

„Rekombinante Antikörper – Eine vollkommen neue Ära für Therapie und Diagnostik“

Annette Hufnagel und Kerstin Brettschneider

Überall in der Medizin und der Biotechnologie sind die molekularen Alleskönner anzutreffen. Ihr Einsatzgebiet reicht vom Schwangerschaftstest zur Aktivimpfung, bis hin zur Isolierung von Proteinen oder zur Visualisierung von Zellstrukturen. In den letzten Jahren haben sich Antikörper zu unentbehrlichen Werkzeugen in der Medikamentenentwicklung und der Forschung entwickelt. Im Organismus sind Antikörper für die adaptive Immunabwehr, also die Erkennung körperfremder Substanzen und Krankheitserreger verantwortlich. Die Immunantwort auf solche Antigene zeichnet sich durch die Produktion großer Mengen Antikörper durch Plasmazellen (B-Lymphozyten) aus.

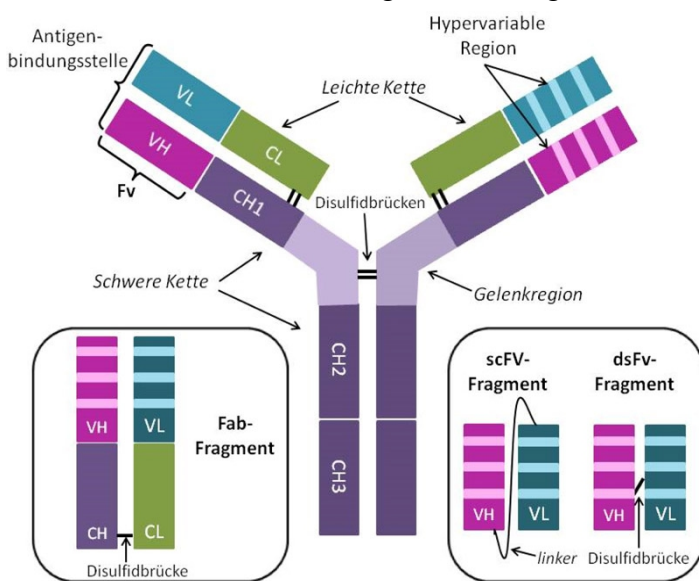


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines typischen Antikörpers und spezifischer Antikörperfragmente. Die leichte Kette besteht aus einem variablen (V_L) und einem konstanten (C_L) Bereich. Auch die schwere Kette besteht aus einem variablen (V_H) und einem konstanten (C_{H1-3}) Bereich. Die variablen Regionen der schweren und der leichten Kette (F_v) bilden die Antigenbindungsstelle. Das Fab-Fragment besteht aus den „Armen“ des Antikörpers. Ein scFv-Fragment besteht aus der variablen Region der leichten und der schweren Kette, die über eine kurze Peptidsequenz (*linker*) verbunden sind. Ein dsFv-Fragment ist nicht über einen Linker verbunden, sondern über eine Disulfidbrücke.

zusammen die Antigenbindungsstelle bilden. Diese hypervariable Region bestimmt durch ihre Aminosäuresequenz die Form, die Spezifität und die Affinität der Bindungsstelle. Der Rest und somit der größte Teil der Struktur ist bei allen Antikörpern einer bestimmten Klasse weitgehend gleich. [1, 3]

Die Aufgabe von Antikörpern besteht darin, die Krankheitserreger zu binden, um sie anschließend mithilfe weiterer Komponenten des Immunsystems unschädlich zu machen. Weil Antikörper zu ihrem jeweiligen Antigen eine sehr spezifische und sehr feste Bindung eingehen, eröffnet sich ein breites Anwendungsgebiet sowohl in der Therapie als auch in der Diagnostik. So ist es beispielsweise möglich, mithilfe therapeutischer Antikörper toxische Wirkstoffe an ihre Wirkorte (z.B. Tumorzellen) zu führen und dadurch Nebenwirkungen zu verringern. Auch in der Forschung macht man sich die hohe Spezifität für einen Bindungspartner zum Beispiel zur Sichtbarmachung bestimmter zellulärer Strukturen zunutze. Dazu werden auch Antikörper verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

Die für die Funktion essentielle und charakteristische Y-Form der Antikörper ist aus jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten aufgebaut, die durch Disulfidbrücken verbunden sind (Abbildung 1). Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten besitzen eine variable Region, die

Herstellung polyklonaler und monoklonaler Antikörper durch traditionelle Verfahren ist teilweise überholt.

