

Methoden der Zellbiologie

In vitro-Generation von Antikörpern mittels Phagen-Display

HEIKO DINTER¹, ARGHAVAN SOLEIMANI ZADEH², KATHARINA SCHINDOWSKI ZIMMERMANN²

¹ FAKULTÄT FÜR MATHEMATIK UND NATURWISSENSCHAFTEN, UNIVERSITÄT TÜBINGEN

² INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BIOTECHNOLOGIE, HOCHSCHULE BIBERACH

Antibodies or immunoglobulins are of vital importance for the neutralization of foreign particles like pathogens in the body. As therapeutics, they provide a high potential for many diseases due to their high specificity. For their generation, the establishment of a library (immunized or synthetic) and a selection process for specific binders (display methods) play the pivotal role. Here, we describe the phage display technology and its advantages to get a specific and high affinity binder.

DOI: 10.1007/s12268-020-1371-9

© Die Autoren 2020

■ Antikörper oder auch Immunglobuline sind Glykoproteine, die vorwiegend im Blut und in der Lymphe zu finden sind. Sie agieren als Hauptkomponente des humoralen Immunsystems und dienen zur Neutralisierung von Pathogenen oder Viren [1, 2]. Schon Paul Ehrlich postulierte Substanzen, die von Zellen produziert werden und eine Immunität vermitteln, wobei sie wie Schlüssel und Schloss zusammenpassen [3].

Antikörper erkennen ihr Antigen hochspezifisch mit ihren variablen Regionen

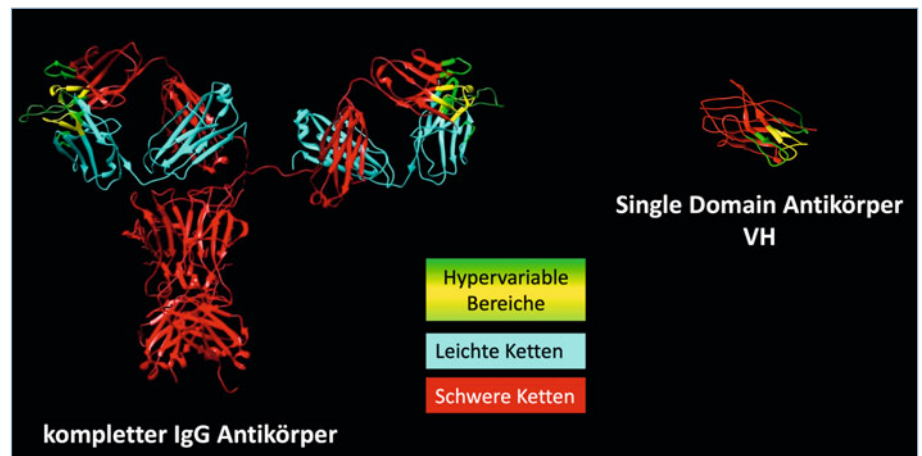
Möglich wird dies durch eine hochspezifische Erkennungsregion im Antikörper, der Antigenbindungsstelle [4]. Die Antigene sind fast immer kleine Regionen auf Proteinen oder Glykoproteinen, die der Antikörper erkennt und bindet. Ein Antikörper besitzt zwei Antigenbindungsstellen (Fab) sowie einen konstanten Bereich (das kristallisierbare Fragment, Fc), den Bestandteile des Immunsystems erkennen [1]. Jede variable Domäne, sowohl in der schweren als auch der leichten Kette (**Abb. 1**), setzt sich aus der Gerüstregion und drei hypervariablen Schleifen (*complementarity-determining regions*, CDR) zusammen. Während die Gerüstregion überwiegend für die Stabilität und die korrekte Proteinfaltung zuständig ist, zeichnen

sich die CDRs hauptsächlich für die Paratopbildung, die eigentliche Antigen-Erkennungssequenz, verantwortlich. Da die Oberflächenstruktur des Antigens (häufig Pathogene, also z. B. krank machende Mikroorganismen, aber auch Tumorzellen) einzigartig ist, ist der Antikörper in der Lage, dieses von anderen körpereigenen Antigenen zu unterscheiden [5].

