

6. Diskussion

6.1 Antikörpergestützte Therapien des M. Hodgkin

Aufgrund der vielversprechenden Aussichten in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern werden unterschiedliche Bestrebungen unternommen, die Toxizität der monoklonalen Antikörper zu steigern. Beispiele hierfür sind bispezifische Antikörper, Immuntoxine- oder Radioimmunokonjugate.

Der bispezifische anti-CD16/anti-CD30-Antikörper (BimAb) wurde entwickelt, um CD16-positive natürliche Killerzellen mit CD30-positiven Hodgkin-Tumoren zu vernetzen und somit eine gezielte Zerstörung der Tumorzellen zu erreichen. Dieser Antikörper konnte im Tiermodell [RENNER C et al. 1994] seine tumortoxische Wirksamkeit beweisen. In zwei klinischen Phase I/II-Studien zeigte der anti-CD16/anti-CD30-BimAb eine objektive Ansprechrate von 29% [RENNER C et al. 1996, HARTMANN F et al. 1997, 1998, 2001]. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des bispezifischen Antikörpers konnte die maximal tolerierte Dosis (MTD) nicht erreicht werden. Die bisher maximal applizierte Dosis lag bei 64 mg/m². Die eingeschränkte Verfügbarkeit war durch die aufwendige Herstellung bedingt [HARTMANN F et al. 2001]. Außerdem konnte in keiner der beiden klinischen Studien eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung oder eine Dosis-Toxizitäts-Beziehung beschrieben noch konnte ein immunologischer Parameter definiert werden, der eine Aussage über ein mögliches Therapieansprechen zulassen würde [HARTMANN F et al. 1997, 2001]. Die Ergebnisse beider Studien erlauben aufgrund der Datenlage derzeit keine größeren klinischen Phase II/III-Studien.

Gegenstand dieser Arbeit ist die radioaktive Markierung des anti-CD16/anti-CD30-BimAb und des elterlichen Antikörpers anti-CD30-HRS-3 mit Jod (¹²⁵I, ¹³¹I) und Indium (¹¹¹In), die Darstellung der Bindungseigenschaften vor und nach dem Prozess der radioaktiven Markierung und die Untersuchung der Biodistributionseigenschaften des BimAb im Vergleich zu seinem elterlichen Antikörper HRS-3 in einem SCID-Mausmodell.

6.2 Auswahl des Tiermodells

Das Hodgkin-Lymphom eignet sich aufgrund seiner histologischen Anordnung mit einer malignen Zelle, die von mehreren nicht malignen Bystander-Zellen umgeben ist, und seiner guten Vaskularisierung hervorragend für immuntherapeutische Ansätze. Um dieser Situation Rechnung zu tragen, wurde ein Tiermodell entwickelt, in dem die Xenograft-Tumorzellen intravenös appliziert wurden und zu einem disseminierten Tumorbefall verschiedener Organe, besonders der Lymphknoten, Leber, Knochen und Lunge führten [WINKLER U et al. 1994, RENNER C et al. 1996]. In diesem Modell kam es

nach Einsatz von bispezifischen Antikörpern in Abhängigkeit der Tumorlast zu einer vollständigen Beseitigung des Tumorgewebes [RENNER C et al. 1996].

Obwohl dieses Modell der im Menschen auftretenden Tumorsituation am nächsten kommt, ist es für eine Biodistribution aufgrund des diffusen Organbefalls nicht geeignet. Eine Aussage über einen tumorspezifischen Uptake könnte nicht getroffen werden. Zur besseren Darstellung des tumorspezifischen Uptakes wurde ein Tiermodell mit einem soliden CD30-positiven und einem CD30-negativen Xenograft-Tumor gewählt.

