

5. Diskussion

5.1. Antikörpergestützte Therapien von Krebserkrankungen

Heute repräsentieren antikörperbasierte Therapeutika einen Gesamtanteil von 25 % an den sich in der frühen klinischen Forschung befindlichen neuen Produkte. Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) hat zurzeit 21 monoklonale Antikörper (alles intakte Immunglobuline) zur Therapie zugelassen, die meisten zur systemischen Tumortherapie (Dongen van et al., 2007). Ungefähr 75 Antikörper befinden sich derzeit in klinischer Erprobung (Carter, 2001). Hauptsächlich stellen hämatologische Erkrankungen das Einsatzgebiet von monoklonalen Antikörpern dar. Gründe dafür sind vor allem die gute Zugänglichkeit der Tumorzellen, die mit malignen Tumorzellen verbundenen spezifischen Antigene (wie z.B. CD19, CD20, CD30, CD33) und die erhöhte Empfindlichkeit der Tumorzellen auf den durch Antikörper vermittelten Zelltod (Dillman et al., 2001). Jedoch werden monoklonale Antikörper derzeit meist noch in Kombination mit Chemotherapeutika eingesetzt. Es werden ausserdem unterschiedliche Anstrengungen unternommen, deren Toxizität zu steigern und die Dosis der Chemotherapeutika zu erniedrigen. Beispiele hierfür sind bispezifische Antikörper oder Radioimmunkonjugate. Trotz der Fortschritte, die bisher in der Krebstherapie mit monoklonalen Antikörpern gemacht wurden, gibt es noch mehrere Hindernisse bis zur erfolgreichen Antikörpertherapie zu überwinden, beispielsweise die Identifizierung tumorspezifischer Antigene, die unterschiedliche Dichte der Antigene auf den Tumorzellen, der geringe Erfolg von Antikörpern bei grossen Tumormassen oder oft auch das Unvermögen des Antikörpers, den Zelltod auszulösen (Countouriotis et al., 2002).

Ebenso sind die meisten, derzeit in der Klinik eingesetzten therapeutischen monoklonalen Antikörper, Antikörper vom IgG-Typ.

Rituximab® ist ein chimärer anti-CD20-Antikörper, der in der Klinik für die Therapie des Rezidivs oder auch in Kombination mit Chemotherapeutika zur Erstbehandlung von grosszelligen diffusen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugelassen ist (Bokemeyer, Panse, 2005). Rituximab® ist ein monoklonales, gentechnisch hergestelltes IgG1 Kappa-Immunglobulin, welches aus einer variablen Maus- und einer konstanten humanen Region besteht. Chimäre Antikörper sind weniger immunogen als murine Antikörper und haben

ausserdem den Vorteil, dass aufgrund der humanen Fc-Region eine effektive Aktivierung des menschlichen Immunsystems möglich ist, während bei reinen murinen Antikörpern beispielsweise eine Komplementbindung nicht möglich ist (Winkler et al., 1999). Diskutiert wird derzeit, dass Rituximab® über mehrere Mechanismen wirkt, vor allem über zellulär vermittelte Zytotoxizität (ADCC), komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) und über signalinduzierte Apoptose (Cartron et al., 2004). Doch die Rolle des Komplementsystems ist bei diesem Antikörper noch wenig überzeugend (Teeling et al., 2004).

Desweiteren benötigt die Wirkung der Antikörper über komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC) die Bindung von zehnmal mehr Antikörpern auf der Zelloberfläche des Zielantigens, als es die zellulär vermittelte Zytotoxizität (ADCC) benötigt (Dyer et al., 1989). Deshalb lösen also die IgG-Antikörper eher die zellulär vermittelte Zytotoxizität aus, und nicht oft wird eine genügend hohe Dichte an Antikörpern auf der Zelloberfläche erreicht, um die komplement-vermittelte Zytotoxizität auszulösen (Cragg et al., 2003; Xia et al., 1993).