Ein körperfremdes Antigen kann somit auch der Anlaufpunkt mehrerer Paratope

und damit mehrerer Antikörper sein. Während einer Immunantwort bilden mehrere unterschiedliche B-Zellen Antikörper, die das Pathogen an unterschiedlichen Stellen (Epitopen) binden. Diese werden polyklonale Antikörper genannt, da sie eine unterschiedliche Sequenz haben, aber alle das gleiche Pathogen erkennen [6]. In der Forschung und bei der Therapie ist es jedoch wichtig, genau zu wissen, welches Epitop ein Antikörper bindet, um eine spezifische Wirkung an einem spezifischen Ort zu gewährleisten.

Dank der Hybridomtechnologie aus dem Jahr 1975 [6] ist es heute möglich, identische monoklonale Antikörper (mAbs) zu generieren, die nur von einer B-Zelle abstammen. Die mAbs sind heute in der Diagnostik unverzichtbar, und es finden sich auch immer mehr therapeutische Anwendungen. Auch werden sie wirtschaftlich immer interessanter: 2019 erreichten sie einen Umsatz von über drei Milliarden US-Dollar mit stark steigender Tendenz [7]. Doch neben ihren zahlreichen Vorteilen besitzen Antikörper auch einige Nachteile: Aufgrund ihrer Größe und komplexen Struktur ist ihre biotechnologische Herstellung beispielsweise sehr aufwendig und teuer. Zudem verteilen sie sich schlecht im Gewebe außerhalb des Bluts, was



▲ **Abb. 1:** Aufbau und Größe eines „kompletten“ IgG-Antikörpers und eines VH-Nanobodys (*single domain*-Antikörper). Die Strukturdaten wurden der Proteindatenbank PDB (IgG: 1HZH; VH: 4U3X) entnommen und mit der Software ECSF Chimera visualisiert.

ihre Einsatzfähigkeit in der Therapie stark limitiert.

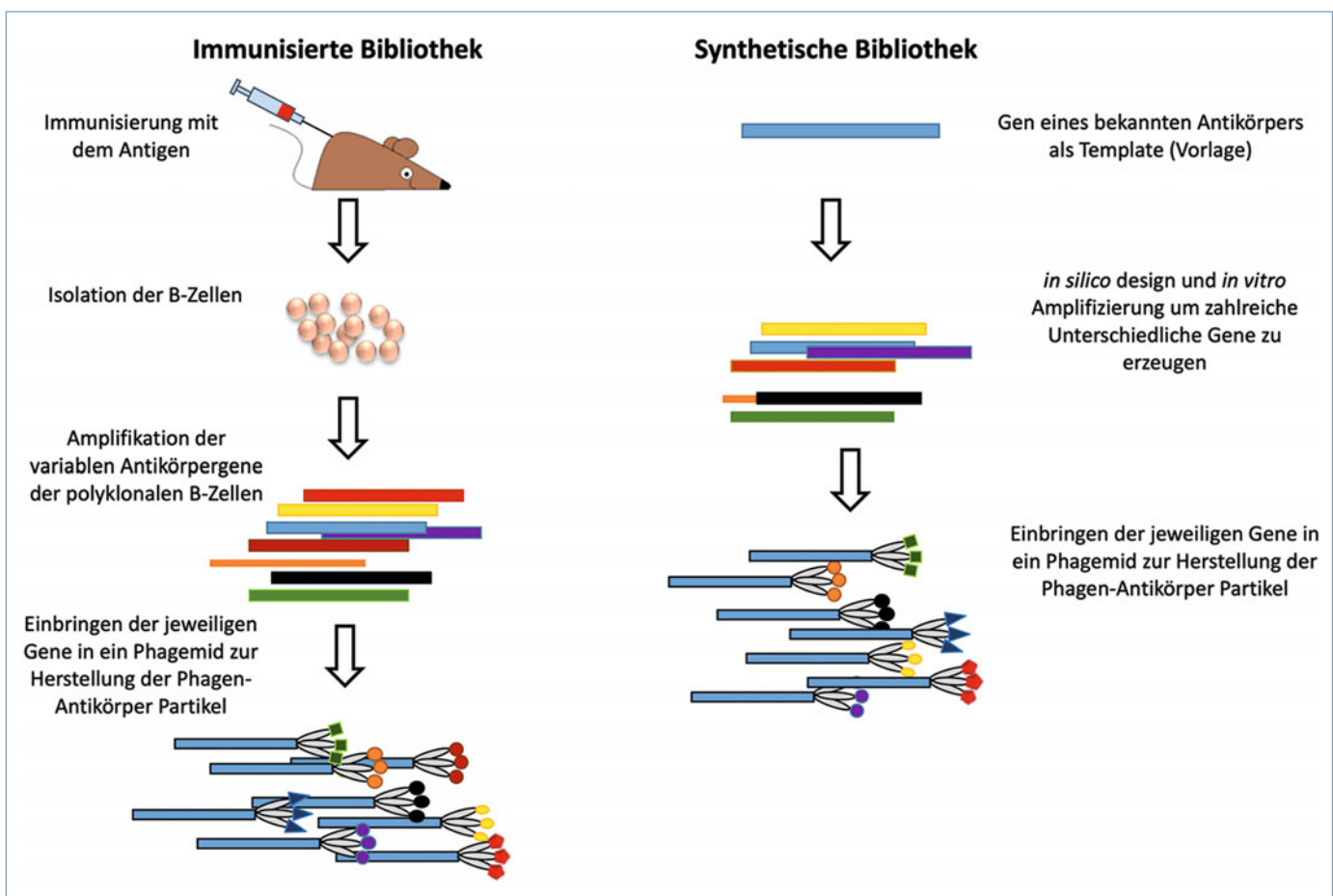
Allerdings kann ein Antikörper auch stark verkleinert und auf seine Antigenbindungsstellen reduziert werden. Ein solches Fragment kann nicht mehr mit dem Immunsystem interagieren, aber dafür sehr viel kostengünstiger beispielsweise in *Escherichia coli* produziert werden. Die kleinsten Fragmente sind die einzelnen Domänen der Antigenbindungsstelle, daher auch Domänenantikörper oder Nanobodies genannt. Des Weiteren weisen Antikörperfragmente eine umso höhere Gewebeporosität auf, je kleiner sie sind. Liegt ihre Größe unterhalb der Nierenschwelle, werden sie im Körper auch schneller wieder renal eliminiert, das heißt die Pharmakokinetik der Fragmente verändert sich im Vergleich zu vollständigen Antikörpern [8].

