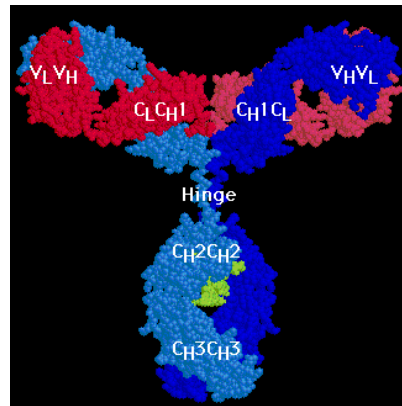
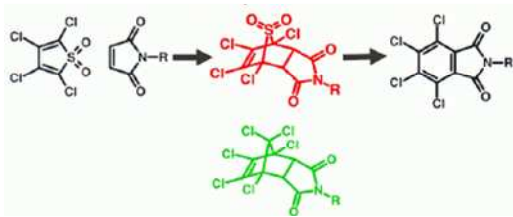


Katalytische Antikörper



Gliederung

Einleitung

- Definitionen und Begriffe

Antikörper - Struktur und Funktion

- Natürliche Bildung von Antikörpern (Immunglobulinen)
- Struktur von Antikörpern: Fragmente und Klassen
- Charakterisierung von Antikörpern

Herstellung von Antikörpern

- Polyklonale Antikörper (pAk)
- Monoklonale Antikörper (mAk)
- Rekombinante Antikörper (rAk)
- Zellfreie Antikörperproduktion

Katalytische Antikörper

- Idee / Prinzip
- Beispiele

Definitionen und Begriffe

Antigen: von *Antikörper-generator*

Substanz, die Lymphocyten durch Wechselwirkung mit den spezifischen Lymphocyten-Rezeptoren aktiviert

Immunogen

Substanz, die eine Immunreaktion auslöst

Adjuvans

Substanz, die Immunreaktionen verstärkt, ermöglicht oder modifiziert

Hapten

Substanz, die Antikörper bindet, aber aufgrund zu geringer Größe ($M < 4000 \text{ g/mol}$) keine Immunreaktion auslöst

Antigenität

Fähigkeit einer Substanz, eine **Immunreaktion** zu induzieren und **spezifisch** mit Antikörpern und aktivierten Lymphocyten zu reagieren

- große Antigenität : Proteine
- nur B-Zellen: Polysaccharide, Lipide, Nucleinsäuren, org. Substanzen

keine Antigenität : anorganische Substanzen

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

3

Definitionen und Begriffe

Immunogenität:

Fähigkeit einer Substanz, eine Immunreaktion zu induzieren

Antigene Determinante oder Epitop:

Bindungsregionen der Antigene

- ein Epitop: **Monovalenz**
- mehrere Epitope: **Polyvalenz**

Merke: 1 Antigen kann verschiedene Antikörper erzeugen.

Paratop:

Antigenbindungsstelle des Antikörpers

- ein Paratop: **Monovalenz**
- mehrere Paratope: **Polyvalenz**

Merke: 1 Antikörper-Molekül kann über mehrere identische Paratope verfügen.

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

4

Definitionen und Begriffe

Klonalität

Klonale Selektionstheorie:

- Vorfertigung von Ag-spezifischen Rezeptoren an Lymphocyten
- bei Auftreten eines Antigens => **selektive Aktivierung** von ca. 100 Lymphocytenklonen
- Vervielfältigung und Mutation der Zellen zu:
 - a) cytotoxischen und regulatorische T-Lymphocyten
 - b) antikörperproduzierende B-Lymphocyten

Ag verfügen meist über mehr als eine **Ak**-Bindungsstelle

- **polyklonale** Antikörper: viele Lymphocyten-Klone sind aktiviert: => **natürlich**
- **monoklonale** Antikörper: nur ein Lymphocytenklon wird aktiviert: => **künstlich**

Aufbau von Antikörpern

Zwei identische Ketten **schwer** (H, ~55kDa) und **leicht** (L, ~25kDa); über Disulfidbrücken verknüpft

C-terminaler Bereich:

Hochkonserviert, Strukturdomänen (CH₁, CH₂, CH₃)

N-terminaler Bereich:

Hochvariable Sequenzen (~110 AS)
Bilden Ag-Erkennungsstelle (Idiotop)

Enthalten:

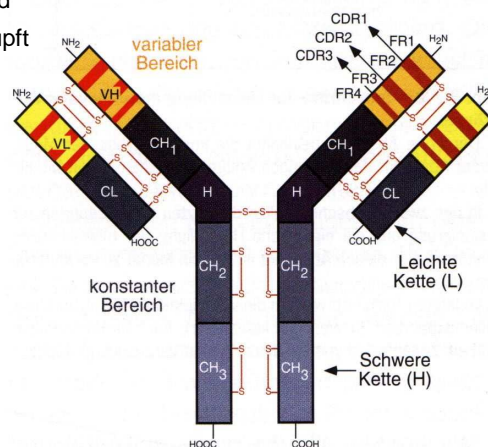
Framework-Region (FR1-FR4)

