

Immunität im Reagenzglas: Die Zauberkugel wird Wirklichkeit

Richard A. Lerner*

Stichwörter:

Antikörperbibliotheken · Immunsystem ·
Kombinatorische Chemie ·
Medizinische Chemie ·
Therapeutische
Antikörper

Manfred Eigen gewidmet



Angewandte
Chemie

Nach über einhundert Jahren immunologischer Forschung ist Paul Ehrlichs Konzept der Zauberkugel heute Realität. Gegenwärtig sind therapeutische Antikörper die wohl wichtigste Klasse von neuen Wirkstoffen zur Behandlung vieler Erkrankungen, darunter der Alzheimer-Krankheit und Krebs. Die Entwicklung von therapeutischen Antikörpern war auf Fortschritte in der Immunchemie angewiesen, die erst die Erzeugung von Antikörpern *in vitro* ermöglichen. Das Herzstück dieser neuen Technik ist die kombinatorische Antikörperbibliothek, die die Synthese eines künstlichen Immunsystems ermöglicht, das die Diversität des Antikörperrepertoires der Natur übertrifft. Der Aufbau einer solchen Bibliothek ausgehend vom natürlichen Immunsystem als Startpunkt musste als schwierig gelten, da Verfahren erforderlich sind, die den zu konventionellen Klonierungsverfahren umgekehrten Weg beschreiten. Bei der Genklonierung beginnt man mit einem komplexen System und vereinfacht dieses zu einem singulären System. Bei der Erzeugung von Diversität durch Aufbau einer kombinatorischen Antikörperbibliothek beginnt man dagegen mit einer Ansammlung von Klonen, erhöht in regeloser Weise deren Komplexität und bringt sie dann wieder zur Singularität zurück. Mit den Methoden, die für diese anspruchsvolle Aufgabe entwickelt worden sind, können Antikörper für jedes Antigen im Reagenzglas erzeugt werden. Diese synthetischen Antikörper können den natürlichen Antikörpern qualitativ und quantitativ überlegen sein.

1. Einleitung

So wie die Chemie selbst, hat sich auch die Immunchemie zu einer exakten Wissenschaft entwickelt. Anders aber als die „klassische“ Chemie, deren Konzepte und Anwendungen stets nahtlos weiterentwickelt wurden, kamen Fortschritte in der Immunchemie meist in Schüben.^[1,2] So hat es über einhundert Jahre gedauert, bis das Konzept der „Zauberkugel“ realisiert wurde. Wir fassen hier den gegenwärtigen Stand der Immunchemie zusammen, mit Schwerpunkt auf der Erzeugung therapeutischer Antikörper. Ziel dieses Aufsatzes ist es, die wichtigsten Konzepte der modernen Immunforschung vorzustellen. Eine chronologische Aufzählung der vielen therapeutischen Antikörper, die heute in der klinischen Praxis eingesetzt werden, ist dagegen nicht beabsichtigt. Im Grunde bestand die zentrale Herausforderung der Immunchemie immer darin, eine Lösung für das Diversitätsproblem zu finden. Vom chemischen Standpunkt betrachtet, besteht diese Lösung in der In-vitro-Synthese eines Antikörperrepertoires, dessen Diversität derjenigen natürlicher Organismen gleichkommt oder diese übertrifft. Wir beschreiben in diesem Aufsatz, wie der Aufbau von kombinatorischen An-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8285
2. Damals und heute	8286
3. Lösung des Diversitätsproblems mithilfe kombinatorischer Antikörperbibliotheken	8287
4. Anforderungen an ein künstliches Immunsystem	8288
5. Vergleich des natürlichen Immunsystems mit kombinatorischen Antikörperbibliotheken	8289
6. Das Häufigkeitsproblem	8290
7. Kopplung von Erkennung und Replikation	8290
8. Lösung des Toleranzproblems: die nichtnatürlichen Paare	8292
9. Zusammenfassung der Hauptmerkmale kombinatorischer Antikörperbibliotheken	8293
10. Synthetische Antikörper, nichtimmunogene Antigene und die Bedeutung von Jackpots und chemischen Konsensussequenzen	8293
11. Erhöhung der Diversität des natürlichen Antikörperrepertoires durch Ketten-Shuffling	8295
12. Zugang zu sehr seltenen Antikörperspezifitäten für die Therapie	8296
13. Das letzte noch fehlende Stück: Mutationsstrategien	8299
14. Problem des überreichen Angebots	8302
15. Phänotypen als selbsterklärend zulassen	8302
16. Die Zukunft	8302

tikörperbibliotheken zu einer „chemischen“ Lösung des Diversitätsproblems führte. Dies war die Grundlage für die Entwicklung synthetischer vollständig humaner therapeutischer Antikörper für die klinische Praxis.

[*] Prof. R. A. Lerner

Department of Chemistry
The Scripps Research Institute und
The Skaggs Institute of Chemical Biology
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-9899
E-Mail: rlerner@scripps.edu

2. Damals und heute

In Abbildung 1 ist dargestellt, wie sich unser Wissensstand zur Beschaffenheit von Antikörpern im Laufe von mehr als

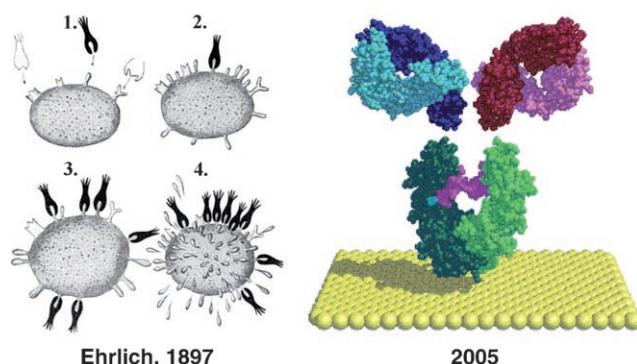


Abbildung 1. Ehrlichs Seitenkettentheorie (links) und kristallographisch gelöste Struktur eines Antikörpermoleküls (rechts). Im Antikörpermolekül sind die schwere und leichte Seitenkette sowie eine Disulfidbrücke zu erkennen, außerdem ist die Art der Packungswechselwirkung der leichten und schweren Kette dargestellt. Die Antigen-Erkennung findet an den Enden des Moleküls statt, wo die schwere und leichte Kette wechselwirken.

einhundert Jahren entwickelt hat, beginnend bei Ehrlichs Seitenkettentheorie bis hin zur Kristallstruktur eines Antikörpermoleküls.^[3,4] Das vielleicht bemerkenswerteste an diesem Vergleich ist, dass man keinen großen Unterschied feststellt! Es ist erstaunlich, wie nahe Ehrlichs Konzept der Antikörperstruktur der tatsächlichen Struktur kommt, die mit Methoden bestimmt wurde, an die 100 Jahre zuvor nicht einmal zu denken war. Silverstein wies darauf hin,^[1] dass Ehrlich bereits ein Diversitätssystem im Sinn hatte, bei dem jeder Antikörper eine eigene Spezifität aufweist (wie an den unterschiedlichen Formen der Seitenketten in Abbildung 1 zu sehen ist). Die Studien zur Struktur und Chemie von Antikörpern bilden mittlerweile ein sehr umfangreiches Gebiet und übersteigen den Rahmen dieses Aufsatzes. Daher soll der Hinweis genügen, dass sich in einem gegebenen Repertoire jeder Antikörper vom nächsten unterscheidet.

Ein einzelner Antikörper hat sechs Proteinschleifen oder Antikörperbindungsstellen (complementarity determining

regions; CDRs), die komplementär zum Antigen sind. Ein Antikörpermolekül ist die höchstentwickelte kombinatorische Vorrichtung, die die Natur kennt, insofern jeder Antikörper sechs unterschiedliche Antikörperbindungsstellen auf zwei Proteinketten (die schwere und die leichte Kette) verteilt, sodass eine dreidimensionale Matrix entsteht, die, bei einer unbegrenzten Zahl von Formen, ungefähr 700 \AA^2 an Bindungsfläche und 3000 \AA^3 an Volumen einnimmt. Im Wesentlichen kann man ein Antikörpermolekül als ein kombinatorisches Display-System für Peptidschleifen betrachten.

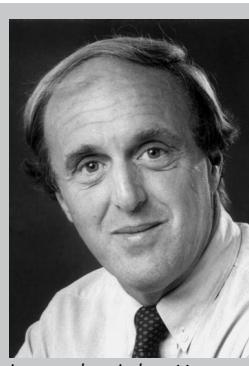
Ehrlichs bemerkenswerte Intuition zeigte sich nicht nur bei der Struktur der Antikörper, sondern gleichermaßen bei seiner Ankündigung der Zauberkugel. In Hal B. Wallis' 1940 produziertem Spielfilm „Dr. Ehrlich's Magic Bullet“ erklärt Ehrlich (Edward G. Robinson) dem Finanzminister, dass „es eines Tages möglich sein wird, kleine Zauberkugeln im Reagenzglas herzustellen, in den Blutstrom zu schießen und eindringende Mikroben zu zerstören“ (Abbildung 2). Der Fi-



Abbildung 2. Szene aus Hal Wallis' Spielfilm „Dr. Ehrlich's Magic Bullet“. Edward G. Robinson (links) spielt Paul Ehrlich.

nanzminister antwortet mit der Bemerkung, damit könne er nicht vor den Haushaltssausschuss treten! Eine vollständige und faszinierende Betrachtung der geschichtlichen Ereignisse findet sich in einem exzellenten Artikel von Bernard Witkop.^[5]

Die moderne Verkörperung von Ehrlichs Reagenzglas voller Zauberkugeln ist die kombinatorische Antikörperfibi-
liotheke, die in wenigen hundert Mikrolitern Lösung 10^{11} un-
terschiedliche Antikörper enthalten kann. Antikörper aus
solchen Bibliotheken fanden breite Anwendung im Labor
und in der medizinischen Praxis. Trotz der erheblichen Zeit-
spanne, die zwischen der Entwicklung des Konzepts und
seiner Nutzbarmachung verging, werden therapeutische An-
tikörper in der klinischen Praxis heute weithin eingesetzt, und
vermutlich sind es die tragfähigsten Komponenten in der
modernen pharmazeutischen Forschung. Zurzeit gibt es 18
Antikörper, die zur klinischen Behandlung von Krankheiten
– von Krebs bis rheumatischer Arthritis – eingesetzt werden.
Mit diesen Antikörpern werden jährlich Milliarden Dollar



Richard A. Lerner studierte an der Northwestern University und erhielt 1964 einen MD von der Stanford Medical School. Anschließend forschte er als Postdoktorand an der Scripps Clinic and Research Foundation auf dem Gebiet der experimentellen Pathologie. Zurzeit ist er Cecil H. und Ida M. Green-Professor für Chemie am Scripps Research Institute. Er erhielt eine Reihe von Auszeichnungen und wurde in die Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften und die United States National Academy of Sciences aufgenommen. Er ist bekannt durch seine immunochemischen Untersuchungen zu katalytischen Antikörpern und zu kombinatorischen Antikörperfibi-
liotheke.

umgesetzt, und über 370 neue Antikörper gegen mehr als 70 verschiedene Antigene befinden sich derzeit in der klinischen Testphase.^[6] Allerdings gibt die bloße Zahl der in klinischen Tests befindlichen Antikörper nicht deren volle Bedeutung wieder, da einige Antikörper mehrere Indikationen haben. Zum Beispiel ist Humira, ein Antikörper gegen den Tumornekrosefaktor (TNF), zur Behandlung von rheumatischer Arthritis und Psoriasis zugelassen und zeigt vielversprechende Ergebnisse bei Morbus Crohn. Fast jedes große Pharmaunternehmen betreibt Forschungsprogramme zu therapeutischen Antikörpern, und etwa 55 % aller Neuzulassungen von Arzneimitteln betreffen Antikörper.

Vor diesem geschichtlichen Hintergrund drängt sich die Frage auf, welche Faktoren letztendlich die Entwicklung von Antikörpertherapeutika ermöglicht haben. Die erste Antwort wäre, dass Fortschritte in der Immunchemie eine Lösung des Diversitätsproblems durch chemische Methoden ermöglicht haben. Dass eine „chemische“ Lösung gefunden wurde, war aus mehreren Gründen wichtig:

- 1) Das volle Potenzial des Antikörperrepertoires konnte ausgeschöpft werden.
- 2) Das Problem der Immuntoleranz wurde umgangen.
- 3) Antikörper konnten so formatiert werden, dass sie für eine therapeutische Anwendung geeignet waren.

Das Diversitätsproblem kann leichter verstanden werden, wenn man es nicht als Problem, sondern als Chance auffasst. Jedes Individuum hat ungefähr 10^8 unterschiedliche Antikörper. Vor Einführung der unten beschriebenen chemischen Techniken konnte man nur einen Bruchteil dieser Antikörper durch das biologische Verfahren der Hybridoma-Bildung gewinnen.^[7] So spektakulär das Hybridoma-Verfahren auch ist, kann es nur einige wenige der ungefähr 10^8 Antikörper einer Maus liefern. Außerdem bleibt das Problem der Immuntoleranz ungelöst, und chemische Veränderungen am Antikörpermolekül sind ebenfalls nicht möglich.

Die Forschungen zur Lösung des Diversitätsproblems mithilfe chemischer Methoden wurden mit dem ambitionierten Ziel aufgenommen, das gesamte Antikörperrepertoire eines Individuums in funktionaler Form zu gewinnen. Obwohl Ehrlich nicht wissen konnte, wie groß die Diversität des Immunsystems ist, glich sein prophetischer Traum von den Zauberkugeln in einem Reagenzglas exakt den Vorstellungen moderner Immunchemiker – mit dem einzigen Unterschied, dass es nicht mehr um Tausende, sondern um Milliarden Antikörper ging.

Mit zunehmender technischer Entwicklung wurden neue Verfahren zur Gewinnung von Antikörperrepertoires aus Tieren und Menschen zugänglich, und heutzutage können oft eine oder mehrere der sechs CDRs eines Antikörpers synthetisch erzeugt werden, sodass eine fast unbegrenzte Diversität möglich ist. Die kombinatorischen Antikörperbibliotheken enthalten mehr diskrete chemische Einheiten (10^{11}) als synthetische chemische Bibliotheken organischer Verbindungen (10^6) oder Naturstoffbibliotheken (10^4 – 10^5). Kombinatorische Antikörperbibliotheken beginnen bei einer Diversität, die dreimal höher sein kann als das natürliche Repertoire eines Menschen. Die Komponenten dieser Antikörperbibliotheken haben Bindungskonstanten für die Bin-

dung ihres Zielmoleküls (des Antigens) im Bereich von 10^9 bis 10^{14} M^{-1} , was die Bindungsstärke von gewöhnlichen Molekül-Substrat-Komplexen um Größenordnungen übertrifft. Oft enthalten kombinatorische Antikörperbibliotheken zahlreiche unterschiedliche Antikörper mit sehr ähnlicher Bindungssaffinität für die Zielstruktur – oder anders ausgedrückt: Es stehen mehrere Lösungsmöglichkeiten für das Problem der Bindung an ein Antigen zur Verfügung. Die Tatsache, dass man mehrere Lösungen für das Problem der selektiven Bindung erhält, unterstreicht die außergewöhnliche Leistungsfähigkeit kombinatorischer Antikörperbibliotheken zur Behandlung des Diversitätsproblems.

Mit der mittlerweile dreißig Jahre alten Hybridoma-Technik^[7] wäre man zwar im Prinzip in der Lage gewesen, therapeutisch interessante Antigene zu erkennen. Da die Antikörper aber aus Mäusen stammten, waren sie für therapeutische Anwendungen weitgehend ungeeignet, weil sie vom menschlichen Immunsystem selbst als Fremdkörper entfernt werden. Eine erste Lösung für dieses Problem beschrieben Winter und Mitarbeiter, die Antikörper der Maus „humanisierten“, indem sie alle variablen Bereiche außer den CDRs durch entsprechende humane Antikörpersequenzen ersetzten.^[8,9] Die Grundidee war folgende: Da sich die variablen Bereiche von Antikörpern alle unterscheiden, sollten die CDRs nicht artspezifisch sein – im Unterschied zu den konstanten Bereichen des Moleküls, die artspezifisch sind.

Dieses Konzept ebnete den Weg zur Konstruktion therapeutischer Antikörper.^[8,9] Während es also gelang, einen bestimmten Antikörper so zu modifizieren, dass er für einen therapeutischen Einsatz infrage kam, blieb das Diversitätsproblem weiter ungelöst. Selbst wenn wir annehmen, dass man eines Tages auf Tierexperimente gänzlich verzichten und man Hybridomazellen stattdessen aus Menschen gewinnen könnte, bleibt das Diversitätsproblem bestehen, weil man unmittelbar auf das Problem der Immuntoleranz trifft, das wohl das größte Hindernis für die Herstellung vollständig humarer therapeutischer Antikörper war. Das Phänomen der Immuntoleranz ist ein zentraler Aspekt der immunologischen Theorie, eine detaillierte Diskussion würde aber den Rahmen dieses Aufsatzes übersteigen. Immuntoleranz bedeutet einfach, dass die Produktion von Antikörpern gegen körpereigene Antigene nicht erlaubt ist. Dies ist ein großes Problem für therapeutische humane Antikörper, weil die Zielspezies solcher Antikörper innerhalb einer Gruppe von Individuen konserviert und damit körpereigen ist.

