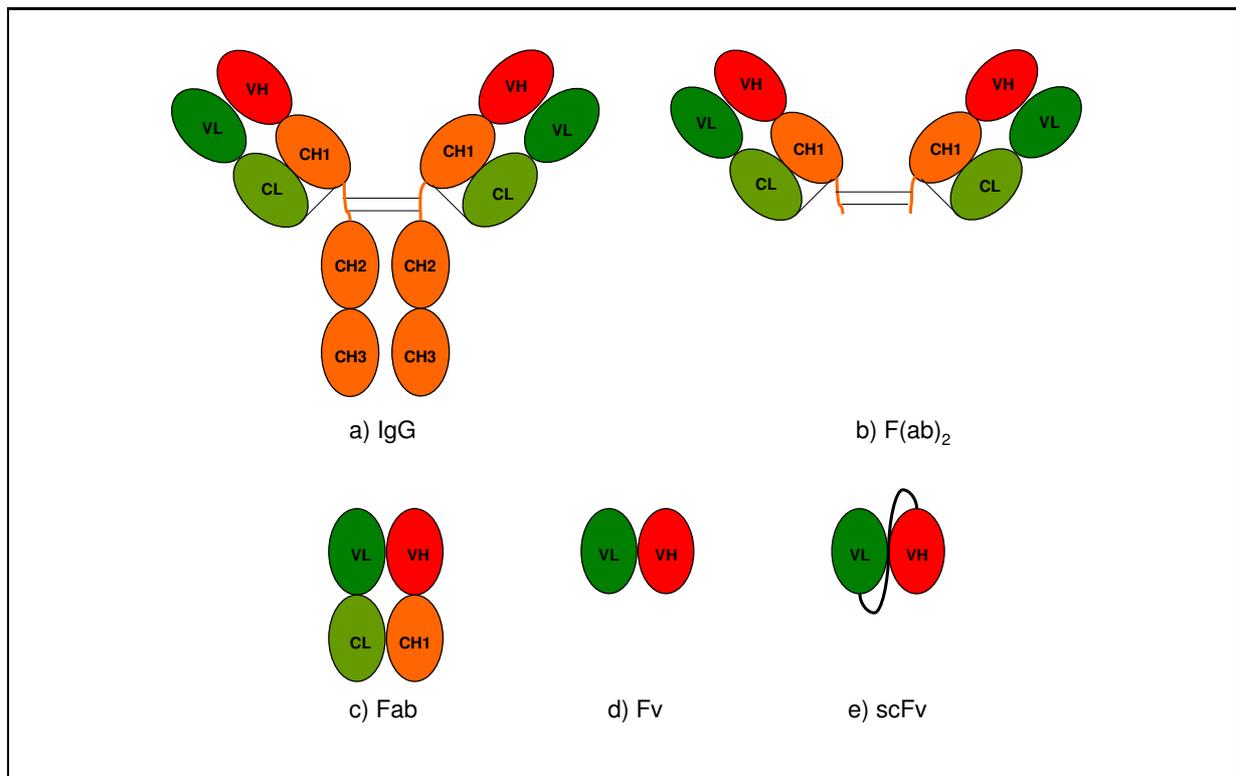


Abbildung 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VERSCHIEDENER ANTIKÖRPERFORMATE. a) Immunglobulin IgG mit den variablen Domänen der leichten (VL, dunkelgrün) und schweren (VH, rot) Ketten, den konstanten Domänen der leichten (CL, hellgrün) und schweren (CH1-CH3, orange) Ketten, sowie den Disulfidbrücken (schwarz). b) F(ab)₂-Fragment c) Fab-Fragment d) Fv-Fragment e) scFv-Fragment

sembliert werden müssen. Demgegenüber bestehen scFv-Fragmente lediglich aus einem Protein mit den variablen Domänen der schweren und leichten Ketten, die über einen flexiblen Abstandhalter verbunden sind (Abbildung 4). Im Allgemeinen sind Fab-Fragmente strukturell stabiler, lassen sich schwieriger assemblieren, können aber leichter in komplette IgG-Formate konvertiert werden. Der Vorteil von scFv-Bibliotheken liegt darin, dass sie bedingt durch ihre geringere Größe genetisch stabiler sind und von Bakterien besser exprimiert werden. Nachteilig beim scFv-Format ist die Bildung von Dimeren, die sich durch Wahl eines längeren Abstandhalters reduzieren lässt [Holliger et al., 1993].

