



Prof. Dr. Barbe Rentsch

studierte Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und arbeitete im Anschluss mehrere Jahre in unterschiedlichen biotechnologischen Firmen sowie am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Dresden. Dort wurde sie 2014 am Universitätszentrum für Orthopädie und Unfallchirurgie zum Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.) promoviert. Nach mehrjähriger nebenberuflicher Dozententätigkeit an der Berufsakademie Sachsen, Staatliche Studienakademie Riesa wurde Frau Rentsch 2018 als Professorin für Angewandte Biotechnologie an die Staatliche Studienakademie Riesa berufen. Ihre Forschungsschwerpunkte liegen in den Bereichen Biomaterialien, Tissue Engineering, Molekularbiologie, Biomedizin und Bioinformatik.

KONTAKT: Berufsakademie Sachsen / Staatliche Studienakademie Riesa
Am Kutzschenstein 6 / 01591 Riesa / barbe.rentsch@ba-riesa.de



Studentinnen und Studenten des Studiengangs Labor- und Verfahrenstechnik der Staatlichen Studienakademie Riesa, Jahrgang 2015, der Studienrichtungen Biotechnologie und Umwelttechnik (von links nach rechts): Sarah Döring, Ann-Kathrin Schatzl, Franziska Lange, Lisa Kristin Ferdinand, Attila Tóth, Daniela Stanke, Jonas Lehn, Verena Otto, Luise Dornfeld, Pia Hirschmann, Stefan Wagner, Paul Gondro

Therapeutische Antikörper in der Mammakarzinom-Behandlung – kleine Helden ganz groß!

Döring S., Dornfeld D., Ferdinand L.K., Gondro P., Hirschmann P., Lange F., Lehn J., Otto V., Schatzl A.K., Stanke D., Toth A., Wagner S., Rentsch B.*

Staatliche Studienakademie Riesa, Studiengang Labor- und Verfahrenstechnik, Jahrgang 2015

*korrespondierender Autor

Brustkrebs ist die weltweit häufigste Form von Krebs bei Frauen. Diese heterogene Erkrankung ist durch ein unkontrolliertes Wachstum von neoplastischen Zellen aus den Brustmilchgängen und den Drüsenlappen gekennzeichnet. Derzeitige Behandlungsstrategien beinhalten Operationen, Strahlentherapie und Breitspektrum-Medikamentenbehandlung mit klassischen Zytostatika (Chemotherapie). Eine Chemotherapie greift nicht selektiv besonders diejenigen Zellen an, die sich häufig teilen. Dadurch werden nicht nur der Tumor sondern alle anderen sich teilende Körperzellen beeinflusst. Dies geht mit starken Nebenwirkungen einher. Eine vielversprechende Alternative sind gezielte antikörperbasierte Therapien. Antikörper sind hochspezifische Moleküle, die pathogene Antigene erkennen und eliminieren. Diese Antikörper gehen hierbei weitaus eleganter und nebenwirkungsärmer vor als jede Chemotherapie. Sie blockieren Signalwege und aktivieren das körpereigene Abwehrsystem. Andere Körperzellen werden kaum in Mitleidenschaft gezogen. Der vorliegende Artikel befasst sich mit therapeutischen monoklonalen Antikörpern, deren Herstellungstechniken und Wirkungsmechanismen am Beispiel zweier Antikörper (Bevacizumab und Trastuzumab). Beide Antikörper haben das Krankheitsbild betroffener Patienten bei der Behandlung von Brustkrebs signifikant verbessert.

Eine Chemotherapie, mit der weltweit viele Millionen Patienten im Jahr behandelt werden, greift besonders diejenigen Zellen an, die sich häufig teilen. Damit erwischt es die meisten Krebszellen.

Einleitung

Krebs wird in der Medizin als eine krankhafte Veränderung von Zellen definiert. [1] Bösartige (maligne) Neubildungen werden als neoplastische Zellen bezeichnet. Diese Zellen unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihrer Struktur stark von den gesunden Zellen. Ein unkontrolliertes, anhaltendes und abnormales Wachstum von Zellen führt zu einer örtlich begrenzten Vergrößerung des Gewebes. Des Weiteren sind maligne Neubildungen in der Lage, Metastasen zu bilden und sich so im Körper auszubreiten. [2] Dieser Review gibt einen Überblick über die Entwicklung und den

Breast cancer is the most common form of cancer in women worldwide. This heterogeneous disease is characterized by uncontrolled growth of neoplastic cells from the breast milk ducts and glandular lobes. Classical treatment strategies rely on surgery, radiation therapy and broad-spectrum drug treatment using classical cytostatics. Classical cytostatics interfere nonselective in the cell cycle of proliferative cells. As a result, not only tumor but all other proliferative body cells are attacked, which leads to strong side effects. A promising alternative are targeted antibody-based therapies. Antibodies are highly specific molecules that recognize and eliminate pathogenic antigens. The present article deals with therapeutic monoclonal antibodies, their production techniques and their mechanisms of action using the example of two antibodies (bevacizumab and trastuzumab). Both antibodies have significantly improved the disease outcome of affected patients in the treatment of breast cancer.

Keywords: Therapeutische Antikörper, Immuntherapie, Mammakarzinom, VEGF, HER2, Bevacizumab, Trastuzumab

Einsatz neuartiger monoklonaler Antikörper als Therapeutika, einschließlich ihres Wirkungsmechanismus bei der Behandlung von Tumoren am Beispiel des Mammakarzinoms.

Epidemiologie

Nach Daten der International Agency for Research on Cancer (IARC) erkranken weltweit jedes Jahr bis zu 14 Millionen Menschen an Krebs [3]. Mit rund 8,2 Millionen Todesfällen im Jahr zählt Krebs damit zu der zweithäufigsten Todesursache, direkt hinter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Tabelle 1) [4].