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern startet mit einer Bibliothek

Um geeignete Antikörper zu finden, können Organismen mit einem Antigen geimpft (immunisiert) werden, woraufhin die B-Zellen beginnen, passende Antikörper gegen dieses Antigen zu bilden und in das Blutplasma zu sezernieren. Dieser Prozess ist jedoch nicht mit körpereigenen Antigenen möglich, da ein gesundes Immunsystem nur auf fremde Antigene reagiert. Das limitiert z. B. die Suche nach Antikörpern in der Maus für Antigene, die eine hohe Homologie zu humanen Antigenen haben. Ein auf diese Weise hergestellter Antikörperpool nennt sich immunisierte Bibliothek (**Abb. 2**). Analog zu einer großen Bibliothek mit Büchern sind die wichtigen Informationen, das heißt die entsprechenden Antikörper gegen das immuni-

sierte Antigen, in dieser Bibliothek; sie müssen nur gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit besteht in der Generation einer Antikörperbibliothek *in vitro* und somit ohne die Nutzung von Tieren (synthetische Bibliothek; **Abb. 2**, [9]). Da heute bekannt ist, dass die Bindung des Antikörpers an sein Antigen hauptsächlich von den CDRs abhängt, kann die DNA eines bestehenden Antikörpers in diesen Regionen mittels molekularbiologischer Methoden verändert werden. Hierzu eignet sich z. B. eine Polymerasekettenreaktion mit degenerierten Primern, die sämtliche proteinogenen Aminosäuren in zufälliger Reihenfolge in die CDRs einbauen. Beim Design der Primer gilt es zu beachten, dass es nicht zu Verschiebungen des Leserasters oder Stoppcodons kommt. Auf diese Weise kann *in vitro* sehr schnell eine große Variabilität entstehen, in



▲ **Abb. 2:** Generierung einer immunisierten und einer synthetischen Bibliothek. Während bei einer immunisierten Bibliothek die Fähigkeiten des Immunsystems eines Tieres genutzt werden, um spezifische Antikörper zu erhalten, wird bei einer synthetischen Bibliothek ein bekanntes Gen eines Antikörpers durch biotechnologische Methoden variiert. Bei der Nutzung des Immunsystems können bei mehrfacher Immunisierung mit dem Antigen hochspezifische Binder entstehen, jedoch entstehen keine Antikörper, wenn das Antigen dem Organismus zu ähnlich ist. Bei der biotechnologischen Variation des Gens entsteht eine zufällige Mischung an Antikörpern, die das Antigen zunächst eher zufällig binden, und es bedarf ggf. einer biotechnologischen Affinitätsreifung. Dies erscheint zunächst umständlich, der Vorteil von synthetischen Bibliotheken ist jedoch, dass sie ohne Nutzung von Labortieren auskommen und dass man gegen jedes erdenkliche Antigen geeignete bindende Antikörper selektieren kann.

welcher ein spezifischer Antikörper zu finden sein kann [10].