Die traditionellen Herstellungsverfahren von Antikörpern beruhen auf der Immunisierung eines Versuchstieres. Durch die Injektion eines Antigens wird die Produktion von Antikörpern veranlasst, die einige Zeit später im Blutserum nachgewiesen und isoliert werden können. Jedoch erhält man immer ein Gemisch verschiedener Antikörper unterschiedlicher Spezifitäten, welches als polyklonales Antikörperserum bezeichnet wird. Für spezielle Anwendungen in der Therapie ist dies ein Problem, da mit der steigenden Anzahl verschiedener Antikörper das Risiko unerwünschter Immunantworten zunimmt. Die 1975 entwickelte Hybridom-Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper löste dieses Problem: Monoklonale Antikörper werden von einer Zelllinie produziert, die auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgeht. Sie sind exakt „baugleich“ und damit in gleicher Weise spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Die Herstellung erfolgt durch die Isolierung der B-Lymphozyten aus der Milz und deren Fusion mit Myelomzellen (Krebszellen). Es entstehen Hybridome, hybride Zellen, die in großen Mengen und nahezu unerschöpflich monoklonale Antikörper produzieren können. Allerdings greift diese Methode ebenfalls auf die Immunisierung von geeigneten Tieren zurück. Für die Anwendung in der Therapie sind solche Antikörper nicht gut geeignet, da behandelte Patienten Antikörper gegen das Antikörper-Grundgerüst des Versuchstieres bilden und so eine Immunreaktion gegen den Wirkstoff ausgelöst wird.

Um dieses Problem zu lösen, bediente man sich der sogenannten „Chimärisierung“ von Maus-Antikörpern. Dies bedeutet, dass die Antikörper aus einem Fv-Fragment eines Maus-Antikörpers und dem konstanten Bereich eines humanen Antikörpers zusammengesetzt werden, um so die Spezifität von monoklonalen Antikörpern bei einer deutlich geringeren Immunantwort nutzen zu können. [4]

Rekombinante Antikörper eröffnen eine Ära von neuen Möglichkeiten

Einen wesentlichen Fortschritt stellen die rekombinanten Antikörper dar, die auf gentechnischem Weg gewonnen werden, also in vitro von Bakterien oder kultivierten Zelllinien hergestellt werden. Die Entwicklung der Hybridom-Technik war ein erster wichtiger Schritt in Richtung rekombinanter Antikörper. Denn Hybridomazellen dienen als Bibliothek für die Antikörper kodierenden DNA-Sequenzen. Allerdings ist die rekombinante Produktion ganzer Antikörper in Hefen oder Bakterien aufgrund des hohen Molekulargewichts (150 kDa) schwierig. Doch um Antigene spezifisch zu binden, genügen auch Fragmente von Antikörpern, solange die Struktur der Antigenbindungsstelle intakt bleibt. Deswegen bestehen rekombinante Antikörper häufig nur aus Fab-Fragmenten (Abbildung 1), die sowohl die Antigenbindungsstellen (Fv) wie auch einen konstanten Teil der schweren und der leichten Kette beinhalten. Eine kleinere Form rekombinanter Antikörper, die sogenannten scFv- oder dsFv –Fragmente, bestehen nur aus den variablen Regionen der schweren und der leichten Kette. Um diese zu stabilisieren, werden entweder kurze Peptidsequenzen (*linker* bzw. *short chain*; scFv) oder Disulfidbrücken (dsFv) eingefügt (siehe Abbildung 1). Zur Selektion solcher Antikörper-Fragmente hat sich vor allem das sogenannte Phagen-Display bewährt. [3]

Phagen-Display als in-vitro Methode zur effizienten Antikörperselektion.

