

Genetische Immunisierung – ein hocheffizientes Verfahren zur Antikörper-Herstellung für die medizinische Diagnostik und Therapie

Stefan Lang und John Thompson, GENOVAC AG, Freiburg

Antikörper in der angewandten Proteomik

► Die große Herausforderung in der post-genomischen Ära ist es, die riesige Menge an genetischer Information aus den Genomprojekten für den Menschen nutzbar zu machen. In der Grundlagenforschung können neue Erkenntnisse für das Verständnis von Lebensprozessen gewonnen, in der medizinischen Forschung neue Wege für die Diagnose, Prävention und Therapie von Krankheiten erkundet und beschriftet werden. Die dazu notwendigen Analysen finden auf der Ebene der Proteine, der eigentlichen biologischen Funktionsträger, statt, von denen es im menschlichen Organismus etwa 100.000 gibt. So erklärt es sich, dass Antikörper, die von der Natur als hochspezifische und hochaffine Erkennungsmoleküle für Proteine modelliert wurden, zu unverzichtbaren Werkzeugen der Proteomforschung geworden sind.

Zum einen werden Antikörper-gestützte Methoden (wie z.B. Immunhistochemie, Immunpräzipitation, ELISA, Durch-

flusszytometrie) in der Arzneimittelentwicklung zur Beurteilung potenzieller Zielmoleküle für neue Wirkstoffe nach strukturellen und funktionellen Kriterien eingesetzt („target validation“). Zum anderen spielen die Antikörper selbst eine große Rolle als diagnostische und therapeutische Agenzien^[1]. Monoklonale Antikörper (mAk) erleben als Therapeutika zur Zeit einen regelrechten Boom, was folgende Zahlen belegen^[2]: 11 mAk sind in den USA bereits zur Humantherapie, insbesondere gegen Krebserkrankungen und gegen die Abstoßung von Transplantaten, zugelassen. Weltweit befinden sich rund 400 mAk-basierte Therapien in der klinischen Prüfung.

Vom Gen direkt zum Antikörper

Die Tatsache, dass die Applikation von Plasmid-DNA in den Muskel oder die Haut eines Versuchstieres zur Expression der fremden genetischen Information und zur Erzeugung einer Immunantwort gegen das gebildete Fremdprotein führen kann, ist seit Beginn der neunziger Jahre

bekannt^[3]. Die Freiburger Firma GENOVAC hat diese Technologie der genetischen Immunisierung standardisiert, optimiert und mit der Hybridoma-Technologie zur Erzeugung von mAk^[4] kombiniert (siehe Versuchsschritte 1–7 in *Abb. 1*). Dieses Verfahren macht sich die zelleigene Proteinsynthese- und prozessierungsmaschinerie zunutze. Ausgehend von cDNA, die in spezielle Expressionsvektoren kloniert worden ist, werden Fremdantigene in nativer Form, also mit korrekter Konformation und posttranslativem Modifizierung, exprimiert und im Versuchstier eine natürliche Immunantwort induziert.

Dieser Ansatz ist optimal für die Proteomforschung, da weder für die Immunisierung noch für die Analyse und Selektion der Hybridom-Klone das Zielprotein in gereinigter Form vorliegen muss. Als patentgeschütztes Screening-System für die Spezifität der Immunsere und Hybridom-Überstände dienen Zellkulturen, die zuvor mit den Immunisierungskonstrukten transfiziert wurden. Die Vorteile dieser Technologie liegen in der

durch konventionelle Immunisierungsverfahren nicht erreichbaren Schnelligkeit und in der Qualität der erzeugten Antikörper. Durch die Optimierung aller Einzelschritte und die Anwendung von Hochdurchsatzverfahren können spezifitätstestete polyklonale Antikörper in 2–3 Monaten und monoklonale Antikörper ausgehend von denselben Immunisierungskonstrukten in 3–6 Monaten erzeugt werden. Die Produktion maßgeschneiderter Antikörper gegen Proteinvarianten oder gegen ausgewählte Proteindomänen ist durch entsprechende DNA-Klonierungsstrategien leicht möglich.

Antikörper als Diagnostika und Therapeutika

Hohe Spezifität und Affinität für ihre nativen Zielproteine sind charakteristische Qualitätsmerkmale von Antikörpern aus genetischen Immunisierungen. Gerade diese Eigenschaften sind für Antikörper mit diagnostischen und therapeutischen Anwendungen essentiell. Als Zielstrukturen für die Diagnostik dienen oft sezernierte Proteine, um invasive Techniken bei der Entnahme von Patientenproben zu vermeiden. Therapeutika sind dagegen oft gegen membrangebundene, von Blut oder Lymphe extrazellulär zugängliche Proteine gerichtet. Beide Proteinklassen machen in konventionellen Protein- und Peptid-Immunisierungsansätzen Probleme, da sie ausgeprägten posttranslationalen Modifizierungen unterliegen bzw. als Membranproteine stark hydrophobe Eigenschaften besitzen. *Tab. 1* zeigt, dass die Erfolgsraten für die Antikörper-Produktion gegen diese „Problem“-Proteinklassen mit der GENOVAC Technologie bei 77 % bzw. 92 % liegen. Die Rate der erfolgreichen Antikörper-Produktion für die aktuell mehr als 100 Gesamtprojekte liegt bei etwa 85 %.

