

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie der Krebserkrankungen

Bösartige Erkrankungen stellen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in westlichen Ländern dar. Laut Bundesamt für Statistik sind im Jahr 2000 pro 100 000 Einwohner 8576 Männer und 6936 Frauen an malignen Tumorerkrankungen verstorben. Vor ungefähr 25 Jahren wurden verschiedene wirksame Polychemotherapie-Schemata eingeführt, mit denen mehrere maligne Erkrankungen geheilt werden können. Jedoch ist selbst unter Ausschöpfung aller therapeutischen Möglichkeiten wie chirurgischer Behandlung, Chemotherapie, Strahlentherapie oder Hormontherapie die Prognose für viele Tumorerkrankungen weiterhin schlecht. So weist zum Beispiel das bei Frauen am häufigsten vorkommende Mammakarzinom beim Auftreten von Fernmetastasen eine 5-Jahres-Überlebensrate von weniger als 10% auf. Für das bei Männern am häufigsten auftretende Bronchialkarzinom ergibt sich aufgrund der oftmals vorliegenden Inoperabilität bei Diagnosestellung mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8-15% eine noch schlechtere Prognose (Zeitschrift: „Krebs in Deutschland“; Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut, 4. Ausgabe, 2004). Im Vordergrund der Tumorforschung steht also die Entwicklung neuer Therapiestrategien und Behandlungs-Schemata.

2.2. Tumorimmuntherapie als Therapieoption

Es gibt verschiedene Arten der Behandlung bösartiger Erkrankungen. Chemotherapie, Bestrahlung und chirurgische Therapie gehören zu den konventionellen Strategien der Tumorbehandlung. Oftmals reichen diese Verfahren für eine Heilung der Tumorerkrankung jedoch nicht aus. Eine der neuen Therapieoptionen, die aufgrund der molekularbiologischen Entwicklungen der letzten Jahre möglich erscheinen, ist die Immuntherapie von Tumoren.

Die Tumorimmuntherapie soll das Immunsystem des Patienten beeinflussen, so dass der Tumor von den körpereigenen Abwehrkräften erkannt und bekämpft wird (Paukovits et al., 2004).

Dabei wird zwischen aktiver und passiver Immuntherapie unterschieden:

2.2.1. Aktive Ansätze - Tumorstabilisierung

Ein vielversprechender Ansatz der Immuntherapie ist die Vakzinierung. Bei der aktiven Immuntherapie wird die Vakzinierung mit tumorassoziierten Peptiden oder Proteinen angestrebt, die im Körper -wie es für virale Proteine bekannt ist- eine integrierte Immunantwort gegen den antigenträgenden Tumor induzieren sollen. Die Basis für diese aktive Immuntherapie bildet die Identifikation von tumorassoziierten Antigenen (TAA), welche durch verschiedene menschliche Tumorarten exprimiert werden (Wang et al., 2005). Bei der Vakzinierung werden die TAA über MHC Klasse I und MHC Klasse II auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) dargestellt. Werden diese durch spezifische T-Zellen erkannt, kann so eine aktive Immunantwort induziert und dadurch die Tumorzellen zerstört werden (Sathaporn et Eremin, 2001). Der Einsatz der Vakzinierung für die Therapie unterschiedlicher Tumoren wie beispielsweise bei B-Zell-Lymphomen (Adam et al., 2007), Brustkrebs (Allan et al., 2004) oder bei Hirntumoren (Soling et Rainov 2001) ist momentan zum Teil noch in der Erprobung und zeigt bereits weitreichende Ansätze: Beispielsweise ist HER2/neu ein überexprimiertes Antigen auf Brustkrebszellen. Zwei kombinierte Vakzine gegen HER2/neu aktivieren bei Mäusen, geimpft mit Brustkrebszellen, die zelluläre und die humorale Immunantwort, und die mittlere Überlebensrate war bei diesen Mäusen signifikant höher als bei der Kontrollgruppe (Orlandi et al., 2007).

