

5. Diskussion

5.1. Antikörpergestützte Therapien des M. Hodgkin

Das Hodgkin-Lymphom gilt mittlerweile als heilbare Erkrankung. Polychemotherapie und Strahlentherapie haben bei HL-Patienten die Langzeitüberlebensraten von weniger als 5% im Jahre 1963 auf über 70% erhöht (DE VITA et al., 1970). Obwohl die meisten Patienten durch die Standardtherapie geheilt werden können, erreichen weniger als 30% der Patienten im Rezidiv eine dauerhafte Remission (JOSTING et al., 1998). Bei bis zu 64% der HL-Patienten werden Tumorreste nach Chemotherapie entdeckt (GLENN et al., 1991). Da residuelle Tumorzellen bei Patienten mit NHL mit einer schlechten klinischen Prognose korrelieren und bei einem Hodgkin Patienten im zweiten Rezidiv der gleiche Zellklon wie bei der Erstdiagnose nachgewiesen wurde (KANZLER et al., 1996), könnte die gezielte Elimination residueller Tumorzellen durch Immunkonjugate, z.B. monoklonale Antikörper (MoAK) zu einer Prognoseverbesserung führen. Hodgkin-Lymphome scheinen für den Einsatz von MoAK oder MoAK-gestützten Immuntherapeutika besonders geeignet zu sein, da die Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen eine große Anzahl von Oberflächenantigenen wie CD25 und CD30 exprimieren. Zudem sind Hodgkin-Lymphome gut vaskularisiert, was einen leichten Zugang der Immunkonjugate zu den Tumorzellen ermöglicht.

In der Behandlung von Hodgkin-Patienten mit nativen MoAK liegen bislang klinische Erfahrungen mit dem chimären gegen CD20 gerichteten MoAK Rituximab vor (REHWALD et al., 2003) sowie erste Daten eines anti CD30 Antikörpers. Aufgrund der vielversprechenden Aussichten in der Therapie mit MoAK, werden unterschiedliche Anstrengungen unternommen, deren Toxizität zu steigern. Beispiele hierfür sind Immuntoxine, bispezifische Antikörper oder Radioimmunokonjugate. Allerdings sind die Ergebnisse bislang wenig ermutigend. ENGERT et al. (1990, 1991) untersuchten 40 verschiedene MoAK (CD25, CD30, IRac) gegen HRS-Zellen in vitro, ohne einen Beweis für zytotoxische Aktivität zu finden. Bispezifische Antikörper sind sehr aufwendig und teuer zu produzieren, so dass schon im präklinischen Bereich hohe Hürden zu überwinden sind. Ein möglicher Weg zur Proteinproduktion zumindest für präklinische Untersuchungen stellt die transiente Proteinexpression dar.

5.2. 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 Mengen an Protein 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 dieses Immunzytokins 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 lag unter anderem daran, dass in diesem System häufig adhärente Zelllinien zum Einsatz kamen. Dies beeinträchtigt natürlich die Proteinproduktion in größerem Maßstab. Im Jahr 2001 gelang es der Arbeitsgruppe um Florian Wurm, ein transientes Expressionssystem herzustellen, das relevante 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. Sicherlich bleibt die Herstellung einer stabilen Zelllinie der Goldstandard, wenn es darum geht, ein Konstrukt für klinische Studien unter

GMP-Bedingungen zu produzieren. Aber für vorklinische Versuche stellt dieses transiente HEK293-EBNA-System eine deutliche Verbesserung dar (Meissner et al., 2001).

5.3. Das chimäre Immunzytokin

In dieser Arbeit wird die Klonierung, Produktion und die funktionelle in vitro-Testung eines neuen chimären Immunzytokins beschrieben, das an das CD30 Antigen bindet und damit gegen die Hodgkin-Tumorzelle gerichtet ist, gleichzeitig aber auch membranverankerte TNF- α Bioaktivität vermittelt; es handelt sich um ein Fusionsprotein aus einem CH2/CH3 deletierten IgG1-Immunglobulin und dem Zytokin TNF- α .