Complementary determining regions

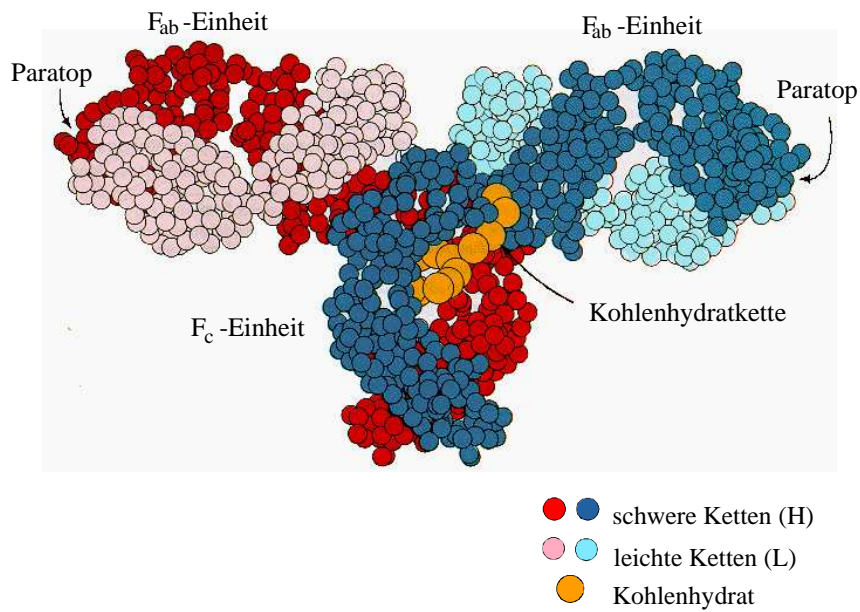
CDR1-CDR3

Bereiche größter Variabilität (~10-15 AS)

=> 10¹⁰ Varianten möglich



Dreidimensionale Struktur eines Immunglobulin-Moleküls (IgG)



Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

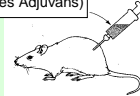
7

Produktion von (polyklonalen) Antikörpern

1. Immunisierung eines Säugetiers
(Maus, Kaninchen, Schaf)

Auslösung der primären Immunantwort

Emulsion (Antigen +
vollständiges Adjuvans)

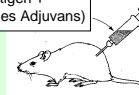


2. Immunisierung

Auslösung der sekundären Immunantwort

Klassenwechsel (IgM -> IgG)

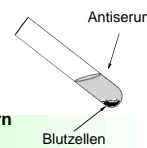
Emulsion (Antigen +
unvollständiges Adjuvans)



Blutentnahme:

+ spontanes Agglutinieren und Absetzen der Blutzellen

+ Abtrennung des 'Antiserum' mit polyklonalen Antikörpern



Prof.

fswald

8

Monoklonale Antikörper (mAK)

Definition:

Sekretionsprodukte einzelner Hybridomzellklone

- Verknüpfung der **Ak-produzierenden** Eigenschaften von B-Zellen mit
- **Langzeitüberlebensfähigkeit** von Myelomzellen

Vorteile:

- Kultivierungsmöglichkeit
- langfristig konstante Produktqualität

Herstellung

Vergleich mAK vs. pAK (Immunglobuline, Antisera)

	Antisera	Monoklonale Antikörper
Zusammensetzung	Mischung unterschiedlicher Antikörper	identische Moleküle
Immunologische Erkennung	viele Antigene	ein einziges Antigenepitop
Vernetzungsfähigkeit (Avidität)	hoch (Präzipitation, Agglutination, Neutralisierung)	niedrig-fehlend
Spezifische Aktivität	niedrig, wegen geringen Anteils von wirksamen Immunglobulinen	hoch, wegen Homogenität
Immunglobulinklasse	mehrere	eine
Standardisierung	hoher Aufwand	geringer Aufwand
Infektionsrisiko bei medizinischer Anwendung	sehr gering	praktisch auszuschließen

Charakterisierung von Antikörpern

A. Titerbestimmung

bei polyklonalen Antikörpern (Vollblut oder Antisera)

Methoden:

- Immunpräzipitation
- Immundiffusion
- Immunoassays: Antikörpertitration

B. Affinität

Definition: Bindungsenergie eines Epitops (Ag) zu einem Paratop (Ak)

Methoden:

- Bestimmung der Affinitätskonstanten (Scatchard-Plot)
- Immunoassays (später)
- Integriert optische Sensoren (BIACORE) => Kinetik

Charakterisierung von Antikörpern

C. Avidität

Definition: Funktionelle Affinität oder **Avidität** ist die gesamte Bindungsenergie eines polyvalenten Ak zu einem polyvalenten Ag

Merke: bei pAk (Antisera) ist die Affinität zu einem Epitop heterogen

Definition: Spezifität ist die Fähigkeit eines Ak selektiv an die Epitope eines Ag zu binden

D. Kreuzreaktivität

Definition: Eigenschaft von Ak, die auf spezifische Bindung von strukturell ähnlichen Ag zurückzuführen ist

Methoden:

z.B. Immunoassays (später)

