

Nachhaltige Wissenschaft

Rekombinante Antikörper als Alternativen in Forschung und Diagnostik

ESTHER VERONIKA WENZEL, KILIAN JOHANNES CARL ZILKENS
 ABCALIS GMBH, BRAUNSCHWEIG

Despite readily available alternative technologies, many antibodies in research and diagnostics are still generated and produced with the use of laboratory animals. Here, we portrait the concept of animal-free recombinant antibodies and the generation of such an antibody against the spike-protein of SARS-Cov-2. The scientific community needs to raise awareness for more sustainable animal-free alternatives, especially as they offer a path to more reliable and reproducible data.

DOI: 10.1007/s12268-022-1716-7
 © Springer-Verlag GmbH 2022

■ Rekombinante DNA-Technologien gibt es schon seit den 1970er-Jahren. Die Möglichkeit zur Veränderung des Erbguts und zur sequenzdefinierten Produktion von Proteinen war ein Grundstein für das Zeitalter der Biotechnologie. Dennoch werden knapp 50 Jahre später viele Antikörper immer noch auf Basis nicht rekombinanter Technologien unter Verwendung von Versuchstieren entwickelt und produziert. 2018 wurden EU-weit 10,8 Millionen Tiere für wissenschaftliche Zwecke verwendet, davon 537.000 für routinemäßige Produktionsvorhaben [1]. Die Produktion von monoklonalen Antikörpern verzeichnete dabei den größten Anteil von schwerwiegenden Maßnahmen, also solchen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für Tierleid [2]. Die Nachteile sind

hohe Variationen in Produktchargen [3], schlechte Reproduzierbarkeit von Daten [4] und Probleme mit unbekanntem zusätzlichen Spezifitäten [5].

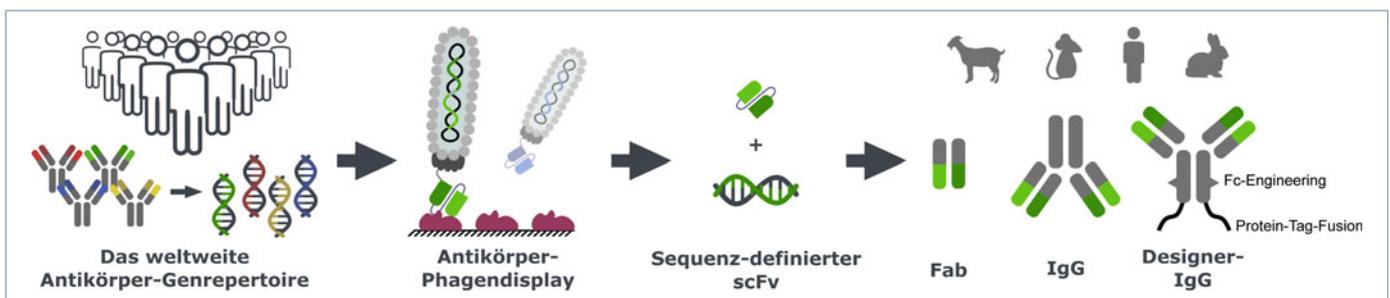
Zahlreiche *in vitro*-Technologien ermöglichen heutzutage die Generierung hochspezifischer Antikörper im Reagenzglas ohne Verwendung von Versuchstieren. Bei all diesen Antikörpern ist zudem von Anfang an die exakte genetische Sequenz bekannt. Viele hochaffine Antikörper, die aus naiven oder synthetischen Bibliotheken gewonnen wurden, konnten sich bereits in der Praxis etablieren [6]. Stetig zu wiederholende Tierimmunisierungen werden durch das einmalige Erstellen von universellen Antikörperbibliotheken obsolet. Diese neuen, nachhaltigeren Technologien sollten von Wissen-

schaftlern bewusst und gründlich als gute Alternativen geprüft werden. In der Medizin ist die Entwicklung von tierfreien Antikörpern als Therapeutikum bereits angekommen. So wurden in den letzten fünf Jahren 34 neue, auf tierfreien rekombinanten Antikörpern basierende Arzneimittel über die EMA und FDA zugelassen [7].

Rekombinante Antikörper sind allein über ihre Aminosäuresequenz definiert. Dadurch sind sie buchstäblich digital immortalisiert. Sie können selbst nach Verlust sämtlicher physischer, biologischer Proben mit exakt gleicher Spezifität neu produziert werden. Zusätzlich führt diese Eigenschaft zu einer Minimierung von Variationen in Produktionschargen. Des Weiteren kann so das Vorhandensein mehrerer Sequenzen von variablen schweren und leichten Ketten ausgeschlossen werden, die unbekannte Spezifitäten hervorrufen [5]. Die dadurch gleichbleibende Produktqualität macht Experimente und Daten unbegrenzt reproduzierbar.