Rang	Todesursache	Tode	%
1	Herz-Kreislauf-Erkrankung	17.513	31
2	Bösartige Tumorerkrankungen	8.204	15
3	parasitäre und Infektionskrankheiten	6.431	12
4	Atemwegserkrankungen	4.040	7
5	unbeabsichtigte Verletzungen (Unfälle)	3.716	7

Tabelle 1: Häufigste Todesursachen im Jahr 2012 (in Tausend) [4]

Als bösartige Tumorerkrankung werden alle Krebsarten, einschließlich Leukämie und der Lymphome zusammengefasst [5]. Die Inzidenz der einzelnen Krebsarten ist sowohl abhängig von der Region als auch dem Geschlecht. Während 2012 bei Männern mit knapp 1,2 Millionen neuen Fällen pro Jahr, Krebserkrankungen der Lunge, Bronchien und Luftröhre weltweit als häufigste Erkrankungen genannt werden, ist Brustkrebs (Mammakarzinom) bei Frauen mit ungefähr 1,7 Millionen neuen Fällen pro Jahr, die häufigste Krebserkrankung [4]. Laut Daten des Robert Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich bis zu 70.000 Frauen und rund 600 Männer an Mammakarzinomen (Tabelle 2). Damit ist das Mammakarzinom in Deutschland die am häufigsten auftretende Krebserkrankung bei Frauen. Im Vergleich dazu liegt die Zahl der Todesfälle bei ungefähr einem Viertel zu den geschätzten Neuerkrankungen. Ausgehend von den epidemiologischen Kennzahlen für Mammakarzinome im Jahr 2012 liegt die 5-Jahres-Prävalenz bei rund 32.000 Neuerkrankungen bei Frauen und 2.300 Neuerkrankungen bei Männern bis 2017. [5]

	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	69.550	620
Erkrankungsrate	117,4	1,1
Todesfälle	17.748	150
5-Jahres-Prävalenz	317.200	2.300
Relatives 5-Jahres Überleben	88 %	78 %
Relatives 10-Jahres Überleben	82 %	65 %

Tabelle 2: Mammakarzinom in Deutschland 2012 [5]

Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom wird aus wissenschaftlicher Sicht als eine heterogene Erkrankung gesehen, die sich durch das unkontrollierte Wachstum von neoplastischen Zellen in den Milchgängen und Drüsenläppchen auszeichnet. Über die Hälfte der diagnostizierten Mammakarzinome werden im oberen äußeren Quadranten der Brust diagnostiziert. [6, 7] Dieser Tumor metastasiert am häufigsten in Lymphknoten, Knochen, Lunge und Leber. Aggressive Formen wie das HER2-neu-exprimierende und das triple-negative Mammakarzinom weisen eine Prädisposition für das zentrale Nervensystem auf. Bei diesen Typen kann die Metastasierung innerhalb weniger Jahre erfolgen. [7] Durch modernere Früherkennungsmaßnahmen wie bundesweite Mammographie-Screenings sowie durch bessere Aufklärung kann ein Mammakarzinom mittlerweile frühzeitig entdeckt werden, was erheblich zu verbesserten Überlebenschancen und besseren Therapievorsetzungen beiträgt. Das Mammakarzinom muss dennoch als eine chronisch verlaufende Erkrankung betrachtet werden, welche auch nach Jahrzehnten rezidivieren kann. [7]

Die Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind nicht absolut identifiziert. Es ist jedoch eine Reihe von Aspekten bekannt, die das Risiko für die Entstehung erhöhen. Zu den nicht modifizierten Risikofaktoren zählen neben verschiedenen Umwelteinflüssen, familiäre Vorbelastungen und auch das Alter der Patientin. [7] Frauen unter 30 leiden selten an einem Mammakarzinom. Ab diesem Alter steigt das Risiko an, wobei zwischen 35 und 45 häufig nur Vorstufen des Karzinoms diagnostiziert werden. Die meisten Mammakarzinome entstehen zwischen 50 und 65. [6] In dieser Altersgruppe liegt die Erkrankungsrate bei 45 % [8]. Ebenfalls als Risikofaktoren gelten eine frühe erste Monatsblutung [6], eine späte erste Schwangerschaft bzw. gar keine ausgetragene Schwangerschaft, eine kurze Stillzeit des Kindes [9] sowie spät auftretende Wechseljahre [6]. Gerade bei kinderlosen Frauen steigt das Risiko für ein Mammakarzinom um einen Faktor von etwa 1,5 - 4 an. Auch eine Hormontherapie, vor allem mit Östrogen oder Progesteron, steigert das Risiko um etwa 45 %. [10] Neben diesen sehr spezifischen Risikofaktoren gibt es noch allgemeine Aspekte, wie Alkohol- und Zigarettenkonsum, Übergewicht, Vitamin-D-Mangel, erhöhte Chemikalienbelastung und der Einfluss von elektromagnetischer bzw. medizinischer Strahlung. [11]

Ursachen für die Mammakarzinom-Entstehung

Das Mammakarzinom entsteht wie alle Tumorerkrankungen, wenn DNA-Mutationen in kritischen Genen, den Driver-Genen, auftreten. [12] Diese Gene kontrollieren das Zellwachstum, sind für die Reparatur der DNA zuständig oder leiten die Apoptose von Zellen ein. Mutationen in diesen Genen können zum Verlust der Zellzykluskontrolle, einer verringerten DNA-Reparatur sowie einer verminderten Apoptose führen. Ein unkontrolliertes Tumorwachstum kann die Folge sein. [13]

Keimbahnmutationen werden vererbt und sind für ca. 5 - 10 % der Mammakarzinome verantwortlich. [14, 15] Die bestuntersuchten Gene sind die BRC-Gene (BRC = breast cancer), die für ein DNA-Reparatursystem codieren. Mutationen in diesen Genen erhöhen das Risiko zu erkranken um 40 - 80 %. [13, 14]

Häufiger sind jedoch Mutationen in somatischen Zellen die Ursache für Tumorerkrankungen. Diese entstehen spontan oder durch äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung (z. B. UV-Licht, Röntgenstrahlung). Infektionen mit Viren und Bakterien können ebenfalls mutationsauslösend sein. [13] Somatischen Mutationen häufen sich über die Lebensdauer einer Person an und sind nur in einzelnen Gewebzellen anzutreffen.