1.2.3 Antikörper Phage Display Bibliotheken

Eine erfolgreiche Selektion hängt in höchstem Maße von der Diversität und Qualität der Bibliothek ab. Die Phagenbibliotheken besitzen üblicherweise eine Diversität von 10^9 - 10^{11} präsentierten Antikörperfragmenten [Nissim et al., 1994; Griffiths et al., 1994; Soderlind et al., 2000] und kommt damit in den Bereich der Diversität des menschlichen Immunsystems. Im Allgemeinen lassen sich zwei Arten von Bibliotheken unterscheiden: naive und immune. Die naiven Bibliotheken sind von natürlichen, nichtimmunisierten humanen rearrangierten [Sheets et al., 1998] oder synthetischen V Genen [Knappik et al., 2000] abgeleitet. Immune Bibliotheken werden aus V Genen immunisierter Menschen gebildet [Barbas et al., 1991] und haben eine starke Neigung für Antikörper einer bestimmten Spezifität, auch wenn sie ebenfalls für Antigene verwendet werden, die nicht Teil der Immunisierung sind [Williamson et al., 1993].

Mit DNA von naiven humanen B-Zellen können durch zufällige Kombination rearrangierter VH- und VL-Gene umfangreiche und vielseitige Bibliotheken erstellt werden (Abbildung 5). Diese Antikörperfragmente können als *single chain* Fv-Fragmente (scFv) hergestellt werden, in denen die VH- und VL-Domänen über einen flexiblen Polypeptidlinker verbunden sind und für das Display mit dem pIII-Oberflächenprotein des Phagen fusioniert werden. Es gibt auch Antikörperbibliotheken, bei denen das Haupthüllprotein pVIII als Fusionsprotein verwendet wird. Im direkten Vergleich zeigt sich jedoch, dass pIII-Fusionsproteine eine wesentlich effizientere Selektion ermöglichen [Kretschmar and Geiser, 1995].

Zur Klonierung der Antikörperfragmente stehen Phagenvektoren oder Phagemide zur Verfügung [O'Connell et al., 2002]. In Phagenvektoren wird das rekombinante pIII-Antikörperfragment im kompletten Phagen genom integriert kodiert, so dass alle Phagen und deren Nachkommen das Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentieren. Plasmide, welche das Verpackungssignal enthalten und auf denen das pIII-scFv Fusionsprotein getrennt von den anderen Phagenproteinen kodiert wird, werden als Phagemid bezeichnet [Vieira and Messing, 1987]. Phagemide kombinieren sowohl die positiven Eigenschaften eines Bakterienplasmids mit denen des Phagenvektors. Sie enthalten den *E. coli* Replikationsursprung und meist eine Ampicillinresistenz zur Verfielfältigung in Bakterien sowie den Phagen ori und das gIII mit einer vorgeschalteten multiplen