Generierung eines tierfreien, rekombinanten Antikörpers für die SARS-CoV-2-Diagnostik

Bei Abcalis verwenden wir die 2018 mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Methode des Phagendisplay zur Erzeugung neuer tierfreier Antikörper. Um einen diagnostischen Antikörper gegen SARS-CoV-2 zu generieren, haben wir naive humane Antikörperbibliotheken genutzt. Die Isolation spezifischer Antikörperfragmente (scFv) erfolgte



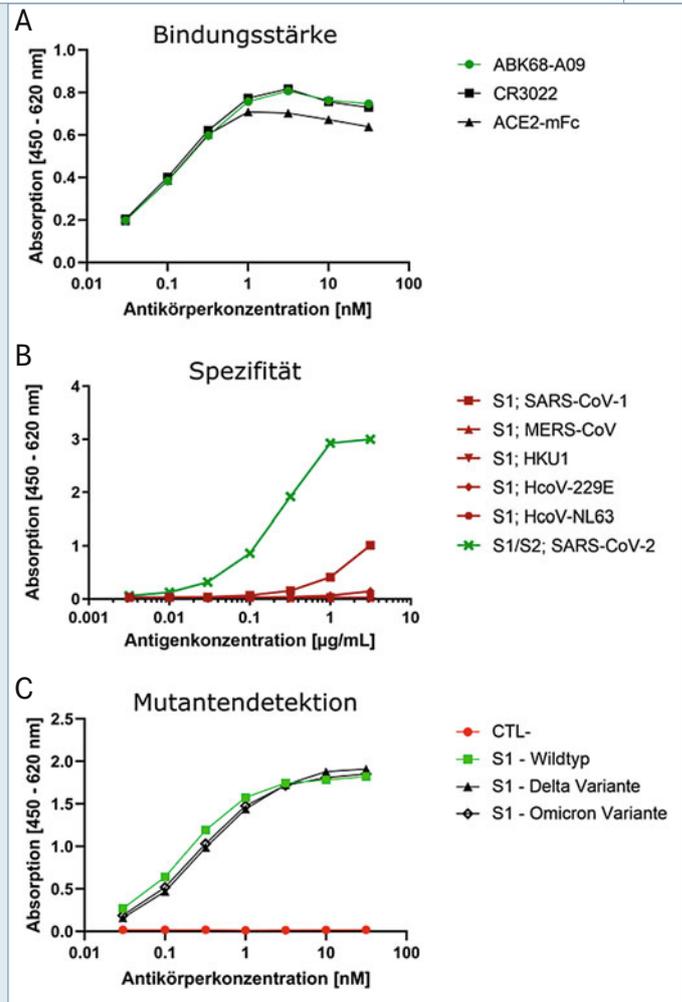
▲ **Abb. 1:** Generierung tierfreier Antikörper. Potenziell können aus naiven humanen Antikörperbibliotheken mittels Phagendisplay Antikörper gegen jedes beliebige Antigen isoliert werden. Alle auf dieser Technologie basierenden Antikörper sind von Anfang an sequenzdefiniert und können leicht in andere Formate umgewandelt werden, z. B. durch die Fusion mit Protein-Tags oder Wechsel oder Modifikation des Fc-Teils (z. B. Einfügen eines freien Cysteins zur Verbesserung von Konjugationen).

unter Verwendung von rekombinantem Spike-Protein (S1). Als Trägermolekül für die Präsentation von scFv-Antikörpern diente dabei der filamentöse Bakteriophage M13. Nach Zugabe der scFv-Phagenpartikel zum S1-Protein wurden ungebundene Partikel durch Waschen entfernt. Nach Elution und erneuter Amplifikation der gebundenen Partikel und mehrfacher Wiederholung des Bindeprozesses folgte ein multiparalleles Screening von vielen hundert Einzelklonen (es können mehrere tausend Klone pro Tag analysiert werden). Auf diese Weise konnten spezifische scFv-Antikörper gegen das SARS-CoV-2-S1-Protein gewonnen werden. Da im Phagendisplay der Phänotyp der Bindungsreaktion und der Genotyp über das im Phagen enthaltene Phagemid (ein spezielles Plasmid) verknüpft sind, war die exakte Primärstruktur jedes isolierten Antikörpers nur eine DNA-Sequenzierung entfernt. Nach Erhalt der Sequenzen klonierten wir die Antikörper in das Maus-IgG2a-Format zur weiteren Validierung. Prinzipiell können die Antikörper zu diesem Zeitpunkt ohne Mehraufwand in viele andere nützliche Antikörperformate umklontiert werden (**Abb. 1**). So können die Antikörper ohne Veränderung der Spezifität an verschiedenste Anwendungen und Detektionssysteme angepasst werden.