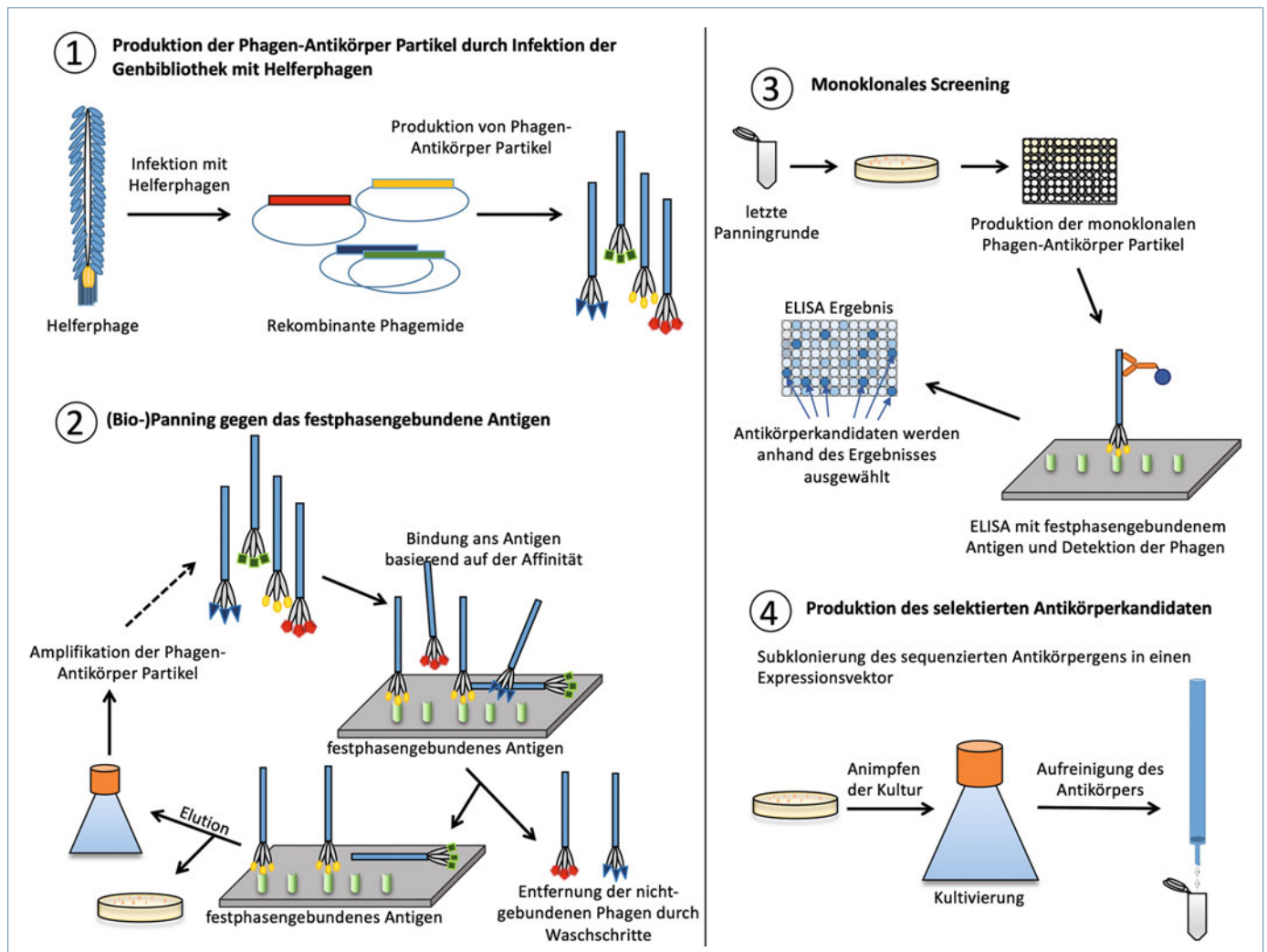
Phagen-Display als Möglichkeit zur Suche nach der Nadel im Heuhaufen