5.3.1. Der IgG1-hinge-Anteil des Immunzytokins

Das IgG1-hinge-TNF-Antikörperformat wurde ausgewählt, da ein CH2/CH3 deletiertes Fusionsprotein einige Vorteile hat verglichen mit ähnlichen Ansätzen, in denen die Zytokineinheit an die CH3-Domäne angehängt wurde (CHRIST et al., 2001). Das letztere Konstrukt ähnelt einem intakten IgG1 Antikörper mit dem Cytokin am C-terminalen Ende. Diese Konstrukte behalten einige ihrer Fc-Fragment-abhängigen Funktionen wie z.B. eine lange Halbwertszeit und die Bindung an den Fc-Rezeptor (Coloma et al., 1997). Man kann daher von einem Fusionsprotein aus TNF und einem kompletten IgG1-Antikörper erwarten, dass es an native Macrophagen bindet und die typischen Signalmuster von löslichem TNF induziert (Watson et al., 1997). Demzufolge limitieren schwere systemische Nebenwirkungen und ungünstige Eigenschaften bezüglich des „Tumor-Targetings“ den klinischen Einsatz dieses Formates. Im Gegensatz dazu hat das CH2/CH3 deletierte, in dieser und anderen Arbeiten (Bauer et al., 2003) beschriebene Fusionsprotein keine bekannten Fc-Rezeptor bindenden Eigenschaften. Trotz der Trunkierung bleibt jedoch die prolin- und cysteinhaltige „hinge“-Region unbeeinträchtigt und garantiert durch die Dimerisierung der Antikörperschwerketten Stabilität des Gesamtproteins. Das Blockieren der N-terminalen TNF-Domäne durch direkte Anbindung an die „hinge“-Region verstärkt sogar die Rigidität des Gesamtproteins und trägt dazu bei, den dimeren Charakter des Proteins zu erhalten, da sich TNF-Monomere bekannterweise zusammenlagern um einen stabilen Zustand zu erlangen.

5.3.1.1 Affinität

In der druchflusszytometrisch durchgeführten Analyse der Bindungseigenschaften des Antikörperanteils des Fusionsproteins zeigte sich im Vergleich zum elterlichen chHRS3 Antikörper ein leichter Verlust der Affinität. Dies stellt aber nicht automatisch einen Nachteil für das Konstrukt im klinischen Einsatz dar. Untersuchungen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz zeigen, dass bei hochaffinen Antikörpern eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers im Tumor nicht möglich ist. Der Antikörper wird im perivaskulären Tumorgewebe festgehalten und kann nicht den gesamten Tumor penetrieren. Im Gegensatz dazu zeigen Antikörper mit niedriger Affinität eine gleichmäßigere Verteilung im Tumorgewebe. Dies bedeutet also, dass ein Antikörper nicht nur binden, sondern auch wieder „loslassen“ muss, um eine gleichmäßige Verteilung und damit ein gleichförmiges Targeting aller Tumorzellen zu ermöglichen (Fujimori et al., 1990; Adams et al., 2001). Dies wird aber durch eine zu hohe Affinität verhindert. Die Bindungseigenschaften des hier beschriebenen Immunzytokins müssen in weiteren Analysen noch genauer charakterisiert werden. Dazu bieten sich Biacoreuntersuchungen an, die sowohl den Antikörperanteil als auch die TNF-Einheit betreffen. Die Tumorpenetration kann dann in einem weiteren Schritt in einem in vivo-Modell mittels Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz weiter untersucht werden.

5.3.2. Der TNF- α -Anteil des Immunzytokins

Während der Immunglobulinanteil des Konstruktes für die Bindung an das Zielantigen CD30 verantwortlich ist (Targeting), soll der TNF- α -Anteil im wesentlichen die Effektorfunktion des Konstruktes übernehmen.

5.3.2.1 Dimere Struktur, Funktionalität

Wie oben bereits beschrieben, wird die Rigidität des Gesamtkonstruktes durch die direkte Anbindung der N-terminalen TNF-Domäne an die „hinge“-Region verstärkt. Die bekannte Eigenschaft der TNF-Monomere sich zusammenzulagern, um einen stabilen Zustand zu erlangen, verstärkt diesen Effekt.

