

Herstellung therapeutischer Antikörper

M. Little

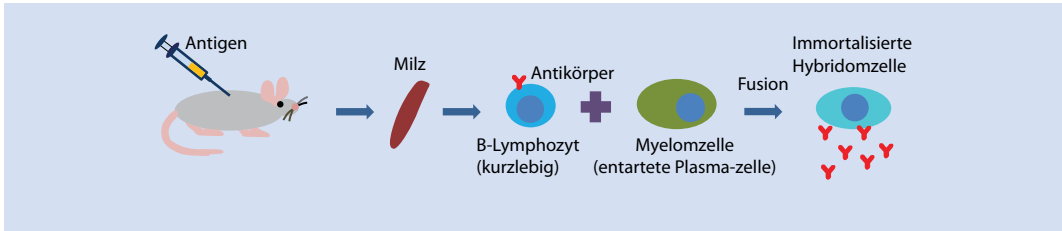
Um eine ausreichende Menge therapeutischer Antikörper für die Behandlung von Diphtherie zu gewinnen, haben Emil von Behring und seine Kollegen Pferde mit dem Diphtherie-Toxin geimpft (► Kap. 1). Das Pferdeserum enthielt eine Mischung verschiedener Antikörper (**polyklonaler Antikörper**), die gegen verschiedene Teile des Toxins gerichtet waren. Abgesehen von der Tatsache, dass das menschliche Immunsystem gegen die Pferdeproteine reagiert, ist eine inhomogene Mischung für die Entwicklung von Medikamenten mit zuverlässigen Eigenschaften nicht geeignet.

■ Gewinnung von geklonten Antikörpern

Eine bahnbrechende Entdeckung im Jahr 1975, die den Weg zur Herstellung therapeutischer Antikörper gegen Krebs freimachte, war eine Methode zur Gewinnung größerer Mengen von Antikörpern, die alle identisch waren. Mit diesen geklonten Antikörpern (**monoklonalen Antikörpern**) war es zum ersten Mal möglich, homogene Antikörperpräparate für diagnostische und therapeutische Anwendungen herzustellen. Da viele Proteine mit monoklonalen Antikörpern identifiziert und verfolgt werden konnten, spielten sie eine wesentliche Rolle in der rasanten Entwicklung der biologischen Wissenschaften in den letzten Jahrzehnten. Für die Entdeckung dieser Methode erhielten **Georges Köhler** und **César Milstein** 1984 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Der dritte Preisträger, **Nils Jerne**, erhielt den Preis für Theorien über den spezifischen Aufbau und die Steuerung des Immunsystems. Er hatte z. B. das monoklonale Prinzip der Antikörper erkannt. Jeder B-Lymphozyt produziert nur identische Antikörper mit einer bestimmten zufälligen Spezifität. Wenn diese Zelle auf ein passendes Antigen trifft, werden Signale in das Zellinnere geschickt, die zur Proliferation des B-Lymphozyten führen. Viele Zellen produzieren dann identische Antikörper mit der gleichen Spezifität wie die ursprüngliche Zelle (**klonale Selektion**).

Im Labor ist die Produktion von monoklonalen Antikörpern aus einer einzigen B-Zelle ungeeignet, da sich B-Zellen schlecht vermehren lassen. Köhler und Milstein haben daher eine B-Zelle aus der Milz einer immunisierten Maus mit einer Tumorzelle fusioniert. Das Ergebnis war eine unsterbliche **Hybridomzelle**, die sich sehr gut vermehren ließ. Durch die Verwendung eines bestimmten Mediums für die Zellkultur konnte nur die Hybrid-Zelle gedeihen (► Glossar). Da als Tumorzelle eine Myelomzelle (eine entartete antikörperproduzierende Plasmazelle) verwendet wurde, war die Grundlage zur Herstellung größerer Mengen eines Antikörpers schon vorhanden. Der Antikörper konnte daher als klonierter einzigartiger Antikörper in großen Mengen produziert werden (■ Abb. 4.1).