Unabhängig davon, wie die Antikörperbibliothek generiert wurde, müssen anschließend aus einem großen Pool an Antikörpern ein oder mehrere spezifische selektiert werden. Dazu müssen die Antikörper, die besonders gut Antigene binden können, identifiziert werden. Da es sehr aufwendig ist, Proteine zu sequenzieren, wird hierzu in der Regel eine Display-Methode angewendet. Bei den Display-Methoden werden Proteine in gemeinsamen Strukturen mit ihren codierenden Nukleinsäuren gebildet. Das funktioniert sowohl auf einer Hefe-, Bakterien- oder tieri-

schen Zelle und mit ein paar Tricks sogar an einem Ribosom. Beim Phagen-Display werden filamentöse Bakteriophagen verwendet, welche auf ihrer Oberfläche die Antigenbindenden Bereiche eines Antikörpers präsentieren. Durch diese Präsentation ist das Antikörperteil in der Lage, den ganzen Phagen an das Antigen zu binden und damit zu immobilisieren. Das Antigen wird hierzu meist an eine Oberfläche aus Kunststoff adsorbiert. Phagen, deren Antikörper das Antigen nicht bindet, können abgewaschen und damit von den bindenden getrennt werden. Durch Erhöhung der Stringenz mit zunehmender Anzahl an Waschstufen, werden dabei auch Antikörper abgewaschen, die nur leicht an das Antigen binden. Somit bleiben diejenigen Phagen übrig, die auf

ihrer Oberfläche einen Antikörper tragen, der eine starke Bindung zum Antigen aufweist. Dieser Selektionsprozess wird als *Panning* oder *Biopanning* bezeichnet. Der Prozess ist schematisch in **Abbildung 3** gezeigt.

Nun wird mithilfe einer unterschiedlichen Salzkonzentration oder pH-Bedingung die Bindung zwischen Antikörper und Antigen geschwächt (Elution) und damit auch der Phage abgelöst, mit dem nun Bakterien infiziert werden. Durch die Infektion gelangt die gesamte Erbinformation des Phagen, inklusive der des Antikörpers, in das Bakterium. Jedoch sind die verwendeten Phagen alleine nicht in der Lage, eine neue Generation an Phagen zu produzieren. Wird aber nun ein Hyperphage zugegeben, der genetisch ein fehlendes Protein für die Neubildung eines



▲ **Abb. 3:** Schematische Darstellung der Herstellung eines Antikörpers aus einer synthetischen Genbibliothek mittels Phagen-Display. Nach der Fertigstellung der Phagen durch die Zugabe von Helferphagen (1), adsorbieren die Phagen über das Antikörperfragment an das Antigen, und Phagen mit einem Antikörperfragment ohne spezifische Bindung werden abgewaschen (2). Mit den verbleibenden Phagen werden Bakterien infiziert, die monoklonal auf das Vorhandensein eines korrekten Antikörperfragments analysiert werden (3). Positive Kandidaten werden anschließend im Großmaßstab kultiviert und der wird Antikörper aufgereinigt (4) (adaptiert aus [9]).

Phagen trägt, werden unzählige Phagen fertiggestellt, mit dem gleichen Antikörper bepackt und aus dem Bakterium freigelassen, welches daraufhin stirbt. Nach kurzer Prozessierung sind die Phagen dann bereit für eine neue *Panning*-Runde. Mehrere Runden *Panning* führen demnach zu einer Anreicherung an spezifischen Antikörpern und einem Rückgang der Diversität, bis theoretisch nur noch der beste Antikörper übrig bleibt. In der Praxis werden deutlich früher einzelne Bakterienklone im ELISA-Verfahren analysiert. Die Sequenz der selektierten Antikörper kann jederzeit sehr leicht über DNA-Sequenzierung des Phagemids (das Phagenplasmid) herausgefunden werden. Ist ein Klon als positiv identifiziert, werden die Bakterien vermehrt und der Antikörper in größeren Mengen (bis zu mehrere Milligramm) isoliert und aufbereitet, sodass eine möglichst reine Antikörperlösung entsteht [9].

Vor- und Nachteile des Phagen-Displays

Zusammenfassend ist die Phagen-Display-Methode eine äußerst effiziente, zeit- und kostengünstige Methode, um spezifische Antikörper zu selektieren. Unter Verwendung synthetischer Bibliotheken kann außerdem der Einsatz von Tierversuchen reduziert und vermieden werden. Diese zufallsbasierte Methode bringt in der Regel allerdings weniger bindungsstarke Antikörper hervor als eine Immunisierung, was allerdings durch eine *in vitro*-Affinitätsreifung ausgeglichen werden kann. Zudem hat eine synthetische Bibliothek den Vorteil, dass auch Antikörper gegen Autoantigene generiert werden können, was unter Einsatz des Immunsystems nicht möglich ist.