Um die hohe Spezifität und Sensitivität der neuen monoklonalen tierfreien Antikörper nachweisen zu können, mussten diese zunächst im gewünschten Format produziert werden. Dazu nutzen wir eine transiente Produktion in der Säugertierzelllinie HEK293 in Suspensionskultur, da sie die Herstellung einer großen Anzahl verschiedener Antikörper in kurzer Zeit ermöglicht. Die Produktion erfolgt dabei in einem chemisch definierten Medium, frei von tierischem Serum.

Unter dutzenden von Antikörperkandidaten erwies sich der Klon ABK68-A09 als einer der vielversprechendsten. Er zeigte hohe Spezifität für das Spike-Protein von SARS-CoV-2 im Vergleich zu Spike-Proteinen anderer Coronaviren, mit nur geringer Kreuzreaktivität zu SARS-CoV-1. Ebenso war seine Bindungsstärke in ELISA-Versuchen vergleichbar zu der eines kommerziellen Antikörpers und der des natürlichen Rezeptors ACE2 (**Abb. 2A** und **B**). Darüber hinaus war ABK68-A09 bisher in der Lage, alle Hauptvarianten des SARS-CoV-2-Spike-Proteins zu binden, inklusive der aktuellen Omicron-Variante (**Abb. 2C**). Dies verdeutlicht, dass es möglich ist, schnell und ohne

► **Abb. 2:** Bindungseigenschaften des tierfreien, monoklonalen Antikörpers ABK68-A09. **A**, Bei gleicher Endkonzentration zeigt der Antikörper vergleichbare Bindung auf SARS-CoV-2-S1-Protein wie ein tierbasierter Antikörper (CR3022) und der natürliche Antigenrezeptor ACE2 (ELISA). **B**, hohe Spezifität für das S1-Protein von SARS-CoV-2 verglichen mit anderen Coronaviren; leichte Kreuzreaktivität auf dem nah verwandten SARS-CoV-1 (ELISA). **C**, vergleichbare Bindung auf verschiedenen Hauptvarianten des S1-Proteins von SARS-CoV-2, inkl. der aktuellsten Omicron-Variante (ELISA).



Immunisierung tierfreie rekombinante Antikörper mit einem bevorzugten Leistungsprofil für diagnostische Zwecke zu erschaffen.

Fazit

Die technischen Möglichkeiten rekombinanter Antikörper für Forschung und Diagnostik sind zahlreich und es gibt wenig andere Technologien, die uns eine solch flexible Anpassung an neue Anwendungen erlauben. Auch wenn eine Technologie allein nicht die Antwort auf alle diagnostischen Fragestellungen und Probleme sein kann, könnten tierfreie, rekombinante Alternativen für Wissenschaftler interessant sein, um ihre Forschung langfristig und nachhaltig zu verbessern. Die Möglichkeit zur erfolgreichen Generierung solcher Produkte haben wir am Beispiel eines tierfreien, rekombinanten Antikörpers gegen das S1-Protein von SARS-CoV-2 deutlich gemacht.

Danksagung

Abcalis wird im Rahmen des EXIST-Forschungstransfers durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie und den Europäischen Sozialfonds gefördert. ■

Literatur

- [1] European Commission (2018) Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/SWD_%20part_A_and_B.pdf (Zugegriffen: 14.02.2022)
- [2] European Commission (2009) Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals. https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/report_ewg.pdf (Zugegriffen: 14.02.2022)
- [3] Gray A, Bradbury A, Knappik A et al. (2020) Animal-free alternatives and the antibody iceberg. *Nat Biotechnol* 38: 1234–1239
- [4] Bradbury A, Plückerthun A (2015) Reproducibility: standardize antibodies used in research. *Nature* 518: 27–29
- [5] Bradbury A, Trinklein ND, Thie H et al. (2018) When monoclonal antibodies are not monospecific: hybridomas frequently express additional functional variable regions. *MAbs* 10: 539–546
- [6] Alfaleh M, Alsaab H, Mahmoud A et al. (2020) Phage display derived monoclonal antibodies: from bench to bedside. *Front Immunol* 11: 1986
- [7] Reichert JM, The Antibody Society (2021) Antibody therapeutics approved or in regulatory review in the EU or US. <https://www.antibodysociety.org/resources/approved-antibodies/> (Zugegriffen: 14.02.2022)

Korrespondenzadresse:

Dr. Kilian Zilkens
Abcalis GmbH
Inhoffenstraße 7
D-38124 Braunschweig
kilian@abcalis.com
<https://abcalis.com>