3. Lösung des Diversitätsproblems mithilfe kombinatorischer Antikörperbibliotheken

Die Lösung des Diversitäts- und Immuntoleranzproblems kam mit der Entwicklung der kombinatorischen Antikörperbibliotheken.^[10–28] Bevor wir genau festlegen, was eine kombinatorische Antikörperbibliothek ist, wollen wir der Einfachheit halber annehmen, es handele sich um eine Vorrichtung zur Synthese von Antikörpern mit unbegrenzter Diversität. Betrachten wir zunächst, was der entscheidende Beweggrund für die Erzeugung von Antikörperbibliotheken gewesen ist: Solche Bibliotheken entstanden zu einer Zeit, in

der die Wirkstoff-Forschung den Strukturraum der Antigene immer weiter aufdeckte. Dies führte umgekehrt zu einem steigenden Bedarf an der Entwicklung von Antikörpern, mit dem Ziel, für ein gegebenes Antigen aus einer Vielzahl von Antikörpern mit passenden Erkennungs- und Bindungseigenschaften auswählen zu können. Mit zunehmender Zahl an Antigenen stellte man auch zunehmend striktere Kriterien für die Bindungseigenschaften auf, um so den größtmöglichen Nutzen aus den neu gewonnenen Erkenntnissen über antigenen Zielstrukturen zu ziehen. In der nicht allzu fernen Vergangenheit hatte sich die Immunchemie noch lediglich zur Aufgabe gestellt, Antikörper zu erzeugen, die in irgendeiner Form an ein Protein binden.

Mit dem Aufkommen neuer Techniken und den damit gewonnenen Erkenntnissen ging die Zielsetzung einher, die Bindungsregion eines Proteins und die dazu passenden Bindungsaffinitäten zu definieren oder sogar Spezifität für seltene Proteinkonformationen zu erzeugen, die z. B. aktive von inaktiven Zuständen des Rezeptors unterscheiden können. Von besonderem Interesse war das Gebiet der katalytischen Antikörper, bei denen der Bindungsmechanismus entscheidend für die Funktion eines Katalysators ist. Zum Beispiel benötigt ein katalytischer Aldolase-Antikörper in passendem Abstand angeordnete Aminosäuren einschließlich eines Lysins mit einem stark verschobenen pK_s -Wert, was ein selten eintreffendes Ereignis darstellt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein solches Ereignis eintritt, wird dadurch noch verringert, dass sich das naszierende Enamin-Nucleophil unter passenden stereoelektronischen Randbedingungen an die als Acceptor wirkende Carbonylfunktion annähern muss.^[29-34] Eine zweite Zielsetzung wäre es, den Vorgang zu wiederholen, um einen zweiten Antikörper zu gewinnen, indem man die gleiche Anordnung von Aminosäuren verwendet, aber diese anders platziert, sodass die antipodische Reaktion abläuft. Bindungen an seltene Proteinkonformationen sind unwahrscheinliche Ereignisse, sodass eine große Zahl von Antikörpern durchmustert werden muss, um solche mit passenden, für die Katalyse geeigneten Aminosäureseitenketten zu finden. Kombinatorische Antikörperbibliotheken bieten hierfür ideale Voraussetzungen.

Wichtig ist vor allem, dass eine kombinatorische Antikörperbibliothek die Erzeugung eines künstlichen Immunsystems mit unbegrenzter Diversität ermöglicht. Auf die zahlreichen Folgen, die sich aus dieser Unbegrenztheit ergeben, werden wir gleich zurückkommen; einstweilen wollen wir festhalten, dass es eines der wichtigsten Merkmale einer solchen Bibliothek ist, dass sie die Entdeckung von „Bindungs-Jackpots“ und von Konsensussequenzen ermöglicht. Ein „Jackpot“ liegt dann vor, wenn der gleiche Antikörper in einem Bindungstest mehrmals aufgefunden wird; eine Konsensussequenz ist eine gemeinsame Aminosäuresequenz irgendwo in den Antikörperbindungsstellen unterschiedlicher Antikörper. Oft findet man in unterschiedlichen Antikörpern der Bibliothek eine komplett Bindungsregion von vier bis acht Aminosäuren, was eine Folge von Selektion und funktioneller Konvergenz ist. Die Ereignisse, die zum Auffinden eines „Jackpots“ oder einer Konsensussequenz führen, finden in der gleichen Bibliothek, ja sogar im gleichen Testvolumen statt. Das gleiche Phänomen tritt bei der Optimierung von

Komponenten chemischer Bibliotheken für die Bindung an eine gemeinsame Zielstruktur auf. Nicht selten kommt es vor, dass Forschungsgruppen, die von unterschiedlichen Leitstrukturen ausgehen, zu gleichen und bereits anderweitig synthetisierten Verbindungen gelangen. Zum Schluss ermöglicht es die kombinatorische Antikörpertechologie auch, Antikörper wie niedermolekulare Verbindungen zu handhaben, d. h. wiederzugewinnen, zu modifizieren und in größeren Mengen herzustellen.

4. Anforderungen an ein künstliches Immunsystem

Um die Antikörperkomponente des natürlichen Immunsystems nachzuahmen, muss ein künstliches System vier Merkmale aufweisen:

1. Es muss klonal sein.
2. Es muss eine große Anzahl von Antikörpern enthalten und der Komplexität des natürlichen Antikörperrepertoires gleichkommen oder dieses übertreffen.
3. Erkennung und Replikation müssen gekoppelt sein.
4. Es muss eine robuste Mutationsstrategie zur Affinitätsoptimierung geben.

Um besser zu verstehen, was diese Merkmale bedeuten und welche Voraussetzungen für ihre Implementierung erfüllt sein müssen, ist es nützlich, die entsprechenden Merkmale des natürlichen Immunsystems zum Vergleich zu betrachten. Das entscheidende Merkmal des natürlichen Immunsystems ist seine klonale Natur (Abbildung 3). Dies bedeutet, dass jede Zelle nur eine Art von Antikörper produziert, sodass die Produktion eines Repertoires von 10^8 Antikörpern eine entsprechende Zahl von unterschiedlichen Zellen erfordert. Eine B-Zelle (B-Lymphozyt) fungiert als Packungseinheit für ein spezielles Paar von schweren und leichten Ketten. Die Antikörperspezifität wird auf der Zelloberfläche exprimiert, und wenn ein oberflächengebundener Antikörper sein Antigen erkennt, wird die Teilung der betreffenden Zelle ausgelöst. Somit replizieren die wenigen Zellen, die das Antigen

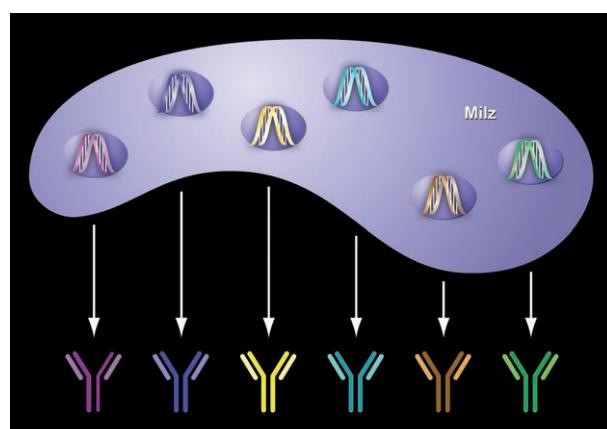


Abbildung 3. Vereinfachtes Schema, das sechs aus einhundert Millionen B-Zellen in der Milz zeigt, von denen jede einen eigenen Antikörper trägt. Jede Zelle verpackt eine charakteristische Kombination von schweren und leichten Ketten.

erkennen, während die anderen unbeteiligt bleiben. Wenn das System z.B. auf eine virale Infektion reagiert, dann replizieren diejenigen Zellen, die das Antigen mit einem Antikörper ausreichender Affinität ($K_d < 10^{-6} \text{ M}$) erkennen, sodass letztendlich viele Replikate von Zellen erzeugt werden, die nun entweder diesen bestimmten Antikörper oder eine durch Mutation verbesserte Variante produzieren. Die Einzelheiten dieses Vorgangs sind komplex und sollen an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden. Wir müssen nur wissen, dass das natürliche Immunsystem in Form zellulärer Packungen organisiert ist, wobei jede Zelle eine bestimmte Kombination aus einer schweren und einer leichten Kette enthält und diese Paarung während des Verlaufs einer Immunantwort unverändert bleibt.

Ein anderes sehr wichtiges Merkmal dieses klonalen Systems besteht darin, dass es mit wiederholter Mutation und Selektion operiert. Ein solches diversifizierendes und selektierendes System ist deshalb erforderlich, weil die Lösung des Bindungsenergieproblems von einer relativ niedrigen Anfangspopulation ausgeht und vor allem schnell erfolgen muss, um das Überleben des Organismus bei einem infektiösen Angriff zu sichern. Die selektierten Zellen produzieren lösliche Antikörper, die die Spezifität der ursprünglichen zell-oberflächenexponierten Antikörper beibehalten, die aber verbesserte Affinitäten aufweisen können, da die Zellreplikation mit Mutation einhergeht. Ein ganz entscheidender Punkt liegt darin, dass dieses System auf ein Antigen reagiert und dabei immer wirksamere Antikörper erzeugt, die das gleiche Antigen zerstören. Eine solche Maschinerie, die von einem induzierenden Agens zur Replikation angetrieben wird und dabei ein mutierbares Produkt erzeugt, das die Konzentration des induzierenden Agens senkt, wird aus thermodynamischen Gründen hin zu einer höheren Affinität für das induzierende Agens getrieben. Fälschlicherweise wird oft erklärt, dass das immunologische Repertoire einer Keimbahn Antikörper für dieses oder jenes spezifische Antigen enthält. Im Wissen um die Mutations- und Selektionsfähigkeit ist aber die Vorstellung treffender, dass das System zu Beginn der Kaskade Antikörper enthält, die kein spezielles Antigen erkennen, dafür aber mit der Fähigkeit ausgestattet ist, Antikörper gegen jede Art von Antigen zu erzeugen.^[*] Zu frühen Zeitpunkten der Antigenpräsentation sind Mutation und Selektion aufgrund der großen Antikörperzahlen unnötig. Ab welchem Punkt dann die Bildung weniger Antikörper mit stattdessen erhöhter Bindungsenergie einsetzt, ist derzeit nicht klar.

[*] Es gibt eine immunologische Theorie, wonach sich das Antikörperrepertoire vor etwa 450 Millionen Jahren in Gnathostomata (Kiefermündern) als Reaktion auf Infektionsgefahren zu entwickeln begann. Dies würde bedeuten, dass sich das Repertoire gegen infektiöse Wirkstoffe richtet, von denen viele inzwischen ausgestorben sind. An den Sachverhalten ändert dies nicht viel, da es lediglich bedeutet, dass ein Ausgangsklon eine Kreuzreaktivität zwischen heutigen Antigenen und einem in der Evolutionsgeschichte auftretenden infektiösen Wirkstoff zeigen muss.

5. Vergleich des natürlichen Immunsystems mit kombinatorischen Antikörperbibliotheken

Für die folgenden Ausführungen ist es wichtig, den chemischen Teil des Immunsystems von seiner zellulären Umgebung zu trennen. Der chemische Teil führt direkt zu einer „chemischen“ Lösung, während die zelluläre Umgebung eine physiologische Vorrichtung ist, die sich im komplexen Milieu des gesamten Organismus entwickelt hat. Daher ist es erforderlich, eine synthetisierte diversifizierte Bibliothek in einem System abzubilden, das den Prinzipien des natürlichen Immunsystems unterliegt, ohne dass die zum Gesamtorganismus gehörenden Komponenten exakt kopiert werden müssten. Damit reduziert sich die Erzeugung und Auswahl von Antikörpern von einem biologischen auf ein hauptsächlich chemisches Problem.

Zunächst war man mit zwei Hauptproblemen konfrontiert, wenn es darum ging, das Funktionsprinzip der Antikörperkomponente des Immunsystems nachzuahmen und möglicherweise zu verbessern: Das gesamte Repertoire an schweren und leichten Ketten musste repliziert werden, und das System musste die Fähigkeit zur Bildung von zellulären Packungen haben, sodass Antigenerkennung und Antikörperreplikation verknüpft werden konnten. Die Forderung einer Replikation des gesamten Repertoires ist offensichtlich, da niemand ein System aufbauen will, das eine geringere Diversität als das natürliche System hat. Eher sollte das künstliche System die Diversität des natürlichen Systems übertreffen, weil viele Randbedingungen wegfallen, sobald die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen nicht mehr von Bedeutung ist.

Die Forderung, dass Erkennung und Replikation gekoppelt sein müssen, ist weniger offensichtlich und röhrt von der Tatsache her, dass man hunderte Millionen von Antikörpern durchmustern muss, um diejenigen mit der höchsten Bindungsenergie aufzufinden. Sobald eine hohe Bindungsaffinität gefunden ist, ist es zweckmäßig, mithilfe molekularbiologischer Methoden die für das Protein codierenden Gene anstelle des Proteins selbst zu erzeugen. In Analogie zu den Zellen des natürlichen Immunsystems besteht die Vorgabe darin, dass jede Packung eine schwere und eine leichte Kette enthält und unter Beibehaltung der Klonierbarkeit replizieren kann. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass eine Klonierung des gesamten Systems mit konventionellen Methoden unmöglich ist, da dies hunderte Millionen von Klonierungereignissen erfordern würde. Die Lösung für dieses Problem liegt in der Beschaffenheit der kombinatorischen Antikörperbibliothek.

Der Unterschied zwischen dem natürlichen Antikörpersystem und kombinatorischen Antikörperbibliotheken ist in Abbildung 4 illustriert. Das Prinzip einer künstlichen kombinatorischen Bibliothek besteht darin, dass die „Quantenpackung“ des natürlich exprimierten Antikörperrogens zerstört wird, indem die Packung der schweren und leichten Ketten der Antikörper aufgebrochen wird und die beiden Ketten stattdessen stochastisch kombiniert werden. Vom Konzept her ist dies der genau umgekehrte Prozess zum Klonierungsvorgang: Statt bei einem komplexen Zustand zu beginnen und diesen zu einem klonalen Zustand zu vereinfachen

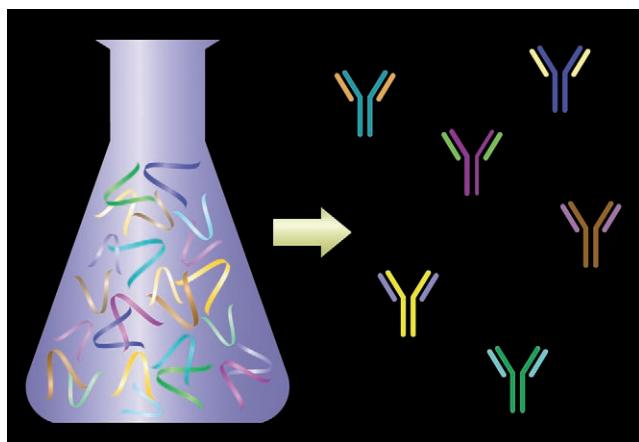


Abbildung 4. Prinzip kombinatorischer Antikörerbibliotheken, die durch stochastische Auswahl von schweren und leichten Ketten von Antikörpern aufgebaut werden, wobei die zelluläre Verpackung der Originalpaare von Ketten aufgespalten wird. Man beachte den Unterschied zum natürlichen Antikörpersystem in Abbildung 3.

chen, beginnt man bei einem klonalen Zustand und verändert diesen zugunsten höherer Komplexität. Mit dem erstmaligen Auftauchen dieses Problems traten unmittelbar zwei Sachverhalte hervor: zum einen, dass es notwendig ist, das gesamte Repertoire an schweren und leichten Ketten zu erzeugen, zum anderen, dass an einem bestimmten Punkt des Systems Erkennung und Replikation gekoppelt sein müssen.

6. Das Häufigkeitsproblem

Die Forderung, das gesamte Immunrepertoire zu klonieren, wurde nach der damaligen Lesart als das „Häufigkeitsproblem“ bekannt. Die Diskussion drehte sich vor allem um die Vorstellung, dass es unabhängig von der eingesetzten Methode unabdingbar wäre, die Originalpaarungen der leichten und schweren Ketten zurückzuerlangen. In Anbetracht der Tatsache, dass ein Individuum etwa 10^8 einzigartige Paarungen leichter und schwerer Ketten enthält, resultiert bei stochastischer Kombination eine kombinatorische Komplexität von 10^{16} , und nur eine einzige Paarung aus 10^8 ist die Originalpaarung. Eine Durchmusterung von 10^8 Klonen zum Auffinden der Originalpaarung wäre zur damaligen Zeit sehr anspruchsvoll gewesen (wenn auch prinzipiell machbar), wogegen eine Suche unter 10^{16} Klonen selbst heute nicht möglich wäre. Warum also wählte man ein System, das auf der stochastischen Kombination von schweren und leichten Ketten beruht, wenn man nach all den technischen Schwierigkeiten am Ende nur einen einzigen Originalantikörper erhält?

Die Lösung des Häufigkeitsproblems basierte auf der Erkenntnis, dass das System auf zwei Ebenen entartet ist. Auf der biochemischen Ebene kann jede leichte mit jeder schweren Kette paaren. Die kombinatorische Diversität folgt einer Art Einbahnstraße, insofern viele leichte Ketten zu einer vorgegebenen schweren Kette komplementär sein können. Umgekehrt gilt dasselbe – allerdings hat man in erster Linie die Komplementierung der schweren Ketten

betrachtet, weil die der Antigenerkennung dienende Diversität aus genetischen Gründen hauptsächlich von den schweren Ketten stammt. Außerdem wissen wir aus vielen Kristallstrukturen von Antikörper-Antigen-Komplexen, dass die Bindungswechselwirkungen in vielen Fällen hauptsächlich von den schweren Ketten bestimmt werden. Wie sich zeigt, nutzt auch die Natur dieses Entartungsprinzip. Wenn wir einen genaueren Blick auf die Antikörnergene eines Individuums werfen, erkennen wir, dass es ungefähr 55 000 für die schweren Ketten codierende Gene und 3000 für die leichten Ketten codierende Gene gibt, die gemeinsam für die Kettenpaare der unterschiedlichen Antikörper codieren. Die Asymmetrie zugunsten der schweren Ketten führt zu zweierlei Folgerungen für den Aufbau einer Antikörerbibliothek: Eine eher beiläufige Folgerung besteht darin, dass sich die Größe der kombinatorischen Matrix verringert, sofern man lediglich das natürliche Repertoire kopieren will. Die weit wichtigere Folgerung ist, dass es genügend Spielraum gibt, um die Diversität der leichten Ketten auf das Niveau der schweren Ketten zu steigern. Wie wir sehen werden, können nichtnatürliche leichte Ketten sehr entscheidend auf die Bindungsenergie Einfluss nehmen.