Antikörper sind bereits eine sehr große, aber dennoch äußerst zukunftssträchtige Sparte in der Biotechnologie. Synthetische Antikörperbibliotheken, kombiniert mit Phagen-Display, bieten eine zukunftsorientierte Lösung zur Gewinnung von Antikörpern, die in fast jedem Labor durchgeführt werden kann und nicht auf den Einsatz von Tieren angewiesen ist. ■

Literatur

- [1] Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. *New Engl J Med* 343:37–49
- [2] Adams GP, Weiner LM (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 23:1147–1157
- [3] Silverstein AM, (2002) Paul Ehrlich's receptor immunology: the magnificent obsession. Academic Press, San Diego and London.
- [4] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M et al. (2001) Structural variation in immunoglobulin constant regions. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5. Aufl. Garland Science, New York. S 1–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27106/>
- [5] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) The immunoglobulin fold consist of a beta-sandwich framework with hypervariable loops. In: *Biochemistry*. 5. Aufl. W H Freeman, New York. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22461/>
- [6] Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497
- [7] Grand View Research (2020) Research Antibodies Market Size, Share | Industry Trends Report. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/research-antibodies-market> (aufgerufen am 2. März 2020)
- [8] Bates A, Power CA (2019) David vs. Goliath: the structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. *Antibodies* 8:28
- [9] Solemani Zadeh A, Grässer A, Dinter H et al. (2019) Efficient construction and effective screening of synthetic domain antibody libraries. *Methods Protoc* 2:17
- [10] The Royal Swedish Academy of Sciences (2018) Scientific background on the Nobel Prize in Chemistry 2018: directed evolution of enzymes and binding proteins. <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/10/advanced-chemistryprize-2018.pdf>

Dieser Beitrag wurde auf Basis des ursprünglich erschienenen Artikels von Solemani Zadeh et al. [9] erstellt.

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Heiko Dinter

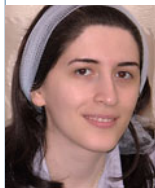
Dr. Arghavan Soleimani Zadeh
Prof. Dr. Katharina Schindowski Zimmermann
Institut für Angewandte Biotechnologie
Hochschule Biberach – University of Applied Science
Karlstraße 11
D-88400 Biberach/Riss
Heiko.Dinter@web.de;
soleimanizadeh@hochschule-bc.de;
schindowski@hochschule-bc.de
www.hochschule-biberach.de/web/iab/
prof.-dr.-katharina-zimmermann

AUTOREN



Heiko Dinter

2014–2018 Bachelorstudium der Pharmazeutischen Biotechnologie in Biberach/Riss. Seit 2018 Masterstudium der Molekularen Zellbiologie und Immunologie in Tübingen.



Arghavan Soleimani Zadeh

2005–2009 Bachelorstudium *Cellular and Molecular Biology – Genetics* in Ahvaz, Iran. 2010–2013 Masterstudium *Cellular and Molecular Biology – Genetics* in Schar-e Kord, Iran. 2010 und 2013–2014 Wissenschaftlerin im Noor Genetic Lab in Ahvaz, Iran. 2014–2015 Wissenschaftlerin im Pasteur-Institut Teheran, Iran. 2015–2019 Promotion an der Hochschule Biberach, dort seit 2020 Postdoc.



Katharina Schindowski Zimmermann

1992–1997 Biochemiestudium in Frankfurt a. M. und Heidelberg. 1997–2001 Promotion. Seit 1998 freiberufliche Wissenschaftlerin für die pharmazeutische Industrie. 2001–2003 Postdoc in Heidelberg, 2003–2005 Marie-Curie Industry Host Post-Pos bei Sanofi in Vitry-sur-Seine, Frankreich. 2005–2007 Juniorguppenleiterin am Inserm in Lille, Frankreich. 2007–2010 Wissenschaftlerin in der pharmazeutischen Industrie, Quintiles GmbH und Boehringer Ingelheim GmbH & Co KG. Seit 2010 Berufung zur Professorin für Molekulare Pharmakologie und Biochemie an der Hochschule Biberach.