E. Immunglobulinklasse

bei mAk und pAk

Methode:

spezifischer Nachweis mit anti-Antikörpern

Rekombinante Antikörper (rAK, rekAK)

Definition:

gentechnisch gewonnene Antikörper, Ak-Produktion erfolgt durch Klonierung in Expressionvektoren und Transformation in Wirtszellen (z.B. *E. coli*, Hefen, Pflanzen)

Strategien:

- Modifikation ausgehend von mAk (Hybridoma-Zellen)
- Mutagenese durch Herstellung von DNA-Bibliotheken (Kombination von H-Ketten und L-Ketten)

Vorteile:

- Herstellung in 'einfachen Wirten' im großen Maßstab und zu geringen Kosten möglich
- Vermeidung von Tierversuchen
- Möglichkeit zur schnellen Veränderung von Ak-Eigenschaften durch gentechnische Modifikation (=> **katalytische Antikörper**, **Phage-Display**)

Katalytische Antikörper: Historisches

1948: L. Pauling postuliert, dass katalytische Aktivität durch Komplementarität zum Übergangszustand begründet ist

1969: B. Jencks postuliert, dass "*one way to do synthesize an enzyme is to prepare an antibody to a haptenic group which resembles the transition state of a given reaction*"; daher auch die Namen **Abzymes** oder **Synzymes**

1975: Köhler und Millstein überwinden die experimentellen Probleme durch Entwicklung der Hybridoma-Technologie und damit zur Herstellung von mAks.

1986: R. Lerner und P. Schultz berichten (unabhängig voneinander!) die ersten tatsächlich katalytisch aktiven Antikörper. Diese katalysieren die Hydrolyse eines Arylestere bzw. eines Carbonates

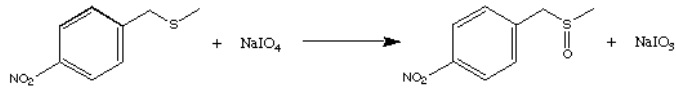
>1986: zahlreiche Publikationen zu katalytischen Antikörpern

Katalyt. AK: Konzept

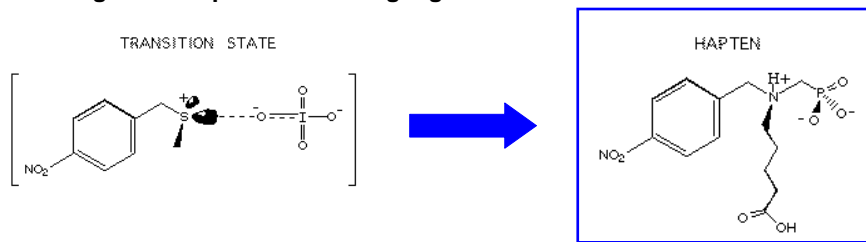
Konzept

- Modell des Übergangszustandes (Hapten) dient als Basis für Antikörper-Screening
- Bibliotheken werden erzeugt und durch Bindungs-Experimente durchmustert
- Identifizierte AKs werden detailliert untersucht

Modellreaktion

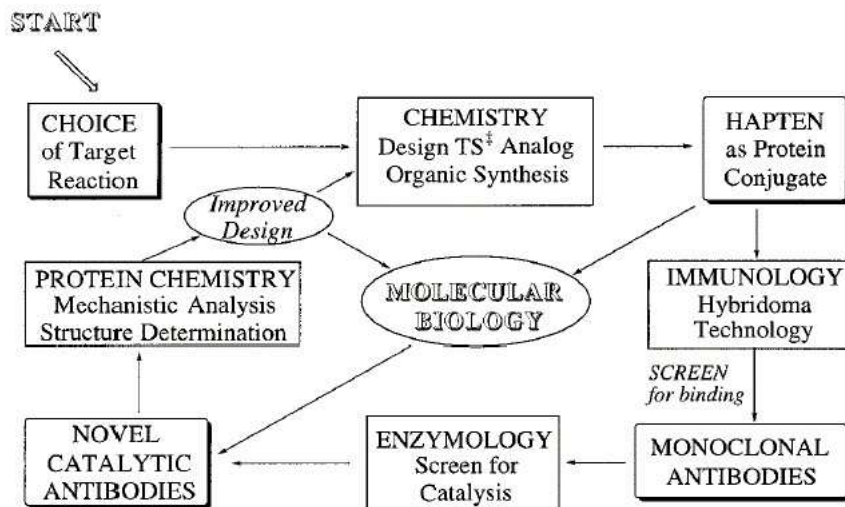


Ableitung eines Haptens aus Übergangszustand



Katalytische Antikörper

Schritte und beteiligte Disziplinen in der Produktion katalytischer Antikörper



Katalytische Antikörper: Erzeugung

Anforderungen an die Chemie, die angedachte Reaktion muss:

- 1) Eine leichte, aber meßbare Autohydrolyse aufweisen
- 2) Sehr gut mechanistisch untersucht sein
- 3) Möglichst aus wenigen (einem) einfachen Schritt bestehen
- 4) Einfach und sehr sensitiv zu messen sein
- 5) Die Erzeugung eines synthetisch darstellbaren Übergangszustandanaloga (ÜZA) erlauben

Anforderungen an die Immunologie / Screening:

- 1) Konjugation von zahlreichen Kopien des ÜZA an ein Trägerprotein zur Herstellung monoklonaler Aks
- 2) Screening erfolgte anfänglich über ELISA, heutzutage über die BIAcore-Technik (Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie) oder catELISA (über Produktbildung, nicht nur Bindung)
- 3) Noch besser: über Selektion (Phage-Display mit Suizid-Substraten etc.)

