

Spezifische Bindemoleküle

Monoklonale Antikörper – Herstellung und Verwendung

KATJA HEILMANN, KATRIN MESSERSCHMIDT, PAMELA HOLZLÖHNER
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE, UNIVERSITÄT POTSDAM

Monoclonal antibodies are unique binding molecules with a high specificity for their target. This makes them a very powerful tool for research, diagnostic and therapeutic applications. Modifications of structure and effector functions as well as a faster biotechnical production lead to an extended application in biomedicine.

DOI: 10.1007/s12268-012-0160-5
© Springer-Verlag 2012

■ Antikörper sind hochspezifische Bindemoleküle, die der Organismus im Zuge einer Abwehrreaktion als Bestandteil der adaptiven Immunantwort generiert. Als „fremd“ erkannte Strukturen auf Bakterien, Viren oder anderen Pathogenen werden gebunden und damit für den Abbau markiert. Gebildet werden die globulären Proteine von B-Lymphozyten, die zunächst einen membranständigen Antikörper auf der Zelloberfläche tragen und diesen dann später in löslicher Form in großen Mengen in das umgebende Medium abgeben können. In diesem Stadium werden die B-Lymphozyten als Plasmazellen bezeichnet, die in der Lage sind, bis zu 3.000 Antikörper pro Sekunde zu sezernieren [1]. Die sezernierten Antikörper sind hochaffin für ihr Antigen, da die produzierende Zelle vorher eine Affinitätsreifung durchläuft. Bei diesem Schritt überleben nur die Zellen, die den Antikörper mit der höchsten Spezifität und Affinität produzieren. Diese Zellen werden dann als Gedächtniszellen etabliert, um bei einer späteren Infektion mit dem gleichen Erregertyp sofort wieder aktiviert zu werden. Die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses ist ein fundamentaler Schritt bei der Bekämpfung von Infektionen.

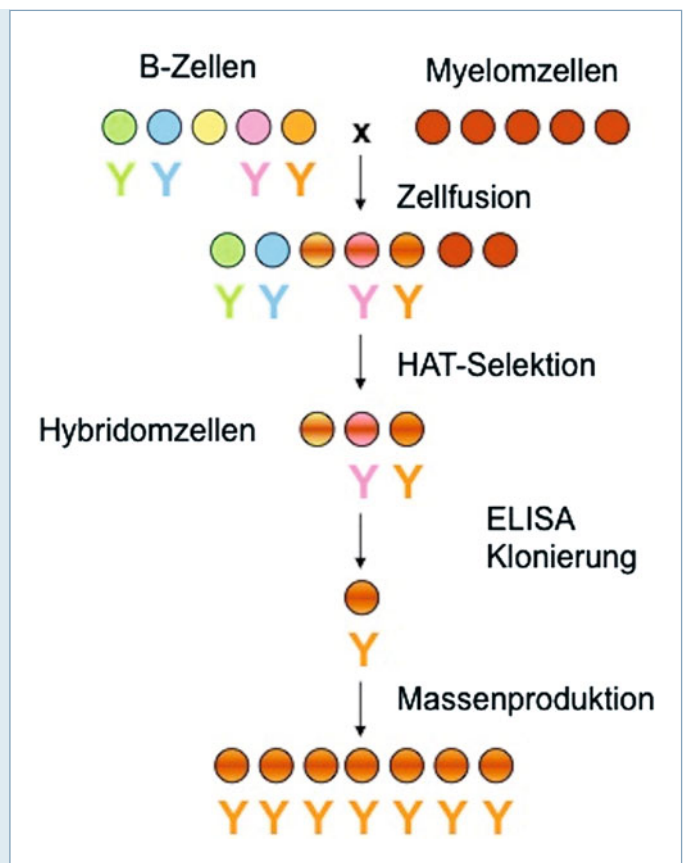
Antikörper als Werkzeuge – Herstellung durch die Hybridomtechnologie