Die erfolgreiche Anwendung kombinatorischer Antikörerbibliotheken beruht letztlich auf dieser intrinsischen Entartung des Systems. Dabei bleibt das Prinzip bewahrt, dass Antikörper gegen alles mögliche existieren, aber auch solche, die gegen nichts gerichtet sind. Es ist einfach eine Frage der Bindungsenergien und der Anzahl an Bindungen, wobei die Zahl der möglichen Lösungen für die Bindung an ein Antigen als Funktion der ausprobierten Bindungseignisse ansteigt.

7. Kopplung von Erkennung und Replikation

Nachdem man erkannt hatte, dass die „chemische“ Lösung des Diversitätsproblems eine Aufspaltung der Originalpaarungen von Antikörerketten erfordert, wendete man sich der Frage zu, an welcher Stelle des Prozesses die Klonalität durch erneutes Zusammenpacken der Ketten wiederhergestellt werden sollte, um so jedes neu gebildete Paar als eine einzelne Einheit behandeln zu können. Im Prinzip hätte man mit den Proteinen arbeiten können, es zeigte sich aber, dass es einer genetischen Lösung bedurfte, da wir viel besser in der Lage sind, einige Kopien eines Gens zu erzeugen als einige Kopien des zugehörigen Proteins. Eine solche genetisch basierte Lösung verlangte zweierlei Arten von Kopplung zwischen Erkennung und Replikation: Zunächst mussten die Gene der schweren und leichten Ketten miteinander gekoppelt werden, und sie mussten außerdem mit ihren Proteinen in der Weise gekoppelt werden, dass die Packung gewonnen und repliziert werden kann. Die Vorgabe einer Replikation ist gleichzusetzen mit der Forderung, dass möglicherweise sehr selten auftretende Bindungseignisse amplifiziert werden müssen.

Mit diesen Vorgaben ist der Gedanke an Viren naheliegend.^[13,14] Vorstellbar ist der Aufbau eines Systems mit einer großen Zahl von replizierenden Partikeln, die im Innern die für die einzelnen Antikörerpaaare codierenden Gene und auf der Außenseite die zugehörigen Proteine tragen. Die Protei-

ne könnten entweder in viraler Plaque exprimiert oder direkt an die Oberfläche des Virions geknüpft werden. Auf diese Weise könnte die gesamte Packungseinheit anhand ihrer Fähigkeit zur Antigenbindung selektiert und dann repliziert werden. Dies wäre die Realisierung von Ehrlichs Zauberkul- gel, in der Art, dass hunderte Millionen unterschiedlicher Antikörper in einer wenige hundert Mikroliter fassenden Lösung in einem Reagenzglas erzeugt werden können. Dar- über hinaus könnte jeder interessierende Antikörper, selbst wenn es nur ein einzelnes Molekül davon gäbe, repliziert werden. Bezuglich therapeutischer Antikörper ergibt sich das vielversprechende Konzept, das gesamte Diversitätssystem eines Individuums in einem Reagenzglas „abzufüllen“. Be- denkt man zudem die mögliche Bildung nichtnatürlicher Paare, so kann die Diversität viertausendfach größer sein als die des Individuums. Um einen Eindruck vom derzeitigen Stand der Technik zu erhalten, sei darauf hingewiesen, dass kommerzielle Anbieter, wie etwa die Firma Cambridge Antibody Technologies, kombinatorische Antikörperbibliotheken in Phagen vertreiben, die mehr als 100 Milliarden ver- schiedene Antikörper enthalten.^[35]

Mehrere Lösungsstrategien zum Aufbau der die Erken- nung und Replikation koppelnden Packung wurden entwi- ckelt (Abbildung 5). Das grundlegende Konzept besteht je- weils darin, dass eindeutig spezifische Antikörper durch die replizierende Packung exprimiert werden und dass sich die für die Antikörperketten codierenden Gene im Innern der Packung befinden.^[13,14,36–68] Die Antikörpervergene sind so aus- gelegt, dass sie im Tandem mit den für die Bestandteile der Packung codierenden Genen replizieren. Ein sehr verbreite- tes System ist in Abbildung 6 illustriert. Der Antikörper wird auf der Oberfläche der filamentösen M13-Phage exprimiert, und die dafür codierenden Gene befinden sich im Innern des Virusteilchens. Das M13-Virus ist ein ca. 1 µm langer Stab mit vier Proteinen an einem Ende des Stabes, für die das Gen 3 des Virus codiert.^[69,70] Der Trick besteht in der Entwicklung eines Genkonstrukt, das sich in den Reifungsprozess des Virus in einer Weise einklinkt, dass die Expression des Antikörpers an eines (oder in seltenen Fällen zwei) der vier durch Gen 3 codierten Protein gekoppelt wird, während das

für den Antikörper codierende Gen im Innern des Virus verpackt wird.

Die verschiedenen Methoden, die für diese offenkundig schwierige Aufgabe entwickelt wurden, sind in der Literatur dokumentiert^[13,14] und werden hier nicht näher geschildert. Auf einen interessanten chemischen Aspekt soll an dieser Stelle aber hingewiesen werden: Eine Hauptaufgabe des Systems besteht darin, die beiden Antikörperketten zur Paarung zu bringen. Dies gelingt einfach, wenn beide Ketten zum Zusammenbau in den periplasmatischen Raum von *E. coli* gelenkt werden. Das Volumen des periplasmatischen Raumes ist kleiner als 10^{-15} Liter und enthält nur einige hundert Moleküle in relativ hohen, mikromolaren Konzen- trationen, sodass die nanomolare Bildungskonstante für die Kettenpaarung weit übertroffen wird. Außerdem ist zu be- achten, dass sich die Reaktionsprodukte replizieren und deshalb – anders wie in der chemischen Synthese – so etwas wie eine Ausbeute nicht relevant ist.

Abbildung 7 zeigt ein Beispiel für eine kombinatorische Antikörperbibliothek, die in diesem Fall gegen das Hepatitis-B-Virus aufgebaut wurde. Sowohl die Phagen als auch die Hepatitis-Viren sind groß genug, um im Elektronenmikro- skop sichtbar zu sein, sodass sich ihre Strukturen beobachten lassen.^[71] Jeder Phage (stabförmige Teilchen) ist an ein Hepatitis-B-Virus (sphärische Teilchen) gehetet, und zwar aus- schließlich mit dem Ende, an dem der Antikörper im Kon- jugat mit dem Gen-3-Protein exprimiert wurde. Gewöhnlich kommt es zu nur einem Bindungseignis, allerdings zeigt der Einschub einen Fall, bei dem zwei stabförmige Phagen an einem Hepatitis-B-Virus heften. Dies kann eintreten, weil die Hülle des Hepatitis-Virus aus vielen Kopien eines einzelnen Proteins (des Antigens) aufgebaut ist. Weil das Gen-3-Protein auch zur Anheftung des Phagen an *E. coli* benötigt wird (im Infektionsvorgang), können nicht alle vier Gen-3-Proteine durch Antikörper derivatisiert werden, da andernfalls der Phage nicht infektiös wäre. Daher ist ein Phage mit vier Antikörpern nicht selektierbar, selbst wenn er an ein Antigen bindet. Obwohl dies nicht mit Sicherheit bekannt ist, gibt es wohl sterische Aspekte, die dafür sorgen, dass die Gen-3-Konstrukte auf die Expression von Einzelkopien von Anti-

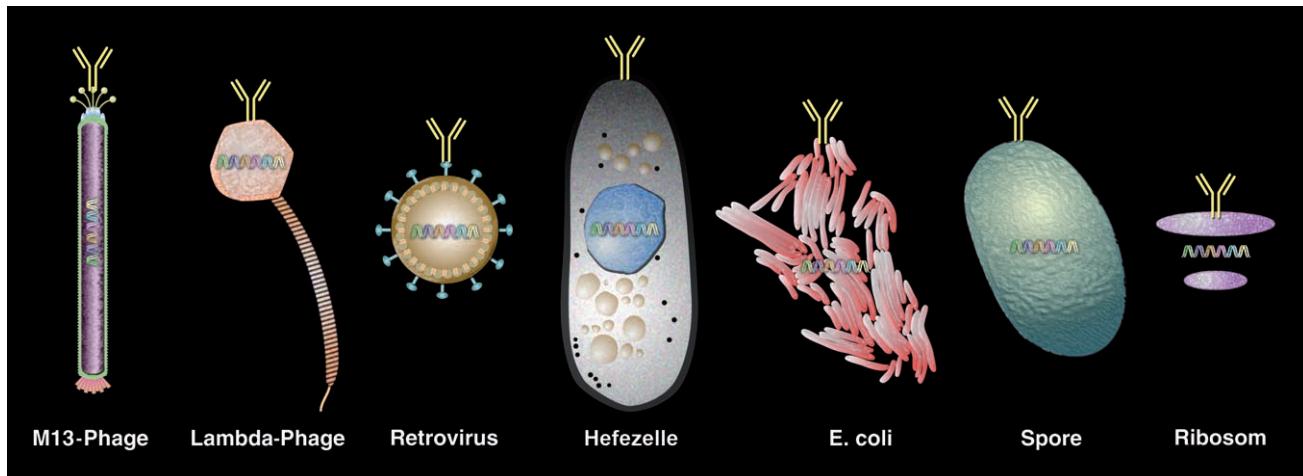


Abbildung 5. Systeme, die zur Kopplung von Replikation und Erkennung von Antikörpervergenen mit ihren zugehörigen Proteinen verwendet wurden, um Komponenten der kombinatorischen Antikörperbibliothek zu selektieren und zu replizieren.

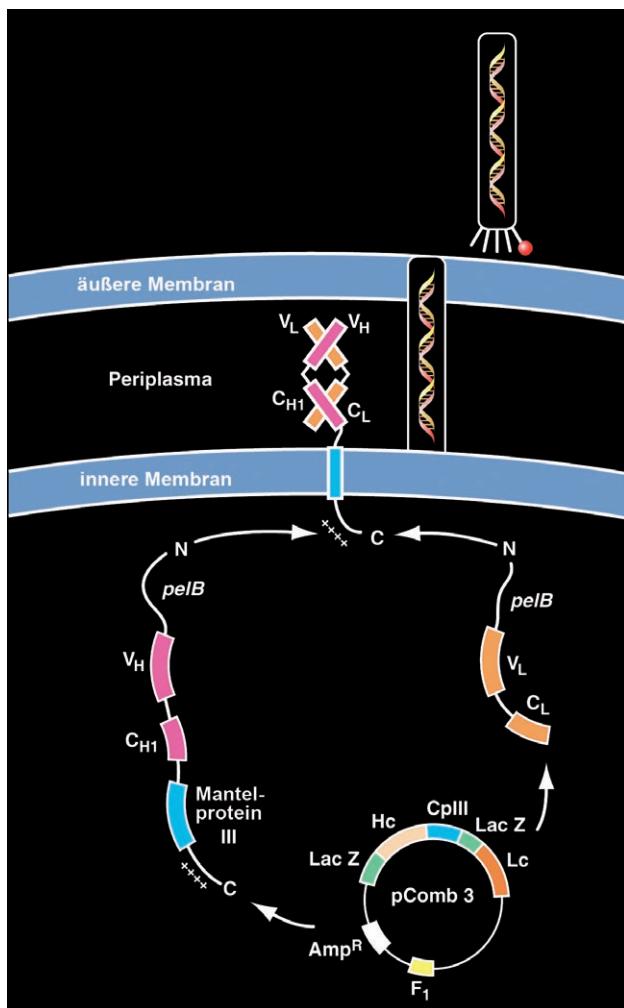


Abbildung 6. Ein Genexpressionssystem für schwere und leichte Antikörperketten in M13-Phagen. Der Phagemidvektor pComb3 kann die Gene der leichten (V_L und C_L) und der schweren Ketten (V_H und C_{H1}) beherbergen. Das für die schweren Ketten codierende Genkonstrukt codiert auch für das virale Gen-3-Protein. In der Praxis werden die genetisch produzierten schweren und leichten Antikörperketten durch die *pelB*-Leitsequenz zum periplasmatischen Raum transportiert, wo sie konjugieren und sich während der Reifungs- und Assemblierungsphase des Virus an das Gen-3-Protein des Phagen heften. In gewissem Sinne wird das Virus übertölpelt, indem man ihn das Antikörpermolekül an sein eigenes Gen-3-Protein heften lässt (roter Punkt oben rechts). Weil ein Helfervirus verwendet wird, gibt es zwei Arten von Gen-3-Protein in der Zelle: natives Gen-3-Protein, das für die Zellinfektion benötigt wird, und Gen-3-Protein mit einem angehefteten Antikörpermolekül. Die Menge, in der diese Proteine auf der Phagenoberfläche vorliegen, wird durch die Konkurrenz zwischen Virusreifung und Virusassemblierung bestimmt, wobei aber nur antikörpertragende Phagen über die Antigenbindung selektierbar sind (in einem als „Panning“ bezeichneten Prozess). Das Gen, das für die aus leichten und schweren Ketten bestehenden Proteine codiert, ist im Innern des Virus verpackt. In Gegenwart des Helfervirus ermöglicht die intergene F1-Region des Vektors, dass das einzelsträngige Phagemid im Innern des Virus verpackt wird. Im Endeffekt erhält man ein Phagenpartikel mit einem Antikörper an der Außenseite (roter Punkt oben rechts) und dem dafür codierenden Gen im Innern.

körpern beschränkt sind. Ein alternativer Mechanismus, den wir hier aber nicht näher betrachten, beruht auf der Express-

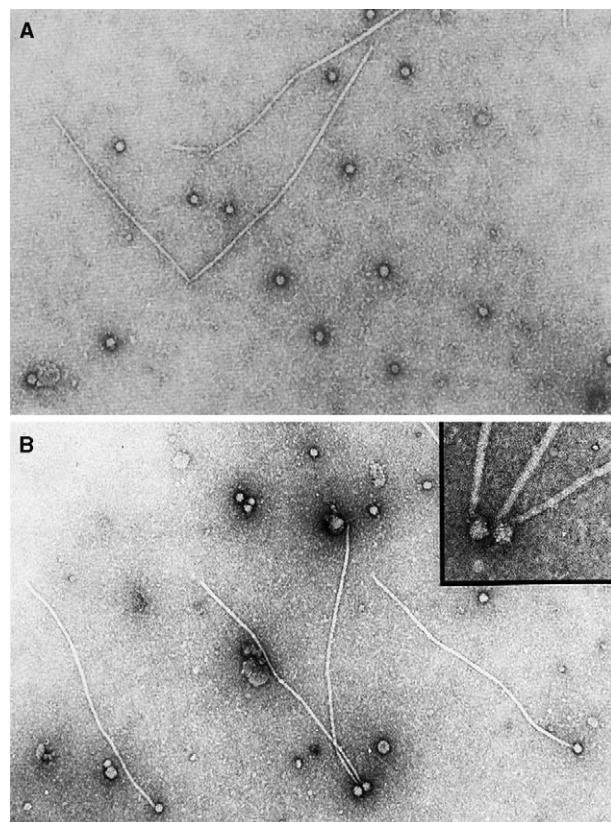


Abbildung 7. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (Hitachi, $\times 35\,000$) von HBsAg-Teilchen (HBsAg = Oberflächenantigen des Hepatitis-B-Virus) und filamentösen Phagen. Frische Phagen wurde in der Vor-Panning-Stufe (a) oder in der dritten Panning-Stufe (B) der JM_K-Bibliothek präpariert und 30 min mit HBsAG-Teilchen inkubiert. Die erhaltenen Komplexe wurden mit einem auf einem Gitter angebrachten Antikörper gegen HBsAg vereinigt und dann gewaschen, fixiert und negativ angefärbt. Die Gitter wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Man beachte, dass im oberen Teil der Abbildung (Kontrollexperiment) keiner der stabförmigen Phagen mit seinem Ende an den Hepatitis-B-Teilchen (kleine Kugeln) heftet, während im unteren Teil sämtliche nun antikörperhaltige Phagen an die Hepatitis-B-Virions heften.^[71] Copyright National Academy of Sciences.

sion von mehrfachen Kopien von Antikörpern entlang des stabförmigen Phagen durch Anheften der Ketten an das Gen-8-Protein, dessen 2700 Kopien die helicale Oberfläche des 1 μm langen Phagen bilden.^[69,70] Obwohl dieser Ansatz einige Anwendungen gefunden hat, besteht ein gravierender Nachteil darin, dass wegen der großen Zahl von Antikörpern, die an das Gen-8-Protein binden, auch schwach bindende Antikörper selektiert werden, die als einzelne Moleküle ineffektiv sein können, aber als Gesamtoberfläche erkannt werden.

8. Lösung des Toleranzproblems: die nichtnatürlichen Paare

Kombinatorische Antikörperfamilienbibliotheken bieten eine Lösungsstrategie für das *in vivo* auftretende Toleranzproblem an. Wie viele andere der hier diskutierten Aspekte der Immunchemie ist das Problem der immunologischen Toleranz

Gegenstand umfangreicher Forschungen und übersteigt den Rahmen dieses Aufsatzes. Für unsere Zwecke wollen wir festhalten, dass immunologische Toleranz bedeutet, dass ein Individuum keine Antikörper gegen körpereigene Antigene produzieren kann. Die biologische Erzeugung von humanen Antikörpern gegen humane Proteine ist daher nicht erlaubt. Dies ist ein grundsätzliches Problem für die Entwicklung und Anwendung therapeutischer Antikörper, da, außer bei infektiösen Erkrankungen, die meisten therapeutischen Antikörper gegen ein körpereigenes Ziel gerichtet werden. Gewöhnlich möchte man eine pathogene Verbindung aus dem Körper entfernen, z.B. ein als Gelenkgift wirkendes Molekül bei rheumatischer Arthritis oder eine Krebszelle, die ein spezifisches Zelloberflächenepitop aufweist. Da das biologische Phänomen der Toleranz jedoch auf der zellulären Ebene auftritt – die per Definition die Paare aus schweren und leichten Ketten einschließt –, muss es sich nicht auf die nichtnatürlichen Paare erstrecken. In anderen Worten tritt kein Toleranzphänomen auf, wenn die Lösungsstrategie für die Antigenbindung auf einer rein chemischen Methode basiert. Wie wir aus Abbildung 8 ersehen können, ergeben die jeweils zehn unterschiedlichen schweren und leichten Ketten in zehn unterschiedlichen Antikörpern in diesem Beispiel eine kombinatorische Bibliothek aus 100 Antikörpern, von denen 90 aus nichtnatürlichen Paarungen zusammengesetzt sind. Wenn dies eine humane Bibliothek wäre, dann könnten die therapeutischen Antikörpern aus diesem Pool von nichtnatürlichen Paaren selektiert werden.