Katalytische Antikörper: Hapten-Design

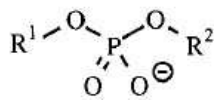
Methoden:

- 1) Übergangszustandanaloga (ÜZA)
- 2) Bait and Switch (Lockvogeltaktik)
- 3) Entropiefallen
- 4) Desolvation
- 5) Supplementation chemischer Funktionalität

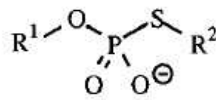
Übergangszustandanaloga

- Meist auf hydrolytische Reaktionen beschränkt
- Von 80 Beispielen für hydrolytisch-aktive catABs basieren 47 auf der Spaltung Acylgruppen

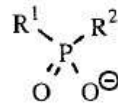
Haptene für Acylrest-Spaltungsreaktionen



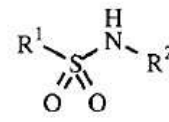
Phosphate diester



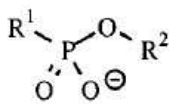
Phosphorothioate diester



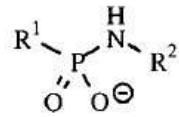
Phosphinic acid



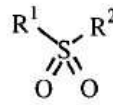
Sulfonamide



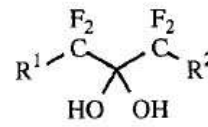
Phosphonate monoester



Phosphonamidate

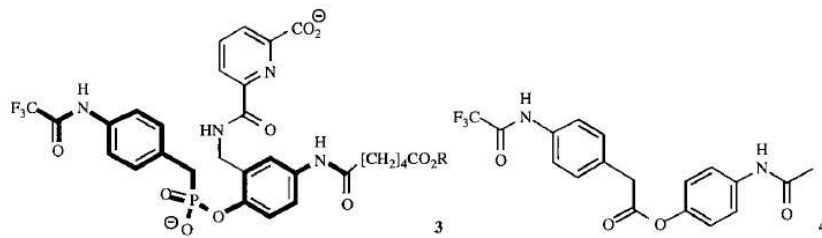


Sulfone



Ketone hydrate

Katalytische Antikörper



Abzyme Identity	Conditions	K_m 4	k_{cat} 4	K_i 3
6D4 ^x	pH 8; 25 °C	1.9 μM	0.027 s^{-1}	0.16 μM

Basierend auf Phosphonat **3** wurden Antikörper erzeugt, die Ester **4** spalten können (R. Lerner group, Scripps, La Jolla, USA).

Die Haptenreste, die an der Erkennung des AK beteiligt sind, sind in **Fett** hervorgehoben.

Katalytische Antikörper

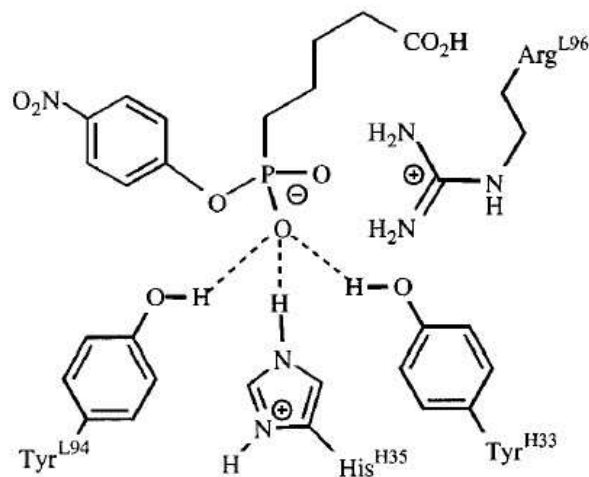


Abzyme Identity	Conditions	K_m 6	k_{cat} 6	K_i 5
MOPC167	pH 7; 30 °C	208 μ M	0.007 s ⁻¹	5 μ M

Natürliche AK waren in der Lage Phosphat **5** als Antigen zu binden und hydrolysierten das *p*-Nitrophenylcholincarbonat **6** (Schultz, USA).

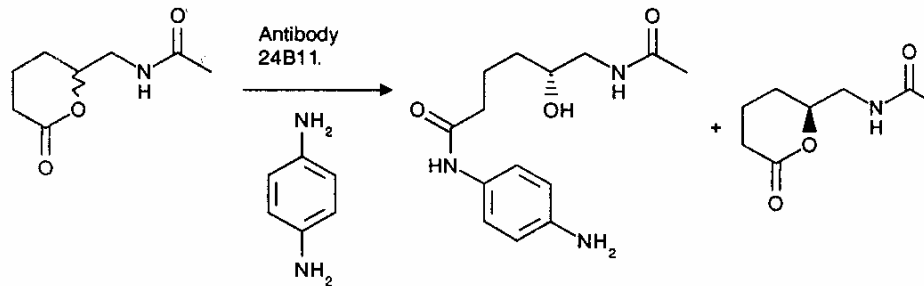
Die Haptenreste, die an der Erkennung des AK beteiligt sind, sind in **Fett** hervorgehoben.