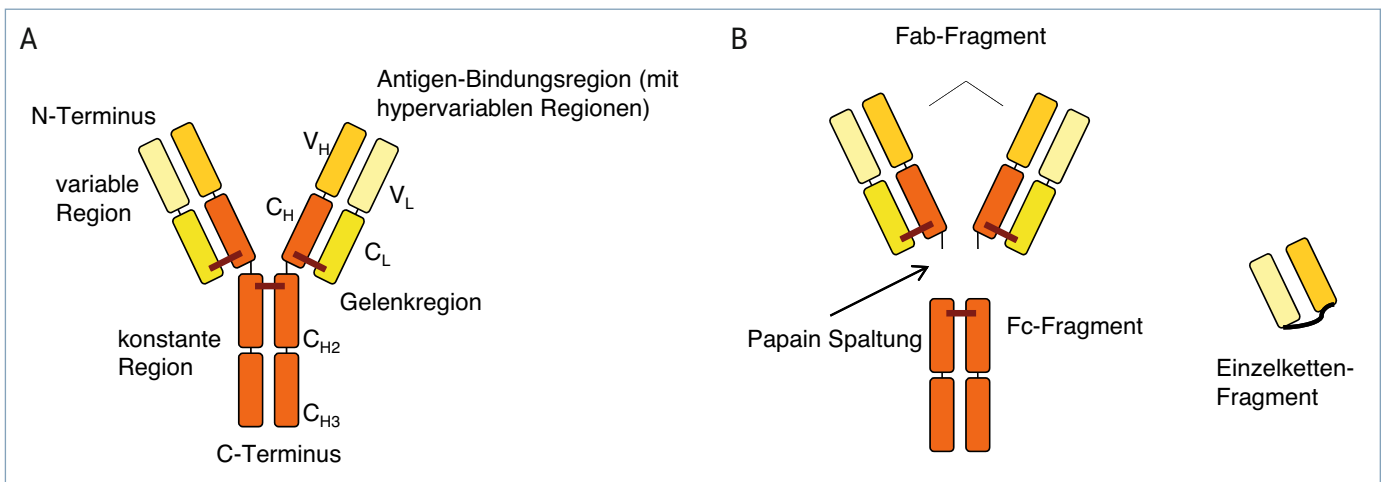
Der Organismus ist in der Lage, Antikörper gegen nahezu jede Fremdschubstanz zu generieren. Damit sind Antikörper hochspezifische Werkzeuge und auch außerhalb des

Organismus von enormer Bedeutung. Seit der Entwicklung der Hybridomtechnologie im Jahr 1975 durch Köhler und Milstein [2] ist es möglich geworden, monoklonale Antikörper gegen nahezu jede Substanz zu generieren und für die Forschung, Diagnostik und The-

rapie einzusetzen. Erst dadurch konnten vielfältige experimentelle Methoden wie die Durchflusszytometrie, die Immunfluoreszenz oder der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) entwickelt werden, die heute als Standardtechnologien in der Forschung und Diagnostik gelten. Die Herstellung monoklonaler Antikörper ist allerdings immer noch sehr zeitaufwendig und benötigt eine hohe fachliche Expertise der beteiligten Mitarbeiter. Für die Gewinnung der Antikörper-produzierenden Zellen werden Mäuse mit dem Antigen der Wahl immunisiert. Das Immunsystem der Maus reagiert darauf mit der Aktivierung von spezifischen B-Lymphozyten und der Differenzierung zu Plasma- und Gedächtniszellen. Anschließend werden die Tiere erneut immunisiert, um das immunologische Gedächtnis zu aktivieren. Danach kann die Milz

► **Abb. 1:** Schematische Darstellung der Hybridomtechnologie. Dabei werden Milzzellen (B-Zellen) mit Myelomzellen fusioniert, um ein langlebige, Antikörper-produzierendes Hybridom zu erhalten. Die entstandenen Hybridome werden selektiert, kloniert und durch ELISA auf die Antikörperproduktion getestet. Hat man den gewünschten Klon identifiziert, kann man in die Massenproduktion gehen und monoklonale Antikörper in großen Mengen herstellen. HAT: Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin. Modifiziert nach [7].