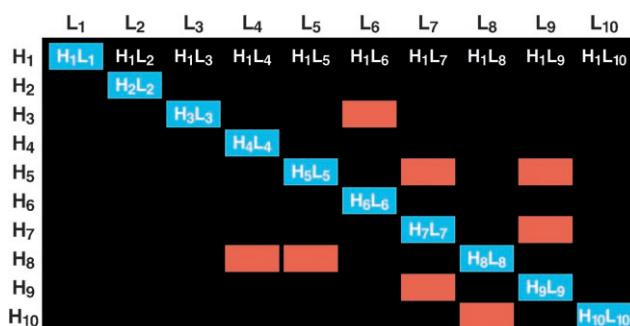


Abbildung 8. Eine theoretische Bibliothek aus zehn Antikörpern, deren schwere und leichte Ketten getrennt und rekombiniert werden. Nur zehn der 100 rekombinierten Antikörper sind Originalpaare (blaue Diagonale), während die anderen 90 Antikörper neu gebildet wurden.

9. Zusammenfassung der Hauptmerkmale kombinatorischer Antikörperbibliotheken

Bevor wir zu den experimentellen Beispielen übergehen, um die wichtigsten konzeptionellen Merkmale von kombinatorischen Antikörperbibliotheken zu illustrieren, sollen einige dieser Merkmale hier zusammengefasst werden:

1. Eine Immunisierung ist nicht erforderlich.
2. Die Bibliotheken unterliegen keinem Toleranzphänomen.
3. Die Bibliotheken sind nicht auf natürliche Spezifitäten beschränkt, da sie die Möglichkeit haben, neuartige Paare aus schweren und leichten Ketten zu erschaffen.
4. Antikörper können aus Menschen in Form klonaler Einheiten gewonnen werden.
5. Jeder Antikörper, der vom Organismus jemals produziert wurde, kann gewonnen werden, gleichgültig ob er gerade produziert wird oder nicht.
6. Sehr seltene Spezifitäten sind zugänglich.
7. Antigene müssen nicht *in vivo* immunogen sein; dies gilt z.B. für Kristalle und Metallionen.
8. Die Bibliotheken ermöglichen die Analyse eines „Jackpots“ und die Bestimmung von chemischen Konsensussequenzen.
9. Kombinatorische Antikörperbibliotheken bieten eine Plattform für die Optimierung von Antikörperaffinitäten.

10. Synthetische Antikörper, nichtimmunogene Antigene und die Bedeutung von „Jackpots“ und chemischen Konsensussequenzen

Beim Aufbau einer kombinatorischen Antikörperbibliothek hat man die Wahl zwischen zwei Quellen für die Antikörpergene. Diese können entweder aus einem Tier gewonnen werden (immunisiert oder nichtimmunisiert), oder man kann die für die sechs Antikörperbindungsstellen codierenden Oligonukleotide einfach synthetisieren. Betrachten wir als Beispiel eine Studie, in der die Fähigkeit einer vollständig synthetischen Antikörperbibliothek untersucht wurde, an Metallionen und Kristalle anorganischer Moleküle zu binden.^[72] Diese gehören zu den einfachsten möglichen Zielstrukturen. In diesem Fall waren die für die CDRs codierenden Gene synthetisch und vollständig randomisiert (Abbildung 9). Die Bindungsenergie wurde erzeugt, indem die Metallspezies im dreidimensionalen Raum an die sechs synthetischen CDRs unter Bildung eines Koordinationskomplexes angenähert wurden. Die betrachtete Bibliothek ist von mittlerer Diversität mit nur 10^8 unterschiedlichen Komponenten. Antikörperklone wurden bezüglich ihres Bin-

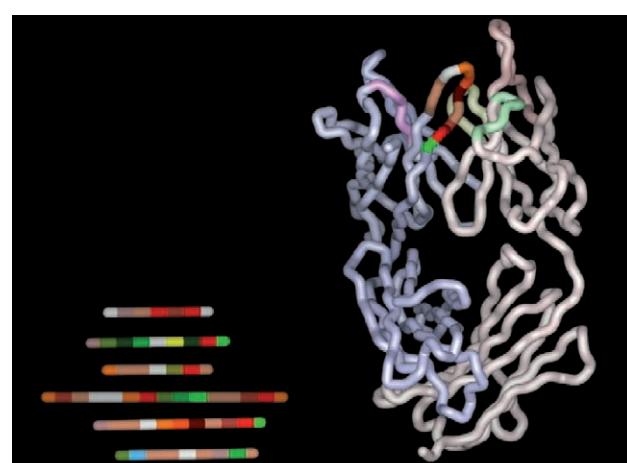


Abbildung 9. Darstellung der sechs synthetischen CDRs (links unten) und ihre Lokalisierung im Antikörpermolekül. Die Bindungstasche des Antikörpers und die sechs CDR-Schleifen, die die dreidimensionale kombinatorische Matrix bilden, sind hier besser zu erkennen als im raumfüllenden Modell in Abbildung 1.

dungsvermögens an Kupfer-, Cer-, Zink-, Eisen- oder Blei-
ionen oder an Magnetitkristalle selektiert. Keines dieser
Antigene ist immunogen, was bedeutet, dass sie – anders als
Proteine und niedermolekulare Haptene – nach Injektion in
einen Tierorganismus keine Antikörperbildung induzieren
(tatsächlich können Magnetitkristalle als solche überhaupt
nicht injiziert werden). Vor dem Selektionsschritt wurden die
Metallionen an chelatisierendes Sepharosegel gebunden, und
antikörpertragende Phagen, die einen Komplex mit den
Metallionen bilden, wurden selektiert. Im Fall der Magnetit-
kristalle machte man sich die magnetischen Eigenschaften
der Kristalle zunutze, um bindende von nichtbindenden
Phagen zu separieren. Die Kristalle wurden der Phagen-
bibliothek ausgesetzt, und die Komplexe aus den antikörper-
tragenden Phagen und den Kristallen wurden einfach mit
einem Magneten aus der Lösung entfernt.^[72]

Die CDR-Sequenzen mehrerer Antikörper, die bezüglich
der Bindung von Metallionen selektiert wurden, sind in Ab-
bildung 10 zusammengefasst. Alle Sequenzen sind unter-
schiedlich, sodass man – ohne über chemische Kenntnisse zu

Cu ²⁺	Ce ³⁺	Pb ²⁺
GRVHHHSLDV	GQVMZELGDA	GNLRRKTSIDI
SWKHHAHWDV	GLTEZOLQDG	GESDSKREDG
GSDWHDRCGD	GYSYSVSPDA	GGPVAGWDW
GHHMYGGWDH	GRLGLVMTDE	GPLQHTYPDY
GHWGRHSLDT	STWPGRHLGZLSDS	GWKVTAEESTDTEGLFDL
GHLHHQHLDL	GYELSWGVDZQGEWWDI	GTRVWRVCOHNHEEDG
SSQRMLGDN	GPVRLDZSKGQYDN	GEWWCSFAMCPARWDF
SHHGHHYLNH	GLSZHIVSETQSSGDL	GDTIFGVTMGYYYAMDV
GKLMMSVCRDTEGCDH	GLESLSKLVGVZLGGDL	
GDTHRGHLRHLPHDW	GNMILGGPGCWSSADI	
GWGLWMKPFVWRAWDM	GCWNVZRLVYHPPDG	
Zn ²⁺	GFEVTCSWFGHWGRDS	Fe ³⁺
SHTHALPLDF		SASMRSAIGLWRTMDY
GRVHHHSLDV		GDREIFHFMZWPLRVDV
GQSSGGDTDD		SZNPQQVCGVRGZDV
GQWTPRGDDF		GNRLSSGHLLKQGZDG
GRCCPSSCDE		GGSDWZIACCCREDDL
GPAKHRHRHVGQMHDS		GMVSMMGOSRPTQCDC
		GVIKWIRWVVRTARDV
		GWFWRLLPTPRAPSDV

Abbildung 10. Aminosäuresequenzen von HCDR3-Regionen, die bezüglich der Bindung von Metallionen selektiert wurden. Z steht für ein Amber-Stopcodon, das im für die Expression genutzten *supE*-Strang zu Q translatiert wird.^[72]

verfügen – keinen direkten Hinweis erhält, auf welche Weise es zu einer günstigen Bindungsenergie kommt. Mit Überlegungen zur Koordinationschemie wird dagegen der Mechanismus der Antikörper-Metall-Bindung klar erkennbar. Zum Beispiel sind viele der an Cu²⁺ und Zn²⁺ bindenden Sequenzen reich an Histidin, was mit der bekannten Rolle von Stickstoffliganden in Koordinationskomplexen dieser Metallkationen in Einklang ist. Tatsächlich enthalten Metalloenzyme mehrere Imidazolgruppen im aktiven Zentrum zur Koordination von Kupfer- und Zinkionen. Bei genauerer Betrachtung kann man auch in anderen Sequenzen viele Gemeinsamkeiten mit der Koordination von Metallionen durch aktive Zentren von Enzymen erkennen. Uns genügt die einfache Aussage, dass die große Zahl von selektierten Antikörpern besagt, dass es eine große Zahl von „chemischen“ Lösungen für das Metallkoordinationsproblem gibt, wobei auch keine eindeutige Konsensussequenz zu erkennen war. Gleichwohl beginnen wir bereits klar zu sehen, wie bedeutend es ist, eine große Zahl von Lösungen für ein Bindungsproblem zu erhalten. Eine vergleichende Analyse großer Antikörperzahlen, die zur Bindung an die gleiche

Zielstruktur befähigt sind, deckt Einzelheiten auf, die bei einer Untersuchung nur weniger Bindungsereignisse verborgen bleiben.

Bei der Untersuchung von Antikörpern, die bezüglich ihrer Bindung an Magnetitkristalle (Eisenoxid, Fe₂O₃) selektiert wurden, zeigt sich ein qualitativer, aber dennoch wichtiger Unterschied in den selektierten Antikörpersequenzen (Abbildung 11). Es gibt acht Proteinsequenzen, in denen sich zwei verschiedene Sequenzen je dreimal wieder-

<i>Konvergente Evolution</i>	
Mutante der IamB-Schleife	L E R R T V K H H V N L E
	S R R S R H H P R M W N G L D V
	S R R S R H H P R M W N G L D V
	S R R S R H H P R M W N G L D V
Antikörper HCDR3	G R F K R V R D R W V V I F D F
	G V A R S K K M R G L W R L D V
	G L A V R S K R G R F F L F D F
	G L A V R S K R G R F F L F D F
	G L A V R S K R G R F F L F D F
Mutante der IamB-Schleife	L E G I R R S K L R L E

Abbildung 11. Vergleich von Aminosäuresequenzen der HCDR3-Regionen, die bezüglich der Bindung an Magnetit selektiert wurden, mit auf ähnliche Weise selektierten IamB-Mutanten. Ähnliche Teilesequenzen sind in Orange hervorgehoben. Die unterstrichene Teilesequenz des dritten Klons markiert eine ungewöhnliche basische Region.^[72] Copyright National Academy of Sciences.

holen. Dies ist der klassische Fall eines „Jackpots“, da die Chance sehr gering ist, dass sich die gleichen Sequenzen in einer aus 10⁸ Komponenten bestehenden Bibliothek stochastisch wiederholen. Ein „Jackpot“ bedeutet, dass die Sequenz eine „chemische“ Lösung des Bindungsproblems ist. Die Erkenntnis ist wichtig, dass bei einem echten „Jackpot“ es die Entartung des genetischen Codes erlaubt, dass unterschiedliche Nucleotide für die gleiche Proteinesequenz codieren, sodass die Gene für jede Antikörpersequenz unterschiedlich sein können. Folglich betrifft der Selektionsprozess auf der Proteinebene unterschiedliche Mitglieder der Bibliothek und nicht deren Kopien. Allerdings kann bei sehr großen Bibliotheken die Selektion von Kopien wichtige Informationen über bevorzugte Bindungsereignisse liefern.

So überzeugend ein „Jackpot“ auch ist, gibt er keine Auskunft darüber, welche der Aminosäurereste die wichtigsten sind und welche entartet sind. Diese Information kann durch Bestimmung einer Konsensussequenz erhalten werden, basierend auf Antikörpern, die an die Zielspezies binden, aber nicht zu einem selektierten „Jackpot“ gehören. In Abbildung 11 ist eine solche Sequenz dargestellt. Das RSK-Motiv eines „Jackpots“ (unterer Satz von Sequenzen) bleibt beibehalten, während der Rest der Sequenz variiert. Basierend auf einem Selektionsprozess von Antikörpern haben wir damit durch Analyse des „Jackpots“ und der Konsensussequenz herausgefunden, dass das RSK-Motiv ein wichtiger Bestandteil des Bindungsprozesses ist. In der Analyse fand sich ein Antikörper, der keine Sequenzhomologie mit einem der beiden „Jackpots“ aufweist. Man kann lediglich feststel-

len, dass dieser wie die Mitglieder des „Jackpots“ reich an basischen Aminosäureresten ist, die außerdem an den genau gleichen Positionen auftreten wie in der „Jackpot“-Sequenz. Welche Bedeutung diese Sequenz für das Bindungsvermögen hat, kann nur in Verbindung mit anderen Mitgliedern des „Jackpot“-Ensembles abgeschätzt werden, was erneut die Vorteile eines Analyseverfahrens verdeutlicht, das viele „chemische“ Lösungen für die Antikörper-Antigen-Bindung bietet.

In der Natur beruht der Prozess der Darwinschen Evolution auf Mutation und selektiver Vermehrung, in der Weise, dass eine verbesserte Lösung für ein physiologisches Problem erhalten wird. In der Enzymevolution kann z. B. die Selektion zu einer höheren Katalysegeschwindigkeit ($k_{\text{kat.}}$) oder zu einer stärkeren Bindung an ein Substrat (K_D) führen. Oft gibt es eine bevorzugte Lösung für das Problem, und man findet dann, dass mehrere Systeme in einem als konvergente Evolution bezeichneten Prozess zu einer gemeinsamen Lösung zusammenlaufen. Die Analyse einer selektierten Antikörperbibliothek ist ein ganz ähnlicher Prozess, insofern nach einer konvergierenden Lösung für ein Bindungsproblem gesucht wird. In unserer Diskussion haben wir Mutation und Selektion bislang nicht berücksichtigt, da große Antikörperzahlen bewirken können, dass beide Prozesse verzichtbar sind. Die Frage lautet, ob sich die Vorteile, die sich aus dem Umgang mit großen Antikörperzahlen ergeben, gegenüber der Fähigkeit zur wiederholten Mutation und Selektion, die eine Verfeinerung bestimmter Lösungen ermöglicht, behaupten können. Die Antwort auf diese wichtige Frage hängt davon ab, mit wie vielen unabhängigen Lösungen man beginnen kann und welche Zeit Mutations- und Selektionsprozesse zur Erzeugung einer verbesserten Lösung in Anspruch nehmen. Man kann davon ausgehen, dass die Antwort sehr vom System abhängt. Wir wissen jedoch, dass man bei Laborsystemen Konvergenz beobachten kann, wenn verschiedene Bibliotheken viele mögliche Lösungen enthalten. Es stellt sich die Frage, ob es eine Konvergenz zwischen Antikörpern und anderen nichtimmunen Proteinen gibt, wenn diese jeweils bezüglich der Bindung an das gleiche Antigen selektiert werden. Die Aminosäuresequenzen, die nichtimmune Proteine zur Bindung heranziehen, ähneln oft denen von Antikörpern. Ein einschlägiger Fall ist die Bindung an Magnetit. Eine unabhängige Forschungsgruppe selektierte *E. coli*-Varianten bezüglich der Bindung an Magnetit, indem zufällige Sequenzen in das auf der Oberfläche des Bakteriums befindliche Lambda-Rezeptorprotein (LamB) eingefügt wurden.^[65, 66, 73] Es wurden zwei Sequenzen selektiert, die stark homolog zu den Sequenzen sind, die in den aus ungefähr 10^6 randomisierten Sequenzen isolierten Antikörper-„Jackpots“ gefunden wurden (Abbildung 11). Dies ist ein dramatisches Beispiel für eine konvergente Evolution, insofern sich die Proteinfaltungen der Antikörper und LamB ohne Zweifel stark unterscheiden, aber dennoch in beiden Strukturkontexten sehr ähnliche Sequenzen selektiert werden. Zusammengefasst ermöglicht die Verwendung von großen Antikörperzahlen die Bestimmung von „chemischen“ Lösungen für ein Bindungsproblem. Die wichtigsten Merkmale sind „Jackpot“, Konsensussequenzen und konvergente Evolution. Der entscheidende Punkt ist, dass diese Merkmale, die ur-

sprünglich für sehr einfache Antigene aufgedeckt wurden, auch bei therapeutischen Antikörpern zutreffen.