6.3 Markierung der Antikörper

Für die Biodistribution der Antikörper war es notwendig, die Antikörper mit Nukliden zu markieren, um die Aufnahme in den jeweiligen Geweben zu detektieren. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Antikörper mit dem technisch einfacheren und günstigeren Verfahren der Jodmarkierung nach Bolton und Hunter mit ^{125}I oder ^{131}I markiert. Da sich im Verlauf der ersten Tierversuchsreihen nur ein geringer Tumoruptake im CD30-positiven Zieltumor zeigte, wurden die Antikörper für die zweite Versuchreihe mit Indium markiert. Ein geringer Tumoruptake von jodmarkierten Antikörpern wurde in mehreren Antikörperstudien beschrieben [CLARKE K et al. 2000]. Der Grund liegt in der Metabolisierung des Jods. Die Testreihen nach der radioaktiven Markierung zeigten, dass sich die Antikörper A9, HRS-3 und BimAb mit Jod (^{125}I oder ^{131}I) und die Antikörper HRS-3 und BimAb auch mit Indium (^{111}In) effizient markieren lassen und die Antikörper danach eine ausreichende immunologische Bindungsaktivität besitzen. Dies konnte durch Testung nach Lindmo bewiesen werden [LINDMO T et al. 1984].

6.4 Affinität der Antikörper A9, HRS-3 und BimAb

Eine fundamentale Grundlage von Antikörper-Studien ist die Tatsache, dass der Antikörper den Tumor in einem optimalen Verhältnis zwischen Tumor- und Normalgewebe spezifisch erreichen muss [SCOTT AM et al. 1997]. Wichtig für den spezifischen Uptake des Antikörpers im Tumorgewebe sind die Affinität gegenüber seinem Zielantigen und die molekulare Größe des Antikörpers.

Die unterschiedlichen Affinitäten der Antikörper A9 und BimAb gegenüber dem CD16-Antigen und die Affinität des HRS-3 und des BimAb gegenüber dem CD30-Antigen wurden durch Untersuchungen mit dem BIAcore-System belegt. Erwartungsgemäß zeigte sich ein Bindungsverlust des monovalent-bindenden bispezifischen Antikörpers gegenüber den bivalent-bindenden elterlichen Antikörpern A9 und HRS-3. Auch die Untersuchungen nach Scatchard zeigten, dass der markierte HRS-3 eine höhere Affinität

als der monovalent-bindende BimAb besitzt. Diese Aussage wurde im direkten Vergleich der Antikörper durch Inhibitionstestreihen bestätigt.

Der einfache Vergleich der Affinitätskonstanten, die mit dem BIAcore-Verfahren und mit der Scatchard-Methode erhoben wurden, ist nicht möglich, da es sich um zu unterschiedliche Verfahren handelt. In wenigen publizierten Untersuchungen wurden beide Verfahren zur Affinitätsbestimmung eingesetzt. Dabei zeigten sich teilweise große Unterschiede zwischen den gemessenen Affinitätskonstanten der untersuchten Antikörper. Beispielsweise wurde das Bindungsverhalten des Antikörpers Cetuximab gegenüber EGFRvIII bestimmt. Der Unterschied der Affinitätskonstanten mit einer K_D von 0,38 nM nach Scatchard und einer K_D von 1,1 nM nach den BIAcore-Verfahren ist eher gering [PATEL D et al. 2007]. Deutlich größere Unterschiede für die Affinitätskonstanten ergaben sich bei der Untersuchung des monoklonalen Antikörpers CC49, der an ein tumorassoziertes Mucin bindet, und seinen dimeren und monomeren scFv-Varianten. Die Unterschiede der einzelnen Affinitätskonstanten variierten zwischen einem Faktor von 70 bis 300 [PAVLINKOVA G et al. 1999].

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, wie die Affinität, die Avidität und die Molekülgröße den Tumoruption und die Funktionalität des Antikörpers bzw. des Antikörperkonstruktes beeinflussen. Mit unterschiedlich affinen bispezifischen fusionierten scFv-Konstrukten konnten McCall et al. *in-vitro* nachweisen, dass eine höhere Affinität gegenüber dem Zielantigen zu einer vermehrten Tumorzell-Lyse führte. In diesem Modell wurden bispezifische scFv-Konstrukte verwendet, die mit einem Anteil am CD16-Antigen binden und mit dem zweiten Anteil an HER2/neu. Die Affinität gegenüber HER2/neu der einzelnen Konstrukte variierte zwischen $1,7 \cdot 10^{-7}$ M und $1,7 \cdot 10^{-10}$ M. Interessanterweise zeigte der ursprüngliche bispezifische Antikörper 2B1, mit einer Affinität gegenüber HER2/neu von $2,3 \cdot 10^{-8}$ M, bereits in geringeren Konzentrationen eine hohe Lyserate, die mit den affineren Konstrukten nicht erreicht wurde. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die Affinität einen wichtigen, aber nicht den alleinigen Faktor darstellt [MCCALL AM et al. 2001].