Katalytische Antikörper



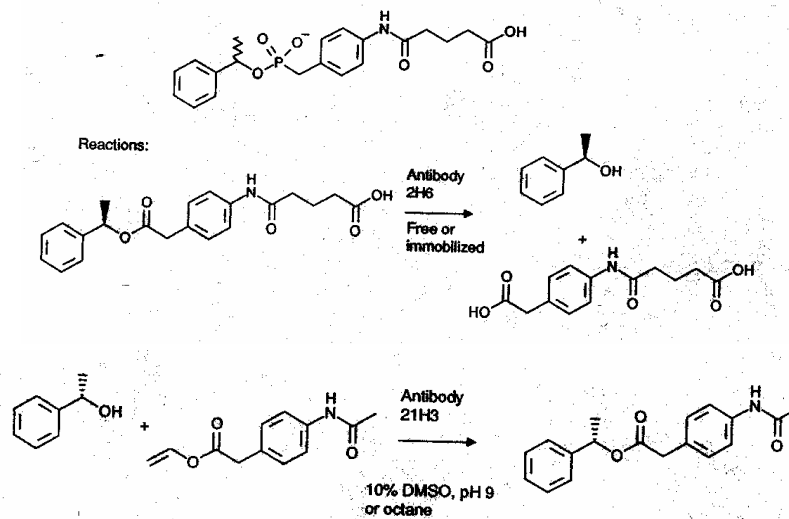
Bindungstasche von AK 48G7 komplexiert mit *p*-Nitrophenyl-4-carboxybutanphosphat. Die Nummerierung von Aminosäureresten in AK basiert auf dem Abstand vom N-Terminus der jeweiligen (H oder L) Kette.

Stereoselektive Hydrolyse von Amiden



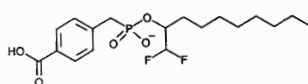
Beachte: Im Gegensatz zur Spaltung von Estern funktionierten Phosphonate nicht als Übergangszustandanaloge!

Stereoselektive Hydrolyse von α -Phenylethanol-Derivaten

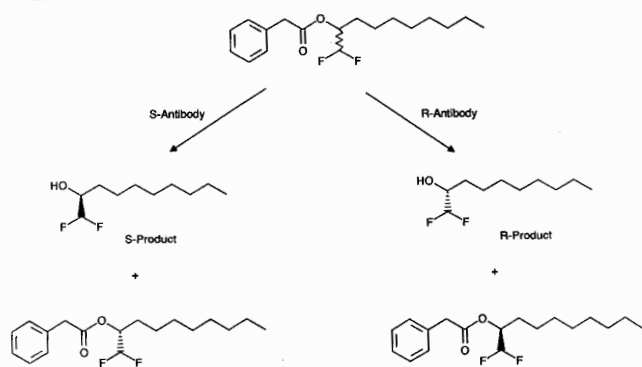


'Stereselektive' Hydrolyse fluorierter Substrate

R- or S-Antigen:



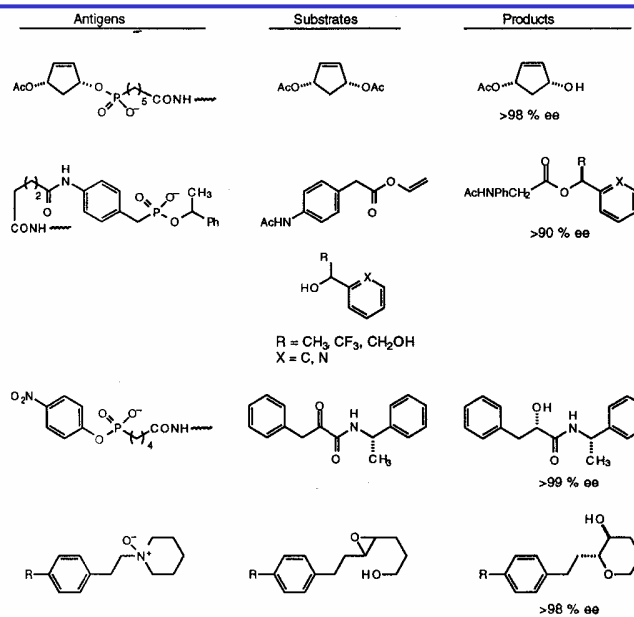
Reaction:



Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

25

Weitere Beispiele



Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

26

Katalytische Antikörper: Bait and Switch

Prinzip basiert auf Ladungs-Ladungs-Interaktionen

CDR-Variabilität bestimmt Interaktion zwischen Antigen und Antikörper
 Hapten funktioniert als Beute (*bait*), da es entgegengesetzte Ladung relativ zum Antikörper trägt. Hierdurch identifizierte AKs (die gut 'binden') werden anschließend in einem *switch* dem realen Substrat 'ausgesetzt'; nach dem zu erwartenden Produkt wird gescreent