11. Erhöhung der Diversität des natürlichen Antikörperrepertoires durch Ketten-Shuffling

Wir haben bereits diskutiert, wie kombinatorische Bibliotheken zur Gewinnung von Antikörpern genutzt werden können und dabei das Toleranzproblem umgehen. Dies ist von großer Bedeutung, weil die meisten therapeutischen Antikörper intrinsisch gegen körpereigene Antigene gerichtet sind. Mit dem was wir bis jetzt wissen, wäre zu erwarten, dass die Protokolle zum Aufbau und Screening von Antikörperbibliotheken mehr oder weniger feststehen. Zum Beispiel ist aber die Methode, mit der der therapeutische Antikörper Humira selektiert wurde, recht ungewöhnlich und geeignet, einige grundlegende Konzepte aufzuzeigen. Humira ist ein Antikörper gegen den Tumornekrosefaktor α (TNF), ein starkes inflammatorisch wirkendes Lymphokin, das in hohen Konzentrationen viele der bei Psoriasis und rheumatischer Arthritis auftretenden Schädigungen verursacht. Eine Entfernung dieses körpereigenen Antigens wäre daher von therapeutischem Nutzen, und tatsächlich bilden entsprechende Antikörper eine wichtige Klasse von Wirkstoffen, die weltweit eingesetzt werden. Humira wurde bei Cambridge Antibody Technologies (jetzt im Besitz von Astra-Zeneca) entwickelt. Ausgangspunkt der Entwicklung war ein Maus-Antikörper gegen TNF, der als Templat für die Selektion eines menschlichen Antikörpers verwendet wurde. Das Entwicklungsschema ist in Abbildung 12 gezeigt. Die zentrale Idee war es, einen bekannten monoklonalen Maus-Antikörper gegen TNF als Templat zu verwenden. Das Templat wurde Bibliotheken humaner leichten und schweren Ketten ausgesetzt, sodass die zum Templat komplementären Ketten se-

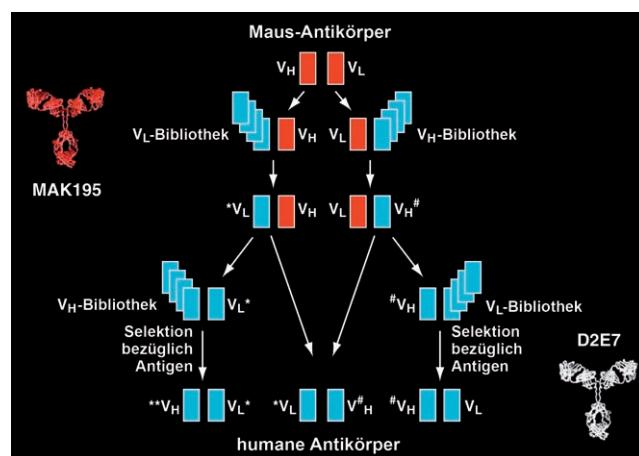


Abbildung 12. Vorgehensweise bei der Entwicklung von Humira (D2E7). Oben links (rot): monoklonaler Maus-Antikörper MAK195; unten rechts (weiß): therapeutischer Antikörper D2E7. Die blauen Kästchen markieren humane Antikörperketten, die roten Kästchen Maus-Antikörperketten. Der monoklonale Maus-Antikörper MAK195 wurde als Templat zur Selektion von komplementären humanen schweren und leichten Ketten verwendet. Abbildung mit Genehmigung von Sir Gregory Winter.

lektiert wurden. Diese vorab selektierten humanen Ketten wurden dann zu einem vollständigen humanen Antikörper rekombiniert.

Beim Humira-Protokoll war die Zahl der Antikörperketten, die in der endgültigen Bibliothek berücksichtigt werden konnten, eingeschränkt, da nur Komponenten in Betracht kamen, deren prinzipielles Komplementierungsvermögen nachgewiesen war. Mit der Leistungsfähigkeit moderner Screening-Verfahren könnte jedoch der Templatsschritt überflüssig werden, weil sämtliche Kombinationen, einschließlich derjenigen, die durch Komplementierung selektiert werden könnten, bereits in der großen Ausgangsbibliothek vorliegen. Diversität ist heutzutage kein Thema mehr, und das Problem besteht in erster Linie darin, die Mitglieder einer Bibliothek zugänglich zu machen. Dennoch verdeutlicht die elegante Methode, die zur Selektion des vollständig humanen therapeutischen Antikörpers Humira verwendet wurde, eindrucksvoll das Prinzip des Ketten-Shufflings, das letztlich auf dem oben diskutierten Prinzip der Kettenentartung basiert.^[24, 74, 75] Darüber hinaus unterstreicht es die Verwendung von nichtoriginalen Paarungen zur Erzeugung von humanen Antikörpern gegen körpereigene Antigene. Wir nennen dies das „Meines Großvaters Axt“-Problem. Beim Betrachten einer historischen Stätte kann man diese als das Gebäude wahrnehmen, in dem jemandens Vorfahren vor 800 Jahren gearbeitet haben, auch wenn das Gebäudeinnere vor 400 Jahren und das Gebäudeäußere im letzten Jahrhundert ersetzt wurden. Oder man kann sagen, dies ist die Axt meines Großvaters, obwohl mein Großvater die Klinge und mein Vater den Stiel ersetzt haben.

12. Zugang zu sehr seltenen Antikörperspezifitäten für die Therapie

Abbildung 13 illustriert eine Eigenschaft von Antikörperbibliotheken, die besagt, dass jeder jemals produzierte Antikörper eines Individuums oder einer Population von Individuen zugänglich ist, gleichgültig ob der Antikörper von diesen Individuen gerade produziert wird oder nicht. Im Grunde befindet sich dann die gesamte immunologische Vorgeschichte eines Individuums oder einer Population in einer wenigen hundert Mikroliter fassenden Lösung. Man bezeichnet dies als die „fossile Aufzeichnung“ einer immunologischen Vorgeschichte.^[76] Die meisten modernen Konzepte der Immunchemie beschränkten sich auf das Repertoire von Antikörpern, das zum jeweils gegenwärtigen Zeitpunkt von einem Individuum produziert wurde. Das Ziel dieser Aktivitäten war meist diagnostischer Art, um Informationen über eine Infektion oder aktive Autoimmunität zu erhalten. Wenn ein Individuum einen gestiegenen Antikörpertiter gegen einen Virus hatte, dann war dies ein Beweis für eine kürzlich zurückliegende Infektion. Auf ähnliche Weise zeigten Antikörper gegen körpereigene Substanzen, z. B. gegen DNA, eine Autoimmunerkrankung an. Nach Abklingen der Infektion ziehen sich dann diese Anzeichen meist in das Gedächtnis des Immunsystems zurück.

Immunologisches Gedächtnis bedeutet einfach, dass die Lymphocytenklone, die während einer Immunreaktion durch

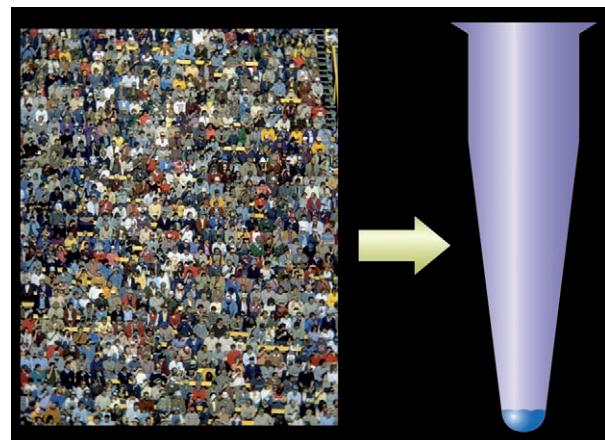


Abbildung 13. Mithilfe kombinatorischer Bibliotheken gelingt es, das Antikörperrepertoire eines Individuums oder einer Population von Individuen in einer Lösung von nur wenigen hundert Mikrolitern Volumen „abzufüllen“. Da man die Gene und exprimierten Proteine für jeden jemals produzierten Antikörper erhält, nennt man die Bibliothek die „fossile Aufzeichnung“ der immunologischen Vorgeschichte des Individuums. Da die Aufzeichnung aus den Genen abgerufen wird, enthält sie auch diejenigen Antikörper, die nicht gegenwärtig produziert werden.

Proliferation gebildet werden, nicht vollständig eliminiert, sondern als Gedächtniszellen gespeichert und bei erneuter Infektion aktiviert werden. Dieses Phänomen bildet die Grundlage von Schutzimpfungen, bei denen es weniger darauf ankommt, die Konzentration eines zirkulierenden Antikörpers aufrechtzuerhalten, als vielmehr dem Immunsystem einen zeitlichen Vorsprung zu geben. Wenn das Antigen (der Impfstoff) im immunologischen Gedächtnis verankert ist, kann das Immunsystem eine so genannte Sekundärreaktion auslösen, die viel schneller als eine Primärreaktion greift, da sie auf einen fertigen Pool von hoch entwickelten und selektierten Lymphocyten zurückgreifen kann, die schnell wiederhergestellt werden können. Die Gedächtniszellen produzieren nur wenige Antikörper für den Zellexport. Die Antikörperproduktion ist hauptsächlich auf den Bereich der Plasmamembran begrenzt, wo diese als Antigenrezeptoren fungieren. Da Antikörperbibliotheken nun auf der genetischen Ebene operieren, kann man die genetische Aufzeichnung der immunologischen Vorgeschichte eines Individuums abrufen, unabhängig von der Seltenheit eines bestimmten Antikörpers im Speicherkompartiment.

Es gibt ein zusätzliches Konzept, das wir berücksichtigen müssen, bevor wir ein experimentelles Beispiel für die Nutzung der „fossilen Aufzeichnung“ zur Gewinnung von seltenen Antikörperspezifitäten geben. Es handelt sich um das Konzept der immunologischen Überwachung, das besagt, dass maligne Zelltransformationen zwar regelmäßig auftreten, diese Zellen in den meisten Fällen aber vom Immunsystem als fremd erkannt und zerstört werden, bevor sie sich als bösartige Tumoren festsetzen können. Die Existenz dieses Phänomens war schwierig nachzuweisen, da wir, wie gerade diskutiert, auf der Ebene der Antikörperproteine nicht mehr viele Hinweise auf einen solchen Prozess zu erwarten haben, wenn die transformierte Zelle erst einmal eliminiert wurde.

Um näheren Aufschluss zu erhalten, wurde eine Antikörperbibliothek von zwanzig Krebspatienten mit unterschiedlichen Arten von Tumoren aufgebaut und nach spezifischen Antikörpern gegen metastatische Zellen durchsucht.^[77] Die Screening-Methode ist in den Abbildungen 14 und 15 illustriert. Zellen aus einem menschlichen Brustkrebs wurden in metastasierende und nichtmetastasierende Zellen selektiert. Dann wurden aus der Bibliothek diejenigen Antikörper selektiert, die nur an die metastasierenden Zellen binden. Es zeigte sich, dass nur sehr wenige solcher Antikörper in der Bibliothek vorliegen, und nur drei von 10^8 Klonen hatten diese Eigenschaft.

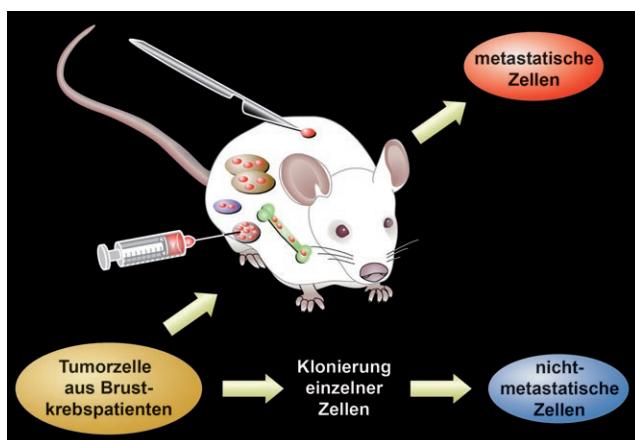


Abbildung 14. Eine Methode, die zur Selektion von Brustkrebszellen in metastatische und nichtmetastatische Phänotypen eingesetzt wurde. Menschliche Brustkrebszellen wurden durch Mäuse geschleust, wobei Zellklone selektiert wurden, die entweder immer oder nie metastasierten. Die menschlichen Zellen wurden dann vom Brustfettpolster und anderen Mausorganen gewonnen und kloniert, wobei permanente Zelllinien mit entweder metastatischen oder nichtmetastatischen Phänotypen erhalten wurden.

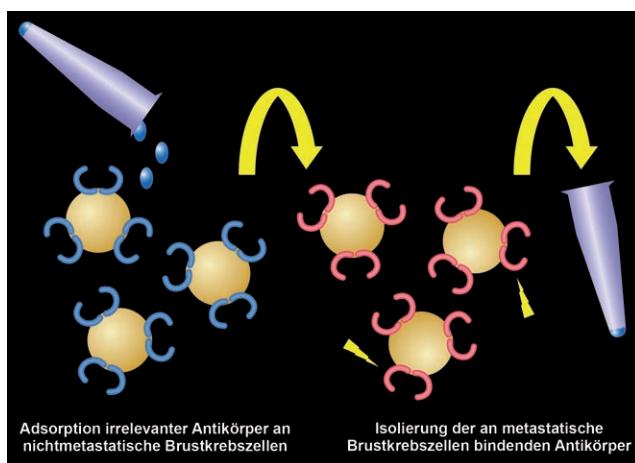


Abbildung 15. Eine Methode zur Selektion von Antikörpern, die nur an metastatische Zellen binden. Kombinatorische Antikörperbibliotheken in Phagen aus 20 Brustkrebspatienten wurden zunächst bezüglich nichtmetastatischer Zellen selektiert, um diejenigen Antikörper zu entfernen, die gegen nichtmetastatische Krebszellen gerichtet sind. Nach dem ersten Screening zurückgebliebene Phagen werden dann bezüglich ihrer Bindung an metastatische Brustkrebszellen selektiert.

In weiteren Analysen dieser Antikörper wurden bemerkenswerte Eigenschaften entdeckt.^[77] Eine erste Besonderheit war, dass diese Antikörper zweiwertige Kationen benötigten, um an die Zellen zu binden (Abbildung 16). Dies er-

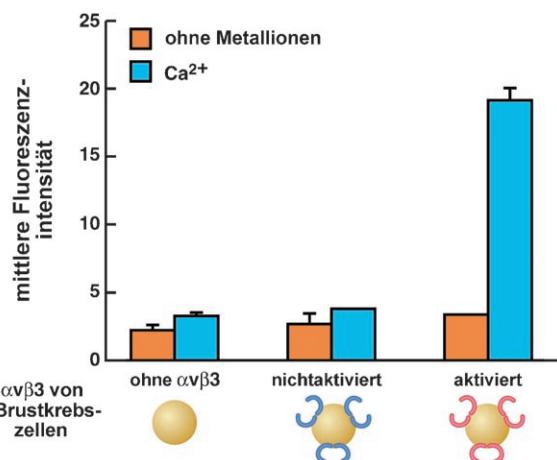


Abbildung 16. Kombinatorische Antikörper, die selektiv an metastatische menschliche Brustkrebszellen binden, benötigen drei Voraussetzungen: 1) Die Zellen müssen das Integrin $\alpha v\beta 3$ an ihrer Oberfläche exponieren. 2) Das Integrin muss aktiviert sein. 3) Es müssen zweiwertige Kationen vorliegen. Zum Nachweis der Antikörperbindung an die Zelloberfläche wurde eine Fluoreszenzmethode eingesetzt.

innerte an eine ähnliche Voraussetzung für die Bindung von Integrinmolekülen an ihre aktivierte Rezeptoren. Damit wurde dann relativ schnell erkannt, dass das Zielantigen dieser seltenen Antikörper tatsächlich ein Integrinmolekül ist. Noch interessanter war, dass die selektierten Antikörper nicht nur an das Integrin $\alpha v\beta 3$ binden, sondern die aktivierte Form des Integrinmoleküls benötigen (Abbildung 16). Tatsächlich weiß man, dass metastasierte Zellen die aktivierte Form dieses Integrins tragen, und dass dessen Aktivierung vermutlich mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht. Eine letzte Überraschung trat mit der Sequenzierung zutage, die aufzeigte, dass diese Antikörper das Arginin-Glycin-Aspartamsäure-Motiv (RGD) enthalten, das das Kernstück bei der Bindung aller natürlichen Liganden an Integrine ist (Abbildung 17). Die RGD-Sequenz im Antikörper war für die Erkennung der metastatischen Tumorzellen über deren Integrine essenziell (Abbildung 17), da die Mutation zu RGE zu einem Verlust des Bindungsvermögens führte. Ähnlich wie bei der Antikörperbindung an Magnetit gibt es eine bemerkenswerte Konvergenz der Sequenzen, die von seltenen humanen Antikörpern und von natürlichen Liganden zur Bindung an das Integrin $\alpha v\beta 3$ genutzt werden.