Monoklonale Antikörper wurden wegen der einfachen Handhabung meist aus Milzzellen der Maus und manchmal der Ratte gewonnen. Humane Milzzellen aus immunisierten Menschen konnten aus ethischen Gründen nicht verwendet werden. Es war außerdem



■ **Abb. 4.1** Produktion monoklonaler Maus-Antikörper. Die Milz ist eine reiche Quelle für B-Lymphozyten. Jeder B-Lymphozyt exprimiert einzigartige Antikörperklone. Durch die Verschmelzung des B-Lymphozyten mit einer Tumorzelle (hier Myelomzelle) entsteht eine Hybridomzelle, die sich endlos teilen kann und in relativ großen Mengen monoklonale Antikörper produziert

sehr schwierig und meist nicht möglich, humane Hybridomzellen zu kultivieren.

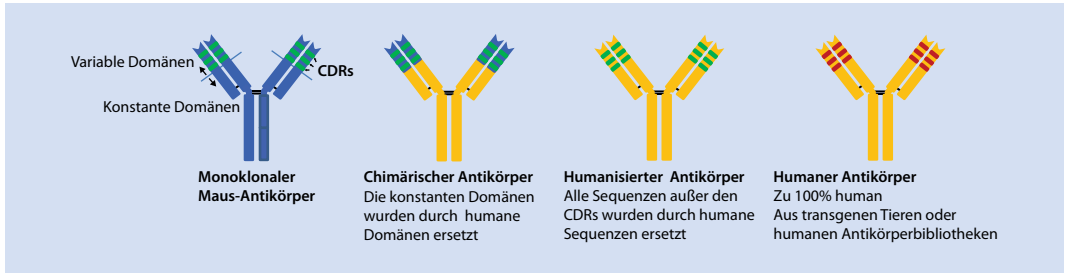
■ Erster zugelassener therapeutischer Antikörper

Muromonab-CD3 (Handelsname Orthoclone OKT3) war der erste monoklonale Antikörper, der für klinische Anwendungen zugelassen wurde (1986 zur Behandlung bestimmter Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen). Die Entwicklung weiterer monoklonaler Antikörper zur Behandlung verschiedener Krankheiten war nicht sehr erfolgreich. Das lag zum Teil daran, dass die fremdartigen Maus-Antikörper eine Immunantwort ausgelöst hatten. Auch die Interaktion der Antikörper mit humanen Immunzellen war nicht optimal. Erst nach der Herstellung von Antikörpern mit einem **signifikanten Anteil humaner Sequenzen** gab es wichtige Fortschritte in der weiteren Entwicklung therapeutischer Antikörper.

■ Humanisierung monoklonaler Antikörper

Um die Bindungsstellen der Maus-Antikörper nicht zu beeinträchtigen, wurden zuerst nur die konstanten Domänen der Antikörper durch die korrespondierenden humanen Sequenzen ersetzt. Solche Hybridmoleküle werden als **chimärische Antikörper** bezeichnet (■ Abb. 4.2). Der Einsatz des ersten Antikörpers MabThera mit menschlichen konstanten Domänen zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen war äußerst erfolgreich. Es folgten eine Reihe weiterer chimärischer Antikörper gegen andere Krebserkrankungen.

Um die Gefahr einer starken Immunreaktion weiter zu reduzieren, wurden auch die Teile der variablen Regionen, die an der Bindung des Antigens nicht beteiligt waren, durch humane Sequenzen ersetzt. Es blieben nur die **Maus-CDRs** (*complementarity determining regions*) übrig. Diese 6 Regionen, jeweils 3 pro schwere bzw. leichte Kette, sind durch ihre zum Antigen komplementäre Struktur an der Bindung des Antigens maßgeblich beteiligt. Da aber die humanisierten Antikörper das Antigen meist weniger stark als der ursprüngliche Maus-Antikörper binden, mussten meist kleine Korrekturen in den angrenzenden Sequenzen der CDRs durchgeführt werden.