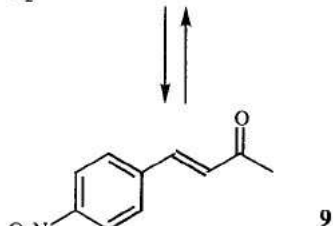
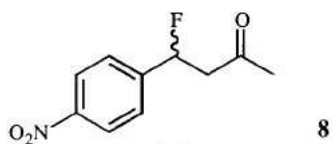
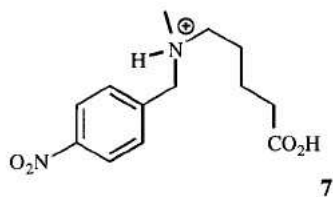
Beispiele:

- β -Eliminierungsreaktionen
- Acyl-Transfer-Reaktionen
- *cis-trans*-Alken-Isomerisierungen
- Dehydratisierungsreaktionen

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

27

Katalytische Antikörper: β -Eliminierung



Abzyme Identity	Conditions		
43D4-3D12	pH 6; 37 °C		
K_m 8	k_{cat} 8	K_i 7	
182 μ M	0.003 s ⁻¹	0.29 μ M	

Fig. 8. Using the “bait and switch” principle, hapten (7) elicited an antibody, 43D4-3D12, which catalyzed the β -elimination of (8) to a *trans*-enone (9). The carboxyl function in (7) is necessary for its attachment to the carrier protein.

Anstieg der Reaktionsrate für

43D4-3D12: $\sim 8.8 \cdot 10^4$

Sequenzierung zeigt, dass Glu^{46H}

für Aktivität verantwortlich ist

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

28

Katalytische Antikörper - Bait and Switch

Aus ersten Erfolgen abgeleitete Erkenntnisse:

- 1) Eine geladene Gruppe ist notwendig für die Katalyse
- 2) Verwendung 'positiver' und 'negativer' Haptene vorteilhaft, die auf verschiedene Regionen der Bindungsregion abzielen
- 3) Eine Kombination aus Ladung und Modell (*mimicry*) war notwendig um hydrolytische Esteraseaktivität zu generieren

Katalytische Antikörper: Entropiefallen

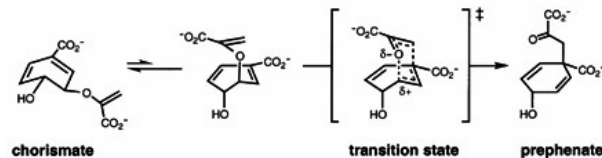
Prinzip basiert auf Kontrolle der translationalen und rotationalen Entropie

Wichtig für intramolekulare Reaktionen, z.B. Umlagerungen

Beispiel: Umlagerung von Chorismat zu Prephenat durch Chorismat-Mutase

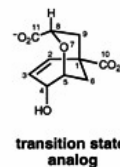
ÜZA weist pseudo-diaxiale Konformation auf.

Analog: Diels-Alder-Antikörper



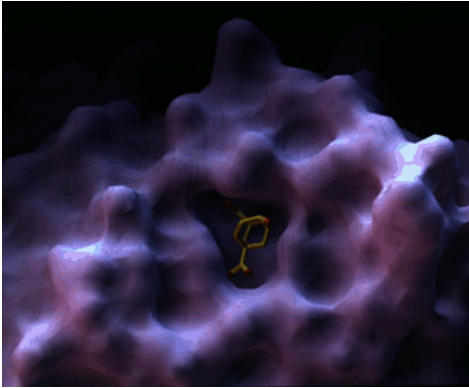
Raten (k_{cat}/k_{uncat}):

Spontan:	1 (25°C)
<i>E.coli</i> :	300 000 (25°C)
AK 1F7:	250 (14°C)
AK 11F1-2E11:	10 000 (10°C)

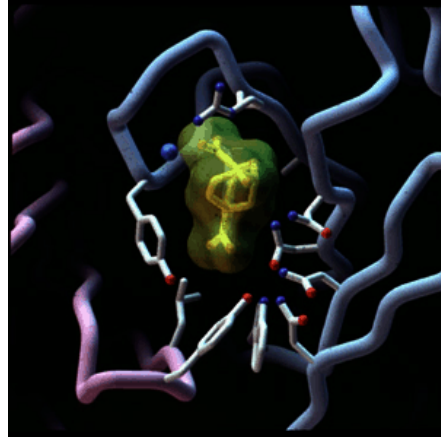


Chorismat-Mutase Antikörper

Aktives Zentrum des AK 1F7



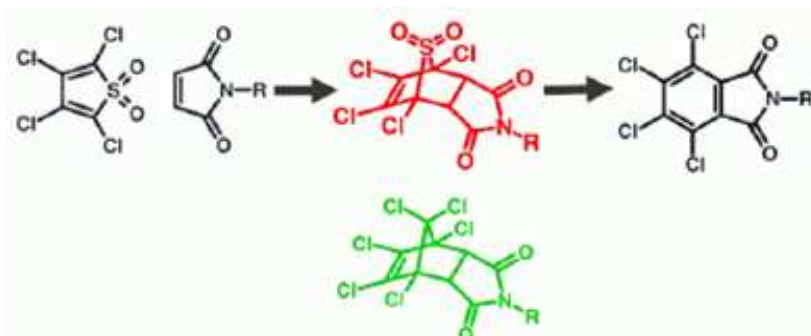
Seitenketteninteraktion von AK 1F7



Katalytische Antikörper: Entropiefallen

Analog: Diels-Alder Reaktion mit katalyt. Aks

Wichtig: für diese Reaktion wurde bislang kein natürliches Enzym gefunden!