Um eine humorale oder zelluläre Immunantwort gegen den Tumor hervorzurufen, sind derzeit Tumorzellen oder Tumorzellextrakte, gen-modifizierte Tumorzellen, Hitzeschockproteine oder tumorspezifische Peptide als Vakzine in Erprobung (Liao et al., 2006). In einer Studie wurden 42 Patienten mit metastasiertem malignen Melanom mit Hitzeschockproteinen immunisiert, woraufhin 18% der Patienten eine lang anhaltende klinische Antwort zeigten (2 Patienten mit kompletter Remission, 3 Patienten mit stabiler Erkrankung) (Parmiani et al., 2002).

2.2.2. Passive Ansätze - monoklonale Antikörper

Seit einigen Jahren sind monoklonale Antikörper auf dem Gebiet der Onkologie im therapeutischen Einsatz. In der Klinik findet man derzeit zur Behandlung maligner Erkrankungen durch passive Immuntherapie native oder an Toxine gekoppelte monoklonale Antikörper. Der Vorteil dieser monoklonalen Antikörper ist der unterschiedliche Wirkmechanismus und die unterschiedlichen Nebenwirkungen im Vergleich zur Standard-Chemotherapie. Während die Chemotherapie vor allem proliferierenden Zellen angreift und deshalb auch oft normale Körperzellen schädigt, kann die Immuntherapie spezifisch Tumorzellen angreifen (Paukovits et al., 2004).

Ein erfolgreiches Beispiel für den Einsatz monoklonaler Antikörper in der Klinik ist der humanisierte monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). Er ist gegen den HER2/neu Membranrezeptor gerichtet, der bei etwa 25% aller Mammakarzinom-Patientinnen überexprimiert vorliegt. In einer Studie, in der Trastuzumab kombiniert mit Chemotherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom eingesetzt wurde, waren das mediane Überleben, die mediane Zeit zur Progression und die mediane Dauer des Ansprechens signifikant verlängert (Raab et al., 2001).

Ein weiteres Beispiel ist der monoklonale Antikörper Rituximab (Mabthera®), ein anti-CD20-Antikörper, der zur Behandlung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-Zell-NHL) eingesetzt wird. In einer Studie wurde die Wirksamkeit einer Chemotherapie nach dem CHOP-Schema in Kombination mit und ohne Rituximab (Mabthera®) getestet. Dabei traten in der Kombinationsgruppe bei 93,8% der Patienten eine Remission auf, in der Chemotherapiegruppe waren es nur 75% (Wu et al., 2005). Rituximab in Kombination mit sechs Zyklen CHOP ist eine effektive Behandlung für junge Patienten mit diffus-großzelligen B-Zell-Lymphomen (Pfreundschuh et al., 2006). Bei 79% der Patienten, die mit dem CHOP-Schema in Kombination mit Rituximab behandelt wurden, war nach drei Jahren noch kein Rezidiv des B-Zell-Lymphoms aufgetreten. In der Vergleichsgruppe ohne Rituximab hatten nur 59% der Patienten noch kein Rezidiv nach drei Jahren. Auch in anderen Studien zeigte sich, dass die Kombination von Rituximab und Chemotherapeutika wie Vincristin und Cyclophosphamid bei Patienten mit fortgeschrittenen B-Zell-NHL in der Lage sein kann, eine komplette Remission zu bewirken (Lazarino et al., 2005).

2.3. Die Herstellung monoklonaler Antikörper

Monoklonale Antikörper sind Immunglobulin-Moleküle mit spezifischen Antigen-Bindungsdomänen in der hypervariablen Region, die von einem definierten Zellklon produziert werden (Bokemeyer et Panse, 2005). 1975 entwickelten Kohler und Milstein die Hybridomtechnik, mit der man eine homogene Antikörperpopulation von bekannter Spezifität herstellen kann (Kohler et Milstein 1975).

Ursprünglich wurden therapeutische Antikörper durch Immunisierung von Mäusen mit humanen Antigenen gewonnen und hatten entsprechend immunogene Epitope (Borchman et al., 2001). Murine Antikörper führten häufig zur Bildung von HAMA (human anti mouse antibodies) durch Aktivierung des humanen Immunsystems (Schaeffer et al., 2001). Deshalb wurden mit Hilfe gentechnischer Methoden die konstanten murinen Domänen des Antikörpers durch humane ersetzt, die variablen Domänen blieben murinen Ursprungs, das Konstrukt wird als chimärer Antikörper bezeichnet (Morrison et al., 1984). ReoPro® kam als einer der ersten chimären Antikörper 1994 auf den Markt, auch Mabthera® ist ein chimärer Antikörper. Doch auch hier wurde das Auftreten von HACAs (human anti-chimeric antibodies) beobachtet (Bell et Kamm, 2000).