Was aber tun diese Antikörper? In Folgestudien wurde gezeigt, dass die Antikörper zum einen die Metastasierung von Zellen in die Lungen von Mäusen blockieren und zum anderen existierende Metastasen verringern (Abbildungen 18 und 19). Die Funktionsweisen der Antikörper wurden in Zellstudien aufgedeckt. Es wurde gezeigt, dass die Antikörper nach der Bindung an die Zelle zusammen mit ihrem oberflächenexponierten Antigen internalisiert werden und

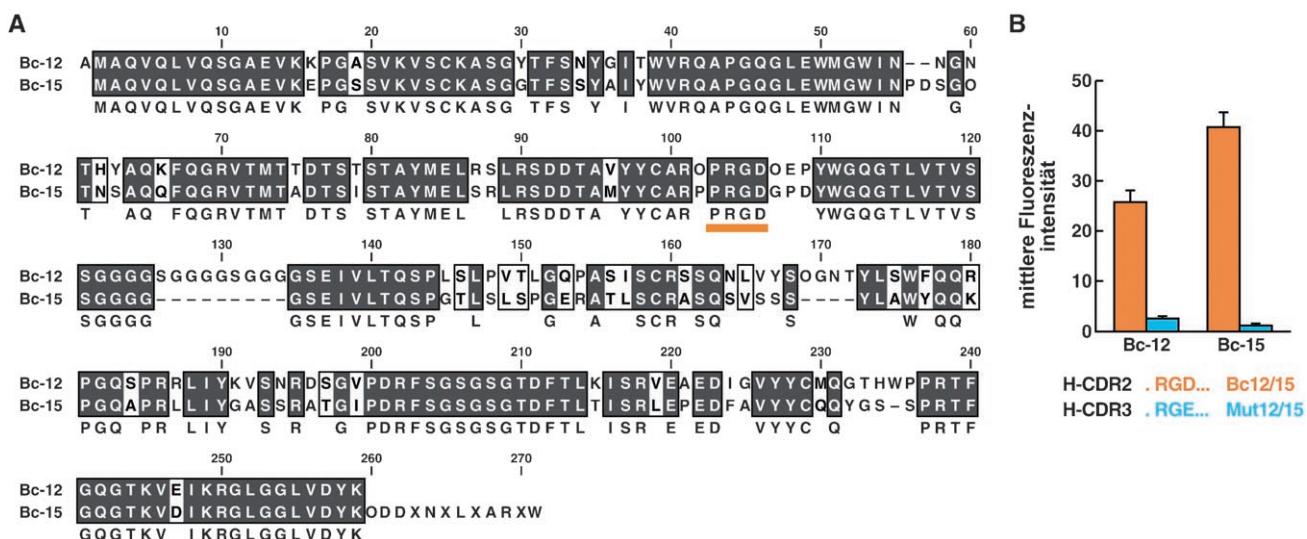


Abbildung 17. Translation von DNA-Sequenzanalysen von scFv-Antikörpern, die für metastatische Brustkrebszellen selektiv sind. Konsensussequenz von Bc-12 und Bc-15 (spezifisch für aktiviertes $\alpha\beta\beta 3$) im Vergleich zu Bc-20 (reaktiv mit nichtaktiviertem $\alpha\beta\beta 3$). Eine flusszytometrische Analyse (rechts) mit menschlichen BMS-Brustkrebszellen belegt einen Verlust des Bindungsvermögen in Mutanten von Bc-12 und Bc-15, die in CDR-H3 das RGE-Motiv anstelle des RGD-Motivs enthalten (Mut-12 und Mut-15). Das Signal für Mut-15 entspricht der Negativkontrolle.^[77] Copyright National Academy of Sciences.

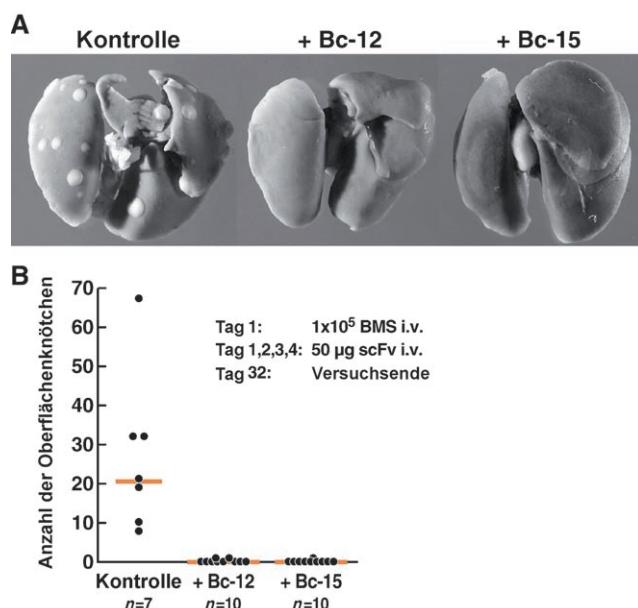


Abbildung 18. Effekt von Bc-12 und Bc-15 auf die Lungenkolonisierung durch menschliche Brustkrebszellen. A) Lungen von weiblichen Mäusen mit schwerer kombinierter Immundefizienz 32 Tage nach intravenöser Injektion von 10^5 BMS-Zellen. Die Mäuse wurden mit 50 μ g Bc-12 oder Bc-15 (intravenös) an den Tagen 1, 2, 3 und 4 behandelt. Kontrolltiere erhielten phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). B) Zahl der Lungenoberflächenmetastasen pro Tier. Die horizontale Linie markiert die mittlere Zahl an Metastasen pro Testgruppe. Mit scFv-Antikörpern behandelte Mäuse hatten signifikant weniger Metastasen ($P < 0.001$ im Kruskal-Wallis-Test).^[77] Copyright National Academy of Sciences.

wahrscheinlich den Zelltod durch einen apoptotischen Mechanismus auslösen (Abbildung 20). Der Hinweis ist wichtig, dass der biologische Effekt der Antikörper verschwand, wenn

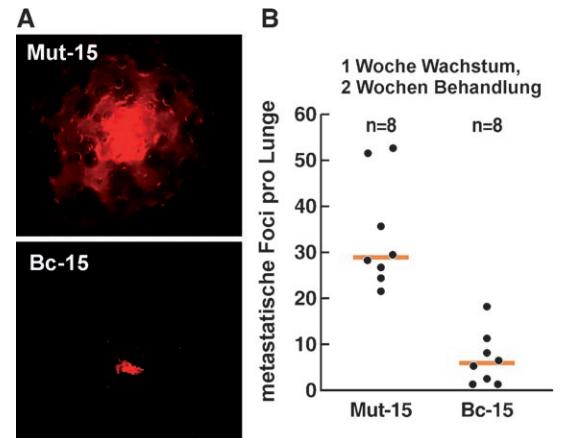


Abbildung 19. Effekt von Bc-15 auf die Metastasierung von Brustkrebs in die Lungen. A) Weiblichen Mäusen mit schwerer kombinierter Immundefizienz wurden durch intravenöse Injektion 5×10^5 DsRed2-markierte MDA-MB-435-Brustkrebszellen verabreicht, die konstitutiv aktiviertes Integrin $\alpha\beta\beta 3_{D723R}$ exprimieren. Die Tiere wurden an den Tagen 7, 9, 11, 14, 16 und 18 durch intravenöse Injektion des scFv-Antikörpers Bc-15 oder seiner RGE-Mutante, Mut-15, behandelt (40 μ g pro Dosis). Metastatische Foci wurden durch Fluoreszenzmikroskopie am Tag 19 detektiert. Die Aufnahmen zeigen typische Foci im Lungengewebe von mit Mut-15 (oben) oder Bc-15 (unten) behandelten Mäusen. B) Zahl der metastatischen Foci pro Tier im Lungengewebe. Die horizontale Linie markiert die mittlere Zahl an Metastasen pro Testgruppe. Mit Bc-15 behandelte Mäuse wiesen signifikant weniger Metastasen auf als mit Mut-15 behandelte Mäuse ($P < 0.001$ im zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test).^[77] Copyright National Academy of Sciences.

die RGD-Sequenz zu RGE mutiert wurde, was die Bedeutung der exakten Konvergenz bestätigt. Diese Antikörper werden derzeit in klinischen Tests untersucht. Insbesondere

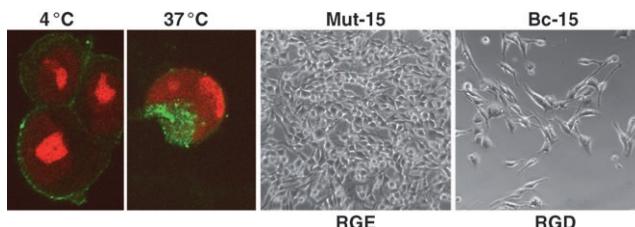


Abbildung 20. Studien zum Mechanismus der Zellschädigung durch Antikörper gegen aktiviertes $\alpha\beta 3$. Vom Patienten stammende Liganden-imitierende scFv-Antikörper gegen aktiviertes $\alpha\beta 3$ werden internalisiert und lösen den Zelltod von Brustkrebszellen aus. Der scFv-Antikörper Bc-15 wird von aus Patientenblut isolierten Brustkrebszellen internalisiert: konfokalmikroskopische Aufnahmen von BMS-Zellen, die 4 h mit FITC-Bc-15 (FITC = Fluoresceinisothiocyanat) bei 4°C (Bindung) oder 37°C (Internalisierung) inkubiert wurden. Der internalisierte Antikörper tötet die Zellen auch durch einen apoptotischen Mechanismus. Mutierte Antikörper, die ein RGE-Motiv anstelle des RGD-Motivs enthalten, sind unwirksam.^[77] Copyright National Academy of Sciences.

hofft man die Tatsache nutzen zu können, dass es sich um menschliche Antikörper handelt und dass sie gegen ein seltenes spezifisches Antigen auf der Oberfläche von Krebszellen gerichtet sind.

An dieser Stelle scheint es sinnvoll, die konzeptionellen Aspekte der seltenen und interessanten Spezifität dieser gegen Integrin gerichteten Antikörper zu betrachten. Die natürliche Evolution hat in einem Millionen Jahre dauernden Prozess die Wechselwirkung des Integrins mit dem RGD-Motiv seines Liganden als einen Erkennungsmechanismus selektiert. Die Überraschung ist, dass Antikörper das gleiche Erkennungsmotiv in einer krebsinduzierten Immunreaktion im Zeitraum von Wochen entwickeln. Dies ist bemerkenswert, da ein Antikörper die Wahl gehabt hätte, jede Region des Integrin-Antigens zu binden, letztlich aber in der gleichen Weise wie bei der natürlichen Erkennung das RGD-Motiv auswählte. Der Grund hierfür ist, dass die Immunreaktion hin zu einem Zustand maximaler Bindungsenergie strebt und der Vorgang deshalb auf die gleiche optimale Protein-Protein-Wechselwirkung hinausläuft wie bei der natürlichen Selektion. Diese Vorstellung ist natürlich an die Bedingung geknüpft, dass es eine begrenzte Zahl von optimalen Lösungen für ein gegebenes Bindungsenergieproblem gibt.

Ein anderes Gebiet, in dem ein Abrufen der „fossilen Aufzeichnung“ zu wichtigen Ergebnissen und möglichen therapeutischen Antikörpern geführt hat, betrifft die infektiösen Erkrankungen. In diesem Feld hat sich die kombinatorische Antikörpertchnologie als besonders robust erwiesen.^[78–104] Bei Infektionen geben die Antikörperfauzeichnungen einer Gruppe von Individuen Aufschluss über den evolutionären Wettkampf zwischen Viren und Antikörpern – was Burton und Mitarbeiter als „Aufeinandertreffen evolutionärer Titanen“ bezeichneten.^[101] An den Arbeiten dieser Gruppe ist schön zu sehen, wie oft man zu einer umfassenden Bibliothek zurückkehren kann, um humane Antikörper mit interessanten Spezifitäten zu erproben.

13. Das letzte noch fehlende Stück: Mutationsstrategien

Würde man einige Wissenschaftler fragen, was fehlte, wenn es die Leistungsfähigkeit des natürlichen Immunsystems zu kopieren gälte, so würde man zur Antwort erhalten, dass es einer Selektion bedarf statt eines einfachen Screenings. Das natürliche Immunsystem schöpft seine Leistungsfähigkeit aus dem evolutionären Prozess von Mutation und Selektion, während kombinatorische Antikörperfabbibliotheken auf ein Screening großer Molekülansammlungen bauen. Eine wichtige Frage lautet, ob ein chemischer Ansatz zur Maximierung von Bindungsenergien, der eine große Zahl möglicher Lösungen heranzieht, die eher zufälligen evolutionären Prozesse der Natur kopieren oder gar übertreffen kann. Anders ausgedrückt: Kann die Chemie den biologischen Prozessen von Mutation und Selektion ebenbürtig sein? Es gibt viele Gründe anzunehmen, dass dies so ist, zumal das natürliche Immunsystem trotz seiner Leistungsfähigkeit Einschränkungen unterliegt, die bei den chemischen Ansätzen nicht vorhanden sind. Zu den Einschränkungen gehört, dass dem Immunsystem eine recht begrenzte Zahl von Spezies in der Ausgangsbibliothek zur Verfügung steht und dass eine ungleichmäßige Diversität unter den CDRs erzeugt wird. Hinzu kommt, dass die Geschwindigkeit der Antikörpergenmutation während der immunologischen Induktion zwar 10^6 -fach höher ist als die spontane Geschwindigkeit, aber trotzdem nur 10^{-5} bis 10^{-3} pro Basenpaar pro Generation beträgt.^[105,106] Darüber hinaus zeigt das natürliche Immunsystem den Effekt, dass es abbricht, wenn die selektierten Antikörper „gut genug“ sind, d.h. eine genügende Bindungsenergie bereitstellen und in genügender Konzentration vorliegen, um das eingedrungene Antigen zu entfernen. Das natürliche Immunsystem ist so ausgelegt, dass eine genügende und keine optimale Affinität selektiert wird. Der Chemiker hat dem viele Vorteile entgegenzusetzen:

1. In einem chemischen Experiment ist Diversität nur durch den Faktor der Verfügbarkeit begrenzt, und man kann den Endpunkt des Experiments festlegen.
2. Die chemische Intuition kommt zur Geltung, als Gegenstand zu den ungeliebten Prozessen der Natur.
3. Dank der Komplexität moderner Antikörperfabbibliotheken kann man mit einem größeren Pool von Ausgangsmaterialien beginnen. Ein Chemiker kann durch rationales Vorgehen ein Produkt erzeugen, das besser ist als das durch zufällige Mutation und Selektion in einem Echtzeitprozess erhaltene Produkt.
4. Durch inkrementelles Kombinieren unterschiedlicher Molekülbestandteile stehen dem Chemiker sehr viel mehr Algorithmen zur Verfügung.
5. Die CDRs sind in vielfältiger Form – weit mehr als in einem natürlichen Repertoire – mit nur wenigen Einschränkungen bezüglich der Proteinsequenz zugänglich.

Die zentrale Idee lautet: Sobald eine kombinatorische Antikörperfabbibliothek zur Verfügung steht, dann ist ein streng chemischer Ansatz zur Mutagenese möglich.

Es gibt viele Experimente, die aufzeigen, wie die Affinitäten von Antikörpern aus kombinatorischen Bibliotheken

verbessert werden können.^[107-109] Im Allgemeinen greifen diese Methoden auf Ketten-Shuffling und/oder ortsspezifische Mutagenese zurück, um damit eine begrenzte Zahl von Positionen im Antikörpermolekül zu mutieren. Ein neueres, besonders interessantes Experiment stammt von Crea und Mitarbeitern, die untersuchten, ob ein kombinatorischer chemischer Ansatz zur Verbesserung der Bindungsenergie (Affinitätsreifung) dem natürlichen Prozess ebenbürtig sein oder diesen gar übertreffen kann.^[110] Als Testobjekt wurde der Antikörper Humira gewählt, der ein schwieriger Testfall ist, da er bereits hoch optimiert ist ($K_d = 1 \text{ nM}$). Es muss immer ein Ziel sein, Strategien zu entwerfen, die die Größe kombinatorischer Bibliotheken einschränken (technisch unrealisierbare Varianten lassen sich dagegen leicht ausdenken). Wollte man bei z. B. 60 Positionen in den sechs CDR-Schleifen (Humira hat 57) alle Kombinationen der 20 natürlichen Aminosäuren ausprobieren, so würde man eine nicht zu handhabende Bibliothek mit mehr als 10^{78} Komponenten erhalten. Der Trick besteht darin, keine Diversität zu verschwenden, indem man nur solche Mutationen zulässt, die nach der chemischen Intuition die besten Chancen zur Erhöhung einer Bindungsenergie haben.

Die von Crea et al. verwendete Strategie, die auf einem hoch iterativen Prozess beruht, ist in Abbildung 21 gezeigt.^[110] Der erste Schritt ist eine so genannte „look-thru“-Mutagenese, bei der zunächst ein Satz von neun Aminosäuren ausgewählt wurde. Die Aminosäuren wurden so ausgewählt, dass sie die wesentlichen chemischen Eigenschaften der Seitenketten repräsentieren. Der Satz von Aminosäuren wurde verwendet, um einen Satz von Positionsmutationen an jeder Position in allen sechs CDRs eines Antikörpers herzustellen (Abbildung 21). Es wurden Bibliotheken mit einzelnen Mutationen in jeder CDR (sechs Bibliotheken), einzelnen Mutationen in zwei CDRs (fünfzehn Bibliotheken) und einzelnen Mutationen in drei CDRs^[20] aufgebaut und auf ein verbessertes Bindungsvermögen durchmustert. Mit diesem Versuchsschema, das auf nur neun Aminosäuren zurückgreift, konnte die diversifizierteste Dreifachmutationsbibliothek auf handhabbare 1.4×10^6 Komponenten eingeschränkt werden. Bezuglich des Bindungsvermögens gab es 14 Positionen, die keine Mutation erlaubten. 38 Mutationen in 21 Positionen ergaben eine verbesserte Antikörperaffinität (Tabelle 1). Diese günstigen Mutationen wurden separat für die schweren Ketten (Diversität von 2.0×10^5) und die leichten Ketten (Diversität von 6.0×10^5) kombinatorisch kombiniert. Die vorab selektierten Bibliotheken der schweren und leichten Ketten wurden vereinigt und selektiert. Daraus ergaben sich 58 Mutanten mit bis zu drei Größenordnungen verbesserter Bindungsenergie (K_D bis 10^{-12} , Tabelle 1). Eine Sequenzanalyse der selektierten Klone ergab eine sehr geringe Konvergenz bei den schweren Ketten (Abbildung 22). Dagegen wurde bei den 14 mutierten Positionen der leichten Ketten eine bemerkenswerte Konvergenz beobachtet (Abbildung 22). Zum Beispiel enthält die leichte Kette CDR-L1 die Aminosäuren His24, Lys27 und Arg28 sowie einen konservativen Austausch von Ile29 gegen Leu29. Viele andere konvergente Sequenzen lassen sich erkennen. Besonders auffällig ist, dass ein Pro94 in Nachbarschaft zu einem nichtmutierten Pro95 vorkommt, was darauf hindeutet, dass

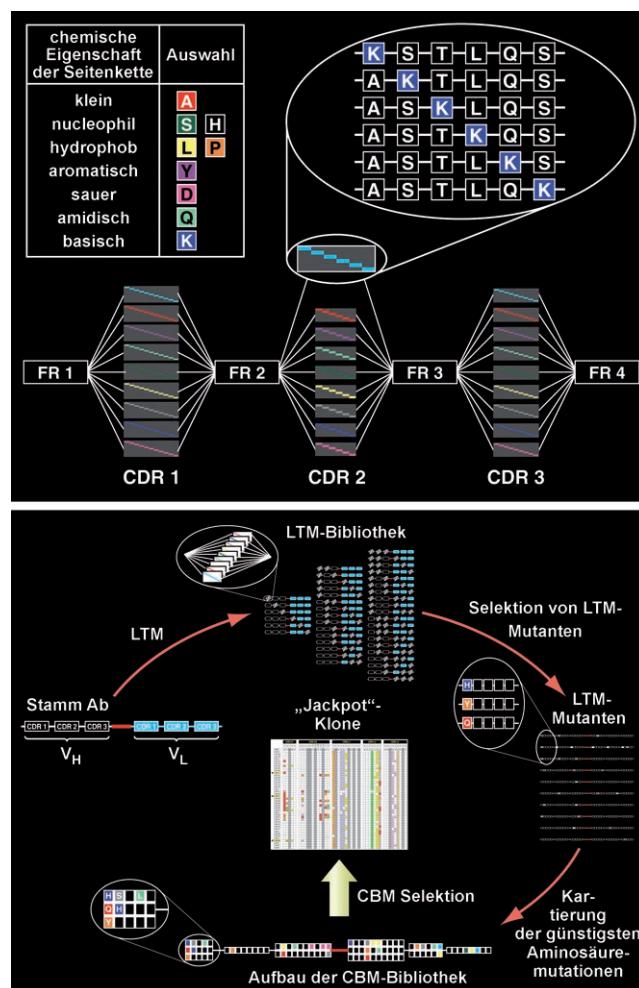


Abbildung 21. Allgemeines Schema der „look thru“-Mutagenese (LTM) und der kombinatorischen Antikörpermutagenese (CBM). Oben: Beispiel für eine dreifache LTM; neun Aminosäuren wurden aus dem Satz der 20 natürlichen Aminosäuren aufgrund der chemischen Funktionalität ihrer Seitenketten für den LTM-Prozess ausgewählt (Einschub links). Diskrete CDR-Oligonukleotide wurden synthetisiert und zur Bildung einer mutagenisierten CDR mit einer der vorab gewählten Aminosäuremutationen an jeder CDR-Position verwendet (Einschub rechts). In der CDR-Dreifachbibliothek werden alle Kombinationen von CDR1-, CDR2- und CDR3-Oligonukleotiden kombiniert, um Bibliotheken mit drei simultan mutagenisierten CDRs zu erzeugen.^[110] Unten: Nachdem die günstigen LTM-Mutanten selektiert wurden, werden diejenigen Mutationen, die in mehreren Klonen auftreten, durch entartete Oligonukleotide im CBM-Prozess codiert, um so die günstigsten Mutanten zu selektieren. Copyright National Academy of Sciences.