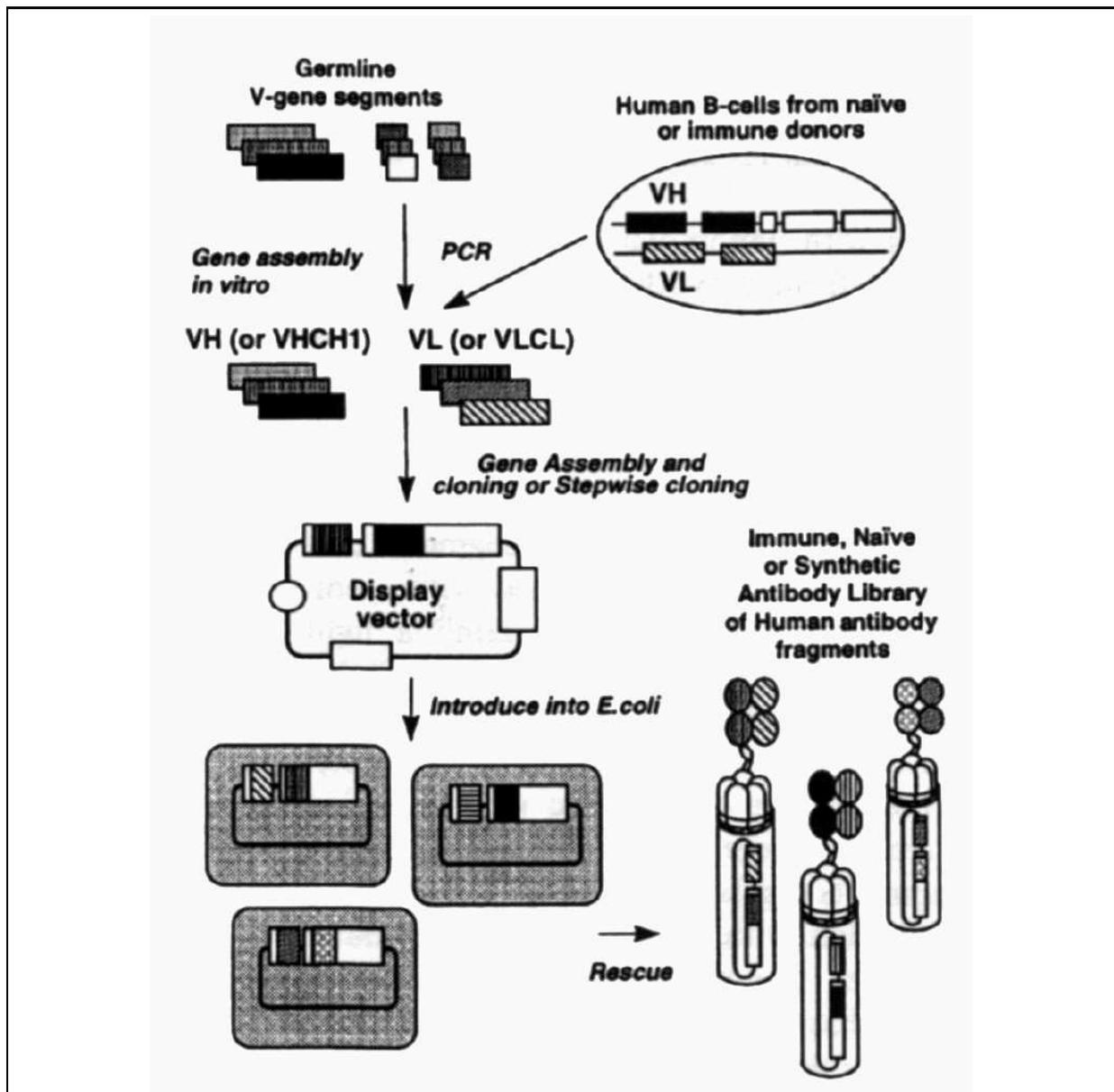


Abbildung 5: KONSTRUKTION EINER HUMANEN ANTIKÖRPER-BIBLIOTHEK ZUR PRÄSENTATION AUF PHAGEN. Gensegmente für die variablen Regionen der schweren und leichten Ketten werden mittels PCR aus humanen B-Zellen amplifiziert und zusammengefügt. Die zusammengeführten Gene werden im Leserahmen mit dem pIII-Hüllprotein in einen Display-Vektor kloniert und dieser in *E. coli* eingeführt. Nach Helferphageninfektion wird die Phagenbibliothek gebildet, welche die verschiedenen Antikörper auf ihrer Oberfläche präsentiert. [Hoogenboom et al. 1993]

Klonierungsstelle, in die das scFv eingebaut wird. Da den Phagemiden jedoch alle anderen genetischen Informationen fehlen, die für die Verpackung und Replikation der einzelsträngigen DNA sowie die Bildung der anderen Hüllproteine verantwortlich sind, sind sie nicht in der Lage, komplette Virionen hervorzubringen.