Um die murine Komponente des Antikörpers weiter zu minimieren, wurden humanisierte Antikörper konstruiert (Jones et al., 1986). In diesen Antikörpern wurden nur die CDR-Schleifen, die für die Antigen-Bindung verantwortlich sind, in den humanen Antikörper eingebaut, wie beispielsweise bei Herceptin®.

Während die Produktion muriner Antikörper mittlerweile Routine ist, war die Produktion vollständiger humaner Antikörper mittels Hybridomtechnik schwierig, da humane Hybridome nicht genug stabile Antikörper produzierten (Sang Jick Kim et al., 2005). Daraufhin wurden neue Methoden zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper entwickelt, wie beispielsweise die Phagen-display Technologie und die Produktion kompletter humaner Antikörper durch transgene humane Mäuse (Sanz et al., 2005). Rekombinante Phagen-Display-Bibliotheken erlauben die Konstruktion und Selektion von humanen monoklonalen Antikörpern beliebiger Spezifität (C. Dantas-Barbosa et al., 2005). Dies wird auch bei der Produktion der Antikörper durch transgene humane Mäuse erreicht (Hudson et al., 2003).

Hier wird die für Immunglobuline kodierende DNA der Mäuse durch humane Sequenzen ersetzt (Tomizuka et al., 2000). Durch diese humanen Antikörper wurden allergische Reaktionen des Patienten stark reduziert. Jedoch zeigte sich bei diesen humanen monoklonalen Antikörpern, die nicht in menschlichen Zellen produziert wurden, teilweise ein Versagen in ihrer Funktion, das Immunsystem zu aktivieren. Ein Ziel ist es, therapeutische Antikörper aus menschlichen B-Zellen zu gewinnen (Jian Li et al., 2006).

2.4. Die Bedeutung monoklonaler Antikörper

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, werden monoklonale Antikörper von einem einzigen B-Zellklon produziert. Diese Antikörper zeigen einige positive Aspekte in der Therapie maligner Erkrankungen. Während konventionelle Chemotherapien vor allem proliferierenden Zellen angreifen, binden entsprechende Antikörper an Oberflächenantigene, die auf gesunden Zellen weniger häufig exprimiert werden, als auf Tumorzellen. Dadurch sind die Auswirkungen der Antikörper auf gesunde Zellen wesentlich geringer als auf Tumorzellen, wodurch eine höhere Effektivität und geringere Nebenwirkungen der Therapie entstehen (Mohindru et al., 2005). Ausserdem besitzen Antikörper ein anderes Nebenwirkungsspektrum und vereinen in einer Kombination mit Chemotherapie synergistische Therapieeffekte bei unterschiedlichen Toxizitäten.

Neben ihrer Spezifität sind weitere Vorteile der monoklonalen Antikörper ihre lange Halbwertszeit und ihre Wirkung über unterschiedliche zytotoxische Mechanismen (Lazar et al., 2006). Unterschieden werden unkonjugierte und konjugierte monoklonale Antikörper (mAK).

2.4.1. Unkonjugierte monoklonale Antikörper

Passive Immuntherapie mit unkonjugierten monoklonalen Antikörpern ist eine etablierte Methode in der Krebstherapie, obwohl in den meisten Fällen der genaue Wirkungsmechanismus *in vivo* nicht bekannt ist (Stern et al., 2005). Als Wirkungsmechanismen von unkonjugierten Antikörpern diskutiert man direkte Effekte auf die Tumorzelle – Blockade von Wachstumsfaktoren oder Induktion von Apoptose – und

indirekte, über das Immunsystem vermittelte Mechanismen, wie komplement - (CDC – „complement-dependent cytotoxicity“) oder zellulär vermittelte Zytotoxizität (ADCC – „antibody dependent cellular cytotoxicity“) (Dillman, 1994). In einer Studie wurde gezeigt, dass der Gangliosid GD2 spezifische monoklonale Maus-IgG2-Antikörper sowohl ADCC als auch CDC auslösen kann. Dieser Antikörper hat eine ähnliche Aktivität wie der humane IgG1-Antikörper, der am häufigsten verwendete Isotyp chimärer und humanisierter monoklonaler Antikörper in der Tumortherapie (Imai et al., 2005).