Die Einführung der *in vitro* Methode des Phagen-Displays in den achtziger Jahren eröffnete für die Selektion spezifischer Bindungsproteine völlig neue Möglichkeiten und ist aus dem wissenschaftlichen Repertoire nicht mehr wegzudenken. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Genotyp-Phänotyp-Kopplung: Hierbei wird ein Protein *of interest* (POI), wie das scFv, auf der Oberfläche eines Phagen präsentiert, in dessen Genom die Sequenz für das Protein verschlüsselt ist. Auf diese Weise kann die Sequenz eines Proteins mit guten Bindungseigenschaften durch die Sequenzierung der DNA des präsentierenden Phagen bestimmt werden.

Ein solcher Phage wird dadurch erhalten, dass die cDNA des zu präsentierenden Proteins in einen Expressionsvektor aus zirkulärer DNA kloniert wird, der unter anderem die DNA-Sequenz für ein Hüllprotein des Phagen (pIII) enthält, sodass eine Fusion aus den Genen für POI und Hüllprotein pIII entsteht (Abbildung 2). Wird der Vektor anschließend in *E.coli*-Bakterien eingebracht und diese wiederum mit einem Helfer-Bakteriophage infiziert, so entstehen Phagen, die das gewünschte Protein als Fusion mit dem pIII-Hüllprotein auf der Oberfläche exprimieren.

Um Proteine, wie zum Beispiel Antikörperfragmente, die spezifisch an bestimmte Strukturen binden, selektieren zu können, müssen kombinatorische Bibliotheken mit vielen verschiedenen Varianten des gewünschten Proteins hergestellt werden. Dazu benötigt man ein Repertoire an Gensequenzen, die man entweder synthetisch oder auch durch moderne PCR-Techniken aus den Genen der B-Lymphozyten erhält. Eine solche Bibliothek kann typischerweise bis zu 10^9 verschiedene Varianten enthalten. Zur Anreicherung von Antikörperfragmenten mit hoher Affinität zum gewünschten Antigen werden die Phagen, die die Antikörper-Varianten tragen, im sogenannten „Panning“-Prozess mit dem immobilisierten Antigen inkubiert. Die ungebundenen Phagen werden durch Waschen entfernt, während Binder gegen das gewünschte Antigen zurückbleiben. Durch Elution der Phagenpartikel vom Antigen und eine erneute Infektion von *E.coli*-Bakterien können in mehreren Runden Antikörper-Fragmente mit hoher Affinität zum Antigen angereichert werden. Durch anschließende Sequenzierung der DNA der verbliebenen Phagen wird die Aminosäuresequenz der angereicherten Bindungsproteine bestimmt. Durch weitere gezielte Modifikationen können die Bindeeigenschaften optimiert werden. Diese Methode eignet sich somit nicht nur zur Anreicherung spezifischer Antikörperfragmente, sondern auch zur Anreicherung beliebiger anderer Bindeproteine gegen ein Zielmolekül. Außerdem gibt es neben dieser Display-Technologie auch noch andere Methoden, wie Hefe- oder Ribosomen-Display, mit denen Proteine in Verbindung mit der codierenden Nukleinsäuresequenz präsentiert werden können. [2, 3]

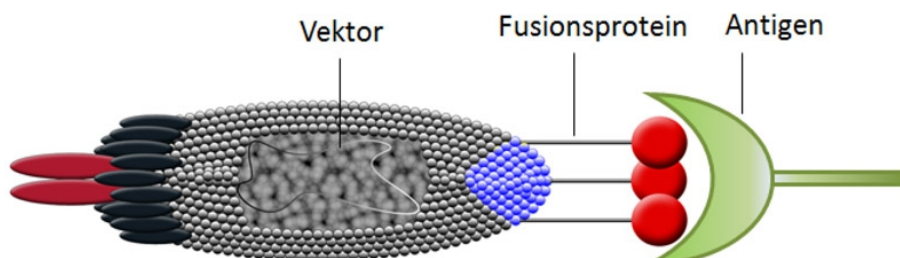


Abbildung 2: Mehrere Varianten des zu repräsentierenden Antikörper-Fragments (z.B. scFv, hellrot) sind als pIII-Fusionsprotein auf einem einzelsträngigen eingebrachten DNA-Vektor kodiert. Durch Einbringen des Vektors in *E.coli* und der Infektion der Bakterien mit Phagen wird der Antikörper mit dem pIII-Hüllprotein des Phagen auf der Oberfläche präsentiert. Die Anreicherung von Antikörperfragmenten gegen auf einer Oberfläche immobilisiertes Antigen (grün) nennt man „Panning“.[5] Die Abbildung des Phagen wurde von Björn Steinmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die neuen rekombinanten Antikörper versprechen vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