Ca. 15-30 % der Mammakarzinome werden den HER2-positiven Mammakarzinomen zugeordnet [16-19]. HER2 ist der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (Epidermal Growth Factor Receptor 2, HER2 oder erbB2), ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor auf Zelloberflächen, der in gesunden Zellen durch die Bindung eines Wachstumsfaktors aktiviert wird und eine Signalkaskade in die Zelle einleitet. Diese veranlasst die Zelle u. a. zur Proliferation. [19] HER2-positive Tumore zeigen eine starke Überexpression, verursacht durch eine Amplifikation (Vervielfältigung) des Genes dieses Rezeptors. HER2-positive Tumore weisen eine hohe Proliferationsrate, einhergehend mit einem aggressiveren biologischen und klinischen Erscheinungsbild, auf. [16, 19] Weiterhin sind eine hohe Rezidivrate und eine erhöhte Mortalität beschrieben. [17]

Tumorwachstum und die Fähigkeit von Tumoren Metastasen zu bilden, ist abhängig von der Blutgefäßenbindung des Tumors. [20] Für alle im Körper ablaufenden Stoffwechselwege und Versorgungsmechanismen werden Blutgefäße benötigt. Um ein gut durchblutetes System aus Kapillaren zu erhalten, wird von einzelnen Organen und Gewebebereichen Angiogenese, die Erweiterung von bereits bestehenden Blutgefäßen, betrieben. Dabei bilden bereits bestehende Blutgefäße aufgrund unterschiedlicher Signale neue Kapillaren, was zu einer besseren Nährstoff- und Sauerstoffversorgung einzelner Gewebebereiche führt. Dieser natürlich vorkommende Mechanismus wird von Tumorzellen bei fortschreitendem Wachstum ausgenutzt. Bei unzureichender Nährstoff- und Sauerstoffversorgung wachsen Tumorzellen nur bis zu einer Größe von 1-2 mm³ an und stagnieren dann aufgrund der fehlenden Versorgung. [20]

Durch den von den Tumorzellen ausgeschütteten Signalstoff VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor) werden die Blutgefäße jedoch dazu angeregt Angiogenese zu betreiben, was eine bessere Versorgung der Tumorzelle und somit ein verstärktes Wachstum derer Folge hat [21]. Das Glycoprotein VEGF dient als Signalstoff, welcher bei Bindung an epithelene Blutgefäßzellen neben Angiogenese auch zu Vasculogenese, Inflammation und erhöhter vasculärer Permeabilität beiträgt. Des Weiteren kann VEGF bei Bindung an Tumorzellen Funktionen wie Überleben, Migration und Invasion verstärken, sodass das Wachstum des Tumors beschleunigt wird. Wie die meisten Tumore weisen auch Mammakarzinome eine Überexpression von VEGF auf, welche auch in diesen Tumoren die Proliferation von Endothelzellen und die Tumor-Angiogenese beschleunigt. [21] Fehlt die Unterstützung der Angiogenese, würde der Tumor in seinem Wachstum eingeschränkt. Dies könnte bis zur Apoptose der Tumorzellen führen. [20, 22]

Therapie von Brustkrebs

Abhängig von personenspezifischen Faktoren sowie der Art des Karzinoms und dessen Stadium u. a. in Hinsicht auf Größe und Ausdehnung, Beteiligung von Lymphknoten, dem Vorhandensein von Metastasen sowie der Zellausbreitung in Lymphbahnen und Blutgefäßen, setzt sich die jeweilige Therapie zusammen. [23] Generell stützt sich die Brustkrebs-Therapie auf drei Säulen, die zeitlich ineinandergreifen können: die Operation, die Bestrahlungstherapie und eine breitflächige medikamentöse Behandlung. [24]

Die Operation von Mammakarzinomen kann heute in zwei Dritteln der Fälle brusterhaltend durchgeführt werden, solange kein erhöhtes Risiko beispielsweise durch Nähe zur Brustwarze besteht. Ist die Erhaltung nicht möglich, werden Brustamputationen mit anschließender kosmetischer Rekonstruktion aus Hautlappen von Bauch oder Rücken durchgeführt. [25] Aufgrund einer Rückfallrate von bis zu 50 % wird im Allgemeinen 4 bis 6 Wochen nach der Operation mit einer Bestrahlungstherapie begonnen, die auf das Zerstören vereinzelter Tumorzellen abzielt. [25]

Vor oder zum Teil während der Bestrahlung beginnt die medikamentöse Behandlung, die zum Ziel hat, das weitere Tumorzellwachstum zu stoppen sowie Metastasen zu verhindern. Das Hauptproblem bei der Therapie mit klassischen Zytostatika liegt darin, dass diese unspezifisch in den Zellzyklus stark proliferativer Zellen eingreifen (Tabelle 3). [26] Dadurch werden nicht nur Tumorzellen sondern alle anderen proliferativen Körperzellen wie Haarwurzel-, blutbildende Knochenmarks-, und Schleimhautzellen angegriffen, was zu den Nebenwirkungen wie Haarausfall, erhöhter Infektionsneigung und Schleimhautentzündungen führt. [24]

Im Gegensatz dazu steht die Therapie mit zielgerichteten Tumortheraeutika, die unabhängig vom Zellzyklus arbeiten. [26] Zu diesen gehören monoklonale therapeutische Antikörper. Antikörper-basierte Therapien sollen die Tumorzellen spezifisch in ihrem Wachstum beschränken und letztlich zu einer Elimination der Tumorzellen führen. [27]

Hauptgruppe	Wirkungsweise	Folgen für die Zelle
Antimetabolite	Einbau als Nukleotid-Analoga in replizierten DNA-Strang	Inhibierung der DNA-Replikation
Alkylierende Zytostatika	Alkylierungs-Reaktionen zwischen Basen führen zu Basenfehlpaarungen	Abbruch der Replikation
Mitosehemmer	Hemmung der Mikrotubuli-Polymerisation (Vinca-Alkaloide), Hemmung der Mikrotubuli-Depolymerisation (Taxane)	Blockierung des Spindelapparates bei Zellteilung, Inhibierung der Zellteilung
Topoisomerase-Hemmer	Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen	Abbruch der Replikation
zytostatische Antibiotika	Unterschiedliche Wirkmechanismen	Hemmung der Transkription; Verursachen von Strangbrüchen; das Lysieren von Membranen

Tabelle 3: Hauptgruppen der klassischen Zytostatika [26]

Allgemeiner Aufbau und Arten von Antikörpern

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, sind globuläre Proteine und spielen eine wichtige Rolle in unserem Immunsystem. Sie erkennen körperfremde und geschädigte körpereigene Strukturen, sogenannte Antigene. Die Bindung eines Antigens an einen spezifischen Antikörper erfolgt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip. [28]

Antikörper sind durch einen Ypsilon-förmigen Aufbau charakterisiert (Abbildung 1A). An den leichten Ketten (light chains, L) befinden sich die Antigen-Bindungsstellen, welche bindungs-spezifisch für die Epitope des Antigens sind und je nach Antikörper variieren. Über die schwere, konstante Kette (heavy chains, H) bindet der Antikörper verschiedene Effektormoleküle oder Zellen des Immunsystems. Sowohl die leichten als auch die schweren Ketten sind über Disulfidbrücken und nicht kovalente Bindungen miteinander verbunden. [27, 29, 30] Polyklonale Antikörper erkennen verschiedenen Epitope eines Antigens und werden im Organismus von den B-Lymphozyten als Antwort einer natürlichen Immunreaktion generiert. Aufgrund des breiten Reaktionsspektrums der polyklonalen Antikörper kann es durch Bindung mit unterschiedlichen Antigenen zu Kreuzreaktionen kommen. Aus diesem Grund finden polyklonale Antikörper keine Anwendung in der Krebstherapie oder -diagnostik. [31]