▲ **Abb. 2:** **A**, Antikörper bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten mit einer konstanten Region am C-Terminus und einer variablen Region am N-Terminus. Die Antigen-bindende Region wird durch die schwere und leichte Kette am N-Terminus gebildet. V: variable Domäne; C: konstante Domäne; Index H: schwere Kette; Index L: leichte Kette. **B**, Mit einer enzymatischen Behandlung ist es möglich, Antikörper-Fragmente herzustellen. Durch Spaltung mit Papain kann man an der Gelenkregion das Fc-Fragment abtrennen, somit erhält man Fab-Fragmente. Um nur die Antigen-bindende Region zu bekommen, isoliert man die Antikörpergene der Hybridomzellen und stellt rekombinant ein Einzelketten-Fragment her.

entnommen werden, um die Antikörper-produzierenden Zellen zu isolieren. Diese werden dann mit Myelomzellen fusioniert (**Abb. 1**). Myelomzellen sind Tumorzellen des B-Zell-Lymphoms, die ein unbegrenztes Wachstum zeigen, aber selbst keine Antikörper mehr produzieren. Durch die Fusion der Zellen werden beide Eigenschaften der Elternzellen vereint, das heißt es entstehen Hybridomzellen, die ein unbegrenztes Wachstum zeigen und einen Antikörper sezernieren. Im Anschluss an die Fusion durchlaufen die Zellen eine Selektionsphase, in der die nicht fusionierten Zellen abgetötet werden. Da bei der Fusion das gesamte B-Zell-Repertoire der Maus fusioniert wurde, entstehen dabei auch viele Antikörper-produzierende Hybridome, die nicht spezifisch für das Antigen sind. Deshalb werden die Zellen wöchentlich auf ihre Antikörperproduktion getestet, um nur diejenigen Zellen zu erhalten, die den gewünschten Antikörper produzieren. Diese Zellen werden vermehrt und durch Kryokonservierung gesichert. Durch Sammeln der Kulturüberstände erhält man den spezifischen Antikörper, der im Anschluss durch eine Affinitätschromatografie gereinigt wird.

Modifikationen von Antikörpern

Der Antikörper kann nun für die Anwendung in unterschiedlichsten Methoden verändert werden. Es können z. B. Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme gekoppelt werden, die einen Nachweis in der Durchflusszytometrie oder im ELISA möglich machen. Aber auch das Koppeln von paramagnetischen Beads gehört mittlerweile zu einer Standardtech-

nologie, mit der es möglich wird, einzelne Zellpopulationen zu sortieren. Da Antikörper (**Abb. 2A**) mit einer Größe von 150 Kilodalton für einige Anwendungen zu groß sein können, ist es auch möglich, Antikörper-Fragmente herzustellen. Eine Fragmentierung kann enzymatisch stattfinden (**Abb. 2B**). Durch Papain-Spaltung wird das konstante Fc-Fragment des Antikörpers abgespalten, und der verbleibende Bereich mit variablen und konstanten Domänen kann als Fab-Fragment (*fragment antigen binding*) für Anwendungen genutzt werden. Die Fab-Fragmente können ebenso mit Farbstoffen oder Enzymen modifiziert werden. Es ist auch möglich, nur mit den bindenden Bereichen eines Antikörpers zu arbeiten. Dafür isoliert und verknüpft man die Gene, die für die variablen Domänen der schweren und leichten Kette der Antikörper codieren, und stellt rekombinant ein Einzelketten-Fragment her. Dieses Fragment hat eine Größe von 25 Kilodalton und kann mit entsprechenden Reinigungs- und Markierungspeptiden versehen werden. Einzelketten-Fragmente werden auch therapeutisch eingesetzt, da sie durch die Minimierung weniger immunogen sind als ein kompletter Maus-Antikörper [3]. Für einen therapeutischen Einsatz müssen die verwendeten Antikörper humanisiert werden, da sonst der Patient eine Immunantwort gegen den Antikörper entwickelt, was der Therapie entgegenwirkt. Die Humanisierung eines Maus-Antikörpers erfolgt rekombinant und kann in verschiedenen Stufen durchgeführt werden. Es gibt aber auch die Möglichkeit, humane Antikörper über die Hybrido-

domtechnik herzustellen, wenn man Mäuse verwendet, die ein humanes Immunsystem ausprägen [4]. Diese Mäuse sind allerdings nicht frei zugänglich.