Um das Phagemid sowie das darauf kodierte Fusionsprotein in neue Partikel zu verpacken, ist die Infektion mit einem Helferphagen notwendig. Als Helferphage wird meist M13K07 oder VCSM13 verwendet, der die fehlenden Gene einschließlich pIII-Wildtyp komplementiert [Vieira and Messing, 1987] und das Phagemid "rettet"(rescue). Durch eine Mutation im Replikationsursprung (origin) wird der Helferphage allerdings kaum selbst in neue Phagenpartikel verpackt. Die resultierenden Phagenpartikel inkorporieren entweder das pIII-Wildtypprotein des Helferphagen oder das pIII-Fusionsprotein des Phagemids. Je nach Wachstumsbedingungen und Natur des fusionierten Polypeptids liegen die Verhältnisse von pIII-Fusion zu pIII-Wildtyp zwischen 1:9 und 1:1000 [Viti et al., 2000]. Seit einiger Zeit existieren Helferphagen mit Wildtyp pIII Phänotyp, aber deletiertem oder mutiertem Gen 3, um diese Heterogenität zu umgehen [Rondot et al., 2001; Soltes et al., 2003]. Die mit Hilfe dieser Helferphagen gebildeten Phagen präsentieren, genau wie bei Phagenvektoren, nur noch pIII-Fusionsproteine, so dass multivalente Phagen entstehen.

Ein weiteres Merkmal von Phagemid-Vektoren ist die *pectate lyase B-leader* Sequenz, welche die gebildeten Proteine ins bakterielle Periplasma dirigiert. Der lacZ Promotor, welcher durch Glucose inhibiert wird und durch IPTG induzierbar ist, gestattet die regulierte Expression des Fusionsproteins [Bellis and Schwartz, 1990]. In der Regel befindet sich in einem Phagemid zwischen den Fusionspartnern ein Amber-Stopcodon. Dies erlaubt einerseits, bei Verwendung eines *E. coli*-Suppressorstamms die Freisetzung löslicher Antikörperfragmente in den Kulturüberstand und andererseits bei Einsatz eines permissiven Bakterienstamms die Präsentation auf der Phagenoberfläche als scFv-gIII-Fusionsprotein durch Überlesen des Stopcodons. Die löslichen Antikörperfragmente werden in den periplasmatischen Raum geleitet und können durch periplasmatischen Aufschluss oder bakterielle Lyse freigesetzt werden.

1.2.4 Selektionsverfahren

Bei der klassischen Selektion wird die Bakteriophagen-Antikörper Bibliothek in vorher mit Antigen beschichtete Immunoröhrchens inkubiert [McCafferty et al., 1990; Marks et al., 1991; Hoo-genboom and Winter, 1992; Nissim et al., 1994; Winter et al., 1994]. Enthält die Bibliothek ein passendes Antikörperfragment, so wird der scFv-Phage durch die Bindung zum Antigen immobilisiert. In mehreren Waschschrinen werden die nicht bindenden Phagen-Antikörper entfernt. Die spezifischen scFv-Phagen können durch Elution mit Säure oder Base wieder vom Antigen gelöst werden. Durch anschließende Amplifikation in Bakterien und weitere Selektionsrunden können mit diesem Verfahren hochspezifische Antikörper gegen theoretisch jedes Antigen gewonnen werden.

Selektionsmethoden für scFv-Phagen auf Zelloberflächenstrukturen Wenn ein Protein das Vorhandensein einer Lipidhülle für seine native Struktur benötigt, wie es für Membranproteine häufig der Fall ist, oder wenn neue Zelloberflächenmarker identifiziert werden sollen, müssen die Selektionen auf isolierten Zellmembranen oder ganzen Zellen durchgeführt werden.

Die Zellmembran besteht aus einer komplexen Struktur aus Phospholipiden, Polysacchariden und (Glyco-)Proteinen. Somit sind die Phagenantikörper der Bibliothek einer Vielzahl von Molekülen auf der Zelloberfläche ausgesetzt, so dass es zu einer Anreicherung vieler ungewollter Binder kommt. Der kritische Punkt einer Selektion auf heterogenen Antigenen ist folglich die Entfernung der Binder gegen allgemeine Zelloberflächenantigene und Anreicherung spezifischer Phagenantikörper [Mutuberría et al., 1999; Hegmans et al., 2002]. Wenn die Selektion auf ein bekanntes Membranprotein durchgeführt wird, kann ein 2-Zellsystem verwendet werden, bei dem eine Zell-Linie mit dem gewünschten Protein transfiziert wird. Die Phagenbibliothek kann dann zuerst mit der nichttransfizierten Zell-Linie von allgemeinen Zelloberflächenbindern depletiert und anschließend auf der Zielzell-Linie selektiert werden [Peipp et al., 2001]. Dabei können die Selektionen auf adhären wachsenden Zellen oder in Suspension durchgeführt werden.