Tabelle 1: Affinitäten von verbesserten Humira-Klonen; D2E7 ist der Ausgangsklon, dessen Affinität um ca. drei Größenordnungen gesteigert wurde.

scFv ^[a]	k_{on} [$\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]	k_{off} [$\times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$]	K_D [pM]	relative Erhöhung von K_D
D2E7	1.12	107	955 ± 17	1
A1	11.1	2.086	1.88 ± 0.05	500
cb2-44	5.8	0.637	1.10 ± 0.08	870
cb1-3	7.1	0.770	1.08 ± 0.02	870
cb2-6	4.0	0.0454	1.1 ± 0.3	870

scFv = variable Einzelkettendomäne.

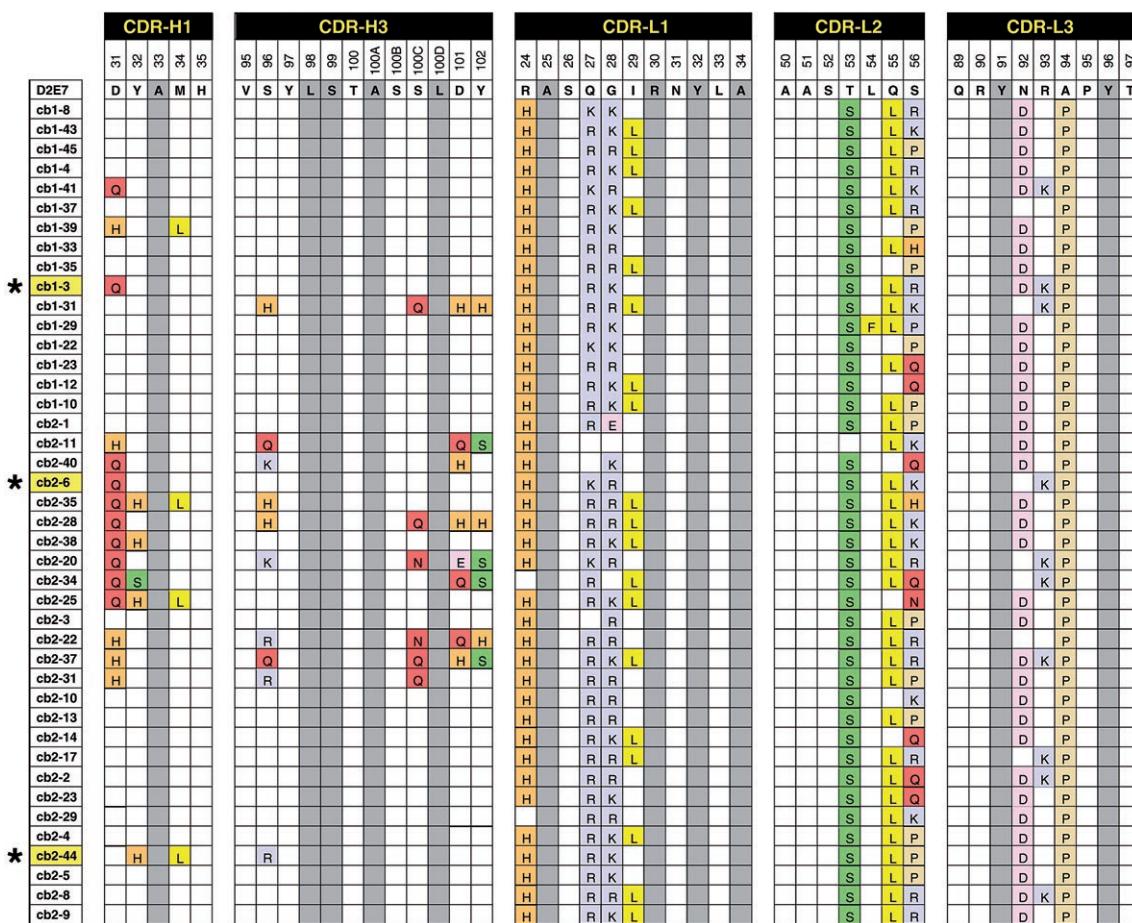


Abbildung 22. Sequenz von CBM-Klonen, die eine höhere Affinität für TNF- α zeigen.^[110] Copyright National Academy of Sciences.

in dieser Region ein Konformationswechsel gefordert ist. Hierin erkennen wir einen weiteren wichtigen Aspekt kombinatorischer Proteinbibliotheken. Vielleicht hätte man erraten können, dass ein Asp 92 in CDR-L3 günstig ist – keine Methode könnte aber vorhersagen, dass eine benachbarte Prolinmutation gefordert ist, um einen Konformationswechsel zu bewirken, der das Asp-Carboxylat korrekt positioniert. Die unterstreicht die Tatsache, dass für Proteine eine kombinatorische Matrix im dreidimensionalen Raum aufgebaut werden muss, was das Problem erheblich verkompliziert.

Diese Ergebnisse werfen zwei sehr interessante Fragen auf: Warum übertrifft die Leistungsfähigkeit dieser Prozesse bezüglich der Bindungsenergieoptimierung die der natürlichen Evolution? Und warum tritt bei den leichten Ketten eine derart bemerkenswerte Konvergenz auf? Die Effizienz des Prozesses röhrt wahrscheinlich von der Tatsache her, dass der *in vitro* geführte Prozess einen genetischen Algorithmus verwendet, der in der Natur nicht erlaubt ist. In der Natur findet die Rekombination vor der Mutation und Selektion statt, und eine weitere Rekombination tritt nicht auf, sodass die Möglichkeit fehlt, dass beide Prozesse synergistisch wechselwirken. Der *In-vitro*-Prozess ermöglicht ein Auffinden von günstigen Mutationen und eine anschließende „kombinatorische Rückkreuzung“, sodass synergistische Effekte genutzt und nichtproduktive Kombinationen eliminiert

werden können. Die Tatsache, dass die leichten Ketten stärker optimiert werden konnten als die schweren, untermauert die Vorstellung, dass in der Natur die schweren Ketten eine höhere Diversität haben als die leichten Ketten. Dadurch gibt es mehr Spielraum für die Optimierung der leichten als der schweren Ketten, da die Diversität der schweren Ketten bereits aus einer relativ großen Anzahl sowie einem recht erfolgreichen genetischen Algorithmus resultiert. Damit können synthetische Antikörperbibliotheken, die von mehr Komponenten als das natürliche Repertoire ausgehen und einen Algorithmus verwenden, der die Optimierung von V_H und V_L mithilfe eines konzertierten Prozesses aus Rekombination und Mutation ermöglicht, leistungsfähiger sein als der genetische Algorithmus der Natur.^[110]

Die Antikörperfaffinität wurde soweit verbessert, dass die K_D -Werte im pikomolaren Bereich liegen, was der oberen Grenze der Bindungsenergie für dieses Antigen nahekommen dürfte. Es ist daher nicht überraschend, dass wir Konvergenz beobachten, denn mit zunehmender Bindungsenergie sinkt die Zahl der „chemischen“ Lösungen des Problems. Dies gilt insbesondere am Energiemaximum, wo es nur noch eine einzige Lösung gibt, aber auch in dessen Nähe, wo es dann einige wenige, annähernd optimale Lösungen gibt. Anders ausgedrückt zeigt das Auftreten von Konvergenz, dass die obere Grenze der Bindungsenergie erreicht wird.

Zum Vorbehalt muss eingeräumt werden, dass lokale Minima auf der Energiehyperfläche zu einer suboptimalen Lösung führen könnten.

Interessant ist ein Vergleich der Selektions- und Optimierungsstrategien chemischer und kombinatorischer Antikörperbibliotheken zur Affinitäts- und Selektivitätssteigerung: Eine große chemische Bibliothek kann bis zu einer Million Komponenten enthalten, aus denen vielleicht ein „Treffer“ selektiert wird. Der „Treffer“ kann typischerweise einen K_D -Wert im mikromolaren Bereich haben, der mithilfe medizinisch-chemischer Methoden verbessert werden kann, um einen optimierten Wirkstoff mit nanomolarer Affinität für die Zielstruktur zu gewinnen. Die Größe synthetischer kombinatorischer Antikörperbibliotheken bewegt sich dagegen zwischen 10^8 und 10^{11} Komponenten, aus denen bindende Spezies mit K_D -Werten von ungefähr 10^{-8} selektiert werden. Deren Bindungsvermögen lässt sich durch Mutagenese und/oder Ketten-Shuffling verbessern, um therapeutische Antikörper mit K_D -Werten im pikomolaren Bereich zu erhalten. An diesem Beispiel erkennen wir abermals das enorme Leistungsvermögen großer Bibliotheken.

14. Problem des überreichen Angebots

Methodisch gesehen ist nicht genutzte Leistung verschwendete Leistung. Vor dem Aufkommen der kombinatorischen Antikörperbibliotheken bot die Hybridoma-Technik Zugang zu einer begrenzten Zahl von Antikörpern für eine gegebene Zielsubstanz. Man arbeitete mit dem, was gerade zur Verfügung stand, sodass die Auswahl eines Antikörpers – entweder als Reagens oder Therapeutikum – vergleichsweise leicht fiel. Hingegen hat man es beim Arbeiten mit Bibliotheken oft mit Tausenden von Antikörpern für eine gegebene Zielsubstanz zu tun, was die Auswahl der näher zu untersuchenden Kandidaten zu einem erheblichen Problem werden lässt. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Konfiguration der Antikörpermoleküle in den leistungsfähigsten Selektionsformaten nicht für eine Beurteilung des Proteins eignet. Das praktische Problem besteht darin, Tausende von unterschiedlichen Antikörpern in ausreichenden Mengen exprimieren zu können, um den wirksamsten Kandidaten für eine bestimmte Aufgabe herauszufinden. Manchmal ist die Bindungsenergie nur ein erstes Kriterium, denn Antikörper mit gleicher Bindungsenergie können sich in einem biochemischen Test oder einer therapeutischen Anwendung (z.B. der Virusneutralisation) recht verschieden verhalten. Obwohl das Problem bislang nicht vollständig gelöst wurde, gibt es vielversprechende Fortschritte in diese Richtung.^[22] Die derzeit interessanteste Entwicklung beruht auf der Verwendung einer Bibliothek von Bibliotheken. Bei diesem Ansatz werden die in einem Bindungstest zu selektierenden Gene direkt in ein Expressionssystem überführt, um so die Klonalität aufrechtzuerhalten und/oder das Ketten-Shuffling zu ermöglichen. Diese Systeme haben den Vorteil, dass Milligramm-Mengen jedes Antikörpers in kleinen Volumen, z.B. Mikrotiterformaten, zugänglich sind. Da sich zwei Antikörper nie gleichen, können die Expressionniveaus variieren, was aber keine Rolle mehr spielt, sofern zu Testzwecken ausrei-

chende Mengen von Antikörpern vorliegen. Mithilfe solcher Systeme könnte es gelingen, das volle Potenzial großer Bibliotheken auszuschöpfen.

15. Phänotypen als selbsterklärend zulassen

Beim Umgang mit leistungsfähigen diversitätserzeugenden Systemen wie kombinatorischen Bibliotheken gerät man leicht in Versuchung, die Effizienz des Systems durch Einführen bestimmter Randbedingungen zu testen und zu verbessern. Zum Beispiel könnte man seine chemische Intuition spielen lassen, wie wir es am oben beschriebenen Beispiel der Affinitätsreifung gesehen haben. In diesem Fall hatte man hauptsächlich das Ziel verfolgt, die Bibliothek auf eine dem Displaysystem angepasste Größe zu verkleinern. Eine ganz andere Angelegenheit ist es, wenn man versucht, dem System etwa eine Randbedingung bezüglich der chemischen Zusammensetzung aufzuerlegen, z.B. Guanidiniumionen primären Aminen vorzuziehen, weil diese stärkere Wechselwirkungen mit Carboxylaten eingehen, oder periodische Bindungen in der Proteinschleife zu erzwingen, indem man Prolinreste inseriert. Weil wir jedoch nicht alle Regeln kennen, ist es allgemein ratsam, eine möglichst große Bibliothek zu erzeugen. Es ist besser, sich vom System etwas beibringen zu lassen, als dem System etwas beizubringen! Solange wir nicht vollständig Bescheid wissen, führt das Leistungsvermögen dieser Systeme vor allem von ihrem stochastischen Verhalten her, und weniger von einem Designprinzip. Soweit ein Designmerkmal den probabilistischen Suchalgorithmus einschränkt, kann es mehr Schaden anrichten als nutzen. Wenn man beispielsweise ein Prolin vorgibt, lässt sich nicht absehen, ob es ein angrenzendes Carboxylat hin zu einem benachbarten Guanidinium oder von diesem weg biegt. Sicher wird der Tag kommen, dass randomisierte Systeme durch Einführung von Designmerkmalen so verändert werden, dass die Kombination zu einem verbesserten Ergebnis führt. Jedoch ist dieser Zeitpunkt noch nicht erreicht, und für den Augenblick ist es das beste, Phänotypen als selbsterklärend zuzulassen. Dies gilt besonders für Antikörper-Antigen-Systeme, bei denen jedes System sich vom nächsten unterscheidet.

16. Die Zukunft

Kombinatorische Antikörperbibliotheken bieten Zugriff auf Antikörper gegen jedes beliebige Antigen. Die Herausforderung verlagert sich nun zunehmend dahin, konkrete therapeutische Anwendungen zu entwickeln. Wir können erwarten, dass therapeutische Antikörper gegen Krankheiten und Antigene erhältlich sein werden, für die eine immunologische Intervention bis vor kurzem undenkbar war. Zum Teil haben wir dies den beiden Tatsachen zu verdanken, dass wir die molekularen Grundlagen von Erkrankungen immer besser kennen und dass immer mehr neue pathogene Antigene bestimmt werden. Ebenfalls wichtig ist das „therapeutische Klima“, das die Antikörperforschung umgibt. Je mehr Antikörper ihre Zulassung erhalten, umso mehr wird die

Fachwelt ermutigt, neue Ansätze auszuprobieren. Während ein Einsatz von Antikörpern z. B. in der Krebstherapie und bei Infektionen noch naheliegend scheint, hätten sich nur die wenigsten den Einsatz von therapeutischen Antikörpern zur Bekämpfung von Makulardegeneration, Alzheimer-Krankheit oder sogar Fettleibigkeit vorstellen können. Könnte sich jemand vorstellen, Antikörper zu verwenden, um das Gleichgewicht zwischen Molekülen im Blut und ihrer Ablagerung an Arterienwänden zu regulieren, um so das Fortschreiten arteriosklerotischer Plaque zu verhindern oder gar rückgängig zu machen? Diese Beispiele spiegeln die derzeitigen Gedankengänge der immunologischen Forschung wider.

Antikörper sind in der Lage, Antigene sehr wirksam zu entfernen, und man muss sich im klaren darüber sein, was genau entfernt oder abgebaut werden soll, um einen bestimmten therapeutischen Effekt zu erreichen. Trotz der vielen Erfolge, die hierbei erzielt worden sind, ist dieses Konzept sehr eingeschränkt und dürfte nur als Ausgangsbasis für weitere Entwicklungen dienen. Eine nächste Generation von Antikörpertherapeutika könnten so genannte „mechanistische Antikörper“ mit agonistischen und antagonistischen Aktivitäten sein. Ein solcher Antikörper (Visilizumab) befindet sich bereits in klinischen Tests zur Behandlung von steroidrefraktärer GvHD.^[110] Hierbei handelt es sich um einen gut untersuchten Antikörper gegen CD3, der ausschließlich in aktivierten T-Zellen Apoptose induziert.^[111] Mechanistische Antikörper könnten im Tierversuch eingesetzt werden, um zelluläre Komponenten des Immunsystems selektiv zu aktivieren und so deren Rolle bei Autoimmunerkrankungen und Krebs zu untersuchen. Wenn z. B. die Antikörperaktivierung bei einem Zelltyp zu Arthritis führt, so würde dies einiges über die Pathogenese dieser Krankheit aufdecken. Außerdem könnte eine Therapie entwickelt werden, die sich gegen diesen Zelltyp oder die von ihm produzierten regulatorischen und/oder Effektormoleküle richtet.