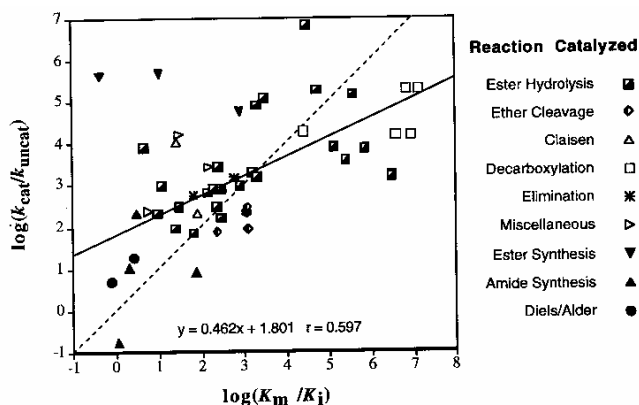
Rate ($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$): 100 (bestes Beispiel in Literatur: 1200)

Wie gut sind katalytische Antikörper ?

Stewart & Benkovic untersuchten die Ratenerhöhung für 60 katAKs.

Ratenerhöhung kann aus Verhältnis von K_m (für das Substrat) und K_i (für Übergangszustandanaloga) vorhergesagt werden.

Aber: sehr starke Abweichungen, $R^2 = 0.6$, Steigung (ausgezogene Linie) weicht stark von berechneter (gestrichelte Linie) ab.



Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

33

Von Antikörpern bislang katalysierte Reaktionstypen

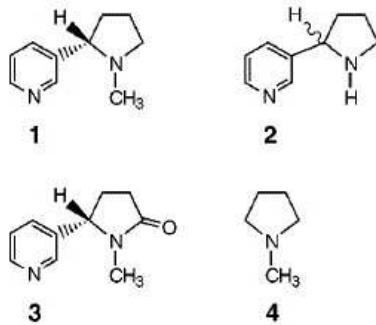
Reaktion	Max. Rate (k_{cat}/k_{uncat})	K_{cat} [min^{-1}]
Hydrolyse aliphatischer Ester	$1.4 \cdot 10^6$	47
Hydrolyse von Arylestern	$6.3 \cdot 10^6$	1 200
Hydrolyse von Carbonaten	$1.2 \cdot 10^6$	4.9
Hydrolyse von Amidinen	$2.5 \cdot 10^5$	800
Hydrolyse von Phosphatestern	$5.5 \cdot 10^3$	4.0
Eliminierungsreaktionen	$8.8 \cdot 10^4$	19
Decarboxylierungen	$1.0 \cdot 10^8$ (!)	27 000
Retro-Diels-Alder	$3.8 \cdot 10^2$	47
Isomerisierungen	$1.5 \cdot 10^4$	4.8
Umlagerungen	$1.9 \cdot 10^4$	18
Aldol-Reaktionen	$2.0 \cdot 10^5$	14 000
Diels-Alder Reaktionen	$2.6 \cdot 10^3$	11
Acyl-Transfer-Reaktionen	$5.5 \cdot 10^4$	14
Oxidationen	$9.4 \cdot 10^6$	8.2
Acetyl-Cholinesterase		1 500 000
Lactat-Dehydrogenase		60 000

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

34

Katalytische Antikörper - Beispiel Nikotinersatz

Tabakinhaltsstoffe und Metabolite



Haptensynthese für (*R*)- oder (*S*)-Nornikotin

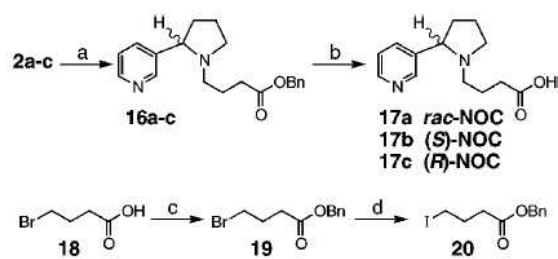


Figure 3. Synthesis of the racemic and (*S*)- and (*R*)-nornicotine haptens: (a) **20**, DIEA, acetonitrile; (b) H₂, Pd/C, MeOH; (c) benzyl alcohol, p-TsOH, cyclohexane; (d) NaI, acetonitrile.