Adams und Mitarbeiter konnten in mehreren *In-vivo*-Untersuchungen mit unterschiedlich affinen, gegen HER2/neu gerichteten scFv zeigen, dass die einzelnen Varianten der Antikörper eine Affinitäts-Schwelle überschreiten mussten, um eine tumorselektive Penetration und Retention zu erreichen. Diese minimale Affinität lag im Bereich von 10^{-8} M [ADAMS GP et al. 1998]. Zudem führt eine Steigerung der Affinität über $1,5 \cdot 10^{-9}$ M nicht zu einer Steigerung des Tumoruptions, sondern zu einer Plateauphase [ADAMS GP et al. 2001]. Die histologischen Untersuchungen der Gewebeschnitte zeigten, dass sich scFv-Konstrukte mit niedriger Affinität besser und gleichmäßiger im Tumor verteilen als Antikörperkonstrukte mit hoher Affinität. Diese Konstrukte wurden besonders in der Nähe der Blutgefäße nachgewiesen [ADAMS GP et

al. 2001]. Eine zu enge Bindung des Antikörpers an seinem Zielantigen hat nicht zwangsläufig die erhoffte positive Auswirkung auf die Aufnahme und Verteilung des Antikörpers zur Folge. Es entsteht ein sogenannter Barriereneffekt an der Bindungsseite [FUJIMORI K et al. 1990, WEINSTEIN et al. 1992, JUWEID M et al. 1992]. Im Gegensatz dazu zeigten Antikörper mit niedriger Affinität eine gleichmäßigere Verteilung im Tumorgewebe. Dieses Hindernis wird den Interaktionen mit den ersten Antigenen zugeschrieben, die sich am Rand des Tumors befinden und ein weiteres Eindringen des Antikörpers in den Tumor verhindern. Die Applikation einer höheren Dosis an Antikörpern kann den Barriereneffekt teilweise überwinden und die Antikörper dringen tiefer in den Tumor ein [BLUMENTHAL RD et al. 1991]. Aus diesen Gründen haben die meisten derzeit zur Diagnostik oder Therapie eingesetzten Antikörper eine Affinität im Bereich von 10^{-9} M [DEYEV SM et al. 2008].

Neben der Affinität hat auch die Molekülgröße einen entscheidenden Einfluss auf den Uptake des Antikörpers bzw. Antikörperkonstruktes in den Tumor. Solide Tumore sind durch einen hohen intestinalen Druck charakterisiert [JAIN RK et al. 1988]. Ein hoher intestinaler Druck inhibiert die Diffusion großer Moleküle in den Tumor [SHARKEY et al. 2006]. Der Einfluss der Molekülgröße lässt sich an den zahlreichen Untersuchungen sehen, in denen 160 kDa große monoklonale Antikörper, 100 kDa große $F(ab)_2$ -Fragmente und 25 kDa große scFv verwendet wurden. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass kleine Moleküle schneller im Tumor aufgenommen wurden, aber wesentlich kürzer dort verweilten und einer rascheren Elimination unterlagen. So zeigten scFv einen frühen Tumoruptake und eine schnellere Clearance, wohingegen die intakten monoklonalen Antikörper ihr Uptake-Maximum erst nach Tagen erreichten, dafür eine verlängerte Clearance und einen höheren Uptake aufwiesen [WEINER LM et al. 1995, HUSTON JS et al. 1996, ADAMS GP et al. 1998]. Zudem war die aufgenommene Menge an Antikörpern bei größeren Molekülen größer als bei kleineren. Dieser Einfluss wurde in der Biodistribution des Antikörpers hu3S193, des hu3S193- $F(ab)_2$ -Fragmentes und des hu3S193-Diabodys verdeutlicht. Hier zeigte sich für die verschiedenen großen Konstrukte eine unterschiedliche Kinetik bezüglich des Tumoruptakes. Der Diabody (50 kDa) erreichte sein Maximum bereits nach einer Stunde, das $F(ab)_2$ -Fragment nach acht Stunden und der intakte hu3S193-Antikörper nach 48 Stunden [CLARKE K et al. 2000, TAHTIS K et al. 2001].