Selektionsverfahren für internalisierende scFv-Phagen auf Zellen Eine ergänzende Methode zur Selektion gegen zelloberflächenspezifische Antigene ist die Selektion auf internalisierende scFv-Phagenantikörper. Für eine Reihe von Antikörper vermittelten Therapieansätzen ist eine Internalisierung notwendig, um z. B. Immuntoxine, Antikörper-Konjugate und DNA für Gentherapie gezielt in die Zelle zu transportieren [Nielsen and Marks, 2000].

Dazu kann die Biologie der Zelle ausgenutzt werden. Alle eukaryontischen Zellen besitzen die Fähigkeit der Endozytose, mit der die Einstülpung der Plasmamembran und Vesikelbildung zur Aufnahme extrazellulärer Substanz bezeichnet wird. Über diesen Prozess werden ligandengebundene Rezeptoren sowie extrazelluläre Flüssigkeit in die Zelle aufgenommen und an ihre Bestimmungsorte sortiert [Mellman, 1996]. Die Clathrin-vermittelte Endozytose sorgt für die Internalisierung und das Recycling von Rezeptoren [Takei and Haucke, 2001]. Die Ligandenbindung verursacht über Homo- oder Heterodimerisierung eine Rezeptoraktivierung, die zur Endozytose führt. Eine Dimerisierung kann dabei direkt durch bivalente Liganden oder indirekt durch eine Konformationsänderung des Rezeptors verursacht werden [Ullrich and Schlessinger, 1990]. Antikörper können diesen Prozess imitieren, Endozytose stimulieren und z. B. eine toxische Ladung in der Zelle abladen. Meistens erfordert dies bivalente Antikörper, um die Rezeptor Dimerisierung zu vermitteln [Heldin, 1995].

Eine Selektion solcher internalisierender Antikörper aus Phagenbibliotheken ist bisher hauptsächlich auf Tumorzellen durchgeführt worden, welche den Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 oder EGF-R überexprimieren [Becerril et al., 1999; Poul et al., 2000]. Außerdem sind Modellsysteme ähnlich der Selektion auf Zelloberflächen gewählt worden, bei der CHO-Zellen mit dem EGF-Rezeptor transfiziert und gegen nicht-transfizierte CHOs selektiert werden [Heitner et al., 2001]. Die besondere Schwierigkeit bei der Selektion auf Endothelzellen liegt darin, dass kaum ein Antigen eine ähnlich hohe Expressionsdichte besitzt.

1.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser der Doktorarbeit ist die Entwicklung von Phage Display Selektionsverfahren für die Isolierung endothelzellspezifischer Antikörper. Dafür soll eine Methode zur Selektion Zelloberflächen-bindender Antikörperfragmente aus einer humanen scFv-Phagenbibliothek etabliert werden. Mit einer Variation der Selektionsmethode soll eine Isolierung internalisierender Antikörper erreicht werden. Diese neuen Trägermoleküle könnten zum gezielten Transport zytotoxischer Substanzen ins Innere der Endothelzellen benutzt werden, wo diese dann ihre Aktivität entfalten können. Dadurch werden weitere immuntherapeutische Ansätze z. B. in der Tumorangiogenese ermöglicht.

Für die Selektionen sollen primäre, humanen Endothelzellen verwendet und die selektierten scFv-Phagen durch ELISA-Analysen auf ihre Zellspezifität getestet werden. Die Charakterisierung der endothelzellspezifischen Phagen-Antikörper erfolgt mit Immunhistochemischen Experimenten und der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie, die außerdem weitere Aussagen zur Verteilung und Lokalisation der entsprechenden Antigene erlaubt.