■ **Abb. 4.2** Humanisierung von Maus-Antikörpern. Die Sequenzen eines Maus-Antikörpers werden durch humane Sequenzen ersetzt, um die Gefahr einer starken Reaktion des Immunsystems gegen das Fremdprotein zu reduzieren. Die Bindung eines Antikörpers wird durch eine zum Antigen passende Struktur der CDRs (*complementarity determining regions*) bestimmt

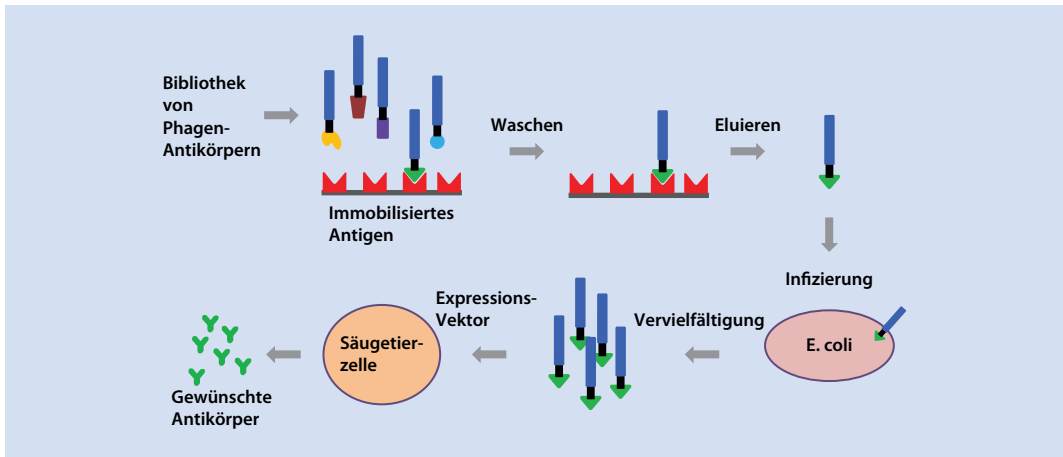
■ Humane Antikörper aus transgenen Tieren

Um zu 100% **humane** Antikörper zu gewinnen und die schwierige Humanisierungsprozedur zu vermeiden, wurde ein großer Teil der Maus-Antikörpergene nach und nach durch menschliche Antikörpergene ersetzt. Dieses riesige Unterfangen hat mehrere Jahre gedauert, bis eine sog. **transgene Maus** kreiert wurde, die humane Antikörper mit sehr guten Bindungseigenschaften nach Immunisierung mit einem Antigen produzierte.

■ Humane Antikörper aus dem Reagenzglas

Um humane Antikörper ohne die Immunisierung von Tieren zu gewinnen, wurden die Prinzipien der In-vivo-Antikörperproduktion und -Selektion im Reagenzglas (in vitro) nachgeahmt. Hierfür wurden alle Gene, die für die schweren und leichten Ketten von Antikörpern kodieren, aus einer großen Anzahl von B-Lymphozyten gewonnen. Riesige **Antikörperbibliotheken** wurden dann durch zufällige Kombination der leichten und schweren Ketten generiert. Eine alternative Methode zur Herstellung großer Antikörperbibliotheken war die **Einführung randomisierter Aminosäuresequenzen** in die CDR-Regionen. Mit beiden Methoden konnten **Genbibliotheken** produziert werden, die für mehr als eine Milliarde Antikörper kodieren.

Im menschlichen Immunsystem wird die Reifung und Proliferation einer bestimmten B-Zelle durch die Bindung eines passenden Antigens vorangetrieben (klonale Selektion). Um diesen Prozess der klonalen Selektion nachzuahmen, wurden alle Gene einer Antikörperbibliothek mit den Genen des Andockungsproteins eines **Bakteriophagen** (Virus, das Bakterien befällt) fusioniert. Die Infektion des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*) wird durch die Bindung der 5 Andockungsproteine am Ende des Bakteriophagen eingeleitet. Durch die Fusion der Antikörpergene mit dem Gen für das Andockungsprotein werden **Fusionsproteine** an der Oberfläche des Bakteriophagen exprimiert, die sowohl Antigene binden als auch die Infizierung von *E. coli* einleiten können. Die Präsentation der Antikörper an der Phagenoberfläche wird **Phagen-Display** genannt.



■ **Abb. 4.3** Phagen-Display zur Selektion eines bestimmten Antikörpers aus einer Bibliothek von humanen Antikörpern. Die Antikörpergene werden mit dem Gen des Andockungsproteins von Bakteriophagen fusioniert. Die Bakteriophagen können sowohl an *E.-coli*-Bakterien andocken und diese infizieren als auch das Antigen eines Antikörpers binden. Das Antigen wird immobilisiert und mit der Bibliothek von Phagen-Antikörpern inkubiert. Bindende Phagen bleiben haften, nichtbindende werden gewaschen. Nach Eluierung der bindenden Phagen mit Chemikalien werden diese durch Infizierung von *E.-coli*-Bakterien vermehrt. Anschließend wird das Antikörpergen aus den selektierten Phagen in einen Expressionsvektor eingebaut, um die gewünschten Antikörper in größeren Mengen in Säugetierzellen zu produzieren

Die **Selektion des gewünschten Antikörpers** erfolgt durch die Bindung eines Bakteriophagen, der den entsprechenden Antikörper präsentiert, an ein immobilisiertes Antigen. Eine Mikrotiterplatte aus Plastik mit vielen kleinen Löchern für die Proben wird meist für die Immobilisierung des Antigens verwendet (■ Abb. 4.3). Bindende Phagen bleiben am Antigen hängen, während die nichtbindenden Phagen gewaschen werden. Die bindenden Phagen werden dann mit geeigneten Chemikalien von der Platte losgelöst (eluert). Die eluierten Klone können jetzt durch die Infizierung von *E.-coli*-Bakterien vermehrt werden. Da noch mehrere unspezifische Klone vorhanden sein können, wird die ganze Prozedur mit den angereicherten Klonen ein paarmal wiederholt. Die Antikörpergene eines spezifisch bindenden Phagen werden dann in einen **Expressionsvektor** eingeschleust, der die Produktion des Antikörpers in Säugetierzellen ermöglicht.

■ Produktion therapeutischer Antikörper

Die am häufigsten verwendete Säugetierzelle für die Produktion von Antikörpern ist eine immortalisierte Zelllinie aus dem Ovar des Chinesischen Hamsters (**CHO-Zelle**). Mit dieser Zelllinie werden ungefähr 70% aller therapeutischen Proteine aus isolierten Genen hergestellt (sog. **rekombinante Proteine**). Hierfür werden die Gene in einen speziellen Expressionsvektor (Plasmid) kloniert, der in die CHO-Zelle eingeschleust wird. In einem Fermenter können Antikörpertiter von 5–10 g/l erreicht werden. Eine hohe Ausbeute ist besonders wichtig, um die Kosten der meist sehr teuren Antikörper zu reduzieren. Es

werden z. B. 3 g des Antikörpers MabThera (*Rituximab*) pro Patient für die Behandlung eines Non-Hodgkin-Lymphoms gebraucht.

■ **GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice – gute Herstellungspraxis)**

Die Herstellung von Arzneimitteln in der EU wird durch die Eudra-Lex (*European Drug Regulatory Legislation*) streng reguliert. Genaue Richtlinien zu Qualitätssicherung, Produktion, Equipment, Medien und Reinraumumgebung werden spezifiziert. Der Prozess muss durch eine genaue Dokumentation und Reproduktion des ganzen Verlaufs des Systems und der Ergebnisse validiert werden. Das Personal muss für die Arbeit unter GMP-Bedingungen qualifiziert sein. Die Qualität der Luft, der Luftdruck, die Temperatur, die Sterilisation der Geräte usw. müssen ständig überwacht werden. Alle Reinigungsschritte müssen unter GMP-Bedingungen erfolgen, und die Zahl der Viren muss auf ein Minimum reduziert werden. Ähnliche Richtlinien werden in den USA durch die CDER (*Center for Drug Evaluation and Research*) auf der Website der FDA (*Federal Drug Agency*) bekannt gemacht.

In der Regel versuchen pharmazeutische Firmen, sowohl die europäischen GMP-Richtlinien als auch die der USA einzuhalten, um ihre Produkte auf beiden Kontinenten an Patienten testen und nach der Zulassung vermarkten zu können. Wegen des hohen Aufwands können meist nur größere Unternehmen die eigenen Produkte unter GMP-Bedingungen herstellen. Kleinere und mittelgroße Firmen geben ihre Produkte an professionelle Herstellungsfirmen in Auftrag.

Antikörper in der Krebsbekämpfung

Grundlagen, Prinzipien und Anwendungsmöglichkeiten

Little, M.

2015, XI, 93 S. 24 Abb. in Farbe., Softcover

ISBN: 978-3-662-45113-7