Verbesserungen der Herstellung

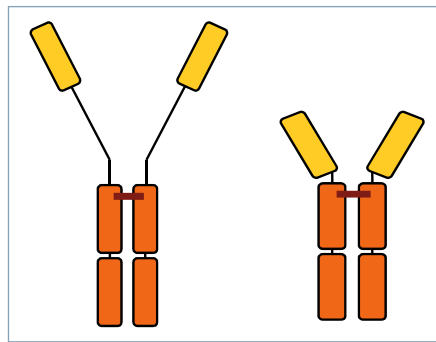
Um den großen zeitlichen Aufwand bei der Hybridomtechnik zu umgehen, werden von unserer Nachwuchsgruppe verschiedene Alternativen entwickelt. Um die Immunisierungsphase zu verkürzen, kann man sehr gut mit Virus-ähnlichen Partikeln arbeiten, da durch die Virushülle in den Tieren eine starke und schnelle Immunantwort ausgelöst wird. In die virale Hülle können Peptidsequenzen integriert werden, die das Assemblieren des Virus nicht stören. Dadurch können Antikörper gegen die inserierten Peptide gewonnen werden. Dies verkürzt die Immunisierungsphase von drei Monaten auf zwei Wochen. Eine weitere Alternative stellt die *in vitro*-Immunisierung dar, bei der die Immunreaktion eines Organismus in die Zellkultur übertragen werden soll. Dafür werden Antigen-präsentierende Zellen mit Antigen aktiviert und anschließend mit naiven T- und B-Lymphozyten kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen findet man spezifische Antikörper im Kulturmedium. Die ersten Ergebnisse zeigen eine mögliche Induktion spezifischer B-Lymphozyten *in vitro* [5]. Hier bedarf es noch weiterer Forschungsarbeiten, da natürliche Prozesse, wie die Affinitätsreifung im Organismus, unter *in vitro*-Bedingungen realisiert werden müssen. Generell wäre es mit einem derartigen System aber möglich, spezies-unabhängig zu

arbeiten und z. B. durch den Einsatz humaner Zellen auch humane Antikörper zu gewinnen.

Auch für die nach der Fusion beginnende aufwendige Selektion der gewünschten Antikörper-produzierenden Zelle werden Alternativen erarbeitet, um den Zeit- und Materialaufwand zu verkürzen. Jede Zelle exprimiert spezifische Oberflächenmarker, die für eine Selektion genutzt werden können. Bei den Hybridomzellen ergeben sich jedoch Schwierigkeiten, da sie aus zwei Elternzellen bestehen und somit teilweise den doppelten Chromosomensatz tragen. Durch diese Last werden häufig Genabschnitte deletiert, die sich einerseits auf die Antikörperproduktion, andererseits auf die Expression von Oberflächenmarkern auswirken können. Deshalb muss ein Marker gefunden werden, der immer und ständig exprimiert wird, um eine routineteaugliche Selektion zu gewährleisten. Dabei ist auch denkbar, dass man künstlich einen Oberflächenmarker in die Fusionszelllinie einbringt, der eine spätere Selektion ermöglicht. Solch eine schnellere und weniger aufwendige Herstellung monoklonaler Antikörper würde zu einer enormen Zeit- und Kostenersparnis führen.