Anhand von monovalent und bivalent bindenden Diabodies konnte Adams 2006 den positiven Einfluss der Avidität auf die Tumorretention der Antikörperkonstrukte belegen [ADAMS GP et al. 2006].

Zusammenfassend müssen für jeden Antikörper bzw. für jedes Antikörperkonstrukt die idealen Voraussetzungen im Bezug auf Affinität, Molekülgröße und Applikationsregime in Anhängigkeit seines Einsatzgebietes gewählt werden. In unserem Hodgkin-Modell scheint die hohe Affinität des elterlichen anti-CD30-HRS-3 ausreichend zu sein, um eine

gute Tumor-Penetration und Bindung in einer bivalenten und monovalenten Form zu erreichen. Wichtig ist die hohe Affinität des HRS-3 gegenüber dem CD30-Antigen und der Unterschied in der Affinität zwischen dem bivalent bindenden HRS-3 und dem monovalent bindenden BimAb. Trotz der unterschiedlichen Affinität ergab sich kein signifikanter Unterschied im Tumoruption und somit in den Tumor-Targeting-Eigenschaften der Antikörper. Die Tumorpenetration und Clearance von den Tumorzellen war praktisch für beide Konstrukte identisch. Zusätzlich waren beide Antikörper in Bezug auf ihre Biodistributionsprofile in den CD30-negativen Geweben und im Bezug auf die Elimination aus dem Körper sehr ähnlich. Somit ist die Affinität des BimAb ausreichend. Die Steigerung der Affinität und Avidität, wie sie der bivalente HRS-3 darstellt, führen nicht zu einer Steigerung des Tumoruptions.

6.5 Bindung an CD16

Die Wirksamkeit des anti-CD16/anti-CD30-bispezifischen Antikörpers durch Rekrutierung und Aktivierung von CD16-positiven natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) konnte in mehreren *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen dargestellt werden [HOMBACH A et al. 1993, RENNER C et al. 1995, RENNER C et al. 1997]. Neben der Aktivierung der NK-Zellen ist es möglich, T-Zellen über bispezifische Antikörper zur gezielten Tumorzelllyse zu aktivieren. T-Zellen benötigen im Gegensatz zu NK-Zellen für ihre Aktivierung zwei Signale. Deshalb wurden T-Zellen durch die Applikation von zwei bispezifischen Antikörpern, einem anti-CD3/anti-CD30- und einem anti-CD28/anti-CD30-bispezifischen Antikörper, aktiviert [POHL C et al. 1993]. In verschiedenen Tiermodellen konnten beide Therapieansätze ihre beeindruckende Wirksamkeit durch die einmalige Zugabe von humanen Lymphozyten unter Beweis stellen [HOMBACH A et al. 1993, RENNER C et al. 1995, RENNER et al. 1996]. Obwohl im Tiermodell die Tumorlyse durch aktivierte T-Zellen effektiver zu sein scheint [RENNER C et al. 1996, DA COSTA et al. 2000], wurde aus logistischen Gründen [DA COSTA et al. 2000] der anti-CD16/anti-CD30-bispezifische Antikörper für die ersten klinischen Versuche verwendet.

Am gewählten Tiermodell konnte der Einfluss der CD16-positiven NK-Zellen auf die Biodistribution in diesem Modell aus zwei Gründen nicht untersucht werden: Erstens hätten die NK-Zellen wie in den anderen Tiermodellen zu einer Lyse der CD30-positiven Tumoren geführt. Zweitens konnte die Situation im menschlichen Körper, in welchem ein zirkulierender Pool von CD16-positiven Zellen besteht, über einen Beobachtungszeitraum von bis zu sechs Tagen nicht nachgeahmt werden. Daher wurden im weiteren Verlauf die Bindungseigenschaften des radioaktiv markierten anti-CD16-Antikörpers A9 und des anti-CD16-Bindungsarmes des BimAb nicht weiter untersucht. Die CD16-positiven Zellen würden um die Bindung mit dem bispezifischen Antikörper konkurrieren.