Dabei stellt sich jedoch die Frage der funktionellen Aktivität des TNF-Anteils des Immunzytokins. Literaturdaten über die Deletion der ersten Aminosäurereste des nativen TNF zeigen entweder kein Einfluss auf die Aktivität oder sogar eine vierfache Steigerung (Guo et al., 1995). Eine andere wichtige Frage stellt sich in Bezug auf die dimere Struktur der TNF-Komponente, denn normalerweise ist die trimere Struktur von TNF und TNF-Rezeptor-Superfamilien essentiell für ihre Struktur und Signalstöchiometrie (Locksley et al., 2001).

Zusätzlich zu neueren Daten, die die Überlegenheit des membranständigen TNF zeigen, in positiv kooperativer Art durch beide TNF-Rezeptor-Formen zu agieren, war ein TNF-R2-spezifischer monoklonaler Antikörper entwickelt worden mit der Fähigkeit, die Aktivität von membranständigem TNF in Gegenwart von löslichem TNF zu imitieren (Grell et al., 1995). Kinetische Studien verdeutlichten, dass dieser Antikörper die Rezeptor-Ligand-Bindung stabilisierte, was zu einer verlängerten Halbwertszeit des Komplexes führte. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die intrazelluläre Signalstärke von der Kinetik der Rezeptor-Ligand-Komplexbildung abhängig sein könnte, weil eine schnelle Dissoziation von löslichem TNF vom TNF-Rezeptor 2 kein intrazelluläres Signal auslösen konnte (Grell et al., 1995). Nachfolgende Studien zeigten, dass die agonistische Aktivität dieses Antikörpers von seiner dimeren IgG1-Struktur abhängt, da Fab-Antikörper inaktiv waren. (Krippner-Heidenreich et al., 2002). Die Tatsache, dass die Dimerisierung des TNF-R2 ein obligatorischer Schritt zur Initiierung der Signalkaskade darstellt (Grell et al., 1993) weist ebenfalls darauf hin, dass das sekundäre „Clustern“ des TNF-TNF-R2-Komplexes durch diesen Antikörper den verantwortlichen Mechanismus zur verstärkten memTNF-TNF-R2-Signalkapazität darstellen könnte. Demzufolge ist das Ausmaß des TNF-R2 Signals nicht alleine durch die Affinität der Rezeptor-Ligand-Interaktion festgelegt (Grell et al., 1998).

Dazu passend verhielt sich ein ähnliches Fusionskonstrukt, bestehend aus einem gegen das Fibroblasten-aktivierende-Protein gerichteten IgG1 (ebenfalls CH2/CH3 deletiert) und TNF (Bauer et al., 2004). Es bindet an Etanercept, ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von TNF-R2 und der hinge- und FC-Domäne des humanen IgG1 (Scallon et al., 2002). Komplexe aus dem anti-FAP-TNF-Dimer und Etanercept waren über die Zeit verglichen stabiler als anti-FAP-single-chain-Antikörper, die gentechnisch mit TNF-Monomeren fusioniert wurden. Zusammengenommen könnte dies erklären, warum IgG1-TNF-Dimere die Bioaktivität von membranständigem TNF ausüben können, obwohl die

Dimerstruktur eine reduzierte Affinität zum TNF-R1 verglichen mit rekombinant löslichem TNF (Trimer) hervorruft (Petersen et al., 1989).

5.3.2.2. Internalisation und Freisetzung von Sauerstoffradikalen

Die Induktion intrazellulärer „Death domain“ Signalwege über TNF-R1, die zur Apoptose führenden eingeschlossen, basieren auf der Internalisation des Ligand-Rezeptor-Komplexes (Schütze et al., 1999). Die Größe von 150 kD des beschriebenen Fusionsproteins könnte diesen Endozytoseprozess sterisch behindern. Im Gegensatz zu TNF-R1 induzierten apoptotischen Signalwegen sind die Antworten der Polymorphonukleären Leukozyten (PMN) auf den TNF getriggerten „respiratory burst“ wahrscheinlich nicht von der Rezeptorkomplex-internalisierung abhängig, weil die prolinreiche Tyrosinkinase (pyk2), die eine kritische Rolle in diesem Aktivierungsprozess spielt, nicht an die „Death domain“ von TNF-R1 angebunden ist. Deshalb kann diese Kinaseaktivität auch nicht von bekannten TNF-R1-Endozytoseblockern inhibiert werden (Schütze et al., 1999; Han et al., 2003). Das Enzym agiert über die Integration von TNF- und β_2 -Integrin-Signalen, wohingegen die Kooperation von TNF-R2 im Induktionsprozess des „respiratory burst“ bei niedrigen TNF-Konzentrationen wichtiger ist. Dies weist eher auf eine modulierende Rolle des Zytokins bei physiologisch relevanten Konzentrationen hin (Perez et al., 1990).