Eine weitere Möglichkeit stellen die biotechnologisch hergestellten Antikörper da, welche nur ein Epitop binden können. Diese monoklonalen Antikörper werden aus einer einzelnen B-Lymphozyten-Zelle gewonnen. Monoklonale Antikörper können nach ihrer Herkunft unterschieden werden, wobei für die Antikörpertherapie die murinen (Maus), chimäre oder humanisierte (Maus/Mensch) Antikörper eingesetzt werden. [32]

Herstellung chimärer und humanisierter monoklonaler Antikörper

Das klassische Verfahren der Hybridom-Technik wurde erstmals bei der Herstellung monoklonaler Antikörper in Mäusen angewandt [33]. Bis heute wird das Tier, meist eine Maus, mit dem entsprechenden Antigen immunisiert und die daraus resultierenden aktivierten B-Lymphozyten, die Plasmazellen, aus der Milz isoliert. Die so gewonnenen B-Lymphozyten werden mit speziellen, immortalen Myelom-Zellen fusioniert. [34] Die durch die Verschmelzung entstandenen Hybridomzellen sind zum einen in der Lage, aufgrund ihrer B-Lymphozyten-Eigenschaften einen spezifischen Antikörper herzustellen, zum anderen sich mit hoher Wachstumsrate zu vermehren. [34]

Murine monoklonale Antikörper sind heute ein wichtiger Bestandteil der Analytik und der medizinischen Diagnostik. In der Labordiagnostik finden sie unter anderem in Enzymimmuno-Assays (ELISA), in Radioimmuno-Assays (RIA), bei der Immunelektrophorese, bei der immunologischen Detektion eines Western Blots oder bei unterschiedlichen Immunfluoreszenz-Techniken Verwendung. [35]

Für den therapeutischen Einsatz sind murine monoklonale Antikörper nur bedingt geeignet, da sie im menschlichen Organismus selbst eine Immunreaktion unter Bildung von humanen Anti-Maus-Antikörpern hervorrufen. [27]

In der Theorie ist die Verwendung von humanen B-Lymphozyten aus der Milz von immunisierten Menschen denkbar. Dieses Vorgehen wird jedoch aus ethischen Gründen nicht angewendet. Bisher gilt es zudem als schwierig, humane Hybridomzellen zu kultivieren. [36] Mit Hilfe gentechnischer Methoden ist es jedoch möglich, auf DNA-Ebene große Teile eines murinen Antikörpers durch die entsprechenden humanen Sequenzen zu ersetzen und dadurch die Immunogenität des Moleküls wesentlich zu reduzieren (Abbildung 1B). [36] Das Resultat ist zunächst ein chimärer Antikörper mit konstanter humaner Domäne und variabler muriner Domäne (ca. 65 % humaner Anteil). [36] Die Weiterentwicklung stellt der humanisierte Antikörper da, bei dem alle Sequenzen außer den komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR, complementarity determining regions) humanen Ur-

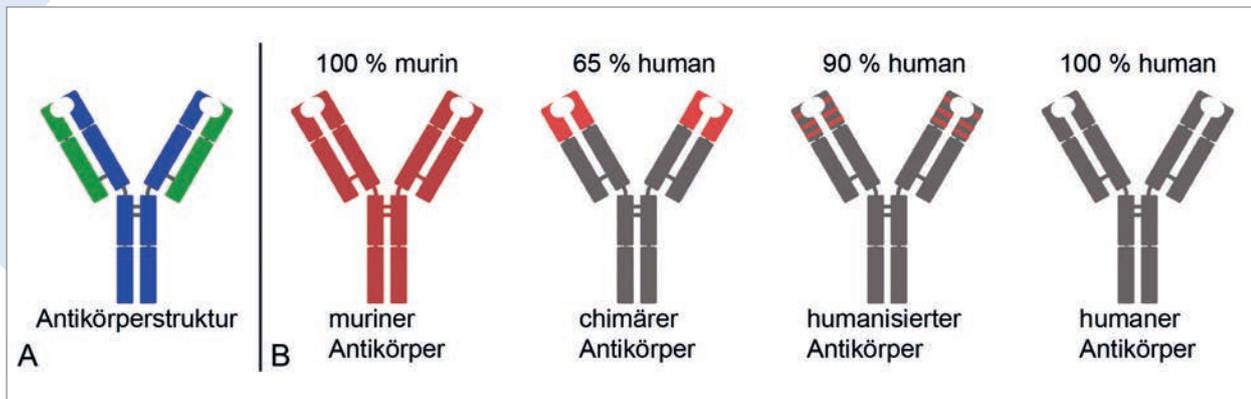


Abbildung 1: A) Darstellung eines Antikörpers: Leichte Kette (engl. light chains, L) mit variablen Epitop (blau/grün) und schwere, konstante Kette (engl. heavy chains, H, blau). B) Schrittweise Humanisierung von therapeutischen Antikörpern.

sprung sind (ca. 90 % humaner Anteil). Diese sind letztlich für die Erkennung des Antigens zuständig. [36] Antikörper die zu 100 % human sind, versprechen die beste Kompatibilität mit dem Zielorganismus [37].

Herstellung humaner monoklonaler Antikörper

Zur Herstellung von vollständigen humanisierten monoklonalen Antikörpern stehen hauptsächlich zwei Methoden zur Verfügung: transgene Mäuse sowie das Phagen-Display [36, 38].

