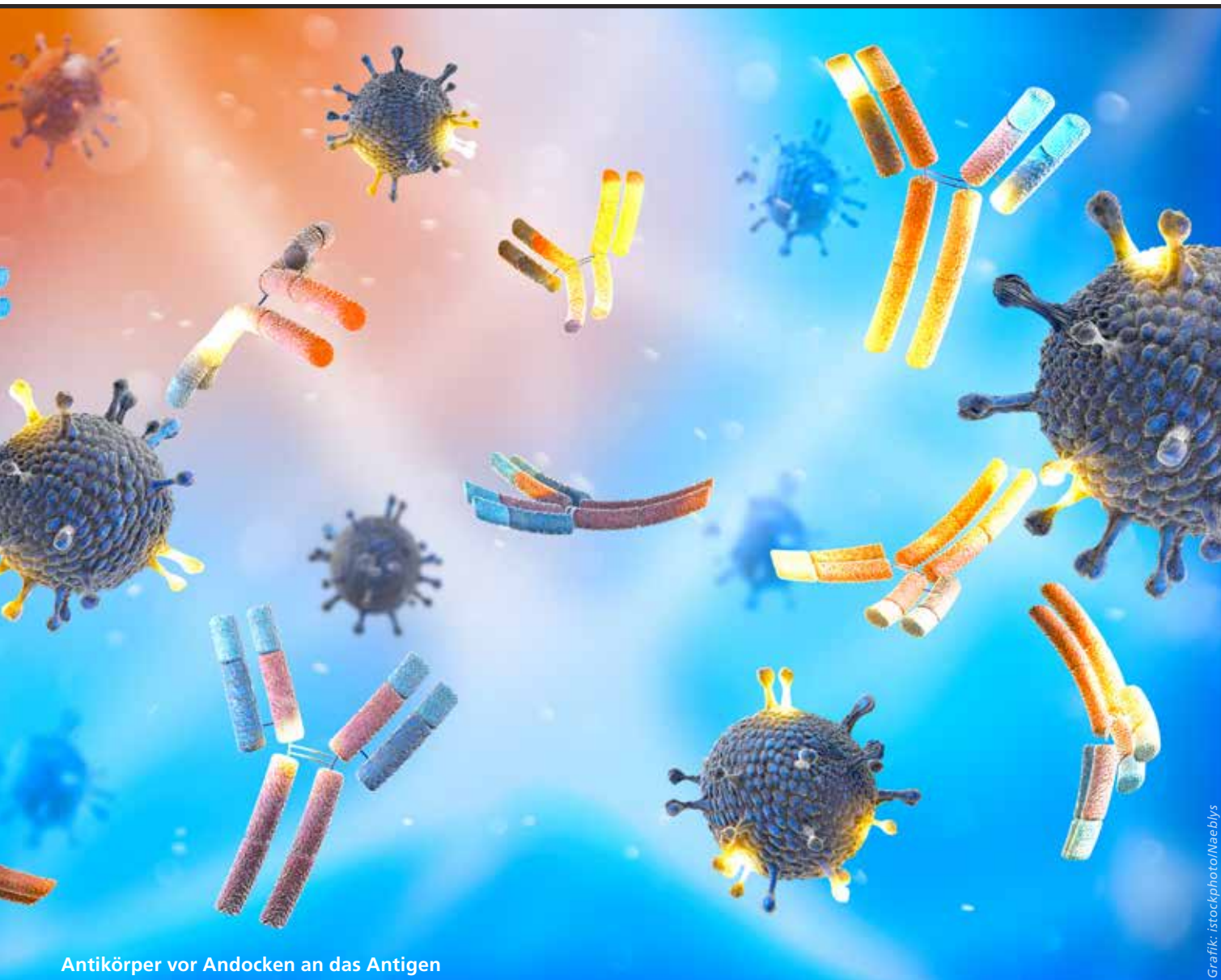


# Replacement des Jahres 2022



Antikörper vor Andocken an das Antigen

Grafik: istockphoto/Naeblyls

## Phagen-Display statt Tiere in der Antikörperproduktion

# Inhalt

Replacement des Jahres 2022: Phagen-Display statt Tiere in der Antikörperproduktion .....	3
Zusammenfassung.....	3
Einleitung, Problemstellung .....	4
Was sind Antikörper und wofür dienen sie? .....	5
Antikörper in Forschung und Diagnostik.....	6
Traditionelle Antikörperherstellung in Kaninchen und Mäusen .....	7
Adjuvantien .....	8
Kritik an aus Tieren gewonnenen Antikörpern.....	9
Die Aszites-Maus: trotz hoher Belastung in (Ausnahme)Fällen erlaubt .....	9
Rechtsgrundlagen .....	11
Es geht auch anders: Herstellung ohne Tier .....	12
Rekombinante Antikörper .....	12
Phagen-Display.....	12
In vitro-Immunisierung.....	13
Beispiel: Mit Phagen-Display zur besseren Behandlung von Diphtherie .....	13
Europäische Validierungsbehörde empfiehlt tierfreie Antikörper.....	14
Pharmazeutische Industrie: Übergangszeit von mehr als 10 Jahren notwendig – Hybridome ersetzbar .....	15
Ausblick .....	16
Bedeutung des Phagen-Displays nicht zu übersehen.....	16
Literatur.....	17



## Replacement des Jahres 2022: Phagen-Display statt Tiere in der Antikörperproduktion

### Zusammenfassung

Antikörper sind Proteine, welche von bestimmten Zellen des Immunsystems gegen erkannte körperfremde Substanzen gebildet werden. Sie dienen vor allem der Abwehr von Krankheitserregern. Sie können die für diese Erreger einzigartigen Strukturen schnell erkennen und entweder das Antigen für den Angriff durch andere Komponenten des Immunsystems markieren oder das Antigen direkt durch Bindung neutralisieren.<sup>(1)</sup>

Diese spezifischen Eigenschaften ermöglichen ein sich immer weiter entwickelndes Einsatzspektrum. Antikörper werden daher auch zu Forschungs-, diagnostischen oder therapeutischen Zwecken hergestellt. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS), Western Blot, Immunhistochemie<sup>(2)</sup> und andere immunologische Methoden sind in der heutigen Laborarbeit nicht mehr wegzudenken. Dabei werden noch immer vor allem Mäuse und Kaninchen als Antikörper-Lebendproduzenten genutzt.

Jedes Jahr wird in der EU fast eine Million Tiere für die Herstellung und Produktion von Antikörpern verwendet,<sup>(3)</sup> obwohl es Technologien gibt, die keinen Einsatz von Tieren erfordern. Die Prozedur ist für die Tiere mit großem Leid verbunden.

Seit Jahren gibt es tierversuchsfreie Methoden zur Erzeugung und Produktion von Antikörpern wie z. B. die Phagen-Display-Technologie. Sie ist äußerst vielseitig und kann sehr effizient zur Erzeugung eines nahezu unendlichen Spektrums qualitativ hochwertiger Antikörper eingesetzt werden. Antikörper, die durch Phagen-Display hergestellt werden, sind bereits in verschiedenen Bereichen, einschließlich der Therapeutik, weit verbreitet.

Das EU-Referenzlaboratorium des JRC für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) hat im Jahr 2020 eine Empfehlung herausgegeben, nach der Endnutzer und andere Interessengruppen dringend aufgefordert werden, die wissenschaftliche Validität von tierfrei gewonnenen Antikörpern anzuerkennen und keine Tiere mehr für die Entwicklung und Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Die Empfehlung ist in der Wissenschaft jedoch kontrovers diskutiert.

## Einleitung, Problemstellung

Antikörper werden in der Diagnostik und Therapie immer wichtiger. In der sogenannten individualisierten Medizin (bspw. Krebstherapie) gelten sie als große Hoffnungsträger. Antikörperbasierte Medikamente sind auch für den Laien leicht an ihrer Namensgebung mit der Endung -ab (für „antibody“) zu erkennen. Mit zunehmendem Bedarf an hochspezifischen Antikörpern steigt aber auch die Tierschutzproblematik. Denn die Herstellung von Antikörpern erfolgt allzu oft immer noch im Tier.

Dafür werden immer noch vor allem Mäuse, aber auch Kaninchen als Lebendproduzenten unzähliger Antikörper genutzt. Sie werden nicht nur mit dem Fremdkörper infiziert, sondern ihnen auch Wirkverstärker verabreicht, um eine Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort zu erzielen. Die Antikörperproduzierenden Zellen werden dann aus der Milz isoliert und mit entarteten Plasmazellen (Myelomzellen) fusioniert, die sich unbegrenzt teilen können. In einem besonders schmerzvollen und belastenden Folgeversuch wird Mäusen das Gebilde in die Bauchhöhle gespritzt und eine schmerzvolle Bauchwassersucht erzeugt, aus dem die gebildeten Antikörper entzogen werden.

Seit Ende der 80er Jahren empfehlen ForscherInnen bereits, den hochbelastenden Versuch zu verbieten und stattdessen tierfreie Verfahren anzuwenden. Aber noch immer werden derartige Versuche in der EU durchgeführt. Allein im Jahr 2018 fast 55.000 Tiere – vor allem Mäuse. Und dies trotz der Tatsache, dass es mittlerweile leistungsfähige und zuverlässige tierfreie Verfahren gibt wie z. B. das Phagen-Display. Im Mai 2020 hatte das EU-Referenzlaboratorium des Joint Research Centers für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) eine Empfehlung herausgegeben, nach der Endnutzer und andere Interessengruppen die wissenschaftliche Validität von tierfrei gewonnenen Antikörpern anerkennen und keine Tiere mehr für die Entwicklung und Herstellung von Antikörpern verwenden sollen. Viele am Tier gewonnenen monoklonalen Antikörper für die Forschung kreuzreagierten mit anderen Molekülen, hieß es. Fast ein Drittel der in einer Studie zufällig ausgewählten Hybridome enthielt eine oder mehrere zusätzliche produktive schwere oder leichte Ketten. Solche unspezifischen Antikörperreagenzien in der Forschung verschwendeten Kosten, Zeit und Ressourcen; die Wirkungen auf Diagnose und Gesundheitsmanagement seien gewaltig.

Die Europäische Validierungsbehörde schätzt, dass Forscher tierfreie Antikörper nicht häufig genug wegen einer Neigung zu bestehenden Methoden, einem mangelnden Bewusstsein für den aktuellen wissenschaftlichen Stand und aufgrund wissenschaftlicher Missverständnisse nutzen. Wirtschaftliche und vertragliche Zwänge und ein begrenzter Zugang zu Einrichtungen hielten sie davon ab, solche tierfreien Antikörper herstellen.

WissenschaftlerInnen vor allem aus der Grundlagenforschung und Immunologie kritisierten diesen Vorstoß als zu verfrüht. Derweilen arbeiten ForscherInnen an dem Phagen-Display der Zukunft und entwickelt tierfreie Verfahren nicht nur für monoklonale, sondern auch für polyklonale Antikörper.

## Was sind Antikörper und wofür dienen sie?

Antikörper (auch: Immunglobuline) sind Proteine, welche von bestimmten Zellen des Immunsystems gegen erkannte körperfremde Substanzen gebildet werden. Sie dienen vor allem der Abwehr von Krankheitserregern.<sup>(4)</sup> Das Immunsystem verteidigt den Organismus gegen Antigene, d.h. körperfremde Materialien. Dafür verfügt er über ein angeborenes (unspezifisches) und ein erworbenes (adaptiertes) Immunsystem.

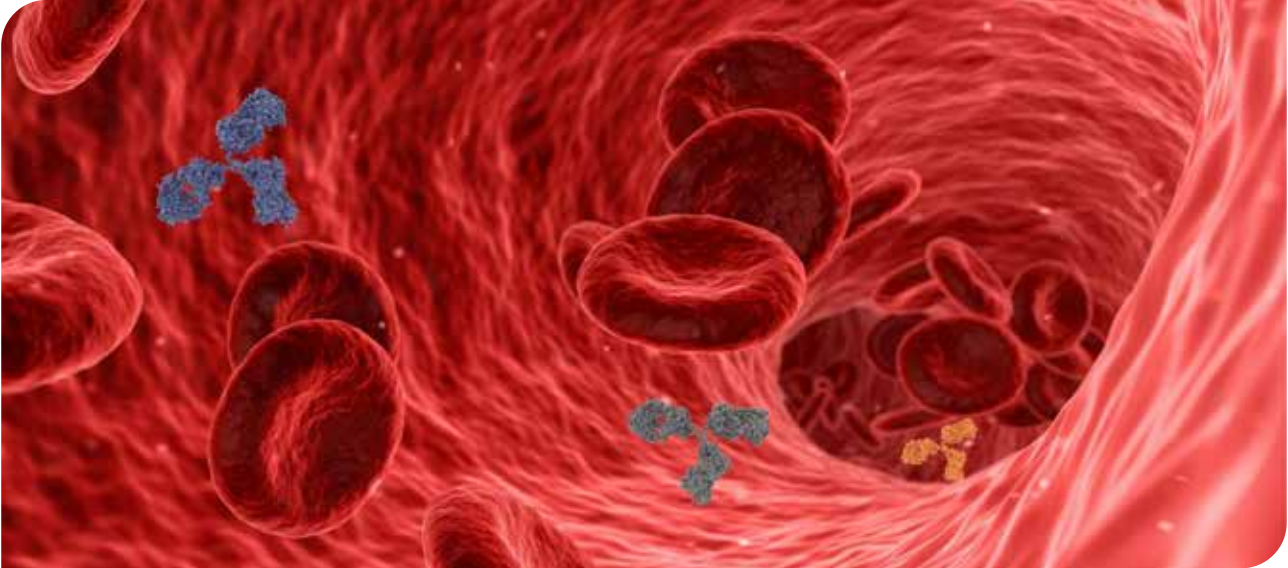
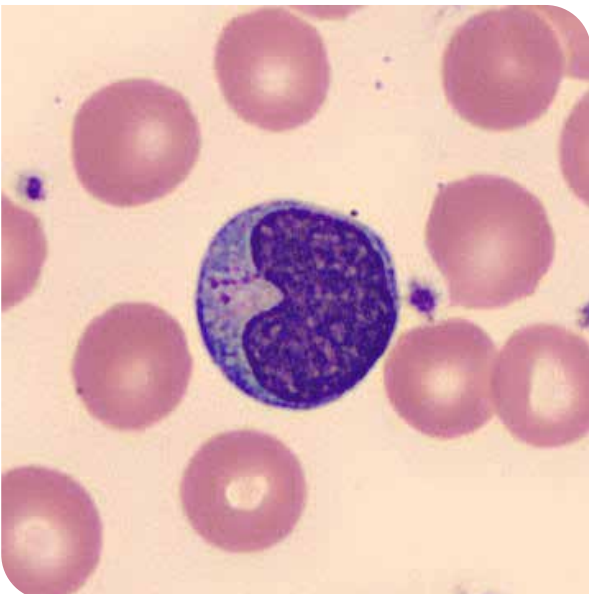


Abb. 1: Schema der Stufenstrategie von Toxizitätsprüfungen.  
In Anlehnung nach Aktories et al. (2009).<sup>(13)</sup>

Grafik: Pixabay/swiftsciencewriting

Während Makrophagen, Granulozyten, Monozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen, aber auch Barrieren wie die Schleimhäute oder körpereigene Botenstoffe zum angeborenen Immunsystem gehören, sind die Lymphozyten Zellen des erworbenen Immunsystems.<sup>(5)</sup> Ein Zwischentyp sind die Dendritischen Zellen, die sowohl zum angeborenen als auch zum erworbenen Immunsystem gehören können.<sup>(6)</sup>

Lymphozyten sind sehr anpassungsfähig gegenüber neuen Krankheitserregern und besitzen gegenüber bereits bekannten Erregern ein hervorragendes „Gedächtnis“.



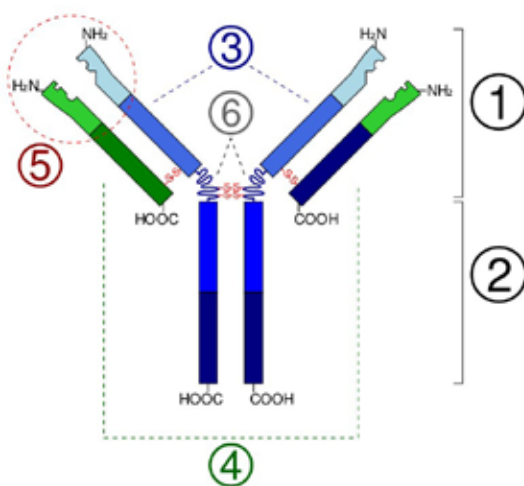
Mikroskopisches Bild eines Lymphozyten (in blauviolett) in einem Blutausschlag, umgeben von Erythrozyten und Thrombozyten.

Foto: El\*Falaf - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31217102>

Gegen Oberflächenstrukturen von Viren, Bakterien oder anderen körperfremden Erregern (Antigenen) reagiert das Immunsystem, indem zunächst ein bestimmter Immunzelltyp, z. B. die dendritischen Zellen im Blut, das durch die Milz strömt, diese Partikel finden und diese auf ihrer Oberfläche präsentieren. Sogenannte T-Lymphozyten werden dadurch aktiviert. T-Zellen erkennen körpereigene Zellen, die von Viren infiziert wurden, und töten sie ab.<sup>(7)</sup> Die T-Lymphozyten wiederum aktivieren auch B-Lymphozyten. Letztgenannte vermehren sich stark, wandeln sich in Plasmazellen um und bilden Antikörper, die an die Erregerstruktur binden und diese dadurch hindern, in die Wirtszelle einzudringen.<sup>(8)</sup> Antikörper können aber auch als Signal andere Immunzellen aktivieren, so z. B. Phagozyten, die den Erreger in sich aufnehmen und verdauen, oder natürliche Killerzellen, die den Erreger abtöten. Eine gute Übersicht bietet die Seite Antikörper online.de.<sup>(9)</sup>

Antikörper sind Y-förmig und bestehen aus Polypeptiden, welche wiederum aus Aminosäuren zusammengesetzt sind. Die Aminosäuren verleihen jedem Antikörper seine spezifische Fähigkeit, bestimmte Antigene zu binden.

Die beiden Spitzen oder Arme sind für die Bindung von Antigenen zuständig und werden als variable Region bezeichnet, während der Stamm des „Y“ der Teil ist, der mit Effektorzellen, ausdifferenzierte Lymphozyten mit spezifischen Aufgaben bei der Immunantwort, interagiert und als konstante Region bezeichnet wird.<sup>(10,11)</sup>



*Aufbau eines typischen IgG-Antikörpers*  
 1. Fab-Abschnitt, 2. Fc-Abschnitt, 3. schwere Ketten, 4. leichte Ketten, 5. Antigenbindungsstelle (Paratop), 6. Scharnier-Region, (\*) -S-S-Disulfidbrücke.

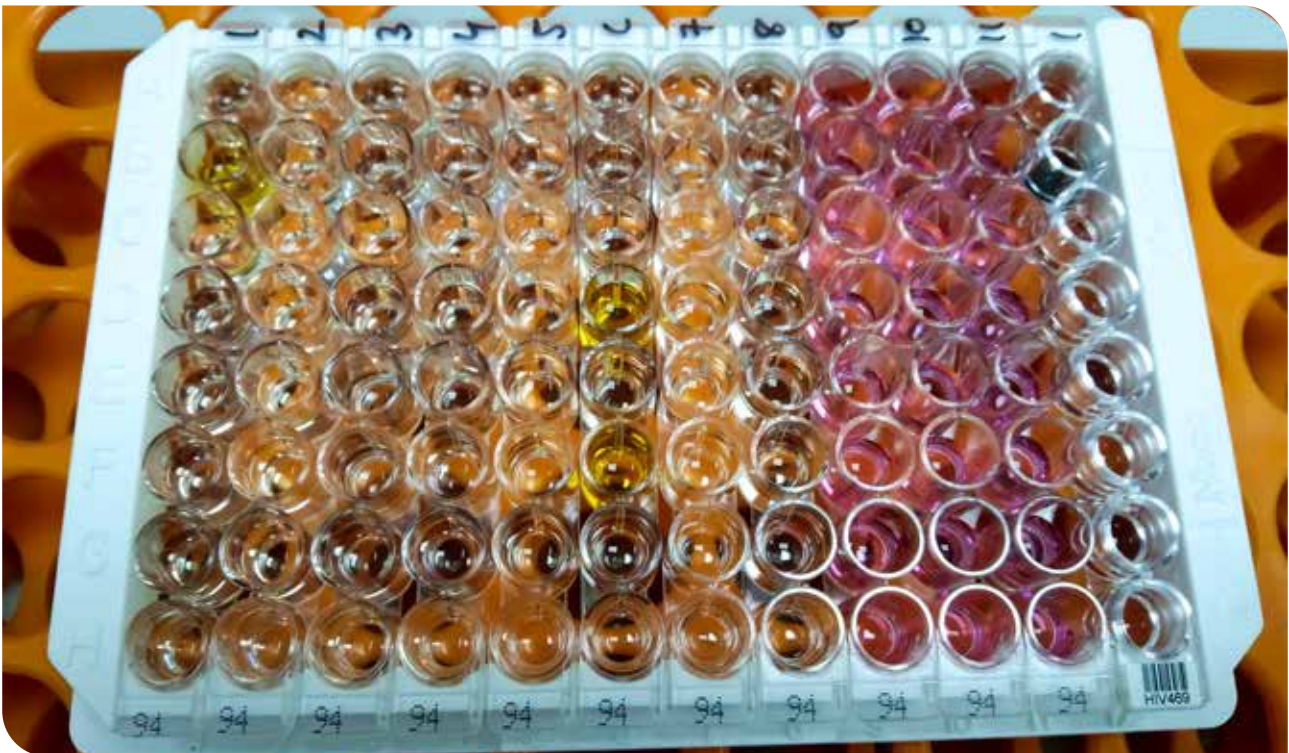
Grafik: Y tambe, Wikipedia (CC BY-SA 3.0)

## Antikörper in Forschung und Diagnostik

Antikörper werden auch zu Forschungs- oder diagnostischen Zwecken hergestellt. Antikörper werden u. a. zur Quantifizierung (ELISA), Lokalisierung in Gewebeschnitten und Reinigung (Affinitätschromatografie) von Molekülen genutzt. Derartige und noch weitere Methoden sind in der heutigen Laborarbeit nicht mehr weg zu denken.<sup>(9)</sup> Dabei werden noch immer z. B. Kaninchen und Mäuse als Lebendproduzenten genutzt. Ein in der Diagnostik weit verbreiteter Assay ist z. B. der ELISA, bei dem das Antigen oder ein Antikörper auf einer Oberfläche in einer Mikrotiterplatte immobilisiert wird. Das Antigen oder der Antikörper werden hier z. B. durch einen fluoreszenzmarkierten oder enzymkonjugierten sekundären Antikörper detektiert.<sup>(12)</sup>

Man unterscheidet zwischen monoklonalen Antikörpern und polyklonalen Antikörpern. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Zellen eines Wirts- in der Regel einem Tier

wie Kaninchen oder Maus - produziert. Als Gruppe von Antikörpern richten sie sich gegen unterschiedliche molekulare Strukturen eines Erregers.<sup>(13,14)</sup> Monoklonale, aus einem einzigen B-Lymphozyten stammende, Antikörper dagegen binden sich hoch spezifisch nur an ein Epitop eines Erregers.<sup>(15,16)</sup> Der monoklonale Antikörper ist hochspezifisch; da monoklonale Antikörper nur einzelne Epitope detektieren, kreuzreagieren sie seltener mit anderen Antigenen. Im Falle einer Mutation des Antigens (z. B. eines Virus) können sie jedoch nicht mehr gut oder gar nicht mehr binden. Polyklonale Antikörper stellen den größten Anteil der derzeit verfügbaren kommerziell erhältlichen Antikörperreagenzien dar und zeichnen sich durch die Erkennung mehrerer Epitope aus. Sie haben oft ein hohes Bindungsbestreben (Gesamtaffinität) zu den Zielantigenen, sind kostengünstig und schnell herzustellen. Sie haben jedoch das Problem, dass sie von Charge zu Charge in ihrer Spezifität variieren.<sup>(17)</sup>



*Ein typischer HBsAG-Test durch Elisa-Verfahren: Durch den Farbumschlag (rot) lassen sich z. B. Antigene oder Antikörper nach durchgemachter Hepatitis B-Virusinfektion detektieren.*

*Foto: Md Ariful Islam, iStockphoto.*

## Traditionelle Antikörperherstellung in Kaninchen und Mäusen

Im Jahr 2020 wurden in Deutschland 56.996 Kaninchen (2019: 75.326) für die Routineproduktion eingesetzt, die gesetzlich vorgeschrieben ist. Unter Routineproduktion versteht man die Herstellung, Gewinnung, Aufbewahrung oder Vermehrung von Stoffen, Produkten oder Organismen (gemäß § 8a Abs. 1 Nr. 3 Tierschutzgesetz).<sup>(18)</sup> Stoffe und Produkte, die hier gemeint sind, sind vor allem monoklonale und polyklonale Antikörper und Immunsereen. Hierfür kommen in erster Linie Mäuse, daneben auch Kaninchen zum Einsatz. Die Behandlungen der Tiere laufen dabei nach einem bereits bekannten und erprobten Verfahren ab.<sup>(19)</sup>



*Kaninchen sind von Natur aus gesellig. Sie benötigen ausreichend Platz für die gemeinsame Haltung mit einem oder mehreren Sozialpartnern und eine Käfiganreicherung (Verstecke und erhöhte Flächen). Die Käfiggröße muss mindestens einen Hoppelsprung, ausgestrecktes Liegen und aufrechtes Sitzen erlauben, wobei die Ohren die Käfigdecke nicht berühren sollen.<sup>(20)</sup>*

*Foto: anilbolukbas, iStockphoto*

Bei der Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen wird traditionell zunächst eine Maus oder ein Kaninchen mit diesem Antigen infiziert. Die aktivierten B-Lymphozyten werden aus der Milz isoliert und mit entarteten Plasmazellen (Myelomzellen) fusioniert, die sich unbegrenzt teilen können.<sup>(21)</sup> Die entstehende Zelle heißt Hybridom.<sup>(22,23)</sup> Aus den Hybridomen werden dann Klone mit spezifischer und hochaffiner Antigenerkennung ausgewählt und die Antikörper charakterisiert. Die Tiere werden z. B. subkutan anästhesiert und das größtmögliche Blutvolumen über die vordere Hohlvene entnommen.<sup>(24)</sup> Am Ende der Produktion werden die Tiere in der Regel euthanasiert. Auf diese Weise im Kaninchen hergestellte Antikörper werden von einigen Wissenschaftlern favorisiert, weil die Antikörper der Tiere eine bessere Antigenerkennung aufweisen als die von Mäusen. Sie sollen über effektivere Mechanismen zur Erzeugung einer größeren Antikörpervielfalt verfügen und ihr Immunsystem eine optimale Antikörperaffinität ausweisen, verglichen mit dem der Maus und anderen Nagetieren.

Die höhere Bindeaffinität der Kaninchenantikörper im Vergleich zur Maus soll ein besseres Verhältnis von Signal zu Hintergrund bei der Darstellung in der Diagnoseanwendung und Forschung bieten.<sup>(25)</sup> Trotzdem werden viele Antikörper in der Maus erzeugt.

## Adjuvantien

Um die Wirkung der Antikörperbildung zu verstärken und schneller zu den gewünschten Ergebnissen zu kommen, werden sogenannte Adjuvantien eingesetzt. Das Adjuvans bewirkt eine Verstärkung und Verlängerung der Immunantwort, z. B. durch Anlocken diverser Immunzellen zum Antigen und verzögerte Freisetzung durch Depotbildung. Durch Zusatz eines geeigneten Adjuvans kann die einzusetzende Menge an Antigen und/oder die Zahl an Immunisierungen reduziert werden.<sup>(26,27)</sup>

Adjuvantien sind sowohl bei der monoklonalen als auch bei der polyklonalen Antikörper-Herstellung für das Tier besonders belastend. Oft das sogenannte Freund'sche Adjuvans zuge-



setzt. Durch Verursachung lokaler Gewebereizungen und -zerstörungen wird der Hilfsstoff als tierschutzrelevant eingestuft. Adjuvantien können in Abhängigkeit von der Art des Antigens, der Tierart, der Injektionsstelle und des -volumens unterschiedlich schwere Nebenwirkungen hervorrufen wie Granulome, Abszesse und Fisteln, Ulcera, Nekrosen, Bauchfellentzündungen oder tödliche Embolien.<sup>(28)</sup> Man unterscheidet zwischen dem vollständigen und dem unvollständigen Freundschens Adjuvans. Beim vollständigen Adjuvans wird das Immunsystem des Tieres durch Paraffinöl, Mannose-Monooleat als Emulgator und abgetöteten Mykobakterien stimuliert. Das unvollständige Freundsches Adjuvans hat ebenfalls alle diese Komponenten mit Ausnahme der Bakterien. Dadurch stimuliert es weniger stark.<sup>(26)</sup> Die Anwendung des kompletten Freundschens Adjuvans wird als schwerbelastender Versuch eingestuft.

## Kritik an aus Tieren gewonnenen Antikörpern

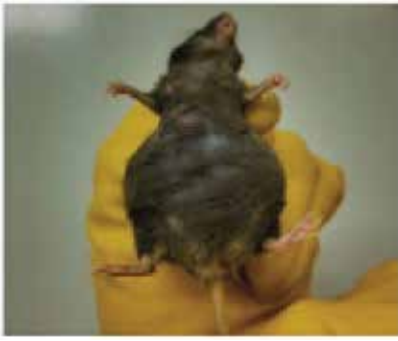
Kritik an der Produktionsart der Antikörper im Tier, aber auch deren Eigenschaften, gibt es vielfach. So sind polyklonale Antiseren aus dem Blut immunisierter Tiere nur begrenzt verfügbar – ist das Serum eines Tieres aufgebraucht, können die damit gemachten Experimente nie mehr reproduziert werden. Zudem sind die enthaltenen Immunglobuline (Antikörper) stets unbekannte Gemische, was zu einem Risiko unerwünschten Nebenreaktionen führen kann.<sup>(29)</sup> Da ein Antigen normalerweise unterschiedliche Epitope aufweist, werden bei einer Immunisierung eines Tieres auch Antikörper gegen die unterschiedlichen Epitope gebildet. Der Anteil der gewünschten Antikörper in dem Gesamtpool an Antikörpern beträgt maximal 10 %, und liegt häufig auch sehr deutlich darunter.<sup>(30)</sup>

Hinzu kommt, dass Menschen im Gegensatz zu Tieren nicht in der Lage sind, die Sialinsäure N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) herzustellen, die typischerweise in von Mäusezellen hergestellten Antikörpern vorkommt, und beim Menschen mit Immunogenität in Verbindung gebracht wird.<sup>(31)</sup> Neu5Gc kommt auch in Schweine- und Rindfleisch vor und wird mit Herzerkrankungen in Krebs beim Menschen in Verbindung gebracht.<sup>(32)</sup> Die Hersteller werden daher aufgefordert, die Verwendung von Materialien tierischen Ursprungs zu vermeiden. Auch aus Hybridomzellen gewonnene monoklonale Antikörper weisen Nachteile auf. Neben der aufwändigen und langwierigen Herstellung sind monoklonale Antikörper oftmals gar nicht so monospezifisch, da die Hybridome unter Umständen genetisch heterogen sind und somit Antikörper unterschiedlicher Spezifität produzieren.<sup>(29)</sup>

## Die Aszites-Maus: trotz hoher Belastung in (Ausnahme)Fällen erlaubt

Bei der Aszites-Methode werden die Hybridomzellen in die Bauchhöhle einer Maus gespritzt, wo sie einen Aszites (Bauchhöhlenwassersucht) produzierenden Tumor auslösen.

In den Jahren 2015-2018 wurden in der Europäischen Union 176.232 Tiere insgesamt für die Herstellung monoklonaler Antikörper nach der Maus-Aszites-Methode eingesetzt. Die zuständige EU-Behörde verzeichnete zwischen 2017 und 2018 einen Anstieg um 22 %. In Deutschland allein waren es zwischen 2015 und 2020 mehr als 7.000 Tiere, hauptsächlich Mäuse, aber auch Ratten und Kaninchen.



So sieht eine Maus mit Bauchwassersucht (Aszites) aus.

Aus: Guo, T., et al. *Oncology Letters* 13(3), 2017. DOI:10.3892/ol.2017.5652. CC BY-NC-ND 4.0

Die Aszitesbildung ist mit erheblichen Schmerzen und Leiden für die Tiere verbunden. Die monoklonalen Antikörper werden dabei von den Tumorzellen in die Bauchhöhlenflüssigkeit abgegeben. Zur Isolation der Antikörper wird die Flüssigkeit nach einer bestimmten Zeit durch Punktion gewonnen. Schon in den 80/90er Jahren haben sich WissenschaftlerInnen für ein Verbot dieses qualvollen Verfahrens stark gemacht.<sup>(33)</sup> Bereits 1992 waren WissenschaftlerInnen in der Lage, monoklonale Antikörper und Hybridome in vitro aus menschlichen Zellen herzustellen.<sup>(34,35,36)</sup> 2001 und 2003 wurde die rechtliche Zulässigkeit der monoklonalen Antikörperproduktion mit der Aszites-Maus im Deutschen Tierschutzbericht der Bundesregierung begründet. Drei sogenannte „Ausnahmefälle“ wurden

in den folgenden Jahren immer wieder in der deutschen und der europäischen Politik angeführt:

Der Tierversuch sei in seltenen Fällen wissenschaftlich gerechtfertigt, wenn es einen außergewöhnlichen Bedarf für eine therapeutische Notfallanwendung gibt, eine bestehende behördliche Zulassung für einen diagnostischen oder therapeutischen in vivo Antikörper vorliegt oder sehr außergewöhnliche Umstände vorliegen, durch die eine Herstellung des Antikörpers in vitro nicht möglich ist.<sup>(37)</sup> 2003 wurde von der Regierung das Beispiel „Rettung“ von Hybridomen angeführt, wenn diese in der Zellkultur nicht mehr wachsen oder wenn sie infiziert sind.<sup>(38)</sup> Dabei ist die Herstellung rekombinanter Antikörper seit 2007 als valide Ersatzmethode von der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch anerkannt (ZEBET 299), wird aber aus verschiedenen komplexen Gründen nicht wahrnehmbar angewendet.

Der Europaabgeordnete der Grünen, Jens Holm, wies 2008 darauf hin, dass die starken Schmerzen und der Stress, unter denen die Mäuse leiden müssen, in keiner Weise durch die damals geltende EU-Tierversuchsrichtlinie gedeckt sei. Er verwies darauf, dass bereits eine Reihe von In-vitro-Methoden für die Herstellung monoklonaler Antikörper zur Verfügung ständen und schlug vor, das Aszites-Verfahren mit Tieren unionsweit zu verbieten, zumal seinen Informationen zufolge mehrere EU-Mitgliedstaaten, darunter Deutschland die Anwendung des Maus-Aszites-Verfahrens offiziell auslaufen lassen wollten.<sup>(39)</sup>

In der Antwort von Umweltkommissar Stavros Dimas 2009 wurde darauf hingewiesen, dass die Mitgliedstaaten selbst für die Durchsetzung der in der Richtlinie 86/609/EWG festgelegten Maßnahmen verantwortlich seien. Die in vitro-Herstellung monoklonaler Antikörper sei laut EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) „wissenschaftlich akzeptabel“ und „praktisch verfügbar“, weshalb die Herstellung mit der Maus-Aszites-Methode, außer in seltenen Fällen, wissenschaftlich nicht mehr notwendig sei. Tatsächlich haben nur wenige Länder die Aszites-Maus vollständig verboten, so die Schweiz und die Niederlande.<sup>(19)</sup>

Im Jahr 2017 wurden 5 % aller Tierversuche in der EU für die Routineproduktion durchgeführt. Davon betrafen 55 % die Herstellung von Produkten auf Blutbasis, aber auch 10 % die Herstellung monoklonaler Antikörper im Aszites-Verfahren.<sup>(40)</sup> Andere Produkttypen, die 35 % der Verwendungen ausmachten, standen meist im Zusammenhang mit der Antigen- und Proteinproduktion.

Laut ALURES, der europäischen Datenbank mit nicht-technischen Projektzusammenfassungen der Mitgliedsstaaten der EU wurden allein im Jahr 2018 54.941 Tiere in der Routineproduktion zur Herstellung von Antikörpern nach dem Aszites-Verfahren verwendet, fast alle waren

Mäuse.<sup>(41)</sup> In den Jahren davor kamen in geringem Maße auch Ratten und Kaninchen hierfür zum Einsatz. Zwischen 2015 und 2017 verzeichnete die Produktion von monoklonalen Antikörpern nach der Maus-Aszites-Methode einen Anstieg von 66 %. Die schwer belastenden Tierversuche wurden allen voran in Frankreich durchgeführt, gefolgt von Deutschland, Spanien, Italien, Ungarn und Tschechien.<sup>(42)</sup>

Dabei gab es seit Ende der 80er/Anfang der 90er Jahren bereits vielfältige Kritik, diesen Tierversuch zu beenden, zumal es bereits andere Methoden gab – mit mäßigem Erfolg.

## Rechtsgrundlagen

Gemäß den Bestimmungen der Europäischen Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU sollten die 3R-Prinzipien (Replacement, Reduction und Refinement) bei der Herstellung und den Kontrollprüfungen von Arzneimitteln angewandt werden. Dies gilt auch für die Herstellung von Antikörpern. Das bedeutet, dass Tierversuche zu wissenschaftlichen Zwecken nur dann erwogen werden sollten, wenn es keine tierversuchsfreie Alternative gibt (Erwägungsgrund Nr. 12 sowie Artikel 47, Absatz 1).<sup>(43)</sup>

Die Rechtslandschaft, die die Herstellung von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern regelt, ist unübersichtlich und kann hier nicht vollständig beschrieben werden.

Die Leitlinie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) z. B. schreibt kein Verfahren vor und erwähnt unter anderem die Herstellung von monoklonalen Antikörpern und verwandten Proteinen nach dem Aszites-Verfahren mit Mäusen. Die WHO rät jedoch von der Verwendung von In-vivo-Produktionsmethoden für die Herstellung von humantherapeutischen Produkten ab, sofern dies möglich ist.<sup>(44)</sup>

Auch das europäische Arzneibuch (European Pharmacopoeia) schreibt kein Verfahren vor. Wenn monoklonale Antikörper zur Verwendung beim Menschen im Tier hergestellt würden, heißt es dort, ist neben der herkömmlichen Sicherheitsbewertung vor allem auch die Virenfreiheit zu gewährleisten, auch z. B. von spongiformen Enzephalopathie-Prionen.<sup>(45)</sup> Antikörper können demnach in Tieren oder aber auch gentechnisch ohne Tier hergestellt werden. Nachdem der Antikörper produziert worden ist, muss seine Sicherheit gewährleistet werden, z. B. auf der Grundlage der Sicherheitsrichtlinien (Guidelines) der International Conference on Harmonisation (ICH).<sup>(46)</sup> Unbeabsichtigte Reaktionen oder Zytotoxizitäten eines monoklonalen Antikörpers gegenüber menschlichen Geweben werden heutzutage zumindest schon durch geeignete immunhistochemische Verfahren mit menschlichen Geweben überprüft. Doch auch bei diesem Prozess ist ein Antikörper involviert, der nach einem bestimmten Verfahren hergestellt worden sein muss. Wegen einer biologischen Aktivität sowie der Spezies- und/oder Gewebespezifität vieler biotechnologisch hergestellter Reagenzien kommen Standard-Toxizitätstests mit z. B. Ratten und Hunden nicht in Frage. Die ICH-Guideline S6(R1) hält für monoklonale Antikörper jedoch Tierarten für relevant, bei denen das Prüfmaterial aufgrund der Expression des entsprechenden Rezeptors oder Epitops (im Falle von monoklonalen Antikörpern) pharmakologisch aktiv ist und deren Gewebe ein ähnliches Kreuzreaktivitätsprofil aufweisen wie menschliches Gewebe. Das klingt sehr stark nach gentechnisch veränderten (humanisierten) Mäusen.

Neben den Sicherheits-Guidelines spielen auch die ICH-Qualitäts-Guidelines eine Rolle (Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B).<sup>(47)</sup>

Viele biotechnologisch hergestellte Arzneimittel, die für den Menschen bestimmt sind, führen jedoch bei Tieren zu allergischen Immunreaktionen. Häufig werden Meerschweinchen-Anaphylaxie-Tests durchgeführt. Jedoch ist die Induktion einer Antikörperbildung bei Tieren kein Indikator für eine mögliche Antikörperbildung beim Menschen. Deshalb werden derartige Studien als wenig wertvoll für die routinemäßige Bewertung dieser Art von Produkten angesehen. Bei monoklonalen Antikörpern und anderen verwandten Antikörperprodukten, die gegen fremde Ziele gerichtet sind (d. h. bakterielle, virale Ziele usw.), könne eine Kurzzeit-Sicherheitsstudie (siehe ICH-Leitlinie S6) an einer zu begründenden Tierart in Betracht gezogen werden; zusätzliche Toxizitätsstudien, einschließlich Studien zur Reproduktionstoxizität, sind nicht angebracht.

Monoklonale Antikörper können jedoch nicht nur im Tier, sondern auch durch rekombinante DNA-Technologie (rDNA) oder z. B. Display-Technologie erzeugt werden. Auch an der Möglichkeit, polyklonale Antikörper tierfrei herzustellen, arbeiten WissenschaftlerInnen bereits.

## Es geht auch anders: Herstellung ohne Tier

Rekombinante Antikörper können ohne Tier aus nicht immunisierten (naiven) Spender-B-Zellen, aus vollständig synthetischen universellen Antikörperbibliotheken oder durch Klonen der Antikörper-DNA aus menschlichen Spender-B-Zellen (z. B. von einem Patienten nach einer Infektion) erzeugt werden.

### Rekombinante Antikörper

Rekombinante Antikörper sind mit gentechnologischen Methoden hergestellte Antikörper. Für ihre Herstellung werden die Gensequenzen von wesentlichen Strukturen des Antikörpers (sogenannte schwere und leichte Ketten) isoliert und über ein synthetisches Verbindungsprotein („Linker“) miteinander verbunden. Die so modifizierten Gene werden in *Echerichia coli*-Bakterien, Hefen, eukaryotischen Zellen oder auch in transgenen Pflanzen exprimiert. Mit dieser Methode werde z. B. auch Biopestizide hergestellt.<sup>(48)</sup> Die rekombinante Technologie ermöglicht, Antikörpermoleküle gegen theoretisch jedes beliebige Antigen herzustellen, ohne ein Tier immunisieren zu müssen.<sup>(49)</sup>

### Phagen-Display

Antikörper, die nicht von Tieren stammen, können *in vitro* aus großen Antigenbibliotheken vor allem durch Phagen- und Hefe-Display, seltener durch Ribosomen-, Bakterien- oder Säugetierzell-Display ausgewählt werden. Die Proteinsynthese (Vervielfältigung) erfolgt dann meist in Bakterien. Mit dieser Methode lassen sich große Mengen an Antikörpern in gleichbleibender Qualität produzieren.<sup>(17)</sup>

John McCafferty, Sir Gregory Winter und David Chiswell sind die Gründer der Cambridge Antibody Technology. John McCafferty ist einer der Erfinder des sogenannten scFv-Antikörperfragment Phage-Displays, das die Entdeckung monoklonaler Antikörper vorangetrieben hat. Das Verfahren wurde entwickelt, nachdem eine Antikörperproduktion in der Maus gescheitert war.<sup>(50,51,52)</sup>

2018 erhielten Sir Gregory Winter und George Smith den Nobelpreis für Chemie für Ihre Entwicklung. Diese vielseitige Technik wurde in den letzten drei Jahrzehnten stark modifiziert und führte zur Entwicklung von verschiedenen Plattformen für die kombinatorische Peptid-darstellung.

Eine Phagen-Display-Bibliothek enthält ein umfangreiches Repertoire an Peptiden oder Proteinen, die als rekombinante Moleküle auf der Oberfläche von genetisch veränderten Bakteriophagen exprimiert werden.<sup>(53)</sup>

Tierfrei erzeugte rekombinante Antikörper (multiklonale) können sogar bereits für die Erkennung mehrerer Epitope verwendet werden, wo traditionell polyklonale Antikörper von Tieren eingesetzt werden.<sup>(17)</sup> Eine „unsterbliche“ und unerschöpfliche Antikörper-Biobank aus rekombinanten Antikörpern gegen jedes menschliche Protein ist bereits heute technisch machbar – und bietet neben der kompletten Vermeidung von Tierversuchen und der Verwendung zu therapeutischen Zwecken noch einen wichtigen Vorteil: Zu ihrer Aufbewahrung braucht man keinen teuren flüssigen Stickstoff wie bei Hybridomen – die E. coli-Klone brauchen nur einen Gefrierschrank.<sup>(54)</sup> Auch therapeutische Antikörper gegen COVID-19 sind bereits erfolgreich entwickelt worden.<sup>(55,56)</sup> Warum ist das das Phagen-Display nicht noch weiter verbreitet und zu einer Selbstverständlichkeit geworden? Die Gründe liegen wohl einerseits in der historischen Entwicklung der Technologie bevorzugt im stark patentregulierten Pharmabereich wie andererseits in der enormen Diversität der Anwendungsgebiete – für jedes einzelne müsse ein Demonstrationsbeispiel präsentiert werden, um die Kollegen zu überzeugen, schätzt Prof. Stefan Dübel, Leiter der Abteilung Biotechnologie der TU Braunschweig. Er initiierte die „Antikörperfabrik“ des Deutschen Nationalen Genomforschungsnetzes und ist Mitbegründer mehrerer Biotech-Unternehmen, darunter das tierversuchsfreie Antikörperunternehmen Abcalis und das Unternehmen Yumab, das therapeutische Antikörper für den Menschen entwickelt. Er war an zahlreichen Innovationen im Bereich der Entwicklung menschlicher Antikörper, des Phagen-Displays und u. a. der Hyperphagen-Technologie beteiligt.<sup>(54,57)</sup>

## In vitro-Immunisierung

Neben der Herstellung von Antikörperprototypen mit Bakterien und Bakteriophagen lassen sich auch Prototypen mit humanen Immunzellen in der Petrischale herstellen. Bei dem Verfahren der sogenannten In-vitro-Immunisierung werden z. B. humane B-Lymphozyten in der Petrischale zur Bildung der spezifischen Antikörper angeregt. Eine Potsdamer Forschergruppe aktiviert zunächst humane Antigen-präsentierende Zellen (Dendritische Zellen) mit dem gewünschten Antigen und kultiviert diese anschließend zusammen mit antigen-unerfahrenen (sogenannten naiven) T- und B-Lymphozyten. Nach einigen Tagen Kultivierung finden sich spezifische Antikörper im Kulturmedium. Diese werden isoliert und gereinigt.<sup>(58)</sup> Die Forschergruppe, die an diesem Ersatzverfahren arbeitet, weist jedoch darauf hin, dass weitere Forschungsarbeiten nötig seien, da natürliche Prozesse, wie die Affinitätsreifung im Organismus unter In-vitro-Bedingungen realisiert werden müssten.<sup>(59)</sup> Unter Affinitätsreifung versteht man zahlreiche Mutationen in den Genen der Antikörper (genannt somatische Hypermutation), welche die Anziehungskraft der Lymphozyten zum entsprechenden Antigen erhöht und die Immunantwort effektiver ausfallen lässt. Sie findet bei ausgereiften B-Lymphozyten innerhalb des Marks der Lymphknoten statt.<sup>(60)</sup>

Kritiker merken an, dass sich bei bakterieller Expression, eine fehlende Anbindung eines Kohlenhydrats (Glykosylierung) oder eine nicht korrekte räumliche Faltung mitunter als problematisch erweisen könnte. Aus Genbibliotheken generierte Antikörper zeigen zudem mitunter schlechte Lagerstabilitäten, ohne dass die Gründe bislang klar erforscht sind.<sup>(30)</sup>

## Beispiel: Mit Phagen-Display zur besseren Behandlung von Diphtherie

In einem vom PETA International Science Consortium Ltd. finanzierten Projekt haben Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler des Instituts für Biochemie, Biotechnologie und Bioinformatik der Technischen Universität Braunschweig zusammen mit dem Britischen National

Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) humane Antikörper entwickelt, die das Diphtherie-Toxin neutralisieren.

Dabei wurde mithilfe des Antikörper-Phagen-Displays der TU Braunschweig ohne die Immunisierung von Tieren humane rekombinante Antikörper generiert, die das Diphtherie-Toxin neutralisieren können. Eine Kombination der Antikörper, die das Toxin am besten neutralisieren, ist ein aussichtsreicher Kandidat für weitere klinische Entwicklungen, um das Diphtherie-Antitoxin (DAT) aus Pferdeserum zukünftig zu ersetzen. Die Ergebnisse wurden in der Fachzeitschrift „Scientific Reports“ veröffentlicht und in einem Artikel in der Fachzeitschrift „Science“ kommentiert.<sup>(61)</sup>

## Europäische Validierungsbehörde empfiehlt tierfreie Antikörper

Im Mai 2020 hatte das EU-Referenzlaboratorium des Joint Research Centers für Alternativen zu Tierversuchen (EURL ECVAM) eine Empfehlung herausgegeben, nach der Endnutzern und anderen Interessengruppen empfohlen wurde, die wissenschaftliche Validität von tierfrei gewonnenen Antikörpern anerkennen und keine Tiere mehr für die Entwicklung und Herstellung von Antikörpern zu verwenden. Die Empfehlung basierte auf der Stellungnahme des Scientific Advisory Committees (ESAC) von EURL ECVAM.<sup>(17)</sup>



Kritisiert wurde, dass viele am Tier gewonnenen monoklonalen Antikörper, die in der Forschung verwendet werden, mit anderen Molekülen kreuzreagieren. Fast 1/3 der in einer Studie zufällig ausgewählten Hybridome enthielt eine oder mehrere zusätzliche produktive schwere oder leichte Ketten (siehe Grafik Seite 6), die die Spezifität oder Empfindlichkeit (Affinität) beeinträchtigten. Unspezifische Antikörperreagenzien in der Forschung verschwanden Kosten, Zeit und Ressourcen und die negativen Wirkungen auf die Diagnosestellung und das Gesundheitsmanagement seien gewaltig, hieß es. Die Kosten für die Herstellung von Antikörpern aus einer Antikörperbibliothek seien vergleichbar mit der Herstellung von monoklonalen Antikörpern durch Immunisierung im Tier, aber es gäbe einen Zeitvorteil (mehrere Monate versus wenige Woche mittels einer rekombinanten Bibliothek).

Tierfreie Antikörper würden derzeit nicht häufiger verwendet, weil es eine Neigung zu bestehenden Methoden gäbe, ein mangelndes Bewusstsein für den aktuellen wissenschaftlichen Stand herrsche, wissenschaftliche Missverständnisse vorlägen, wirtschaftliche und vertragliche

Zwänge bestünden und es einen begrenzten Zugang zu Einrichtungen gäbe, die solche Moleküle herstellen.

Daher wurde den Regierungsbehörden, Fördereinrichtungen und wissenschaftlichen Verlagen empfohlen, sich für die tierfreie Antikörperherstellung und -nutzung auszusprechen. EU-Regierungen sollten außerdem Subventionen für Antikörperhersteller oder Kunden bereitstellen, die eine maßgeschneiderte Antikörperproduktion benötigen.

## **Pharmazeutische Industrie: Übergangszeit von mehr als 10 Jahren notwendig – Hybridome ersetzbar**

Die European Animal Research Association (EARA) und die European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) erkennen den vorausschauenden Ansatz von EURL ECVAM an, halten aber dessen Empfehlung für verfrüht, insbesondere im Bereich der Impfstoffe und Therapeutika. EARA/EFPIA seien eher davon überzeugt, dass die Existenz mehrerer Methoden zur Antikörpergenerierung - in vivo oder in vitro - einander ergänzten, aber nicht ersetzen.

Die Begründung: Es gäbe technologische, wissenschaftliche und regulatorische Fragen, die zuerst geklärt werden müssen, damit die Methoden in allen Bereichen, in denen Antikörper verwendet werden, voll zum Einsatz kommen könnten. Jegliche Umstellung von an Tieren erzeugten Antikörpern, auf tierfreie Antikörper sollte erst dann erfolgen, wenn der Nachweis erbracht ist, dass die Technologie ausgereift genug ist. Zum einen sei die derzeitige Technologie und Infrastruktur nicht für einen großen Maßstab geeignet. Zum anderen müsse der biomedizinische Sektor sicherstellen können, dass die Technologien zur Herstellung von tierfreien Antikörpern, die notwendige Entwicklung und Reife erreicht haben, um Antikörper in gleichbleibender Qualität und Menge gewährleisten zu können, was derzeit noch nicht der Fall sei.

Die posttranslationale Modifikation ist ein Enzym-abhängiger Vorgang, bei dem ein gerade gebildetes körpereigenes Protein durch Anhängen eines Moleküls verändert wird. Dadurch können die Eigenschaften des Proteins verändert werden. Sie ist einer der Gründe, weshalb ImmunologInnen den Tierversuch favorisieren. Sie argumentieren, dass eine derartige Modifikation in vitro schwierig zu bewerkstelligen sei.

Die Immunisierung von Kaninchen sei auch immer noch die beste Wahl für die Herstellung von hochaffinen Antikörpern gegen Haptene. (Haptene sind Moleküle oder Ionen, die allein nicht in der Lage sind, eine Immunreaktion hervorzurufen, sondern nur dann, wenn sie sich an ein körpereigenes Trägerprotein binden.)

Für Forschungszwecke bestünden größtenteils Antikörper, die aus Tieren gewonnen wurden. Ihr Wegfall würde einen Mangel an verfügbaren Forschungsinstrumenten in Europa und weltweit bedeuten. EFPIA und EARA unterstützten daher Investitionen in die Erweiterung des Angebots an derartigen Instrumenten, einschließlich beispielsweise der rekombinanten Produktion von Antikörpern, die derzeit noch aus Hybridomen gewonnen werden. EFPIA und EAZA plädieren zudem für eine wissenschaftlich fundierte Übergangszeit, die mehr als 10 Jahre beträgt.<sup>(62)</sup>

## Ausblick

Engagement, den Tierversuch für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern zu beenden, gibt es seit den 90er Jahren. Die Entwicklung ist über die Jahrzehnte kontinuierlich weiter vorangeschritten. Anhand der Diskussionen wird jedoch erkennbar, dass noch viel Überzeugungsarbeit zu leisten ist, um hier zu einer Akzeptanz des neuen Verfahrens zu kommen. Vor nicht allzu langer Zeit war die kommerzielle Nutzung des Phagen-Displays auf einige ausgewählte biopharmazeutische Unternehmen beschränkt, die die Rechte am geistigen Eigentum des Verfahrens besitzen. Damit gehörten die Rechte der meisten der zugelassenen oder in der klinischen Prüfung befindlichen monoklonalen Antikörper, die aus Phagen-Display-Bibliotheken stammen, auch kommerziellen Unternehmen. Mittlerweile sind jedoch die meisten wichtigen Patente für die Phagen-Display-Technologie in Europa und den USA abgelaufen. Deshalb sollte das Auslaufen von Patenten akademische und biotechnologische Start-ups ermutigen, ihre eigenen Bibliotheken zu entwickeln, um mehr Antikörper für die klinische Anwendung zu entwickeln.<sup>(63)</sup>

## Bedeutung des Phagen-Displays nicht zu übersehen

Die Verwendung des Phagen-Displays in der synthetischen Biologie, Immuntherapie, Diagnostik, bei der Entwicklung von Bioassays und Biosensoren, Arzneimittelforschung u. a. belegt dessen Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit. Z. B. hat das Phagen-Display auch einen tieferen Einblick in die Proteininteraktionen ermöglicht, die an der Pathogenese von SARS-CoV-2 beteiligt sind und hat die Suche nach potenziellen Antikörpern auch für andere humane und tierische Coronaviren vorangetrieben. Hochaffine Antikörper oder kleinmolekulare Therapeutika gegen virale Proteine des SARS-CoV konnten bereits identifiziert werden.<sup>(64)</sup> Der jüngste Durchbruch bei den Antikörpermedikamenten ist größtenteils auf den Beitrag der Phage-Display-Technologie zurückzuführen. Zusätzlich zu den oben erwähnten Antikörpern werden derzeit bispezifische Antikörper, die zwei Antigene in einem einzigen Antikörperformat erkennen, vermarktet.<sup>(65)</sup> Eine wichtige Rolle spielt das Phagen-Display auch in der Krebsimmuntherapie, indem auf Basis dieses Verfahrens abgeleitete Peptide Krebsantigene nachahmen (Mimotope) und daher eine effektive Antikörpertherapie gegen Krebs ermöglichen.<sup>(66)</sup> Aufgrund des großen Potenzials werden technologische Grenzen der Technologie kontinuierlich verschoben.<sup>(64)</sup>

Im Hinblick auf die zustimmende Empfehlung von EARA und EFPIA sollte auf jeden Fall sollte in einem ersten Schritt die Produktion von Antikörpern mit Hybridomen ersetzt werden. In einem zweiten könnte durch spezielle Förderung der Entwicklung die noch fehlende Leistungsfähigkeit des Phagen-Displays erweitert und so schrittweise der Tierversuch in den nächsten Jahren abgelöst werden.

Weshalb sollte in schon heute realisierbaren Einsatzbereichen nicht verpflichtend mit dem Phagen-Display gearbeitet werden?



# Literatur

- 1 [https://blog.hoelzel-biotech.com/2019/03/25/die-antikorperverschiebung\\_vom\\_aszites\\_zur\\_kultur/](https://blog.hoelzel-biotech.com/2019/03/25/die-antikorperverschiebung_vom_aszites_zur_kultur/)
- 2 Bei immunhistochemischen Untersuchungen werden Zell- oder Gewebestrukturen mit immunchemischen Methoden, beispielsweise mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen angefärbt. <https://www.patho-marburg.de/immunhistochemie.html>
- 3 <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/better-antibodies-without-using-animals>
- 4 <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/antikoeper/antikoeper-node.html>
- 5 Deutsche Gesellschaft für Immunologie e.V. (2021). Immunologie für jedermann. Online. [https://das-immunsystem.de/wissenswertes/immunsystem\\_angeboren\\_und\\_erworben/](https://das-immunsystem.de/wissenswertes/immunsystem_angeboren_und_erworben/)
- 6 <https://www.mikroimmuntherapie.com/angeborenes-erworbenes-immunsystem/>
- 7 <https://www.lmu-klinikum.de/aktuelles/pressemitteilungen/b-zellen-fur-anhaltende-immunantwort-gegen-sars-cov-2/d50c7a5b32822272>
- 8 <https://www.netdokter.de/anatomie/milz-funktion/>
- 9 <https://www.antikoerper-online.de/resources/16/1208/antikoeper/>
- 10 Kinthaert, L. (2019). What is an antibody? <https://informaconnect.com/what-is-an-antibody/>
- 11 <https://flexikon.doccheck.com/de/Effektorzelle>
- 12 Dübel, S. et al. (2019). Rekombinante Antikörper. Springer Verlag. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-50276-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-50276-1_5)
- 13 <https://www.antikoerper-online.de/antibody/polyclonal/>
- 14 <https://de.wikipedia.org/wiki/Epitop>
- 15 <https://www.antikoerper-online.de/antibody/monoclonal/>
- 16 Kania, M. (2002). Entwicklung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von Domoinsäure. Dissertation an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München. <https://mediatum.ub.tum.de/doc/603289/603289.pdf>
- 17 Barroso J., Halder M., Whelan M. EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived Antibodies. EUR 30185 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2020, ISBN 978-92-76-18346-4, doi:10.2760/80554, JRC120199.
- 18 [https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/\\_8a.html](https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/_8a.html)
- 19 Hirt, Maisack, Moritz: Tierschutzgesetz. 2. Auflage.
- 20 Jirkof, P., Chourbaji, S., Ott, S. et al. (2020). Tiergerechte Haltung von Laborkaninchen. Fachinformation Aus dem Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung (GV-SOLAS) und dem Arbeitskreis Versuchstiere (TVT), März. 2020.
- 21 <https://www.takeda-onkologie.de/lexikon/myelomzellen>
- 22 <https://de.moleculardevices.com/applications/monoclonal-antibodies-mabs>
- 23 <https://de.moleculardevices.com/applications/monoclonal-antibody-production>
- 24 Schmidt, R. (2018). Entwicklung von Immunisierungsstrategien zur Induktion hoher funktionaler Antikörperantworten. Dissertation Universität Frankfurt/Main. <https://d-nb.info/1164077619/34>
- 25 abacam (o.J.). RabMAbs® - Antikörper der Superlative. <http://docplayer.org/11260664-Rabmabs-antikoeper-der-superlative.html>
- 26 Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. (2009). Immunologie. Spektrum Verlag.
- 27 vfa. Die forschenden Pharma-Unternehmen (2009). Adjuvantien: Wirkverstärker in Impfstoffen. <https://www.vfa.de/de/patienten/artikel-patienten/adjuvantien-wirkverstaerker-in-impfstoffen.html>
- 28 Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV, Tierschutz (2017). Fachinformation Tierversuche - Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren 3.04. <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/tiere/rechts--und-vollzugsgrundlagen/hilfsmittel-und-vollzugsgrundlagen/fachinformationen-und-merkblaetter.html>
- 29 Dübel, S. (2018). Hybridome. Viele monoklonale Antikörper sind nicht spezifisch. BIoSpektrum 04.18, Springer Verlag. [http://www.bbt.tu-bs.de/Biotech/PDF/Duebel\\_Biospektrum\\_Hybridome\\_2018.pdf](http://www.bbt.tu-bs.de/Biotech/PDF/Duebel_Biospektrum_Hybridome_2018.pdf)
- 30 Glogger, S. (2019). Antikörper. <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitfach.17258/full/>
- 31 Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(3):226-34. In: WHO Guideline for the safe production and quality control of 5 monoclonal antibodies for use in humans, WHO/MAB/DRAFT/12 October 2021
- 32 Deutsche Apothekerzeitung (2003). Zuckerablagerungen: Schädliche Immunreaktion durch Fleischverzehr? <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2003/daz-43-2003/uid-10839>
- 33 Fischer, R. W. & Ferner, P. C. (1992). Monoklonale Antikörper: In vitro-Produktionsmethoden im Vergleich. ALTEX. <https://www.altex.org>
- 34 [https://www.hu-berlin.de/de/forschung/szf/forschungsmanagement/veroeffentlichungen/fober/fober93/foib90\\_13\\_html](https://www.hu-berlin.de/de/forschung/szf/forschungsmanagement/veroeffentlichungen/fober/fober93/foib90_13_html)
- 35 Glaser, R. W. et al. (1992). Antigen-specific enrichment of peripheral blood lymphocytes with magnetic beads combined with electrofusion enables efficient production of human mabs, in: Acta Biotechnologica 12.
- 36 Lindl, T. (1988). Technisch-wissenschaftliche und ethische Aspekte der Produktion monoklonaler Antikörper. ALTEX. <https://www.altex.org>
- 37 Deutscher Bundestag (2001). Tierschutzbericht 2001 der Bundesregierung. Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes. Drucksache 14/5712 vom 29.3.2001. [https://dejure.org/Drucksachen/Bundestag/BT-Drs.\\_14/5712](https://dejure.org/Drucksachen/Bundestag/BT-Drs._14/5712)
- 38 Bundesministerium für Verbraucher, Ernährung und Landwirtschaft (2003). Tierschutzbericht 2003. „Bericht über den Stand der Entwicklung des Tierschutzes“. BMVEL 321-0869-1/8. [https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/\\_Tiere/Tierschutz/Tierversuche/Tierschutzbericht\\_2003.html](https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Tiere/Tierschutz/Tierversuche/Tierschutzbericht_2003.html)
- 39 [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/E-6-2008-5769\\_DE.html?redirect](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/E-6-2008-5769_DE.html?redirect)
- 40 Europäische Kommission (2020). Bericht 2019 über die statistischen Daten über die Verwendung von Tieren für wissenschaftliche Zwecke in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union in den Jahren 2015-2017, vom 5.2.2020, COM(2020) 16 final. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1581689520921&uri=CELEX:52020DC0016>
- 41 [https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/content/alures/section2\\_number-of-uses.html](https://webgate.ec.europa.eu/envdataportal/content/alures/section2_number-of-uses.html)
- 42 Europäische Kommission (2020). Accompanying the document Report from the Commission to the European Parliament and the Council 2019 report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union in 2015-2017. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:52020SC0010&from=EN>

- 43 <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32010L0063:DE:HTML>
- 44 WHO Guideline for the safe production and quality control of 5 monoclonal antibodies for use in humans. WHO/MAB/DRAFT/12 October 2021 (pdf abgerufen am 13.2.22)
- 45 European Pharmacopoeia 6.0 (EP) 01/2008:2031: Monoclonal Antibodies For Human Use (pdf abgerufen am 16.02.22)
- 46 ICH - Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1). <https://www.ich.org/page/safety-guidelines>
- 47 ICH Quality Guidelines. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- 48 Bioökonomie.de (2017). Biologika für die Landwirtschaft. 23.12.2017. <https://biooekonomie.de/themen/dossiers/biologika-fuer-die-landwirtschaft>
- 49 Spektrum.de (o. j.). Lexikon der Biologie. Rekombinante Antikörper. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/rekombinante-antikoerper/56157>
- 50 McCafferty J; Griffiths A.D; Winter G; Chiswell D.J (1990). „Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains“. *Nature*. 348 (63017): 552–554.
- 51 Burrows, A. (2019). Dr John McCafferty on how his antibody phage display work contributed to a Nobel Prize. <https://informaconnect.com/antibody-phage-display-john-mccafferty-nobel-prize/>
- 52 Alfaleh, M. A., Alsaab, H. O., Mahmoud, A. B., et al. (2020). Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* 11:1986. doi: 10.3389/fimmu.2020.01986
- 53 Spektrum.de (o. j.). Lexikon der Biologie. Rekombinante Antikörper. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/rekombinante-antikoerper/56157>
- 54 Dübel, S., Breitling, F., Frenzel, A., Jostock, T., Marschall, A. L. J., Schirrmann, T. & Hust, M. (2019). Anwendungsgebiete für rekombinante Antikörper. *Rekombinante Antikörper*. 2019 Oct 9 : 189–230. doi: 10.1007/978-3-662-50276-1\_5. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7153412/pdf/978-3-662-50276-1\\_Chapter\\_5.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7153412/pdf/978-3-662-50276-1_Chapter_5.pdf)
- 55 Dübel, S., Herrmann, A., Schirrmann, T., Frenzel, A. & Hust, M. (2021). COR-101, ein menschlicher Antikörper gegen COVID-19. *BIOspektrum* 01.21. DOI: 10.1007/s12268-021-1512-x. <https://www.proquest.com/openview/e26a3930786979072ef368408808fd8b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2043960>
- 56 Bertoglio, F., Fühner, V., Ruschig, M. (2020). A SARS-CoV-2 neutralizing antibody selected from COVID-19 patients by phage display is binding to the ACE2-RBD interface and is tolerant to known RBD mutations. *bioRxiv preprint*. <https://doi.org/10.1101/2020.12.03.409318>.
- 57 <https://www.tu-braunschweig.de/bbt/team/prof-dr-stefan-duebel>
- 58 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.
- 59 Immuntechnologie - Prof. Dr. Katja Hanack (2017). Induktion der Antikörper-Affinitätsreifung in vitro <https://www.uni-potsdam.de/de/ibb-immuntechnologie/forschung/affinitaetsreifung>
- 60 <https://flexikon.doccheck.com/de/Affinit%C3%A4tsreifung>
- 61 Wenzel, E. V., Bosnak, M., Tierney, R., Schubert, M., Brown, J., Dübel, S., Efstratiou, A., Sesardic, D., Stickings, P. & Hust, M. (2020). Human antibodies neutralizing diphtheria toxin in vitro and in vivo. *Sci Rep* 10, 571. doi:10.1038/s41598-019-57103-5
- 62 European Animal research association/ European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (2020). EARA/EFPIA response to EURL ECVAM Recommendation on Non-Animal-Derived antibodies. 18. November 2020. <https://www.eara.eu/post/eara-efpia-response-to-antibody-recommendation>
- 63 Alfaleh, M. A., Alsaab, H. O., Mahmoud, A. B., et al. (2020). Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* 11:1986. doi: 10.3389/fimmu.2020.01986
- 64 Anand T, Virmani N, Bera BC, Vaid RK, Vashisth M, Bardajaty P, Kumar A, Tripathi BN. Phage Display Technique as a Tool for Diagnosis and Antibody Selection for Coronaviruses. *Curr Microbiol.* 2021 Apr;78(4):1124-1134. doi: 10.1007/s00284-021-02398-9
- 65 Nagano K, Tsutsumi Y. Phage Display Technology as a Powerful Platform for Antibody Drug Discovery. *Viruses.* 2021 Jan 25;13(2):178. doi: 10.3390/v13020178
- 66 Goracci, M., Pignochino, Y., & Marchiò, S. (2020). Phage Display-Based Nanotechnology Applications in Cancer Immunotherapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(4), 843. <https://doi.org/10.3390/molecules25040843>



Für eine moderne Forschung  
**ohne Tierversuche!**



Menschen für Tierrechte –  
Bundesverband der Tierversuchsgegner e. V.  
Tel. 02252 - 830 12 10 | [www.tierrechte.de](http://www.tierrechte.de)

## Tiere haben Rechte – wir fordern sie ein!

Trotz Tierschutzgesetz und Staatsziel Tierschutz leiden jeden Tag Millionen Tiere in Tierversuchen, in der industriellen Landwirtschaft, auf Transporten und Schlachthöfen. Hinzu kommen artwidrig gehaltene Haus- und Wildtiere in Privathaushalten, in Zoo und Zirkus, „Pelztiere“ und unzählige Tiere, die jährlich Opfer der Jagd werden. Um dieses millionenfache Leid zu beenden, setzen wir uns aktiv für den Ausstieg aus dem Tierversuch und der „Nutztier“-Haltung sowie gegen jeglichen Missbrauch von Tieren ein. Um diesen Systemwechsel einzuleiten, brauchen wir einen Masterplan für den Abbau von Tierversuchen und eine Kehrtwende in der Landwirtschaft von der tierischen zur pflanzlichen Eiweißproduktion. Unser langfristiges Ziel: Das Mensch-Tier-Verhältnis muss sich grundsätzlich ändern. Tiere haben ein Recht auf Leben, auf Freiheit und auf Unversehrtheit. Der Weg zur Anerkennung dieser Rechte ist beschwerlich – wir gehen ihn pragmatisch, schrittweise und konsequent.

- **Wir freuen uns, dass Sie sich für unsere Arbeit interessieren. Um die Abschaffung des Tierversuchs zu erreichen, sind wir als gemeinnütziger Verein auf Ihre Mithilfe angewiesen.**

**Bitte unterstützen Sie unsere Arbeit mit einer Mitgliedschaft oder Spende.  
Vielen Dank!**

### BLEIBEN SIE INFORMIERT

Abonnieren Sie unter: [www.newsletter.tierrechte.de](http://www.newsletter.tierrechte.de) unseren Tierrechte-Newsletter und folgen Sie uns auf Facebook: [www.facebook.com/menschenfuertierrechte](http://www.facebook.com/menschenfuertierrechte)

### SPENDEN

Der Bundesverband ist seit über 30 Jahren als gemeinnützig und besonders förderungswürdig anerkannt. Spenden und Mitgliedsbeiträge sind steuerlich absetzbar.

Sparkasse Aachen  
IBAN DE02 3905 0000 0016 0079 73  
SWIFT-BIC AACSD33

### KONTAKT

Geschäftsstelle:  
Severinusstr. 52 | 53909 Zülpich  
Tel. 02252 - 830 12 10 | Fax 02252 - 830 12 11  
[info@tierrechte.de](mailto:info@tierrechte.de) | [www.tierrechte.de](http://www.tierrechte.de)



**Menschen für Tierrechte**  
Bundesverband der Tierversuchsgegner e. V.