Dies wird bestätigt durch die Daten von Bauer et al., 2004, die ein gleiches Ausmaß der H_2O_2 -Freisetzung aus adhären PMNs nach Stimulation mit rhTNF und dem Immunzytokin zeigten. Dies belegt aber auch die Bedeutung der CH2/CH3 Deletion des Immunzytokins, um ein TNF-induziertes Triggern peripherer Blutmakrophagen über Fc-Rezeptorbindung unabhängig von der Bindung am Zielantigen (CD30) zu verhindern.

5.3.2.3 Aktivität eines membranständigen Immunzytokins über TNF-R2

Die in den vorausgehenden Abschnitten diskutierte TNF-Aktivität bezieht sich auf löslichen TNF über den TNF-R1. Wenn jedoch das rigide Konstrukt auf der Zelloberfläche gebunden ist, imitiert es die Aktivität von membranständigem TNF über den TNF-R2. Wie im Ergebnisteil beschrieben, zeigt das CD30-TNF-Fusionsprotein in einem Versuch direkte

zelloberflächengebundene Zytotoxizität durch Zell-Zell-Kontakt direkt benachbarter Zellen (Abb. 6), indem es an CD30 gebunden an der TNF-sensiblen Wehi-S-Zelllinie Apoptose induzieren kann. Dies wurde in einem ähnlichen Ansatz bereits für das anti-FAP-TNF-Fusionsprotein gezeigt (Bauer et al., 2004). In derselben Arbeit konnte auch an der TNF-R1-resistenten Zelllinie Colo 205 gezeigt werden, dass membranständige TNF-Aktivität den Zelltod über das TNF-R2-Signal und damit über die IgG1-abhängige Rezeptor-Clusterbildung auslöst. In derselben Arbeit wurde über Induktion von endotheliale Tissuefactor aus HUVEC ein weiterer Hinweis darauf erbracht, dass derartig aufgebaute Immunzytokine TNF-R2 abhängige Signalwege anschalten können. Beide TNF-Rezeptoren sind in die TNF-Antwort involviert, die zur Expression dieses endothelialen prothrombotischen Faktors führen (Schmidt et al., 1995). Dabei können jedoch bei gesättigten TNF-R1-Rezeptorbindungen durch löslichen TNF nur durch zusätzliche TNF-R2-Signale höhere Raten an TF-Expression erreicht werden (Gell et al., 1995). Genau dies konnte mit dem anti-FAP-TNF-Fusionsprotein erreicht werden. Obwohl dies im Rahmen dieser Arbeit noch nicht gezeigt wurde, ist in Analogie zu der beschriebenen Arbeit von Bauer et al., anzunehmen, dass sich ein CD30-TNF-Immunzytokin bezüglich der TF-Freisetzung ähnlich verhält. Weitere Untersuchungen mit dem CD-30-TNF-Konstrukt werden diese Frage beantworten müssen.

5.3.2.4. In-vivo-Toxizität eines TNF-Immunzytokins

Tissuefactorfreisetzung ist das Schlüsselereignis zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade, was zum thrombotischen Infarkt von Tumorgewebe führt. Zerstörung von Tumorgefäßen ist die Hauptwirkung von TNF bei der einzigen klinisch zugelassenen Anwendung von rhTNF, der isolierten Extremitätenperfusion (Ruegg et al., 1998). Um diese Restriktion der TNF-Applikation zur Tumorthherapie überwinden zu können, muss die reduzierte Toxizität des Immunzytokins in vivo gezeigt werden. Es besteht nämlich die Gefahr, dass nach der intravenösen Applikation des Konstruktes der TNF-Anteil trotz der geplanten Antikörperbindung möglicherweise mit TNF-Rezeptoren vom Typ I von nicht anvisierten Zellen – vor allem Endothelzellen – interagiert. Diese Stimulation könnte die vaskuläre Permeabilität erhöhen und letztlich zu einem „Capillary-leak-Syndrom“ führen (Curnis et al., 2000; Ferero et al., 2001). Bauer et al., haben die Toxizität des anti-FAP-TNF-Fusionsproteins im Vergleich zu rhTNF in BALB/c nu/nu Mäusen getestet. Dabei zeigte sich, dass der trimere rhTNF deutlich toxischer ist als das Fusionsprotein mit dimerem TNF.