Transgene Mäuse

Transgen bedeutet, dass dem Tier ein artfremdes Gen eingefügt wird [39]. Durch den Transfer von Genen in der Frühphase der embryonalen Entwicklung können genetisch veränderte Mäuse erzeugt werden [40]. Um vollständig humanisierte Antikörper zu produzieren (Abbildung 2A), werden in Mäusen die murinen Gene für die Immunglobuline (Antikörper) inaktiviert und die humanen Gene in das Maus-Genom eingefügt. Als Resultat produzieren die Mäuse nach Antigenkontakt humane Antikörper (z.B. HuMab mouse, GenPharm, Canada; TC mouse, Kirin Brewery Company, Japan) [41]. Auch bei dieser Technik werden nach Immunisierung der transgenen Mäuse die B-Lymphozyten isoliert und mittels der Hybridomtechnik Antikörperproduzierenden Hybridomzellen selektiert. Die resultierenden Antikörper sind auf Grundlage der humanen Gensequenzen vollständig human und besitzen keinen Mausanteil mehr (Abbildung 1B). [36]

Phagen-Display

Während die bisherigen Techniken auf die Hybridom-Technik und somit auf die Nutzung von Tieren zurückgriffen, stellt die Verwendung des Phagen-Displays eine in vitro Selektionstechnik dar, die nicht auf eine Immunreaktion beim Tier oder beim Menschen zurückgeht [42]. Bakteriophagen stellen eine Gruppe von Viren dar, deren ausschließliche Wirte Bakterien sind. Bei lytischen Bakteriophagen werden nach der Injektion der Phagen-DNA in das Wirtsbakterium unter Nutzung von wirtseigenen Enzymen neue Phagen-Bestandteile wie

Hüllproteine synthetisiert, neue Phagenpartikel zusammgebaut und die Wirtszelle lysiert (lytischer Zyklus). [43] Temperente Phagen integrieren ihre DNA zunächst in das Bakterienchromosom (lysogener Zyklus). Bei sich ändernden physiologischen Bedingungen wird die Phagen-DNA aus dem Wirtschromosom entfernt und der lytische Zyklus wird eingeleitet. [44]

Das Konzept des Phagen-Displays wurde 1985 erstmals angewendet. Mittels dieser molekularbiologischen Technik (Abbildung 2B), wird DNA, die für ein zu untersuchendes Protein codiert, mit den Phagen-Hüllprotein-Genen fusioniert. Als Resultat exprimiert der Phage nicht nur sein Hüllprotein auf seiner Oberfläche, sondern auch das zu untersuchende Protein. [45] Mittels dieser Methode wird zunächst die DNA aus (humanen) Antikörperproduzierenden B-Zellen isoliert und Gene für den Antigen-bindenden Teil des humanen Antikörpers jeweils an das Phagengen fusioniert. [45] Es entstehen Phagen-Bibliotheken, mit einer großen Anzahl an Phagen, von denen jeder auf seiner Oberfläche jeweils einen anderen Antigen-bindenden Teil der humanen Antikörper exprimiert. [46] Die größten solcher Bibliotheken enthalten bis zu 10 Milliarden humane Antikörpersequenzen. Beim sogenannten Biopanning (Selektion von Bindungspartnern) werden die Phagen dann spezifisch an immobilisierte Antigene gebunden. [46] Die selektierten Phagen enthalten die gesuchte kodierende Antikörper-DNA, die molekularbiologisch weiter vervielfältigt und für die rekombinante Herstellung kompletter humaner Antikörper in Prokaryoten, wie E. coli oder Eukaryoten (Hefen oder Säugerzellkulturen) herangezogen wird. [47]

Die therapeutischen Antikörper Bevacizumab und Trastuzumab

Bevacizumab und Trastuzumab sind humanisierte monoklonale IgG-Antikörper, die rekombinant in Ovarzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen) produziert werden. Der humane Anteil (ca. 90 %) stellt das Antikörpergerüst dar und der murine Anteil (ca. 10 %) stellt die komplementaritätsbestimmenden Regionen dar, die das Antigen binden. [48, 49] Bevacizumab (Avastin®) zielt auf Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ab und hemmt dadurch das Tumorstadium. Er ist seit 2005 in der EU für verschiedene Tumorthérapien zugelassen, u. a. für metastasierende Mammakarzinome. [49] Trastuzumab bindet mit hoher Affinität an die extrazelluläre Domäne von HER2 und ist seit 2000 für die Behandlung von humanem Epidermis Wach-

tumfaktor-Rezeptor (HER2) metastasierendem Brustkrebs in der EU zugelassen [48].

Wirkmechanismen von therapeutischen Antikörpern am Beispiel von Trastuzumab und Bevacizumab

Bei der Behandlung mit therapeutischen Antikörpern wird auf verschiedene Mechanismen zurückgegriffen (Abbildung 3). Im Folgenden werden diese verschiedenen Mechanismen anhand der Antikörpern Trastuzumab und Bevacizumab genauer erläutert.

Blocking: Bevacizumab

Durch die Bindung von Bevacizumab an VEGF kann keine Reaktion des Signalstoffes mit den Rezeptoren (VEGFR) der Blutgefäße erfol-