Für die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper ist die ADCC einer der wichtigsten Mechanismen (Graziano et Ranger, 1987). Zur Rekrutierung von Effektorzellen müssen die Antikörper mittel ihres konstanten Fc-Teils an spezifische Rezeptoren (Fc-Rezeptoren) auf zytotoxischen Zellen binden (Repp et al., 2001). Die an die Tumorzelle gebundenen monoklonalen Antikörper können mit ihrem Fc-Anteil beispielsweise gleichzeitig an natürliche Killerzellen binden, wodurch diese aktiviert werden und lytische Enzyme freisetzen. Dadurch werden die Tumorzellen permeabel, und es kommt durch osmotische Schwellung zur Lyse der Zelle.

Die CDC verläuft abhängig von der Bindung zweier C1q-Moleküle des Komplementsystems an den Gelenkteil und die CH₂-Region des Antikörpers. Durch den Antigen-Antikörper-Komplex kommt es zu Konformationsänderungen in diesen Antikörperregionen, und Komplement-Faktoren können gebunden werden (Klein et al., 1981). Die Tumorzellen werden nun durch die in Gang gesetzte Komplementkaskade lysiert.

Alemtuzumab (Mabcampath®) und der oben schon erwähnte Antikörper Rituximab (Mabthera®) sind Beispiele für unkonjugierte monoklonale Antikörper. In der Behandlung von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen oder der B-CLL (chronisch lymphatische Leukämie) mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab (Mabthera®) zeigte sich nach Infusion des Antikörpers eine schnelle B-Zell Elimination aus dem Blutstrom, was auf die komplement-vermittelte Lyse und/oder Phagozytose der B-Zellen mittels eines Fc γ -Rezeptors auf Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zurückzuführen ist (Kennedy et al., 2004). Alemtuzumab (Mabcampath®) ist gegen das CD52-Antigen gerichtet und wird ebenfalls in der Therapie der B-CLL eingesetzt. In Anwesenheit von Komplement-Faktoren ist Alemtuzumab *in vitro* in der Lage, 80% aller malignen B-Zellen mittels komplement-vermittelter Zytotoxizität (CDC) zu lysieren, während seine zytotoxische Aktivität in Abwesenheit von Komplement-Faktoren sehr gering ist (Golay et al., 2004).

2.4.2. Konjugierte monoklonale Antikörper

Das Leitprinzip der konjugierten monoklonalen Antikörper (mAK verbunden mit Toxinen oder Medikamenten) ist die spezifischere Wirkung auf Tumorzellen mit reduzierten systemischen Nebenwirkungen, die die Antikörper ansonsten hätten (Ortin, 2005). Gemtuzumab ozogamicin (GO, Myelotarg™) ist ein monoklonaler anti-CD33 IgG4, konjugiert mit dem Zytostatikum Calicheamicin (Zein et al, 1988). Er wird in der Rezidivtherapie der CD33-positiven akuten myeloischen Leukämie von Patienten älter als 60 Jahre erfolgreich eingesetzt, annähernd 25% der Patienten sprachen auf diese Therapie an (Bross et al., 2001). Der Antikörper bindet spezifisch an CD33-positive Zellen, dringt in die Zelle ein und gibt das Toxin Calicheamicin erst in der Zelle ab, wodurch systemische Nebenwirkungen des Zytostatikums reduziert werden können (Tsimberidou et al., 2005). Das CD33-Antigen besitzt zwei tyrosinspezifische Immunrezeptoren („immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM)) in der zytoplasmatischen Region, diese Rezeptoren kontrollieren die Internalisation der an CD33 gebundenen Antikörper in die myeloischen Zellen (Walter et al., 2005).