Anhand dieser Daten wäre es sinnvoll, an der Entwicklung von IgM-Antikörpern zur Krebstherapie zu arbeiten: *In vivo* Versuche in der Krebstherapie haben bereits gezeigt, dass monoklonale IgM-Antikörper eine Tumorregression auslösen können (Irie et al., 2004). Diese Ergebnisse können der ausgeprägten Fähigkeit von IgM, Komplement zu binden und zu aktivieren, zugeschrieben werden (Jian Li et al., 2006). Aus diesem Grund erscheint eine Evaluierung von IgM-Antikörpern im Hinblick auf einen klinischen Einsatz sinnvoll. Die ersten Schritte auf diesem Weg sind die Antikörperproduktion und ausgiebige präklinische Testung.

In dieser Arbeit wird die Herstellung, Aufreinigung und funktionelle *in vitro*-Testung eines CD33-spezifischen IgM-Antikörpers vorgestellt.

5.2. Komplement vermittelte Zytotoxizität monoklonaler Antikörper an CD33-antigentragenden Zellen

Die akute myeloische Leukämie ist der bei Erwachsenen am häufigsten vorkommende Leukämie-Typ: 14,1 von 100 000 Menschen älter als 65 Jahre erkranken an einer akuten myeloischen Leukämie (Ries et al., 2000). Das CD33-Antigen stellt ein gutes Therapieziel der akuten myeloischen Leukämie mit monoklonalen Antikörpern dar: es wird bei annähernd

85% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie auf der Oberfläche der leukämischen Blasten exprimiert (Andrews et al., 1989), es befindet sich jedoch nicht auf normalen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (Griffin et al., 1984). Mit diesem tumorspezifischen Antigen könnte man eins der Hindernisse der erfolgreichen Antikörpertherapie überwinden: die Zerstörung gesunder Körperzellen.

Jedoch zeigten sich bisher Grenzen in der CD33-vermittelten-Antigen-Therapie der akuten Leukämie mit unmodifizierten monoklonalen Antikörpern: beispielsweise wurde ein getesteter muriner Antikörper schlecht von menschlichen Antigen-präsentierenden Zellen erkannt (Ruffer et al., 2000). Ebenso wurde durch die Bindung dieses monoklonalen Antikörpers an das CD33-Antigen kein intrazelluläres Signal beobachtet, es kam also nicht zum erwarteten Zelltod. Deshalb entwickelte man den seit 2000 zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie zugelassenen modifizierten monoklonalen Antikörper Mylotarg®, der durch Internalisation in die Zelle und die dortige Abgabe des Chemotherapeutikums Calicheamicin den Zelltod durch Apoptose auslöst (Zein et al., 1988). Doch die Ansprechraten bei der Rezidivtherapie einer akuten myeloischen Leukämie betragen derzeit nur zwischen 20 und 30% (Brethon et al., 2006). Auch Versuche, Mylotarg® bei älteren Patienten mit akuter myeloischer Leukämie als erste Induktionstherapie einzusetzen, waren wenig ermutigend (Estey et al., 2002).

Da das CD33-Antigen aber ein tumorspezifisches Antigen ist, wird es in dieser Arbeit im Hinblick auf die Entwicklung eines IgM-Antikörpers zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie als Zielantigen verwendet.

Antikörper entfalten ihre Aktivität durch die Bindung an die Tumorzelle über die Blockade von Signaltransduktionswegen, durch die lokale Initiierung der Komplementkaskade oder durch die Rekrutierung von Effektorzellen (Clynes et al. 2000; Fliegler et al. 2000; Shan et al. 2000). In der Therapie der akuten myeloischen Leukämie wurde -wie oben beschrieben- mit dem monoklonalen Antikörper Mylotarg® versucht, eine direkte Wirkung auf die Tumorzelle zu erzielen. Trotz einiger Erfolge ist das derzeitige Ansprechen auf diese Therapie teilweise gering, so dass in dieser Arbeit *in vitro* versucht wurde, über den indirekten Weg der Initiierung der Komplementkaskade die CD33-spezifischen Tumorzellen zu lysieren.

Die Komplementkaskade über den klassischen Weg wird ausgelöst, wenn C1q, die erste Komponente des Komplementsystems, an die CH₂-Domäne der Antikörper eines IgM- oder IgG-Antikörpers im Komplex mit einem Antigen bindet (Sakano et al., 1979; Ellerson et al., 1976). Diese Antikörper können IgG- oder IgM-Antikörper sein. IgM kann das Komplementsystem effektiver aktivieren als IgG, da ein Molekül IgM eine Reaktion auslösen kann, bei der Aktivierung des Komplementsystems durch IgG müssen mindestens zwei Moleküle vorhanden sein (Borsos and Rapp, 1965; Ishizaka et al., 1968). Deshalb wurden in dieser Arbeit beide Antikörper im Bezug auf ihre Fähigkeit, CD33-spezifische Tumorzellen zu lysieren, getestet und miteinander verglichen.

Um diese Versuche mit dem anti-CD33-IgM-Antikörper durchführen zu können war es notwendig, eine ausreichende Menge des Antikörpers zu produzieren. Ein möglicher Weg zur Proteinproduktion zumindest für präklinische Untersuchungen stellt die transiente Proteinexpression dar.

5.3. Transiente Proteinproduktion in 293 HEK (human embryonic kidney)-Zellen

Um Antikörper *in vitro* und gegebenenfalls *in vivo* testen und anwenden zu können, ist die Produktion ausreichender Proteinmengen erforderlich. Da mikrobielle Expressionssysteme bei grösseren Proteinen häufig überfordert sind, und ausserdem eine falsche Proteinkonformation nach mikrobieller Expression die Funktionalität deutlich beeinflussen oder gar behindern kann, war für die Expression von diesem Antikörper ein System mit Säuger- bzw. humanen Zellen wünschenswert. Nicht jedes Protein lässt sich gleich gut exprimieren, und häufig ist die Ausbeute an produziertem Protein sehr gering, so dass dies limitierend für den Ablauf der *in vitro*-Versuche sein kann. Mit der stabilen Transfektion von Zelllinien kann man dieses Problem möglicherweise umgehen und eine größere Proteinausbeute erzielen. Allerdings ist die Herstellung einer stabilen Zelllinie zeit- und kostenaufwändig. Außerdem ist dieses System unflexibel. Wenn man in kürzerer Zeit mehrere Konstrukte herstellen möchte, um diese vergleichend zu testen und gegebenenfalls aus den gewonnenen Erkenntnissen weitere Verbesserungen an diesen Konstrukten vorzunehmen, würde dies eine langwierige Herstellung vieler stabiler Zelllinien bedeuten. Ein transientes Transfektionssystem ist wesentlich schneller und flexibler, hat allerdings häufig den Nachteil einer zu geringen Proteinausbeute. Dies liegt unter anderem daran, dass in diesem System

häufig adhärenzte Zelllinien zum Einsatz kommen. Dies beeinträchtigt natürlich die Proteinproduktion in grösserem Massstab. Im Jahr 2001 gelang es der Arbeitsgruppe um Florian Wurm, ein transientes Expressionssystem zu etablieren, das die Produktion relevanter Proteinmengen in einem größeren Massstab erlaubt. Dieses System arbeitet mit „human embryonic kidney“ (HEK)-293 Zellen, die in langer Selektion an serumfreie Bedingungen adaptiert wurden und deshalb in Suspension wachsen können. Dies ermöglicht eine Proteinproduktion in grösserem Massstab durch Transfektionsansätze in Rührflaschen oder sogar Bioreaktoren. Ausserdem wurde die Proteinproduktion durch Herstellung von Expressionsvektoren auf Basis des EBV-nuclear antigens (EBNA) optimiert. Die Transfektion selbst basiert auf der altbekannten Calcium-Phosphat Methode, wurde jedoch für die HEK293-Zelllinie zeit- und dosisoptimiert, um die grösstmögliche Anzahl von Zellen im Kulturansatz zu transfizieren. Dieses System vereint nun die Vorzüge einer genügenden Proteinproduktion für die Austestung eines neuen Konstruktes mit der nötigen Schnelligkeit und Flexibilität und erlaubt somit, rasch mehrere Konstrukte zu produzieren und zu testen. Für vorklinische Versuche stellt dieses transiente HEK293-EBNA-System eine deutliche Verbesserung dar (Meissner et al., 2001).

5.4. Der IgM-Antikörper

5.4.1. Überblick über den IgM-Antikörper in Labor und Klinik

In vivo wurden Studien mit IgM-Antikörpern durchgeführt: L612 HuMab ist ein chimärer, monoklonaler IgM-Antikörper, der an die Oberflächen von Zellen eines malignes Melanoms bindet und diese in Anwesenheit von Komplement lysieren kann (Irie et al., 2004). L612 bindet an GM3, ein Gangliosid, welches sich auf Melanomzellen deutlich mehr und dichter als auf normalen Körperzellen findet (Azuma et al., 2007). Dieser chimäre L612 HuMab IgM-Antikörper aktiviert *in vitro* das Komplementsystem wesentlich effizienter als der chimäre L612 HuMab IgG-Antikörper (Hoon et al., 1993). Retrospektive Analysen haben ebenfalls gezeigt, dass hohe Titer eines gegen ein Gangliosid auf der Oberfläche der Melanomzellen gerichteten IgM-Antikörpers, aber nicht eines IgG-Antikörpers, mit guten Prognosen korrelieren (Jones et al., 1981).

In einer Studie über die Reaktion zwischen HIV-infizierten Zellen und IgM-Antikörpern wurde ein weiterer Vorteil des IgM-Antikörpers beschrieben: viele Zellen sind gegen das Komplementsystem über Membranhemolysine geschützt, einige Zellen exprimieren komplement-inaktivierende Faktoren, wie DAF (decay-activating factor) oder CD59-Antigen (Davies et al., 1989). Doch der IgM-Antikörper scheint im Gegensatz zum IgG-Antikörper gegen diese Inhibitoren resistent zu sein (Okada et al., 2005). CD59 ist überexprimiert auf Tumorzellen (Niehans et al., 1996), und die Expression dieses Antigens wurde in Zusammenhang gebracht mit der Resistenz einiger Lymphom-Patienten gegenüber der Rituximab-Therapie (Treon et al., 2001).

5.4.2. IgM-Antikörper von Tumorpatienten

Ein weiteres Beispiel für einen monoklonalen IgM-Antikörper ist der SC-1-Antikörper, der in der Klinik an Patienten mit Magenkarzinom getestet wurde (Vollmers et al., 2002). Zwei Tage nach der Injektion einer Einzeldosis des SC-1-Antikörpers war der apoptotische Effekt des Antikörpers sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen sichtbar (Vollmers et al., 1998). Klinische Studien haben gezeigt, dass dieser SC-1-Antikörper die Regression und Apoptose von primären Magenkarzinomen induziert, ohne eine toxische Kreuzreaktion mit normalem Gewebe zu zeigen (Vollmers et al., 1997). Dieser SC-1-Antikörper ist ein IgM-Antikörper, der aus den B-Zellen von Patienten mit Siegelringkarzinom des Magens isoliert wurde (Vollmers et al., 1989). Die von Tumorpatienten isolierten, tumorspezifischen monoklonalen Antikörper zeigten einige Gemeinsamkeiten, vor allem aber waren diese Antikörper vom IgM-Isotyp (Brändlein et al., 2003). Auch der tumorspezifische monoklonale IgM-Antikörper PAM-1 wurde von Patienten mit einem Magenkarzinom isoliert (Vollmers et al., 1994).

5.4.3. IgM als Pentamer/Hexamer

Der IgM-Antikörper wird beschrieben als pentamerer Molekül, zusammengesetzt aus fünf monomeren IgM-Untereinheiten und einer J-Kette (Koshland, 1985). *In vitro* wurde gezeigt, dass sich die IgM-Monomere in Anwesenheit der J-Kette zu einer pentameren Struktur

formen. In Abwesenheit der J-Kette entstanden meist Hexamere, aber auch Pentamere und weitere Formen (Kownatzki, 1973).

Eins der stärksten Argumente gegen die Tumorthherapie mit IgM-Antikörpern war jedoch immer, dass das pentamere IgM-Molekül mit einem Gewicht von annähernd 1 Million Da das Endothel der Blutgefäße nicht durchdringen und deshalb nicht in die umliegenden Gewebe penetrieren kann (Jain et al., 1988). Jedoch zeigten Analysen von menschlichen Tumoren, dass die Blutgefäße in Tumoren eine Mischung aus normalen und veränderten Gefäßen bilden (Peterson, 1979). Tumormikrogefäße sind im Allgemeinen chaotisch angeordnet, und auch die Innervation fehlt oft, so dass sie eine höhere Permeabilität für Makromoleküle haben, als normale Gefäße (Dvorak et al., 1991).

Wie bereits gesagt, aktiviert ein IgM-Antikörper das Komplementsystem effizienter als ein IgG-Antikörper. Es lassen sich aber auch Unterschiede zwischen IgM als Pentamer und IgM als Hexamer im Bezug auf die Aktivierung des Komplementsystems feststellen: ein chimärer IgM-Antikörper aktiviert das Komplementsystem 4-13-fach stärker in Form eines Hexamers als in Form des pentameren Moleküls (Collins et al., 2002). Aber die J-Kette ist auch verantwortlich für den Transport der grossen Moleküle über Barrieren, indem sie an spezifische polymere Immunglobulinrezeptoren auf Epithelzellen bindet. Dadurch wird der transzelluläre Transport der Antikörper mittels Transzytose, einem rezeptorabhängigen Transport von extrazellulärem Material durch die Zelle hindurch, ermöglicht (Mostov, 1994).

Aufgrund der hier beschriebenen Vorteile des IgM-Antikörpers und einiger, oben beschriebener Daten bezüglich des IgG-Antikörpers, wurden in dieser Arbeit beide Antikörper im Bezug auf das Komplementsystem *in vitro* getestet.

5.5. Vergleich beider Antikörper in dieser Arbeit

5.5.1. Affinität der Antikörper an das CD33-Antigen

Durchflusszytometrisch wurde gezeigt, dass der IgG- und der IgM-Antikörper eine ähnliche Affinität für das CD33-Antigen besitzen. Die Affinität eines Antikörpers, die die Bindung

zwischen einem Fab-Teil und einem Antigen misst, steht in Beziehung zur Avidität des Antikörpers, die die gesamte Bindungsstärke zwischen einem multivalenten Antikörper und seinen Antigenen misst (Rosen et al., 1989). Die Avidität ist abhängig von der Affinität der Einzelbindung, von der Anzahl der Bindungsstellen pro Antikörper und von der Antigendichte auf den Tumorzellen (Adams et al., 2006). IgM als pentameres Molekül besitzt zehn identische Antigenbindungsstellen. Die Affinität jeder einzelnen Bindungsstelle für das Antigen ist normalerweise relativ niedrig, aber die Avidität ist sehr hoch, da beim Lösen des Antikörpers vom Antigen alle Bindungsstellen gleichzeitig vom Antigen abdissoziieren müssen. Trotz der gesteigerten Avidität des IgM-Antikörpers lässt sich keine gesteigerte Affinität im Vergleich mit dem IgG-Antikörper feststellen. Dies könnte auf einen doch vorhandenen leichteren Affinitätsverlust des IgM-Antikörpers zurückzuführen sein, der durch seine höhere Avidität wieder ausgeglichen wird, wodurch eine ähnliche Gesamtaffinität wie die des IgG-Antikörpers resultiert. Es könnte aber auch an der sterischen Inhibition der Bindung durch das grosse IgM-Molekül liegen.

Zu erwähnen dabei ist, dass die FACS-Messungen nur einen groben Hinweis auf die Affinität liefern. Genaue Affinitätsmessungen müssten später im BIAcore System erfolgen. Dieses nutzt die Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR) zur Messung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen qualitativ (Spezifität) und quantitativ (Konzentration, Affinitätskonstanten und Geschwindigkeitskonstanten).

5.5.2. Aktivierung des Komplementsystems und Lyse der Zellen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei einer Konzentration von 50µg/ml der CD33-spezifische IgM-Antikörper bis zu 70% der CD33-spezifischen CHO-Zellen lysiert, der IgG-Antikörper bei einer Konzentration von 50 µg/ml nur bis zu 55% der Zellen. Da durchflusszytometrisch nachgewiesen wurde, dass die beiden Antikörper eine ähnliche Affinität für das Zielantigen besitzen und beide Versuche unter den gleichen Ausgangsbedingungen durchgeführt wurden, kann man davon ausgehen, dass der IgM-Antikörper das Komplementsystem stärker aktivieren kann als der IgG-Antikörper. Auch Poon et al. zeigten 1994 in ihrer Arbeit mit roten Blutkörperchen aus Meerschweinchenseren, dass 50% Zellen von 0,2µg/ml IgM-Antikörpern lysiert wurden, während um die gleiche

Prozentzahl der Zellen durch einen IgG-Antikörper zu lysieren, 3 μ g/ml dieses Antikörpers benötigt wurden.

Doch in diesen Vergleichen wird von beiden Antikörpern als Einzelmolekül ausgegangen. Zwar kommt der IgG-Antikörper fast immer als Einzelmolekül vor, jedoch wird IgM meist als pentameres Molekül, bestehend aus fünf IgM-Untereinheiten und einer J-Kette, beschrieben (Koshland, M.E., 1985). IgM kommt auch in einer ebenfalls biologisch aktiven Form vor, als Hexamer ohne die J-Kette. Diese IgM-Form ist wesentlich potenter in der Aktivierung des Komplementsystems als die pentamere Form (Randall et al., 1990). IgM als Hexamer aktiviert das Komplementsystem 15 bis 20mal effektiver als IgM in Pentamerform (Davis et al., 1988; Randall et al., 1990). Jedoch liegt der IgM-Antikörper im menschlichen Körper vor allem als pentameres IgM-Molekül vor. Um vergleichbare Molaritäten zu erlangen, wurde näherungsweise in dieser Arbeit die 5fache Konzentration des IgM-Antikörpers eingesetzt, allerdings ohne die Benutzung einer J-Kette. Verglichen wurde dies mit der einfachen Konzentration des IgG-Antikörpers in Bezug auf die Lyse CD33-positiver CHO-Zellen. 50 μ g/ml (= 4,76 μ mol/ml) des IgM-Antikörpers lysierten bis zu 75% der CD33-positiven CHO-Zellen und im Vergleich dazu lysierten 10 μ g/ml (= 6,25 μ mol/ml) bis zu 55% der Zellen. Ebenfalls lässt sich im Kurvenverlauf erkennen, dass bei zunehmender Verdünnung der Antikörper die Lysekurve des IgG-Antikörpers wesentlich schneller abfällt, als die des IgM-Antikörpers. Letztendlich ist deutlich erkennbar, dass der IgM-Antikörper eine bessere Zelllyse macht, als der IgG-Antikörper.

Anhand dieser *in vitro* Daten würde sich dieser Versuch auch *in vivo* durchführen lassen.

5.6. Ausblick

Abschliessend lässt sich sagen, dass der IgM-Antikörper aufgrund der oben genannten und in dieser Arbeit teilweise dargestellten Vorteile im Bezug auf das Komplementsystem ein wichtiger Ansatzpunkt ist, um die Tumorthherapie mit monoklonalen Antikörpern voranzutreiben. Das in dieser Arbeit beschriebene Immunglobulin muss zunächst noch weiter *in vitro* untersucht werden. Weitere Ansätze wären der Einsatz einer J-Kette und der Vergleich der IgM-Antikörper im Bezug auf die Lyse mit und ohne J-Kette. Ebenfalls sollte die oben beschriebene Affinitätsmessung im BIAcore erfolgen. Im Anschluss wäre eine

weitere Untersuchung im Mausmodell mit CD33 positiven Tumorzellen denkbar. Parallel dazu müsste zur Produktion grösserer Antikörpermengen für weitere präklinische Versuche und zur genaueren Charakterisierung des Antikörpers eine stabile Zelllinie etabliert und die Produktion des Antikörpers unter GMP-Bedingungen sichergestellt werden.

Bei entsprechendem Verlauf der weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Experimente wäre dann der letzte Schritt eine Phase I/II-Studie im Menschen.