Aufgrund der immunologischen Interaktionen der Antikörper sollte im Gegensatz zu Chemotherapiestudien nicht die maximal tolerierte Dosis (MTD) das Ziel der Dosisfindungsstudien sein, sondern die Antikörperdosierung mit den höchsten gegen den Tumor gerichteten immunologischen Effekten und mit der geringsten unspezifischen Aktivierung des Immunsystems. Gleiches gilt auch für die zunehmende *target*-Therapie mit *small molecules* [PARULEKAR WR et al. 2004]. Eindrucksvoll konnten einzelne Studien die Variabilität der MTD beim Einsatz bispezifischer Antikörper zeigen. Die MTD des 2B1 (anti-HER2/neu x anti-CD16) lag bei 2,5 mg/m² [MCCALL AM et al. 2001] und die MTD von Ertumaxomab (anti-HER2 x anti-CD3) wurde mit 100 µg ermittelt [KIEWE P et al. 2006], während die MTD des hier verwendeten BimAb bei klinischem Ansprechen mit 64 mg/m² noch nicht erreicht wurde.

Die Fähigkeit der Immunsystemaktivierung muss der Tumor-Targeting-Eigenschaft folgen. Nach dem spezifischen Tumor-Targeting muss das bispezifische Konstrukt in der Lage sein, das Immunsystem effizient für die lokale Tumorerstörung zu aktivieren [GROSSE-HOVEST L et al. 1999]. Die effiziente Aktivierung des Immunsystems ohne adäquates Targeting könnte zu allgemeiner und nicht spezifischer Toxizität führen. Daher sollte die Affinität gegenüber den Effektorzellen niedrig sein [MCCALL AM et al. 2001].

Die BIAcore-Untersuchungen zeigten, dass die Affinität des bispezifischen Antikörpers für das CD16-Antigen im Vergleich zur Affinität für das CD30-Antigen etwa acht Mal geringer ist. Dieser Unterschied in der Affinität könnte dem anti-CD16/anti-CD30-BimAb ermöglichen, in ausreichenden Mengen in den CD30-positiven Tumor zu penetrieren und dann lokale CD16-positive Effektorzellen zu aktivieren. Diese Theorie könnte das gute klinische Ansprechen, das bei Hodgkin-Patienten nach Behandlung mit bispezifischen Antikörpern beobachtet wurde, erklären. Allerdings ist diese Theorie noch nicht bewiesen und sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

6.6 Biodistribution der ¹²⁵I- und ¹¹¹In-markierten Antikörper

Der Antikörperuptake im Zieltumor, bezogen auf die injizierte Dosis pro Gramm Gewebe (%ID/g), war für ¹¹¹In-markierte Antikörper signifikant höher als für ¹²⁵I. Zusätzlich wurde ¹¹¹In über einen längeren Zeitraum in CD30-positiven Xenograft-Zieltumoren zurückbehalten als ¹²⁵I. Die Darstellung der spezifischen Aufnahme des Antikörpers im Zieltumor konnte durch die Markierung mit Indium deutlich besser dargestellt werden.

Das Phänomen des besseren Tumoruptakes von ¹¹¹In-markierten Antikörpern wurde auch in anderen Studien beobachtet. Die Arbeitsgruppe von Carrasquillo nutzte sowohl ¹³¹I- als auch ¹¹¹In-markierte T101-Antikörper, um kutane T-Zell-Lymphome beim Menschen zu detektieren. Für den ¹³¹I-markierten Antikörper zeigte sich eine rasche Clearance und der Verlust des ¹³¹I am T101-Antikörper. Im Gegensatz hierzu

zeigte der ^{111}In -T101-Antikörper eine verlängerte Retention in Leber, Milz und Knochenmark und einen ausgezeichneten Uptake in Hauttumoren und Lymphknoten [CARRASQUILLO JA et al. 1987]. Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete in einem Xenograftmodell für den chimären Antikörper ch806, der an ein Epitop des EGFR-Rezeptors bindet, ebenfalls einen niedrigeren Uptake an ^{125}I -markierten Antikörpers verglichen mit dem ^{111}In -markierten Antikörper. Die Aufnahme des ^{125}I -markierten Antikörpers im Tumor war nicht signifikant, wohingegen der ^{111}In -markierte Antikörper einen spezifischen Uptake von 31 % ID/g erreichte [PANOUSIS C et al. 2005].

Der unterschiedliche Uptake des Radiomarkers im Tumor ist Ausdruck eines unterschiedlichen zellularen Metabolismus des ^{125}I und des ^{111}In . Der Stoffwechsel des ^{125}I , das an Tyrosin gebunden wird, endet in der Bildung von ^{125}I -mono-Jodtyrosin in den Lysosomen. Diese verlassen die Zelle schnell über ein zellvermitteltes Transportsystem [PRESS OW et al. 1996, SHIH LB et al. 1994]. Durch diesen Metabolismus konnte nur eine geringe Aufnahme an jodmarkierten Antikörpern dargestellt werden.

^{111}In -DTPA-markierte Antikörper werden im Gegensatz zu ^{125}I -markierten Antikörpern nach der Endozytose zu Lysosomen transportiert und durch lysosomale Enzyme in niedrigmolekulargewichtige Metaboliten hydrolysiert. Diese verbleiben in den Tumor-Lysosomen [DUNCAN JR et al. 1997, PRESS OW et al. 1996]. Bei der Untersuchung der Normalgewebe zeigte sich eine hohe Aufnahme an ^{111}In in der Leber. Diese Beobachtung ist mit der bekannten Sequestration von Radiometallen in reticuloendothelialen Organen vereinbar [SHARKEY RM et al. 1990]. Für ^{125}I -markierte Antikörper zeigte sich keine vermehrte Aufnahme in der Leber.

Zusammenfassend wäre die aufwendigere und kostenintensivere Markierung mit Indium für weitere Biodistributionsuntersuchungen des BimAb sinnvoll. Ein wesentlicher Affinitätsunterschied zwischen Jod- und Indium-markierten Antikörpern besteht in dieser Arbeit nicht. In wenigen publizierten Antikörperstudien, die sowohl Jod- als auch Indium-markierte Antikörper nutzten, wurden Affinitätsunterschiede gefunden, die bis zu einem Faktor von maximal 1,43 reichten [TAHTIS K et al. 2001, CLARKE K et al. 2000, PANOUSIS C et al. 2005]. Eine einheitliche Regel bezüglich der Auswirkung der radioaktiven Markierung auf die Antikörper und besonders auf die kleineren Antikörperkonstrukte lässt sich anhand der bisherigen Ergebnisse nicht formulieren. Der Einfluss der chemischen Prozesse muss für jeden Antikörper experimentell bestimmt und charakterisiert werden.

6.7 Aktuelle Entwicklung

Der bispezifische anti-CD16/anti-CD30-Antikörper stellte bereits in klinischen Studien seine Wirksamkeit unter Beweis. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Darstellung der Biodistribution durch radioaktive Markierung möglich ist und es zu einer selektiven Aufnahme in CD30-positiven Xenograft-Tumoren kommt. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Tumortake des bispezifischen Antikörpers gegenüber dem affineren Antikörper HRS-3. Ein Hindernis für einen größeren klinischen Einsatz stellt die aufwendige Herstellung des BimAb und die dadurch bedingte geringe Verfügbarkeit dar. Eine weitere Schwierigkeit liegt in der murinen Herkunft des Antikörpers. Bei wiederholten Applikationen innerhalb der klinischen Studien traten in 25% der Fälle allergische Reaktionen nach Reexposition auf. Zudem entwickelten 46% der Patienten in der ersten Studie und 37,5% Patienten in der zweiten Studie humanen anti-Maus-Antikörper (HAMA) [HARTMANN F et al. 2001].