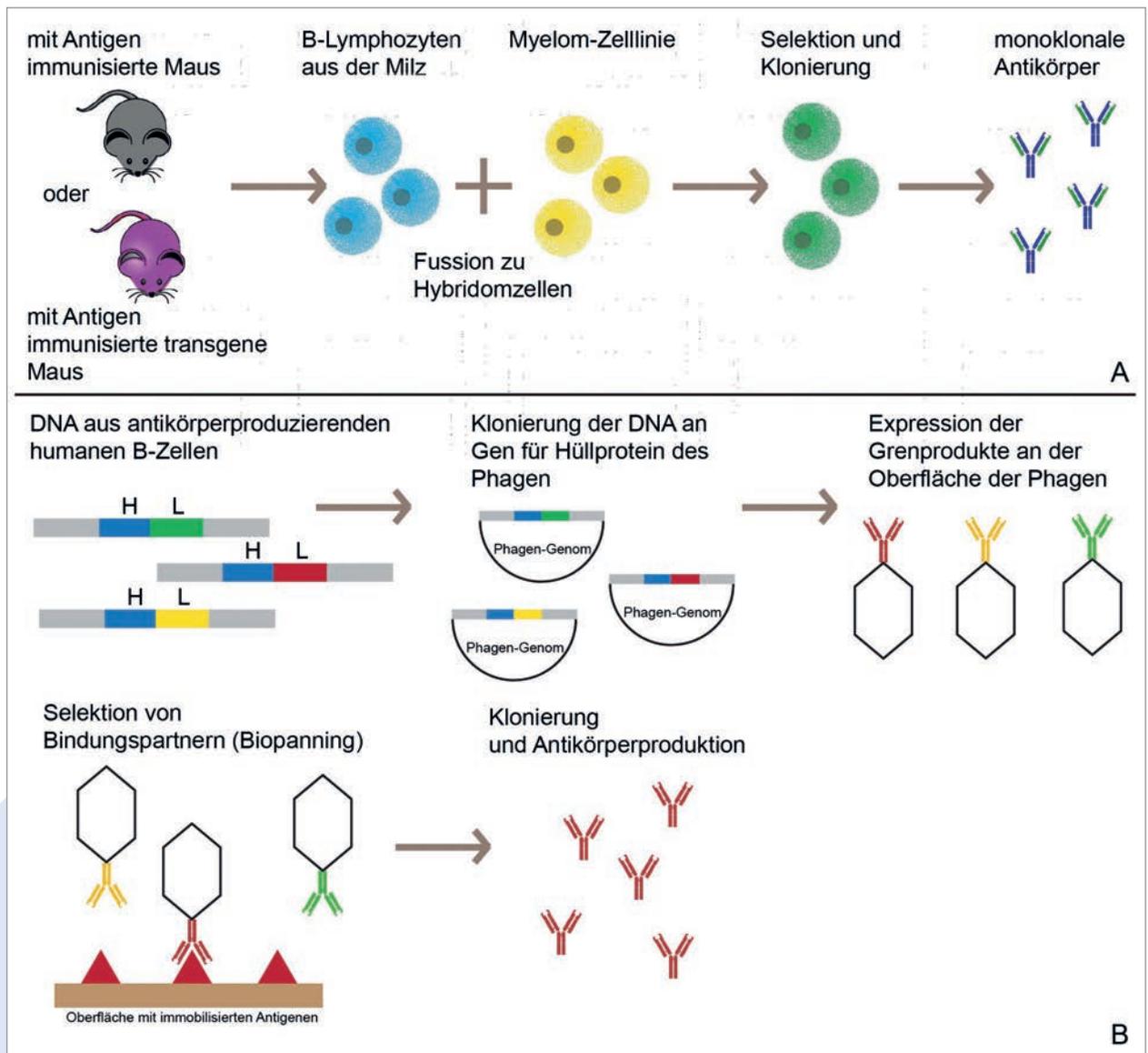


Abbildung 2: (A) Herstellung humaner monoklonaler Antikörper mittels Hybridom-Technik in der klassischen Maus sowie in transgenen Mäusen. (B) Nutzung des Phagen-Displays zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper.

gen (Abbildung 3-1). Dies führt dazu, dass keine weiteren Kapillaren von den Blutgefäßen gebildet und bereits bestehende, jedoch nicht differenzierte Kapillaren, zurückgebildet werden. Durch den Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff bildet sich der Tumor zurück. [49, 50]

Aktivierung des Immunsystems: Trastuzumab

Trastuzumab bindet selektiv an den transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor HER2. [48, 51] Eine Aktivierung des HER2-Rezeptors findet durch die Bindung eines Liganden statt. Dadurch werden Wege der Signaltransduktion ausgelöst, die das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung regulieren. [18] Die spezifische Anlagerung von Trastuzumab an den HER2-Rezeptor blockiert die Ligandbindung, was in einer gezielten Inhibierung der Proliferation der Krebszellen endet (Abbildung 3-3). [51] Außerdem initiiert dieser monoklonale Antikörper die Lyse der Tumorzelle durch die Einbeziehung des Immunsystems. Die Zellyse kann durch die Aktivierung des Komple-

mentsystems oder durch die Mobilisierung von natürlichen Killerzellen bewirkt werden.

Komplementabhängige Zytotoxizität (CDC)

Der Mechanismus CDC (complement dependent cytotoxicity) bewirkt eine Aktivierung des Komplementsystems, was zur Lyse der Tumorzellen führt (Abbildung 3-2). Das Komplementsystem ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems [52]. Es beinhaltet eine Reihe von Proteinen, welche über Kaskadenreaktionen zur Zellyse führen. Durch die spezifische Bindung von Trastuzumab an HER2, kann das Protein C1 an der schweren Kette von Trastuzumab binden. [52] C1 ist das erste Protein der Komplementkaskade, an welcher insgesamt 9 Proteine beteiligt sind. Am Ende der Kaskade entsteht ein porenbildender MAC-Komplex (membrane attack complex) in der Tumorzellmembran. Dadurch können Wasser und Elektrolyte in die Zelle eindringen. Infolge dessen steigt der osmotische Druck und die Tumorzelle wird lysiert. [53]

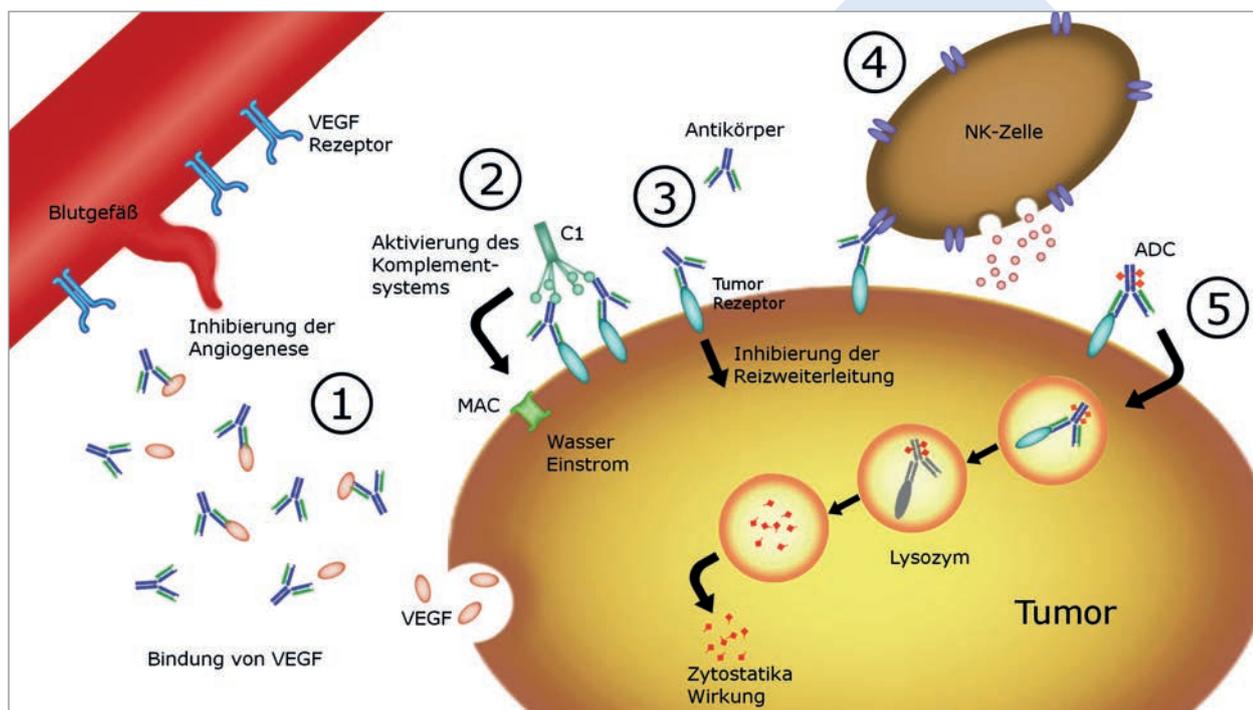


Abbildung 3: Wirkmechanismen von therapeutischen Antikörpern.

- (1) Wirkungsweise von Bevacizumab: Der Antikörper bindet den von den Tumorzellen sekretierten Wachstumsfaktor VEGF, wodurch dieser nicht mehr an den Rezeptoren auf den Blutgefäßen binden kann. Als Resultat werden nicht ausdifferenzierte Blutgefäße zurückgebildet und die Angiogenese gehemmt.
- (2) Komplementabhängige Zytotoxizität (CDC). Mit Trastuzumab markierte HER2-Rezeptoren aktivieren das Komplementprotein C1. Seine Bindung am Antikörper initiiert eine Komplementkaskade, wodurch ein porenbildender MAC-Komplex in der Tumorzellmembran entsteht. Infolgedessen strömen Elektrolyte und Wasser in die Tumorzelle. Diese wird lysiert.
- (3) Die spezifische Anlagerung von Trastuzumab an den HER2-Rezeptor blockiert die native Ligandenbindung. Als Konsequenz wird die Proliferation der Tumorzellen inhibiert.
- (4) Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC): Trastuzumab bindet spezifisch an den HER2-Rezeptor und initiiert die Anlagerung von natürlichen Killerzellen (NK), wodurch zytotoxische Granula freigesetzt und die Tumorzellen lysiert werden.
- (5) Antikörper Wirkstoff Konjugat (ADC) - Trastuzumab-Emtansin (T-DM1): Nach der Bindung von T-DM1 an den HER2-Rezeptor wird der ADC-Komplex in die Zelle aufgenommen und über Lysosomen abgebaut. Der so freigesetzte Wirkstoff T-DM1 verhindert die Proliferation der Tumorzellen.

Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity) ist ein Mechanismus, bei welchem Immuneffektorzellen bei antikörpermarkierten Zellen die Lyse auslösen (Abbildung 3-4). Dazu bindet Trastuzumab spezifisch an den HER2-Rezeptors [54]. Natürliche Killerzellen erkennen den monoklonalen Antikörper über dessen schwere Kette, binden diesen und setzen zytotoxische Granula mit Perforin oder Granzym B frei. Dadurch setzt die Apoptose der Tumorzelle ein. [55, 56]

Antikörper Wirkstoff Konjugat (ADC) -

Trastuzumab Emtansin (T-DM1)

Trastuzumab Emtansin (T-DM1) ist ein Antikörperwirkstoffkomplex (ADC antibody drug conjugate). Dieser besteht aus dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, welcher mit dem Wirkstoff Emtansin (DM-1) verknüpft ist (Abbildung 3-5). [57] Durch die Bindung des Zytostatikums an den Antikörper, kann dieses lokal und spezifisch wirken. Nach der Bindung von T-DM1 an den HER2-Rezeptor wird der Rezeptor-ADC-Komplex in die Zelle aufgenommen und durch Lysosomen abgebaut (Abbildung 3-5). Durch den Abbau des ADC wird das gekoppelte DM1 freigesetzt. DM1 verhindert durch Inhibierung der Mikrotubuli-Polymerisation die Proliferation der Tumorzellen. [58, 59]

Zusammenfassung

Eine Chemotherapie, mit der weltweit viele Millionen Patienten im Jahr behandelt werden, greift besonders diejenigen Zellen an, die sich häufig teilen. Damit erwischt es die meisten Krebszellen. Doch auch andere Zellen im Organismus teilen sich oft, darunter die Zellen in den Haarwurzeln und im Darm. Die Chemotherapie ist somit sehr unspezifisch, und dementsprechend groß sind deren Nebenwirkungen. Eine neue Chance gegen Krebs bieten sogenannte zielgerichtete Therapien. Der Review stellt die Wirkungsweise der hochspezifischen Krebszelleneliminierung durch monoklonale Antikörper am Beispiel der Mammakarzinom-Behandlung ausführlich vor. Diese Antikörper gehen hierbei weitaus eleganter und nebenwirkungsärmer vor als jede Chemotherapie. Sie blockieren Signalwege und aktivieren das körpereigene Abwehrsystem. Andere Körperzellen werden kaum in Mitleidenschaft gezogen.

Monoklonale Antikörper werden nicht nur zur Behandlung vieler Krebsformen eingesetzt sondern auch bei Autoimmunerkrankungen sowie bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen. Schon heute verdanken etliche Menschen den therapeutischen Antikörpern ihr Leben. Durch kontinuierliche Verbesserung der Herstellungstechnologien werden sie die Zukunft in der modernen Medizin prägen.

Literaturverzeichnis

- [1] Sedlacek, H.-H. (2013): Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen: Entstehung, Abwehr und Behandlungsmöglichkeiten. Berlin : De Gruyter.
- [2] Renneberg, R; Berkling, V. (2013): Biotechnologie für Einsteiger. Berlin-Heidelberg : Springer Verlag.
- [3] Torre, L.A, et al. (2015): Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin., Mar;65(2), 87-108.
- [4] American Cancer Society (2015): Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta : American Cancer Society.
- [5] Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html. [Online] 2015. [19.10.2017]
- [6] Barth, V.; Barth, A. (2003): Brustkrebs: schnell verstehen – richtig behandeln: Antworten auf Ihre wichtigsten Fragen. Stuttgart : TRIAS Verlag in MVS.
- [7] Ulrich, U. (2013): Gynäkologische Onkologie – Ein Kompendium für die Klinik. Berlin : De Gruyter.
- [8] Robert Koch-Institut, Zentrum für Krebsregisterdaten. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.html. [Online] 2016. [15.10.2017]
- [9] Deutsches Krebsforschungszentrum (2009): MARIE-Studie, Studienbericht. Heidelberg, Hamburg : s.n.
- [10] Beral, V. (2003): Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet. Aug 9;362(9382):419-27.
- [11] Kemper, G. (2016): Brustkrebs und Umweltbelastungen: Erkennen, verstehen, vermeiden. Zeitschrift. vol. 48, no. 1, pp. 29-34.
- [12] Nik-Zainal, S. et al. (2016): Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. Nature. 534, 47-54.
- [13] Sharma, G.N. et al. (2010): Various types and management of breast cancer: an overview. J Adv Pharm Technol Res., Apr;1(2):109-26.
- [14] Baretta, Z. et al. (2016): Effect of BRCA germline mutations on breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis. Medicine (Baltimore, Oct;95(40):e4975.
- [15] Tung, N. et al. (2016): Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. J Clin Oncol. May 2016,1;34(13):1460-8.
- [16] Callahan, R.; Hurvitz, S. (2011): HER2-Positive Breast Cancer: Current Management of Early, Advanced, and Recurrent Disease. Current opinion in obstetrics & gynecology, 23(1):37-43.
- [17] Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R. (2012): The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemotherapy Research and Practice. Volume 2012, Article ID 743193.
- [18] Iqbal, N.; Iqbal, N. (2014): Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. Mol Biol Int., 852748.
- [19] Yersal, O.; Barutca, S. (2014): Biological subtypes of breast can-

- cer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3):412-424.
- [20] Nishida, N. et al. (2006): Angiogenesis in Cancer. *Vascular Health and Risk Management*, 2(3):213-219.
- [21] Byrne, G.J. et al. (2007): Serum vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Anticancer Res.*, Sep-Oct; 27(5B):3481-7.
- [22] Ziyad, S.; Iruela-Arispe, M.L. (2011): Molecular Mechanisms of Tumor Angiogenesis. *Genes & Cancer*, 2(12):1085-1096.
- [23] ONKO Internetportal. <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/brustkrebs/therapie/brustkrebs-therapieverfahren-im-ueberblick.html>. [Online] 2018. [15.10.2017]
- [24] Deutsches Krebsforschungszentrum (2017): Brustkrebs Behandlungsverfahren. Heidelberg, Hamburg : s.n..
- [25] AGO Empfehlungen (2012): Brustkrebs, Patientenratgeber zu den AGO-Empfehlungen. s.l. : Kommission Mamma – Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
- [26] Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. s.l. : Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., 2017.
- [27] Brekke, O. H.; Sandlie, I. (2003): Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.*, Jan;2(1):52-62.
- [28] Durak, C. (2011): Antigen-Antikörper-Reaktionen mit Modellbau. s.l. : GRIN Verlag.
- [29] Wollenberger, U. et al. (2012): Analytische Biochemie: Eine praktische Einführung in das Messen mit Biomolekülen. s.l. : John Wiley & Sons.
- [30] Kaufmann, S. H. E. (2013): Basiswissen Immunologie. s.l. : Springer.
- [31] Luttmann, W. et al. (2014): Der Experimentator: Immunologie. s.l. : Springer.
- [32] Ochsenbein, A. F. (2008): Monoklonale Antikörper als therapeutische Substanzen. *Swiss Med Forum*, 08(08):140-143.
- [33] Köhler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. Bd. 256, 495-497.
- [34] National Research Council Committee on Method (1999): Monoclonal Antibody Production. Washington: National Academies Press.
- [35] Lipman, N. S. et al. (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J.*, 46(3):258-68.
- [36] Foltz, I. N.; Karow, M.; Wasserman, S. M. (2013): Evolution and emergence of therapeutic monoclonal antibodies: what cardiologists need to know. *Circulation*. 2013, Jun 4;127(22):2222-30.
- [37] Laffleur, B. et al. (2012): Production of human or humanized antibodies in mice. *Methods Mol Biol.*, 901:149-59.
- [38] Tabil, A. et al. (2015): Monoclonal antibodies: Principles and applications of immunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World J Hepatol*. 2015, Oct 8;7(22):2369-83.
- [39] Kumar, T. R. et al. (2009): Transgenic Mouse Technology: Principles and Methods. *Methods Mol Biol*. 590, 335-362.
- [40] Cho, H. S. et al. (2003): Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*, 421(6924):756-60.
- [41] Weiner, L. M. (2006): Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother.*, Jan-Feb;29(1):1-9.
- [42] Frenzel, A.; Schirrmann, T.; Hust, M. (2016): Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *MABs.*, Oct;8(7):1177-1194.
- [43] Nafissi, N.; Slavcev, R. (2014): Bacteriophage recombination systems and biotechnical applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, Apr;98(7):2841-51.
- [44] Bobay, L. M.; Rocha, E. P.; Touchon, M. (2013): The adaptation of temperate bacteriophages to their host genomes. *Mol Biol Evol.*, Apr;30(4):737-51.
- [45] Haq, I. U. et al. (2012): Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol J.*, Jan 10;9:9.
- [46] Bazan, J.; Całkosiński, I.; Gamian, A. (2012): Phage display – a powerful technique for immunotherapy: 2. Vaccine delivery. *Hum Vaccin Immunother.*, Dec 1;8(12):1829-35.
- [47] Frenzel, A.; Hust, M.; Schirrmann, T. (2013): Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol.*, Jul 29;4:217.
- [48] Boekhout, A. H. Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. (2011): Trastuzumab. *The Oncologist*, 16(6):800-810.
- [49] Keating, G. M. (2014): Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. *Drugs*, Oct;74(16):1891-925.
- [50] Niu, G.; Chen, X. (2010): Vascular Endothelial Growth Factor as an Anti-angiogenic Target for Cancer Therapy. *Current drug targets*, 11(8):1000-1017.
- [51] Burmester, G. R.; Pezzutto, A.; Ulrichs, T. (2007): Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik. s.l. : Georg Thieme Verlag KG.
- [52] Shuptrine, C.; Surana, R.; Weiner, L. M. (2012): Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol.*, Feb;22(1):3-13.
- [53] Little, M. (2015): Antikörper in der Krebsbekämpfung: Grundlagen, Prinzipien und Anwendungsmöglichkeiten. Berlin, Heidelberg : Springer.
- [54] Pohlmann, P. R.; Mayer, I. A.; Mernaugh, R. (2009): Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res.*, December 15; 15(24): 7479-7491.
- [55] Surana, R.; Wang, S.; Weiner, L.M. (2010): Antibodies and cancer therapy: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.*, May; 10(5): 317-327.
- [56] Rogers, L. M.; Veeramani, S.; Weiner, G. J. (2014): Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Res.*, Aug;59(1-3):203-10.
- [57] Krop, I.; Winer, E. P. (2014): Trastuzumab emtansine: a novel antibody-drug conjugate for HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.*, Jan 1;20(1):15-20.
- [58] Fresno Vara, J. A. et al. (2004): PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.*, Apr;30(2):193-204.
- [59] Junttila, T. T. et al. (2011): Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*, Jul;128(2):347-56.