Besondere Antikörper

Dass Antikörper in ihrer Form und Struktur keinesfalls festgelegt sind, sieht man in anderen Organismen wie Ammenhaien und Kamelen. Diese Tiere weisen zusätzlich zur konventionellen Antikörperstruktur eine modifizierte Version auf (**Abb. 3**). Diesen Antikörpern fehlt die leichte Kette, und sie werden deshalb als Schwere-Ketten-Antikörper bezeichnet. Gerade die Kamel-Antikörper sind schon mehrfach in den wissenschaftlichen Fokus gerückt, da die rekombinante Herstellung der Antigen-bindenden Bereiche durch das Klonieren von nur einer Kette einfacher ist als die übliche Herstellung von Einzelketten-Fragmenten. Diese werden in der Literatur als Nanobodies bezeichnet und bereits für therapeutische Anwendungen getestet [6]. Aber auch die kompletten Schwere-Ketten-Antikörper sind für die Forschung und Diagnostik sehr interessant, da sie Temperaturen bis 90 °C tolerieren können. Durch die unterschiedlich lange Gelenkregion der einzelnen Subklassen sind die Antikörper in der Lage, auch an schwierige antigene Determinanten, wie z. B. aktive Zentren von Enzymen, zu binden. Aus diesem Grund widmen wir uns auch diesen interessanten Fragestel-



▲ **Abb. 3:** Schwere-Ketten-Antikörper bei Kamelen mit langer (links) und kurzer Gelenkregion (rechts).

lungen und versuchen, die Kamel-Antikörper für die Wissenschaft zugänglich zu machen.

Die Nachwuchsgruppe legt den Schwerpunkt auf anwendungsorientierte Lösungen. Die Vereinfachung der Antikörper-Herstellung ist ein sehr wichtiger Aspekt, da Antikörper heute und auch in Zukunft ein überaus großes Potenzial aufweisen.

Danksagung

Unsere Arbeiten werden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung unterstützt (Unternehmen Region – InnoProfile-Programm – Antikörper-Technologien). ■

Literatur

- [1] Kirk SJ, Cliff JM, Thomas A et al. (2009) Biogenesis of secretory organelles during B cell differentiation. *J Leukoc Biol* 87:245–255
- [2] Köhler G, Milstein C (1976) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497

- [3] De Marco A (2011) Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microb Cell Fact* 10:44–58
- [4] Berges BK, Rowan MR (2011) The utility of the new generation of humanized mice to study HIV-1 infection: transmission, prevention, pathogenesis, and treatment. *Retrovirology* 8:65–84
- [5] Wand I, Holzlöhner P, Neupert S et al. (2011) Cooperation of dendritic cells with naive lymphocyte populations to induce the generation of antigen-specific antibodies *in vitro*. *J Biotechnol* 156:173–181
- [6] Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H (2009) The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs* 10:1212–1224
- [7] Micheel B (2003) Monoklonale Antikörper. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer-Verlag, Berlin. 494–523

Korrespondenzadresse:

Dr. Katja Heilmann
Universität Potsdam
Institut für Biochemie und Biologie
Nachwuchsgruppe „Antikörper-Technologien“
Karl-Liebknecht-Straße 24–25
Haus 25
D-14476 Potsdam-Golm
Tel.: 0331-977-5348
Fax: 0331-977-5061
katja.heilmann@uni-potsdam.de
www.uni-potsdam.de/de/ibb/arbeitgruppen/nachwuchsgruppen/heilmann.html

AUTORINNEN



Pamela Holzlöhner

Jahrgang 1982. 2000–2004 Biotechnologiestudium an den Universitäten Leipzig und Wollongong, Australien. 2009 Promotion. 2008–2012 Postdoc in der Nachwuchsgruppe „Antikörper-Technologien“, Universität Potsdam.



Katrin Messerschmidt

Jahrgang 1979. 1999–2004 Biochemiestudium an der Universität Potsdam. 2008 Promotion. 2008–2012 Postdoc in der Nachwuchsgruppe „Antikörper-Technologien“, Universität Potsdam.



Katja Heilmann

Jahrgang 1978. 1996–2002 Biologiestudium an den Universitäten Rostock und Humboldt, Berlin. 2006 Promotion, anschließend Postdoc an der Charité – Universitätsklinikum Berlin. Seit 2008 Leiterin der InnoProfile-Nachwuchsgruppe „Antikörper-Technologien“ an der Universität Potsdam.