Die derzeit erforschten Antigene kommen hauptsächlich im extrazellulären Raum vor, da sie entweder sezerniert werden oder auf der Zelloberfläche vorliegen. Für die Zukunft erwarten wir, dass auch intrazelluläre Antigene angesteuert werden können, vielleicht mit zellpenetrierenden Peptiden, die Antikörper in zellinnere Kompartimente transportieren.^[112]

In der sicherheitsbewussten Welt der Wirkstoffentwicklung sind Antikörper mit ihrer außergewöhnlichen Selektivität und Spezifität und ihrer natürlichen Aminosäurezusammensetzung attraktive therapeutische Substanzen. Nach ersten Erfolgen kleiner Biotech-Firmen widmen sich nun auch große Pharmaunternehmen in immer stärkerem Maße der Entwicklung und Gewinnung von therapeutischen Antikörpern. Es ist davon auszugehen, dass große wie auch kleine Pharmafirmen durch Selektion von Antikörpern aus großen kombinatorischen Bibliotheken viele weitere neuartige Therapeutika entwickeln werden.^[113]

Ich danke meinen vielen Mitarbeitern, die zur Entwicklung von kombinatorischen Antikörperfamilien beigetragen haben, insbesondere Carlos Barbas, Dennis Burton und Kim Janda. Ich danke außerdem Tamas Bartfai, Jerry Joyce und

Greg Winter für viele Vorschläge zu diesem Manuskript und Lenore Horowitz für die Erstellung des Vortitels. Verbliebene Fehler liegen allein in meiner Verantwortung.

Eingegangen am 18. August 2006
Online veröffentlicht am 22. November 2006

- [1] A. Silverstein, *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 425–428.
- [2] S. Arrhenius, *Immunochemistry*, MacMillan, New York, **1907**.
- [3] P. Ehrlich, *Klin. Jahrb.* **1897**, *6*, 299–333.
- [4] P. Ehrlich, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1900**, *66*, 424–448.
- [5] B. Witkop, *Proc. Am. Philos. Soc.* **1999**, *143*, 540–557.
- [6] Antibodies in Oncology: Drug Pipeline Update, **2006**, Bio-Seeker Group AB.
- [7] G. Kohler, C. Milstein, *Nature* **1975**, *256*, 495–497.
- [8] L. Riechmann, M. Clark, H. Waldmann, G. Winter, *Nature* **1988**, *332*, 323–327.
- [9] P. Jones, P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, G. Winter, *Nature* **1986**, *321*, 522–525.
- [10] L. Sastry, M. Alting-Mees, W. D. Huse, J. M. Short, J. A. Sorge, B. N. Hay, K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5728–5732.
- [11] R. Orlandi, D. H. Gussow, P. T. Jones, G. Winter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 3833–3837.
- [12] W. D. Huse, L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Science* **1989**, *246*, 1275–1281.
- [13] J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell, *Nature* **1990**, *348*, 552–554.
- [14] C. F. Barbas, A. S. Kang, R. A. Lerner, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7978–7982.
- [15] H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson, G. Winter, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4133–4137.
- [16] H. R. Hoogenboom, G. Winter, *J. Mol. Biol.* **1992**, *227*, 381–388.
- [17] J. D. Marks, H. R. Hoogenboom, T. P. Bonnard, J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 581–597.
- [18] A. S. Kang, C. F. Barbas, K. D. Janda, S. J. Benkovic, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4363–4366.
- [19] C. F. Barbas, J. D. Bain, D. M. Hoekstra, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4457–4461.
- [20] C. Gao, S. Mao, G. Kaufmann, P. Wirsching, R. A. Lerner, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12612–12616.
- [21] R. A. Lerner, A. S. Kang, J. D. Bain, D. R. Burton, C. F. Barbas, *Science* **1992**, *258*, 1313–1314.
- [22] D. R. Burton, C. F. Barbas, *Adv. Immunol.* **1994**, *57*, 191–280.
- [23] A. Bradbury, L. Persic, T. Werge, A. Cattaneo, *Bio/Technology* **1993**, *11*, 1565–1569.
- [24] J. D. Marks, A. D. Griffiths, M. Malmqvist, T. Clackson, J. M. Bye, G. Winter, *Bio/Technology* **1992**, *10*, 779–783.
- [25] C. F. Barbas, D. R. Burton, J. K. Scott, G. J. Silverman, *Phage Display: A Laboratory Manual*, CSH Laboratory Press, **2001**.
- [26] J. Marx, *Science* **1989**, *246*, 1250–1251.
- [27] A. D. Griffiths, M. Malmqvist, J. D. Marks, J. M. Bye, M. J. Embleton, J. McCafferty, M. Baier, K. P. Holliger, B. D. Gorick, N. C. Hughes-Jones, H. R. Hoogenboom, G. Winter, *EMBO J.* **1993**, *12*, 725–734.
- [28] R. A. Lerner, C. F. Barbas, K. D. Janda, *Harvey Lect.* **1998**, *92*, 1–40.
- [29] J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Science* **1995**, *270*, 1797–1800.
- [30] G. Zhong, T. Hoffmann, R. A. Lerner, S. Danishefsky, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8131–8132.

- [31] C. F. Barbas, A. Heine, G. Zhong, T. Hoffmann, S. Gramatikova, R. Björnstedt, B. List, J. Anderson, E. A. Stura, I. A. Wilson, R. A. Lerner, *Science* **1997**, *278*, 2085–2092.
- [32] M. G. Finn, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2963–2964.
- [33] B. List, C. F. Barbas, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 15351–15355.
- [34] G. Zhong, D. Shabat, B. List, J. Anderson, S. C. Sinha, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2609–2612; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2481–2484.
- [35] Siehe: www.cambridgeantibody.com.
- [36] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [37] J. F. Smothers, S. Henikoff, P. Carter, *Science* **2002**, *298*, 621–622.
- [38] D. W. Colby, B. A. Kellogg, C. P. Graff, Y. A. Yeung, J. S. Swers, K. D. Wittrup, *Methods Enzymol.* **2004**, *388*, 348–358.
- [39] D. W. Colby, P. Garg, T. Holden, G. Chao, J. M. Webster, A. Messer, V. M. Ingram, K. D. Wittrup, *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 901–912.
- [40] W. Ernst, R. Grabherr, D. Wegner, N. Borth, A. Grassauer, H. Katinger, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1718–1723.
- [41] M. C. Kieke, B. K. Cho, E. T. Boder, D. M. Kranz, K. D. Wittrup, *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1303–1310.
- [42] S. A. Richman, S. J. Healan, K. S. Weber, D. L. Donermeyer, M. L. Dossett, P. D. Greenberg, P. M. Allen, D. M. Kranz, *Protein Eng. Des. Sel.* **2006**, *19*, 255–264.
- [43] E. T. Boder, K. D. Wittrup, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 553–557.
- [44] M. J. Feldhaus, R. W. Siegel, L. K. Opresko, J. R. Coleman, J. M. Weaver Feldhaus, Y. A. Yeung, J. R. Cochran, P. Heinzelman, D. Colby, J. Swers, C. Graff, H. S. Wiley, K. D. Wittrup, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 163–170.
- [45] E. T. Boder, K. D. Wittrup, *Biotechnol. Prog.* **1998**, *14*, 55–62.
- [46] J. Hanes, C. Schaffitzel, A. Knappik, A. Plückthun, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1287–1292.
- [47] E. T. Boder, K. D. Wittrup, *Methods Enzymol.* **2000**, *328*, 430–444.
- [48] J. A. Francisco, R. Campbell, B. L. Iverson, G. Georgiou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10444–10448.
- [49] Y. Boublík, P. Di Bonito, I. M. Jones, *Biotechnology* **1995**, *13*, 1079–1084.
- [50] E. T. Boder, K. S. Midelfort, K. D. Wittrup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10701–10705.
- [51] H. R. Hoogenboom, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1105–1116.
- [52] X. X. Wang, E. V. Shusta, *J. Immunol. Methods* **2005**, *304*, 30–42.
- [53] M. N. Hall, T. J. Silhavy, *Annu. Rev. Genet.* **1981**, *15*, 91–142.
- [54] M. Agterberg, H. Adriaanse, J. Tommassen, *Gene* **1987**, *59*, 145–150.
- [55] R. Freudl, S. MacIntyre, M. Degen, U. Henning, *J. Mol. Biol.* **1986**, *188*, 491–494.
- [56] I. M. Taylor, J. L. Harrison, K. N. Timmis, C. D. O'Connor, *Mol. Microbiol.* **1990**, *4*, 1259–1268.
- [57] P. Fuchs, F. Breitling, S. Dübel, T. Seehaus, M. Little, *Bio/Technology* **1991**, 1369–1372.
- [58] T. Klauser, J. Pholner, T. F. Meyer, *EMBO J.* **1990**, *9*, 1991–1999.
- [59] J. A. Francisco, C. F. Earhart, G. Georgiou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2713–2717.
- [60] J. A. Francisco, C. Stathopoulos, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn, G. Georgiou, *Bio/Technology* **1993**, *11*, 491–495.
- [61] L. Hedegaard, P. Klemm, *Gene* **1989**, *85*, 115–124.
- [62] G. Kuwajima, J.-I. Asaka, T. Fujiwara, T. Fujiwara, K. Nakano, E. Kondoh, *Bio/Technology* **1988**, *6*, 1080–1083.
- [63] S. M. Newton, C. O. Jacob, B. A. Stocker, *Science* **1989**, *244*, 70–72.
- [64] A. Charbit, A. Molla, W. Saurin, M. Hofnung, *Gene* **1988**, *70*, 181–189.
- [65] L. Steidler, E. Remaut, W. Fiers, *Mol. Gen. Genet.* **1993**, *236*, 187–192.
- [66] J. C. Boulain, A. Charbit, M. Hofnung, *Mol. Gen. Genet.* **1986**, *205*, 339–348.
- [67] A. Plückthun, A. Skerra, *Methods Enzymol.* **1989**, *178*, 497–515.
- [68] J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4056–4072.
- [69] D. A. Marvin, L. C. Welsh, M. F. Symmons, W. R. P. Scott, S. K. Straus, *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 294–309.
- [70] K. A. Williams, M. Glibowicka, Z. Li, H. Li, A. R. Khan, Y. M. Y. Chen, J. Wang, D. A. Marvin, C. M. Deber, *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 6–14.
- [71] S. L. Zebedee, C. F. Barbas, Y.-L. Hom, R. H. Caothien, R. Graff, J. DeGraw, J. Pyati, R. La Polla, D. R. Burton, R. A. Lerner, G. B. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3175–3179.
- [72] C. F. Barbas, J. S. Rosenblum, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6385–6389.
- [73] S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8651–8655.
- [74] T. A. Collet, P. Roben, R. O'Kennedy, C. F. Barbas, D. R. Burton, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10026–10030.
- [75] A. S. Kang, T. M. Jones, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11120–11123.
- [76] R. A. Lerner, C. F. Barbas, A. S. Kang, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9705–9706.
- [77] B. Felding-Habermann, R. A. Lerner, A. Lillo, S. Zhuang, M. R. Weber, S. Arrues, C. Gao, S. Mao, A. Saven, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17210–17215.
- [78] D. R. Burton, C. F. Barbas, M. A. A. Persson, S. Koenig, R. M. Chanock, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10134–10137.
- [79] C. F. Barbas, E. Björling, F. Chiodi, N. Dunlop, D. Cababa, T. M. Jones, S. L. Zebedee, M. A. A. Persson, P. L. Nara, E. Norrby, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9339–9343.
- [80] C. F. Barbas, J. E. Crowe, Jr., D. Cababa, T. M. Jones, S. L. Zebedee, B. R. Murphy, R. M. Chanock, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10164–10168.
- [81] C. F. Barbas, T. A. Collett, W. Amberg, P. Rogen, J. M. Binley, D. Hoekstra, D. Cababa, T. M. Jones, R. A. Williamson, G. R. Pilkington, N. L. Haigwood, A. C. Satterthwait, I. Sanz, D. R. Burton, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 812–823.
- [82] R. A. Williamson, R. Burioni, P. Sanna, L. Partridge, C. F. Barbas, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4141–4145.
- [83] J. E. Crowe Jr., B. R. Murphy, R. M. Chanock, R. A. Williamson, C. F. Barbas, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1386–1390.
- [84] C. F. Barbas, D. Hu, N. Dunlop, L. Sawyer, D. Cababa, R. M. Hendry, P. L. Nara, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3809–3813.
- [85] E. Bender, G. R. Pilkington, D. R. Burton, *Hum. Antibodies Hybridomas* **1994**, *5*, 3–8.
- [86] P. Roben, J. P. Moore, M. Thali, J. Sodroski, C. F. Barbas, D. R. Burton, *J. Virol.* **1994**, *68*, 4821–4828.
- [87] D. R. Burton, J. Pyati, R. Koduri, S. J. Sharp, G. B. Thornton, P. W. H. I. Parren, L. S. W. Sawyer, R. M. Hendry, N. Dunlop, P. L. Nara, M. Lamacchia, E. Garratty, E. R. Stiehm, Y. J. Bryson, Y. Cao, J. P. Moore, D. D. Ho, C. F. Barbas, *Science* **1994**, *266*, 1024–1027.
- [88] I. Moreno de Alborán, C. Martínez-Alonso, C. F. Barbas, D. R. Burton, H. J. Ditzel, *Immunotechnology* **1995**, *1*, 21–28.
- [89] R. A. Williamson, D. Peretz, N. Smorodinsky, R. Bastidas, T. Blochberger, A. Serban, S. DeArmond, S. B. Prusiner, D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7279–7282.

- [90] J. M. Binley, H. J. Ditzel, C. F. Barbas, N. Sullivan, J. Sodroski, P. W. H. I. Parren, D. R. Burton, *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1996**, *12*, 911–924.
- [91] H. J. Ditzel, K. Itoh, D. R. Burton, *J. Immunol.* **1996**, *157*, 739–749.
- [92] P. W. H. I. Parren, P. Fisicaro, H. J. Ditzel, W.-P. Yang, C. F. Barbas, D. R. Burton, *J. Virol.* **1996**, *70*, 9046–9050.
- [93] R. A. Williamson, D. Peretz, C. Pinilla, H. Ball, R. B. Bastidas, R. Rozenshteyn, R. A. Houghten, S. B. Prusiner, D. R. Burton, *J. Virol.* **1998**, *72*, 9413–9418.
- [94] T. Maruyama, P. W. H. I. Parren, A. Sanchez, I. Rensink, L. L. Rodriguez, A. S. Khan, C. J. Peters, D. R. Burton, *J. Infect. Dis.* **1999**, *179*, S235–9.
- [95] M. P. Burgoon, R. A. Williamson, G. P. Owens, O. Ghausi, R. B. Bastidas, D. R. Burton, D. H. Gilden, *J. Neuroimmunol.* **1999**, *94*, 204–211.
- [96] C. D. C. Nicacio, A. Williamson, P. W. H. I. Parren, A. Lundkvist, D. R. Burton, E. Bjorling, *J. Virol.* **2002**, *76*, 251–258.
- [97] D. R. Burton, *Trends Biotechnol.* **1991**, *9*, 169–175.
- [98] D. R. Burton, C. F. Barbas, *Chem. Immunol.* **1993**, *56*, 112–126.
- [99] D. R. Burton, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 405–411.
- [100] D. R. Burton, C. F. Barbas, *Adv. Immunol.* **1994**, *57*, 191–280.
- [101] D. R. Burton, R. L. Stanfield, I. A. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 14943–14948.
- [102] S. M. Kipriyanov, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14*, 135–140.
- [103] L. Kausmally, K. Waalen, I. Lobersli, E. Hvattum, G. Berntsen, T. E. Michaelsen, O. H. Brekke, *J. Gen. Virol.* **2004**, *85*, 3493–3500.
- [104] J. Sui, W. Li, A. Murakami, A. Tamin, L. J. Matthers, S. K. Wong, M. J. Moore, A. St. Clair Tallarico, M. Olurinde, H. Choe, L. J. Anderson, W. J. Bellini, M. Farzan, W. A. Marasco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2536–2541.
- [105] Z. Li, C. J. Woo, M. D. Iglesias-Ussel, D. Ronai, M. D. Scharff, *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1–11.
- [106] K. Rajewsky, I. Forster, A. Cumano, *Science* **1987**, *238*, 1088–1094.
- [107] H. Gram, L.-A. Marconi, C. F. Barbas, T. A. Collet, R. A. Lerner, A. S. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3576–3580.
- [108] R. E. Hawkins, S. J. Russell, G. Winter, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 889–896.
- [109] W.-P. Yang, K. Green, S. Pinz-Sweeney, A. T. Briones, D. R. Burton, C. F. Barbas, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 392–403.
- [110] A. Rajpal, N. Beyaz, L. Haber, G. Cappuccilli, H. Yee, R. R. Bhatt, T. Takeuchi, R. A. Lerner, R. Crea, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8466–8471.
- [111] P. A. Carpenter, F. R. Appelbaum, L. Corey, H. J. Deeg, K. Doney, T. Gooley, J. Krueger, P. Martin, S. Pavlovic, J. Sanders, J. Slattery, D. Levitt, R. Storb, A. Woolfrey, C. Anasetti, *Blood J.* **2002**, *99*, 2712–2719.
- [112] U. Langel, *Handbook of Cell Penetrating Peptides*, CRC, Boca Raton, **2002**.
- [113] *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 631–766.