Durch in-vitro-Selektionsmethoden wie das Phagen-Display können Antikörper-Fragmente isoliert werden, die eine hohe Bindungsaffinität zum Zielmolekül aufweisen. Die typischen Dissoziationskonstanten (K_d) natürlicher Antikörper liegen zwischen 10^{-4} und 10^{-10} M, die von rekombinant hergestellten Antikörpern im niedrigen nanomolaren (10^{-9} M) bis hin zum picomolaren Bereich (10^{-12} M). [1, 2] Die *in-vitro*-Selektion bietet außerdem den wichtigen Vorteil, dass die Umgebungsbedingungen wie zum Beispiel pH-Wert und Temperatur genau festgelegt und kontrolliert werden können. [3] Ein weiterer Fortschritt ist, dass Antikörper gegen eine bestimmte Konformation eines Zielmoleküls angereichert werden können. Dies ist bei der herkömmlichen Herstellung, die auf einer Immunisierung beruht, nicht möglich. Ferner eröffnen die neuen Selektionsverfahren die Möglichkeit, Antikörper gegen toxische, pathogene oder körpereigene Stoffe zu kreieren, die durch die Immunisierung eines Versuchstiers niemals zugänglich wären. Des Weiteren bietet sich die Chance zur Produktion bispezifischer Antikörper. Dies sind sogenannte *Diabodies*, die sich durch zwei gegen unterschiedliche Epitope gerichtete Antigenbindungsstellen auszeichnen. Auch die Produktion von sogenannten *Tria-* oder *Tetrabodies* ist möglich. Diese können gegenüber den *Diabodies* eine noch höhere Affinität zum Antigen besitzen (Aviditätseffekt). [2]

Gegenüber der traditionellen Herstellung von Antikörpern, die mit hohen Kosten und vergleichsweise geringer Ausbeute einhergeht, bieten rekombinante Antikörper einen Kosten-Vorteil bei der Handhabung und Produktion. [3] Obwohl rekombinante Antikörper eine Vielzahl an Vorteilen aufzeigen und einige sogar schon für klinische Anwendungen zugelassen sind, beherrschen die traditionell hergestellten Antikörper immer noch den Markt. Der Grund hierfür liegt im langwierigen Prozess der klinischen Erprobung von Antikörpern. In naher Zukunft sollte sich dies aber ändern, denn durch die rekombinanten Antikörper eröffnen sich neue Möglichkeiten wie die bereits erwähnte Generierung neuer Antikörper gegen bisher unerreichbare Epitope oder die Herstellung bispezifischer Antikörper, welche zur Zielführung bestimmter Medikamente eingesetzt werden können.

Kontakt:



Der Artikel wurde im Rahmen des Studienprojektes HighChem des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt verfasst (s. [Woche 2](#)).

Die Autorinnen, Annette Hufnagel und Kerstin Brettschneider, waren zum Zeitpunkt des Verfassens Studierende des Diplomstudiengangs Biologie an der TU Darmstadt

(E-Mail: annette.hufnagel@gmx.de und kerstin.brettschneide@kgu.de).



Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Katja Schmitz (E-Mail: schmitz@biochemie-tud.de).

Schlauer Fuchs

Unsere Schlaue-Fuchs-Frage zu diesem Beitrag lautete:

Wann wurde die Hybridom-Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper entwickelt?

Literatur:

[1] Bradbury, A.R., et al., *Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(3): p. 245-54.

[2] Colwill, K. and S. Graslund, *A roadmap to generate renewable protein binders to the human proteome*. Nat Methods, 2011. **8**(7): p. 551-8.

[3] Dubel, S., et al., *Generating recombinant antibodies to the complete human proteome*. Trends Biotechnol, 2010. **28**(7): p. 333-9.

[4] Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. 1975. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 2453-5.

[5] Steinmann, B., *Intrazelluläre Immobilisierung von Enzymen auf der Oberfläche von Protein-Einschlusskörpern*, 2009, Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt: Clemes-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie.