Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen

Adrian F. Ochsenbein
Klinik und Poliklinik für Medizinische Onkologie, Inselspital Bern

Quintessenz

- Monoklonale Antikörper können durch die Aktivierung des Komplementsystems und durch die Rekrutierung sekundärer Effektorzellen (z.B. T-Zellen, NK-Zellen, Granulozyten) indirekt zytotoxische Reaktionen auslösen. Zudem können monoklonale Antikörper in physiologische Abläufe der Zelle eingreifen. Sie blockieren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren an der Zelloberfläche oder neutralisieren die Liganden in der Zirkulation.
- Die Verwendung von murinen Antikörpern war durch die Induktion von Human-Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) limitiert. Durch gentechnologische Methoden wurde es möglich, Antikörper mit einer grossen Homologie zum humanen IgG-Molekül herzustellen. Diese Antikörper werden *chimäre* Antikörper (konstanter Anteil human, variabler Anteil murin), *humanisierte* Antikörper (nur Aminosäuresequenzen der CDR (Complementary Determining Region) murin) und *vollständig humane* Antikörper genannt.
- Durch die Herstellung rekombinanter Antikörper wurde es möglich, monoklonale Antikörper therapeutisch bei verschiedenen Krankheiten auch repetitiv einzusetzen. Monoklonale Antikörper werden heutzutage zur Behandlung der Osteoporose, der Transplantatabstossung von Autoimmunerkrankungen in der Rheumatologie und in der Onkologie eingesetzt.

Summary

Monoclonal antibodies as therapeutic substances

- *Antibodies are not toxic for a target cell per se but act either by blocking vital signalling molecules on the cell surface or via a secondary effector mechanism including antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC). In addition, monoclonal antibodies block central signalling pathways by binding to extracellular receptors or by neutralising their ligands.*
- *The therapeutic application of monoclonal antibodies of murine origin in human disease was limited by the induction of human anti-mouse antibodies (HAMA). The generation of chimaeric antibodies (the constant part of the antibody is human, the variable part is murine) lessened but did not eliminate the murine content. Further elimination of rodent sequences enabled the production of humanised monoclonal antibodies (only amino acid sequences of the CDRs are murine), followed by generation of fully human antibodies.*
- *The reduced immunogenicity of chimeric, humanised and fully human antibodies allowed repetitive application to patients with various diseases. Monoclonal antibodies are now established in the therapy of osteoporosis, transplant rejection, autoimmune diseases, rheumatology and malignancy.*

Einführung

Das therapeutische Potential von Antikörpern als «magic bullets» wurde von Paul Ehrlich bereits 1908 beschrieben. 1975 gelang Köhler und Milstein die Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit der Hybridomtechnik. Während der letzten 25 Jahre wurde es durch die Etablierung zell- und molekularbiologischer Techniken möglich, unlimitierte Mengen von murinen, chimären und humanisierten monoklonalen Antikörpern für die klinische Anwendung zu produzieren. Diese fanden Anwendung in der Forschung, der Diagnostik und der Therapie. In den ersten therapeutischen Anwendungen wurden monoklonale Antikörper verwendet, die in Mäusen produziert wurden (murine Antikörper). Die Injektion von murinen Antikörpern löste jedoch eine Immunreaktion aus und führte zur Bildung von Mensch-Anti-Maus-Antikörpern (Human Anti-Mouse Antibodies, HAMA). Die Entdeckung der genetischen Basis für die Antikörperdiversität und die rekombinante DNA-Biotechnologie machten es möglich, Maus-Antikörper in partiell humanisierte Formen zu bringen. Chimäre, humanisierte oder sogar vollständig humane monoklonale Antikörper sind weniger immunogen und induzieren in der therapeutischen Anwendung nur mit einer geringen Inzidenz Anti-Immunglobulin-Antikörper. Dadurch können diese Antikörper über einen längeren Zeitraum repetitiv angewendet werden. Dies führte in den letzten Jahren zur Etablierung monoklonaler Antikörper in der Therapie von Krebserkrankungen, rheumatischen Erkrankungen, Autoimmunität und Transplantatabstossung.

Von der Maus zum Menschen: chimäre, humanisierte und vollständig humane Antikörper

Die ersten monoklonalen Antikörper wurden durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle mit einer Myelomzelllinie hergestellt. Myelomzellen sind immortalisierte B-Lymphozyten, die die Fähigkeit zur Antikörperproduktion haben.

CME zu diesem Artikel finden Sie auf S. 135 oder im Internet unter www.smf-cme.ch.

Durch diese Fusion können langlebige Zelllinien hergestellt werden, die Antikörper von einer gewünschten Spezifität herstellen [1].
Der Anti-CD3-Antikörper (Orthoclone OKT3®, Muromonab-CD3) ist ein Erstgenerationsantikörper dieser Art. Er wird eingesetzt zur Therapie der akuten Transplantatabstossung und wurde als erster monoklonaler Antikörper für die Behandlung beim Menschen zugelassen. Die klinische Erfahrung zeigte, dass Muromonab-CD3 zusammen mit anderen immunsuppressiven Medikamenten verwendet werden muss, um die Entwicklung einer Immunreaktion gegen den Maus-Antikörper zu unterdrücken. HAMA-Antikörper können jedoch sogar unter gleichzeitiger intensiver Immunsuppression entstehen. Eine Immunantwort gegen Muromonab-CD3 reduziert die Bindung am CD3ε und kann zur Reduktion des therapeutischen Effekts führen. Die normale Halbwertszeit von Muromonab-CD3 in der Zirkulation beträgt 18 Stunden. Nach der Entwicklung von HAMA-Antikörpern kann Muromonab-CD3 innerhalb weniger Stunden aus der Zirkulation eliminiert werden. Zudem wurden zirkulierende IgE-Antikörper gegen Muromonab-CD3 beschrieben, welche zu lebensbedrohlichen anaphylaktischen Reaktionen bei weiterer Verwendung führen können.
Im Gegensatz zur zeitlich limitierten Behandlung einer akuten Transplantat-Abstossung ist es zur Behandlung von Krebserkrankungen und Autoimmunität nötig, einen therapeutischen Effekt über längere Zeit zu etablieren. Die Feststellung, dass die Immunreaktion des Patienten gegen die Maus-Antikörper die therapeutische Effizienz bei diesen chronischen Krankheiten limitiert, führte zu Strategien, die Immunogenizität der monoklonalen Antikörper zu reduzieren [2]. In einem ersten Schritt wurden deshalb chimäre monoklonale Antikörper hergestellt (Abb. 1). Chimäre Antikörper besitzen einen murinen variablen und einen humanen konstanten Anteil. Die Häufigkeit der Induktion einer Anti-Antikörper-Antwort wurde dadurch deutlich reduziert. Dies ermöglichte die wiederholte therapeutische Anwendung bei Patienten. Verschiedene chimäre Antikörper wie z.B. Rituximab (Mabthera®) und Cetuximab (Erbitux®) induzieren selten Anti-Antikörper. Im Gegensatz dazu werden HAMA in bis zu 61% der Patienten gefunden, welche mit dem chimären Antikörper Infliximab (Remicade®) therapiert werden. Die Entwicklung von Anti-Antikörpern gegenüber Infliximab korreliert mit einer Reduktion des therapeutischen Effekts und einem erhöhten Risiko für akute Infusionsreaktionen. Die Bildung von HAMA bleibt deshalb trotz der Etablierung von chimären monoklonalen Antikörpern in der Klinik ein potentiell signifikantes Problem, welches eine engmaschige Kontrolle, unter gewissen Umständen eine konkomittierende Therapie mit Kortikosteroiden oder die Absetzung des Medikaments nötig werden lässt.
Als konsequente Weiterentwicklung folgte deshalb die Herstellung von humanisierten Antikörpern. Bei humanisierten Antikörpern sind alle Aminosäurensequenzen der Maus durch humane Sequenzen ersetzt, mit der Ausnahme der Complementary Determing Regions (CDR), die für die Antigenbildung verantwortlich sind (Abb. 1). Dadurch wurde erwartet, dass die Immunogenizität, wie sie bei chimären Antikörpern noch immer beobachtet wurde, deutlich reduziert wird. Die Praxis zeigt jedoch, dass nun Human-Anti-Human-Antikörperreaktionen (HAHA) induziert werden können. Die Inzidenz ist im Vergleich zu den Anti-Antikörperantworten gegenüber chimären Antikörpern jedoch reduziert. Alemtuzumab (MabCampath®) induziert mit einer Inzidenz von etwa 1,9% und Transtuzumab (Herceptin®) mit einer noch tieferen Inzidenz von 0,1% HAHA. Im Gegensatz dazu induzieren andere humanisierte Antikörper wie z.B. Daclizumab (Zenapax®) HAHA mit einer Inzidienz von bis zu 34%. Die Humanisierung von murinen Antikörpern ist nicht unproblematisch. Die Aminosäuresequenzen zwischen den CDR-Regionen tragen signifikant zur Antikörperaffinität bei. Es ist deshalb bei verschiedenen humanisierten Antikörpern nicht möglich, nur die CDR-Regionen zu erhalten, sondern es braucht häufig konservierte Sequenzen vom Maus-Antikörper auch in den Regionen zwischen den CDR-Anteilen des Antikörpers (Framework).
Um die Immunogenizität der therapeutischen monokonalen Antikörper weiter zu reduzieren, wurden in den letzten Jahren *vollständig humane Antikörper* hergestellt [3,4]. Dies ermöglichen verschiedene Methoden. Mäuse mit einem Immundefekt (severe combined immune deficiency, SCID) können mit humanem fetalem Gewebe rekonstruiert werden. Durch Immunisierung dieser Mäuse werden humane Antikörper generiert. Der grösste Anteil der humanen Antikörper wird jedoch mit der *Phage-Display-Methodik* in vitro hergestellt, oder es wurden transgene Mäuse etabliert, die vollständig humane Antikörper produzieren. Verschiedene dieser vollständig humanen Antikörper sind zurzeit in klinischer Testung in Phase I bis III Studien.
Sind nun vollständig humane Antikörper den humanisierten und diese wiederum den chimären Antikörpern in therapeutischen Anwendung

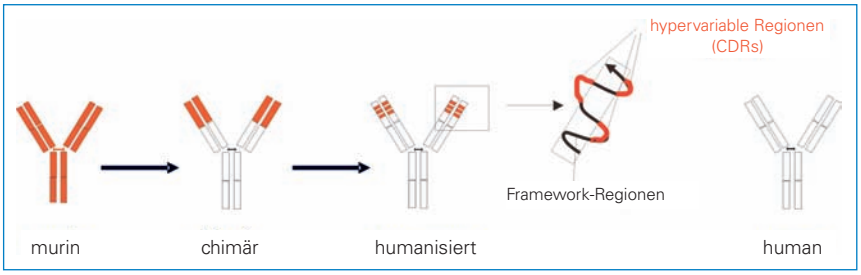

Abbildung 1
Rekombinante monoklonale Antikörper. Sequenzen von der Maus sind rot dargestellt, humane Anteile weiss.

überlegen? Die Immunogenizität therapeutischer Antikörper ist ein signifikantes Problem, das die wiederholte Anwendung in der Behandlung verschiedener Erkrankungen limitiert. Die Immunogenizität der monoklonalen Antikörper ist einerseits darauf zurückzuführen, dass fremde Aminosäuresequenzen (murine Aminosäuresequenzen) vom Immunsystem erkannt werden können. Auf diesen Erkenntnissen basierte die Entwicklung von initial chimären, dann humanisierten und nun vollständig humanen Antikörpern. Es ist jedoch zu beachten, dass auch vollständig humane Antikörper mit einer gegebenen Spezifität eine für den Körper einmalige (fremde) Aminosäuresequenz aufweisen. Diese beinhaltet die Antikörperbildungsstelle und wird als *Idiotyp* bezeichnet. Der Körper kann deshalb auch gegen vollständig humane Antikörper, an ebendieser Idiotypstelle, Human-Anti-Human-Antikörper bilden. Antikörper sind evolutionär entstanden, um die Immunogenizität fremder Proteine zu erhöhen. Sie tun dies durch Bindung an Fc-Rezeptoren oder durch Aktivierung der Komplementkaskade. Diese Funktionen tragen dazu bei, dass chimäre, humanisierte aber auch vollständig humane Antikörper (bezüglich ihres Idiotyps) immunogen sind. Andererseits sind es gerade diese Charakteristika der Antikörper, die für einen therapeutischen Effekt bei der Zerstörung von Zielzellen (z.B. Krebszellen) nötig sind. Die Herstellung eines Antikörpers mit maximaler Effektorfunktion gegen Zielzellen mit fehlender Immunogenizität gegen den Antikörper selbst ist deshalb schwierig zu erreichen.

Oft wird beschrieben, dass chimäre Antikörper rund 75%, humanisierte Antikörper 95% und vollständig humane Antikörper 100% Sequenzhomologie zum menschlichen IgG aufweisen. Diese Zahlen stimmen jedoch nur, wenn davon ausgegangen wird, dass murine und humane Antikörper vollkommen unterschiedlich sind. Es gibt einerseits stark konservierte Sequenzhomologien zwischen murinen und menschlichen Antikörpern. Auf der anderen Seite entsprechen auch vollständig humane Antikörper nicht vollständig der im Genom festgelegten Sequenz, da eine effiziente somatische Mutation während der Affinitäts-Maturation der Antikörper stattfindet [5].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Herstellung chimärer, humanisierter und vollständig humaner Antikörper die Immunogenizität der ursprünglich murinen Antikörper deutlich reduziert werden konnte. Dadurch wurde die therapeutische Anwendung bei vielen Krankheiten beim Menschen möglich, bei denen eine repetitive Verabreichung nötig ist. Auf der anderen Seite kann aber die Weiterentwicklung von chimären über humanisierte zu vollständig humanen Antikörpern nicht einfach als kontinuierliche Verbesserung des therapeutischen Potentials angesehen werden. Jede dieser biotechnologisch hergestellten Antikörper hat Vor- und Nachteile, die jeweils einzel in klinischen Studien untersucht werden müssen.

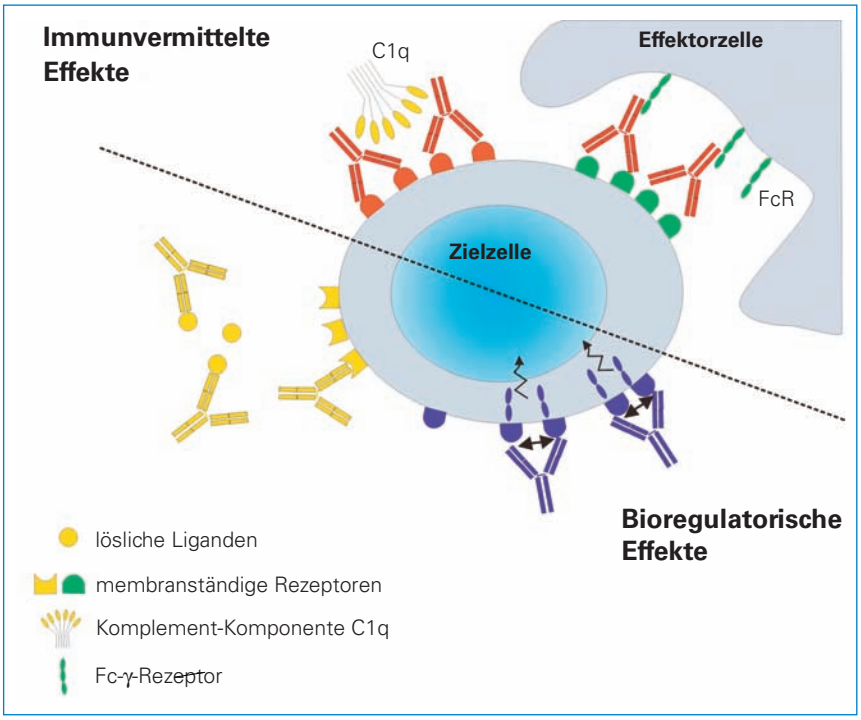

Abbildung 2
Effektormechanismen monoklonaler Antikörper. Immunvermittelte Effekte durch die Aktivierung der Komplementkaskade via Binden von C1q an membrangebundene IgM- oder IgG-Moleküle (CDC) oder durch die Rekrutierung von Effektorzellen via Fc-Rezeptoren (ADCC). Bioregulatorische Funktionen durch über Kreuz Verbinden (cross-linking) von zellulären Rezeptoren mit direkter Signaltransduktion (z.B. Apoptose-Signale) oder durch Blockierung von Rezeptoren oder deren Liganden (z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren).

Wirkungsmechanismen von unkonjugierten monoklonalen Antikörpern

Immunvermittelte Effektormechanismen

Monoklonale Antikörper sind per se für eine Zielzelle nicht zytotoxisch. Sie induzieren zytotoxische Effekte (z.B. gegen Tumorzellen) durch die Interaktion mit dem Komplementsystem oder mit Effektorzellen (T-Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Eosinophile usw. (Abb. 2, Tab. 1). Zytotoxische Effekte, die durch Aktivierung der Komplementkaskade und durch Komplement-vermittelte Zytotoxizität entstehen, werden *Complement-Dependent Cytotoxicity* (CDC) genannt [6]. Effektormechanismen, die sekundäre Effektorzellen benötigen, werden mit *Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity* (ADCC) bezeichnet [7]. Die Aktivierung der Komplementkaskade und die Aktivierung von Effektorzellen erfolgt über Karbohydrate des Fc-Anteils des Antikörpers. Der Fc-Anteil von humanem IgG_1 ist in der Aktivierung der Komplementkaskade und von humanen Effektorzellen besonders effizient. Die konstante Region von humanem IgG_1 wird deshalb bei der Herstellung chimärer und humanisierter mono-

Tabelle 1. Wirkungsmechanismen therapeutischer monoklonaler Antikörper.

Antikörper alleine
Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC)
Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität (ADCC)
Bioregulatorische (Rezeptor/Ligand) Interaktionen
Anti-idiotypische Vakzinierung
Immunkonjugate
Radioaktiv markierte Antikörper
Immunotoxine
Chemotherapie markierte Antikörper
Zyktokin-Immunkonjugate
Zelluläre Immunkonjugate

klonaler Antikörper bevorzugt, bei denen in vivo eine möglichst ausgeprägte Zytotoxizität erreicht werden soll.