Während alle Mäuse mit rhTNF bei einer 50% letalen Dosis (LD50) innerhalb von 24 Stunden starben, konnten die Mäuse mit dem Fusionsprotein in einer dreifach höheren Dosis mehrfach ohne Nebenwirkung therapiert werden. Allerdings war bei tumortragenden Mäusen unter Therapie mit dem Fusionsprotein ein signifikanter Gewichtsverlust und Kachexie festzustellen. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, dass tumortragende Mäuse anfälliger für TNF-vermittelte Kachexie sind (Krosnick et al., 1989). In der vorliegenden Arbeit wurden keine in-vivo Versuche durchgeführt, so dass keine in vivo-Toxizitäten ermittelt wurden. Es ist zwar anzunehmen, dass sich ein CD30-TNF-Fusionsprotein in vivo ähnlich verhält, aber weitere Untersuchungen mit diesem Konstrukt werden dies in-vivo belegen müssen.

5.3.2.5. Antitumorwirksamkeit

Obwohl das Mausmodell von Bauer et al., nicht unbedingt geeignet war, eine Antitumorwirksamkeit nachzuweisen, zeigte sich nach Applikation des Immunzytokins eine signifikante Verlangsamung des Wachstums der zuvor etablierten Tumoren. Die Gründe für eine unzureichende Wirkung des TNF-Konstruktes in der Maus liegen zum einen in einer insuffizienten Induktion von TNF-R2 durch den humanen TNF (Ameloot et al., 2001), zum anderen in der Verwendung einer nicht TNF-sensitiven Tumorzelllinie HT1080FAP⁺. Demzufolge scheidet die TNF-vermittelte Apoptoseinduktion bei diesem Modell aus. Das Wachstumsmuster der xenotransplantierten Fibrosarkome zeigte nur eine geringe Vaskularisation, weshalb eine TNF-vermittelte Hochregulation von Tissuefaktor und dadurch ausgelöste hämorrhagische Tumornekrose weitestgehend ausgeschlossen sind. Außerdem ist der „respiratory burst“ von murinen Neutrophilen als Antwort auf löslichen TNF zehnfach geringer als der von menschlichen (Lowell et al., 1996; Yaffe et al., 1999).

Nichtsdestotrotz zeigte sich in der immunhistochemischen Analyse der Tumoren eine FAP antigenabhängige Rekrutierung muriner Leukozyten als Haupteffektormechanismus und zwar reproduzierbar und in dosisabhängiger Weise. Dies lässt hoffen, dass die TNF vermittelten Antitumorwirkungen in einem besser geeigneten Mausmodell noch wirkungsvoller eintreten und dann genauer analysiert werden können. Zu überlegen wäre vielleicht ein syngenes Mausmodell, indem sowohl ein muriner Antikörper gegen murines FAP als auch murines TNF als auch eine murine Tumorzelllinie eingesetzt werden. In Analogie könnte mit dem CD30

TNF-Konstrukt verfahren und dabei auf bereits gemachte Erfahrungen mit dem Anti-FAP-TNF-Fusionsprotein zurückgegriffen werden.

5.4. Ausblick

Das in dieser Arbeit beschriebene Immunzytokin muss zunächst noch weiter *in vitro* untersucht werden. Dazu gehören sowohl Analysen der Bindungseigenschaften mittels Biacore als auch eine Charakterisierung der Cytotoxizität durch entsprechende H₂O₂-release-assays. Im Anschluss wäre eine weitere Untersuchung im Mausmodell mit CD30 positiven Tumorzellen denkbar. Parallel dazu müsste zur Produktion größerer Antikörpermengen eine stabile Zelllinie etabliert werden und die Produktion des Antikörpers unter GMP-Bedingungen sichergestellt werden. Bei entsprechendem Verlauf der weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Experimente wäre der letzte Schritt dann eine Phase I/II-Studie im Menschen.