Prof. Dr. Uwe Bornscheuer, Institut für Chemie & Biochemie, Abt. Techn. Chem. & Biotechnologie, Universität Greifswald

35

Beispiel Nikotinersatz - Synthese des (*S*)-Nikotin-Haptens

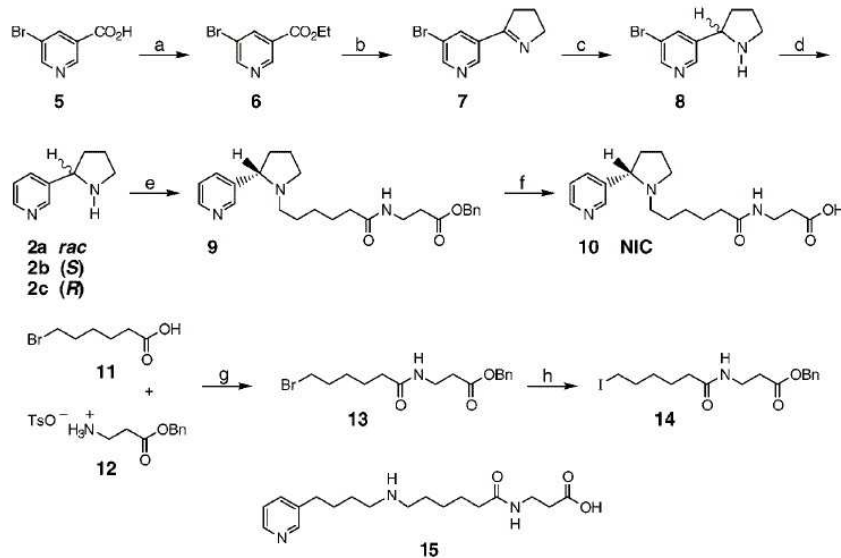


Figure 2. Synthesis of the (*S*)-nicotine hapten: (a) ethanol, concentrated H₂SO₄, reflux; (b) (i) NaH, THF, 1-vinyl-2-pyrrolidinone, reflux, (ii) aq HCl, reflux, (iii) aq NaOH; (c) NaBH₄; (d) (i) resolution (MTPA salts), (ii) H₂, Pd/C, NEt₃, EtOH; (e) **14**, DIEA, acetonitrile; (f) H₂, Pd/C, MeOH; (g) HBTU, *N*-methylmorpholine, DMF; (h) NaI, acetonitrile.

Beispiel Nikotinersatz - erste Ergebnisse

Table 1. Data for Some Antinicotine MAbs Derived from NIC-KLH

NIC mAb	isotype (IgG)	K_d (M x 10 ⁷)	specificity ^a (%)
3G2	$\kappa\gamma 1$	3.0	0.30, nd
6C12	$\kappa\gamma 1$	2.7	0.15, nd
13A3	$\kappa\gamma 2a$	1.6	0.10, nd
1B10	$\kappa\gamma 1$	2.5	0.20, nd
5E8	$\kappa\gamma 1$	3.4	0.65, nd
9D9	$\kappa\gamma 1$	2.0	0.055, nd

^a Determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using NIC-BSA; percent cross-reactivity (**2b**, **3**) relative to the amount of free nicotine that produces 50% decrease in mAb binding; nd = not detectable (no change in ELISA reading at 1000-fold molar excess of **3** compared to nicotine).

Weitere Anwendung von Antikörpern

VIELSEITIG

DER SPIEGEL

Detektor soll Drogen und Biowaffen aufspüren

Milzbrand-Bakterien, Sprengstoff, Heroin: Ein neues Nachweisgerät soll unterschiedlichste Substanzen erkennen können. Die Vielseitigkeit beruht auf dem Einsatz von Antikörpern.

Ob Kokain oder Heroin, ob Milzbranderreger oder der Landminensprengstoff TNT - ein in Schweden entwickeltes automatisches Suchsystem kann schon jetzt unterschiedlichsten Drogen und später auch Kampfstoffen mit einer neuartigen Analysemethode auf die Spur kommen. Der letzte Woche auf der internationalen Messe für innere Sicherheit in Paris vorgestellte Detektor macht die gesuchten Stoffe mit Hilfe von Antikörpern aus, die ausschließlich auf die entsprechende Substanz reagieren.



Entseuchung von FBI-Ermittlern nach der Milzbranderreger-Suche

Das Gerät der Firma Biosensor Applications besteht aus zwei Teilen, von denen das erste das verdächtige Objekt absaugt, um so viel Material wie möglich in einem speziellen Filter aufzunehmen. Ein Analysesystem mit mehreren Sensoren, die mit Antikörpern beschichtet sind, signalisiert per Rotlicht Alarm, wenn die gesuchte Chemikalie erkannt worden ist. Mit grünem Licht wird Entwarnung gegeben.

Eine Anmerkung zum Schluß

Kritiker behaupten:

Die zahlreichen Mißerfolge hätten leicht in einem:

Journal of Unsuccessful Abzymes

publiziert werden können....

Literatur und Internet-Seiten zum Thema

Biotechnology Series, Vol. 8b, Chapter 11, Wiley-VCH, Weinheim

http://www.rcsb.org/pdb/molecules/pdb21_3.html

<http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/catab.htm>

<http://www.protein.ethz.ch/antibody.shtml>