Bioregulatorische Effekte

Monoklonale Antikörper können jedoch auch therapeutische Effekte induzieren, ohne immunologische Effektormechanismen zu aktivieren (Abb. 2, Tab. 1). Monoklonale Antikörper können Rezeptoren auf der Zelloberfläche blockieren oder lösliche Liganden (z.B. vascular endothelial growth factor [VEGF], TNFα usw.) neutralisieren. Antikörper können auch direkt zur intrazellulären Signaltransduktion via Cross-Linking von Rezeptoren führen. In Abhängigkeit des Rezeptors kann dies in der Zielzelle direkt Apoptose induzieren. Als Beispiel für einen monoklonalen Antikörper mit bioregulatorischem Effekt kann Trastuzumab (Herceptin®) gelten, der an den Epidermal-Growth-Factor-Family-Rezeptor HER-2/neu bindet. Die Blockade dieses Rezeptors reduziert die proliferative Kapazität von Zellen, die HER-2/neu überexprimieren. Auf der anderen Seite sind die bioregulatorischen Effekte häufig schwierig von immunvermittelten Effekten zu unterscheiden. Gerade für Trastuzumab gibt es experimentelle Daten, die neben der bioregulatorischen Funktion auf einen wichtigen zusätzlichen Effekt der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität hinweisen.

Immunkonjugate: Antikörper als Träger

Der Begriff *Immunkonjugate* wird verwendet, um monoklonale Antikörper oder deren Untereinheiten zu beschreiben, wenn sie als Träger für andere Wirkstoffe wie beispielsweise Radioisotope, Toxine, Zytostatika, Zytokine oder Zellen verwendet werden (Tab. 1). Die immunologische Aktivität der Antikörper ist bei diesen Konstrukten irrelevant. Die Aktivität wird durch die daran gekoppelte Substanz vermittelt [8].
Monoklonale Antikörper, konjugiert mit Indium-111 oder Technetium-99, wurden bereits für die Tumordiagnostik verwendet. Radioisotope wie Jod-131, Yttrium-90 und Venium-186 sind für radiotherapeutische Ansätze vielversprechend. Die Strahlung kann, relativ lokalisiert, durch die Bindung an den Antikörper auf einen Tumor appliziert werden. Eine der grossen therapeutischen Vorteile der Radio-Immuntherapie mit Beta-Strahlen ist, dass die Strahlung mehrere Millimeter in den Tumor eindringt. Das Zielantigen muss deshalb nicht auf jeder Tumorzelle exprimiert sein.

Andere Antikörperformate

Bispezifische Antikörper erkennen zwei unterschiedliche Antigene. Der Effekt ist unabhängig von der Fc-Region. Bei diesen Molekülen ist deshalb die Komplementaktivierung minimal, wodurch ein Teil der unerwünschten Nebenwirkungen unterdrückt werden kann. Bispezifische Antikörper benötigen deshalb nicht sämtliche Strukturen des Ig-Moleküls und können auf Fv-Fragmente reduziert werden. Kombinationen von zwei oder drei Einzelketten-Fvs resultieren in bispezifischen Antikörpern mit minimaler molekularer Masse, die optimal ins Gewebe penetrieren. Ihre In-vivo-Halbwertszeit ist jedoch im Vergleich zu kompletten IgG-Molekülen kurz.

Korrespndenz:
Prof. Dr. Adrian F. Ochsenbein
Klinik und Poliklinik
für Medizinische Onkologie
Inselspital
CH-3010 Bern
adrian.ochsenbein@insel.ch

Literatur

1 Yoo EM, Chintalacharuvu KR, Penichet ML, Morrison SL. Myeloma expression systems. J Immunol Methods. 2002; 261:1–20.
2 Berger M, Shankar V, Vafai A. Therapeutic applications of monoclonal antibodies. Am J Med Sci. 2002;324:14–30.
3 Weiner LM. Fully human therapeutic monoclonal antibodies. J Immunother. 1997;29:1–9.
4 Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. Immunol Today. 2000;21:364–70.
5 Diaz M, Casali P. Somatic immunoglobulin hypermutation. Curr Opin Immunol. 2002;14:235–40.
6 Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD, Gorter A. Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. Trends Immunol. 2004;25:158–64.
7 Casadevall A, Pirofski LA. Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. Trends Immunol. 2003;24:474–8.
8 Pastan I, Hassan R, Fitzgerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6:559–65.