Ein Beispiel für den erfolgreichen Einsatz eines der erzeugten Antikörper gegen einen nativen membrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezep-



Abb. 1: Ablaufschema der genetischen Immunisierungsstrategie zur Erzeugung monoklonaler Antikörper.

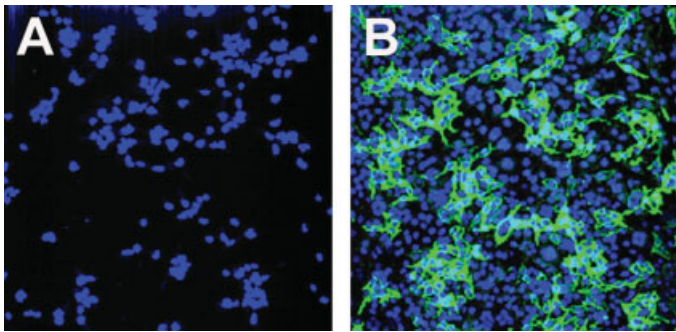


Abb. 2: Immunfluoreszenz-Analyse von GPCR-transfizierten HEK (human embryonic kidney) Zellen.
A: nicht-transfizierte HEK Zellen (Kontrolle)
B: GPCR-transfizierte HEK Zellen
Doppelfärbung: Zur Identifizierung einzelner Zellen wurde der Kernfarbstoff Hoechst 33342 eingesetzt (Zellkerne blau); zellgebundene primäre Maus anti-GPCR Antikörper wurden mit sekundären Ziege anti-Maus IgG (H+L) Antikörpern nachgewiesen, an die der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 gekoppelt war (GPCR-Protein grün).

tor (GPCR) in einer Immunfluoreszenz-Analyse ist in *Abb. 2* gezeigt. Diese Rezeptoren sind an

der Signalweiterleitung beteiligt und nehmen eine biologische Schlüsselfunktion ein. GPCR

sind Zielstrukturen für mehr als 50 % der gegenwärtig auf dem Markt befindlichen Therapeutika und zugleich Haupt-Targets für die Entwicklung neuer inhibierender und aktivierender Therapeutika.

Fazit

GENOVAC hat die genetische Immunisierung zu einem standardisierten und optimierten Verfahren entwickelt und bietet Kunden in der akademischen Forschung und in der biopharmazeutischen Industrie die schnelle Herstellung sehr gut charakterisierter, hochqualitativer poly- und monoklonaler Antikörper als Auftragsentwicklung an. Die Antikörper dienen einerseits der effizienten Target-Validierung in der Medikamentenentwicklung und werden an-

dererseits selbst als Agenzien für den Einsatz in der medizinischen Diagnostik und Therapie entwickelt.

Literatur:

[1] **M.A. van Dijk, J.G.J. van de Winkel.** Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2001) 5, 368 – 374
 [2] **T. Gura.** Magic bullets hit the target. *Nature* (2002) 417, 584 – 586
 [3] **S. Gurunathan, D.M. Klinman, R.A. Seder.** DNA vaccines: Immunology, application, and optimization. *Ann. Rev. Immunol.* (2000) 18, 927 – 974
 [4] **G. Köhler, C. Milstein.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (1975) 256, 495 – 497

Korrespondenzadresse:

Dr. Stefan Lang
GENOVAC AG
Waltershofener Str. 17
D-79111 Freiburg
Tel.: 0761-45636-0
Fax: 0761-45636-29
slang@genovac.com
www.genovac.com

Lokalisierung/Herkunft des Proteins	Anteil der Projekte an den Gesamtprojekten	erfolgreiche Antikörper-Produktion
sezerniert	30 %	77 %
membrangebunden (Typ I, Typ II, „multiple-spanning“)	34 %	92 %
virale Proteine	9 %	78 %
andere Lokalisierung (z.B. Zytoplasma, Kern, Lysosomen, unbekannt)	28 %	86 %
Gesamterfolgsraten (n=98):	Antigen-Expression	95 %
	Antikörper-Herstellung	84 %

Tabelle 1: Erfolgsrate für die Antikörper-Herstellung durch genetische Immunisierung bei GENOVAC