Das Auftreten von HAMA wird kontrovers diskutiert. HAMA können an den murinen Antikörper binden und seine Wirksamkeit reduzieren. HAMA können aber auch durch Auslösen einer anti-idiotypischen Kaskade zu einer Vakzinierung gegen das entsprechende Tumorantigen führen [Clark J et al. 1997, HARTMANN F et al. 2001]. Unterschiedliche Arbeitsgruppen berichten über ein verlängertes Überleben von HAMA-positiven Patienten und sogar über eine positive Korrelation zwischen dem Überleben und der Konzentration an HAMA [MIOTTI S et al. 1999, AZINOVIC I et al. 2006]. In den beiden durchgeführten anti-CD16/anti-CD30-BimAb-Studien konnte keine Korrelation zwischen der BimAb-Dosierung und der Bildung von HAMA sowie zwischen dem Auftreten der HAMA und der Ansprechrate gefunden werden [HARTMANN F et al. 2001]. Die Induktion von allergischen Reaktionen durch Antikörper murinen Ursprungs verhindert eine wiederholte Anwendung dieser Antikörper. Zur Überwindung der beschriebenen Problematik wäre die Entwicklung von Antikörperkonstrukten mit einer reduzierten Immunogenität [HARTMANN F et al. 2001] und einer großen Verfügbarkeit notwendig. Diese könnte durch die Herstellung von chimären oder vollständig humanisierten Antikörpern, bispezifischen $F(ab)_2$ -Fragmenten oder Diabodies gelingen.

Auf dem Gebiet der Antikörperherstellung, des sogenannten *antibody engineering*, wurden in den letzten Jahren große Fortschritte erreicht [LOO L et al. 2008]. Somit eröffnen sich vollkommen neue Möglichkeiten bezüglich der Größe der Antikörperkonstrukte und der Affinitäten der einzelnen Bestandteile. Bereits 1999 wurde ein 59 kDa großer anti-CD16/antiCD30-Diabody entwickelt. Dieser Diabody ist einfacher zu produzieren als bispezifische Antikörper. HAMA sind nicht zu erwarten. *In-vitro* zeigte der Diabody überlegene Lyseeigenschaften gegenüber dem anti-CD16/antiCD30 BimAb. In einem Xenograft-Tiermodell mit soliden CD30-positiven Tumoren zeigte dieser Diabody eine vergleichbare Ansprechrate zum ursprünglichen anti-CD16/antiCD30-BimAb

[ARNDT M et al. 1999]. Eine Biodistribution wurde nicht durchgeführt. Erfahrungsgemäß zeigen aber Diabodies eine geringere Verweildauer als Antikörper, so dass ein anderes Applikationsprotokoll für den Einsatz beim Menschen entwickelt werden müsste.

Die Herstellung eines rekombinanten humanisierten anti-CD30-*Fab*-Fragments wurde 2005 vorgestellt. Beim Übertragen der CDR (Complementarity Determining Region) von der murinen Sequenz auf eine humane Sequenz entstand initial ein huHRS3-*Fab* mit einer 10-fach geringeren Affinität als das ursprüngliche murine HRS3-*Fab*-Fragment (muHRS3-*Fab*). Durch Änderung der Gensequenz im Bereich der V_H-Region konnte ein huHRS3- V_H-EP3/1-*Fab*-Fragment hergestellt werden, dessen Affinität dem muHRS3-*Fab* entspricht [SCHLAPSCHY M et al. 2004]. 2008 wurde ein rekombinantes humanisiertes anti-CD16-*Fab*-Fragment entwickelt. Dieses zeigte initial einen 100-fachen Affinitätsverlust als das ursprüngliche muA9-*Fab*-Fragment. Durch eine Änderung in der V-Region konnte ein huA9-*Fab*-Fragment entwickelt werden, das eine vergleichbare Affinität zum muA9-*Fab* besitzt [SCHLAPSCHY M et al. 2009]. Nach diesen Entwicklungen liegen beide Bestandteile des antiCD16/antiCD30-Antikörpers in einer humanisierten Form vor. Beide *Fab*-Fragmente lassen sich rekombinant herstellen. Diese Entwicklungen sind wichtige Voraussetzungen für einen erneuten klinischen Einsatz eines humanisierten anti-CD16/anti-CD30 Antikörpers bzw. Antikörperkonstruktes.

Die Effizienz eines solchen bispezifischen *single-chain*-Konstruktes konnte Bargou et al. 2008 in einer Phase-I-Studie belegen. In dieser Studie wurden Patienten, die an einem Rezidiv eines Non-Hodgkin-Lymphoms erkrankt waren, mit dem BiTE (*Bispecific T Cell Engager*) MT103 behandelt. Ein BiTE-Molekül ist ein neuartiges bispezifisches *single-chain*-Antikörper-Konstrukt. Es ist ca. 55 kDa groß und besteht aus zwei scFv-Domänen. Dieses Konstrukt besitzt eine Bindungsstelle für CD19 und eine Bindungsstelle für CD3. Die Affinität gegenüber dem Zielantigen CD19 der Lymphom-Zellen liegt mit einer K_D von 10⁻⁹ M 100 mal höher als gegenüber dem CD3-Molekül der Effektor-T-Zellen [DREIER T et al. 2002]. Mit diesem Konstrukt können CD19-positive Non-Hodgkin-Lymphome durch T-Zellen eliminiert werden. BiTE-Konstrukte benötigen kein zusätzliches Signal zur Stimulation der T-Zellen [WOLF et al. 2005]. Das CD19/CD3-BiTE-Konstrukt zeigte bereits in einer Dosierung von 0,015 mg/m² pro Tag bei einigen Patienten ein Therapieansprechen. Alle sieben Patienten, die in der höchsten Dosisstufe mit einer Dosis von 0,06 mg/m² pro Tag behandelt wurden, zeigten ein objektives Ansprechen in Form einer kompletten oder partiellen Remission [BARGOU et al. 2008]. Allerdings musste MT103 wegen seiner kurzen Halbwertszeit von ca. zwei Stunden [SCHLERETH B et al. 2006] als kontinuierliche Infusion gegeben werden.

6.8 Ausblick

Bisher existieren keine prädiktiven Parameter bezüglich der Auswahl bispezifischer Antikörper und Antikörper-Konstrukte für den klinischen Einsatz. Daher sollten sich klinische Studien mit bispezifischen Antikörpern auf *In-vivo*-Eigenschaften wie Tumor-Targeting und Antigenzugänglichkeit konzentrieren. Bispezifische Antikörper zielen darauf, eine lokale Immunantwort am Tumor zu initiieren und aufrechtzuerhalten. Diese Immunantwort sollte gezielt gegen das Tumorgewebe erfolgen. Die Affinität gegenüber dem Zielantigen sollte daher höher sein als gegenüber den Effektorzellen.

Der murine bispezifische anti-CD16/anti-CD30-Antikörper mit seiner 8-fach höheren Bindungsaffinität für das Tumorantigen CD30 im Vergleich zum CD16-Antigen würde diese Bedingung erfüllen. Durch die Entwicklung neuer Konstrukte könnte die Immunogenität reduziert und eine kostengünstigere Produktion ermöglicht werden. Das Applikationsregime muss so optimiert werden, dass eine optimale Tumor-Targeting-Effizienz erzielt werden kann. Einfluss auf das Applikationsregime werden die Affinitäten des bispezifischen Konstrukts, die molekulare Größe und die Clearance-Rate haben. Beispielhaft ist die Applikation des 55 kDa großen bispezifischen scFv-Konstruktes MT103 aufgeführt, das aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit als kontinuierliche Infusion gegeben werden muss. Die Auswirkung der Kinetik und die Effektivität der kleineren Konstrukte wie z.B. *single-chains* (scFv) und Diabodies in Bezug auf die Tumorerstörung *in-vivo* muss in Studien untersucht werden.

Die radioaktive Markierung der Antikörper und Antikörperkonstrukte würde sowohl eine Biodistribution im Tiermodell als auch im Menschen ermöglichen. Sie stellt eine hilfreiche Methode dar, optimale Applikationsregime der bispezifischen Antikörper und deren Konstrukte zu entwickeln.