2.5. Struktur und Funktion von Antikörpern

Das Immunglobulin (Ig) Molekül besteht aus schweren und leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Man kennt zwei Hauptgruppen der leichten Ketten (κ und λ) und fünf Hauptgruppen der schweren Ketten (α , μ , γ , δ und ϵ) (Martin, 1969). Die leichten Ketten sind allen Hauptgruppen der Antikörper gemeinsam. Es existieren fünf unterschiedliche Ig-Isotypen, die durch den konstanten Teil ihrer schweren Kette voneinander unterschieden werden (Davis et al., 1988).

Antikörper können auf drei verschiedenen Wegen zur Immunität beitragen: Sie können Pathogene neutralisieren, sie können durch Opsonierung die Phagozytose unterstützen, und sie können das Komplementsystem aktivieren.

2.5.1. Der IgG-Antikörper

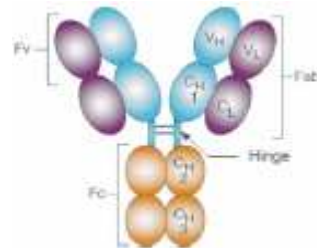


Abbildung 1: Die Struktur eines IgG-Antikörpers, modifiziert nach Kim, Park, Hong, *Molecules and Cells*, 18, 2005

Ein IgG-Molekül besitzt zwei leichte und zwei schwere Ketten (Isotyp γ) in äquimolaren Mengen. Die leichten Ketten haben ein Molekulargewicht von je 22 kDa, die schweren je 50 kDa. Das Gesamt-IgG Molekül hat somit ein Molekulargewicht von ca. 144 kDa. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen und einer konstanten Region, die schweren Ketten haben eine variable und drei konstante Regionen (CH1, CH2, CH3).

Funktionell teilt man Antikörper in eine konstante (Fc) Region und in zwei Antigen-bindende Regionen (Fab) ein. Die variablen Anteile der schweren und leichten Kette in der Fab-Region sind für die Antigen-Bindung zuständig. Die antigen-bindenden Stellen bilden hypervariable Schleifen, die sogenannten Komplementarität-determinierenden Regionen (CDR), da sie zur antigenen Determinate komplementär sind (Sang Jick Kim et al., 2005). Die Fc-Region vermittelt die Funktion des Antikörpers, die ADCC und die CDC.

Vier verschiedene Subklassen der humanen IgG-Antikörper (IgG 1-4) sind bisher beschrieben, die sich in Länge und Struktur ihres Gelenkteils (hinge region) unterscheiden (Michaelsen et al., 1994). Ein gemeinsames Merkmal der IgG-Isotypen ist, dass jede schwere Kette einen Kohlehydratrest an Asn 298 in CH2 besitzt, der wichtig für die Funktion des Antikörpers ist (Braun et al., 1992). IgG1 und IgG3 sind wesentlich effektiver als IgG2 und IgG4, die erste Komponente des Komplementsystems zu binden und dieses zu aktivieren (Bredius et al., 1992). Der IgG1-Antikörper ist der häufigste Isotyp im Blut und

extrazellulären Flüssigkeiten des Menschen und kann, wie auch der IgM-Antikörper, effizient das Komplementsystem aktivieren.

2.5.2. Der IgM-Antikörper



Abbildung 2: Die mögliche Struktur eines IgM-Antikörpers, links als Hexamer, rechts als Pentamer, modifiziert nach Wiersma, Collins, Fazel, Shulman, *The Journal of Immunology*, 160, 1998

IgM-Antikörper sind die ersten bei einer Immunreaktion produzierten Antikörper. Sie bestehen wie alle Antikörper aus schweren (Isotyp μ) und leichten Ketten und liegen im Serum, im Gegensatz zu den IgG-Antikörpern, hauptsächlich als Pentamer vor, können aber auch als Hexamer vorkommen (Hughey et al., 1998). Jedes IgM-Monomer ist im Aufbau den IgG-Antikörpern ähnlich, aber anstelle der Gelenkregion besitzt es eine weitere Domäne, besteht also aus vier konstanten Regionen (CH1-4) und ist dadurch weniger flexibel als IgG (Poon et al., 1995).

IgM als Pentamer besteht aus fünf monomeren Untereinheiten, die durch Disulfidbindungen kreisförmig angeordnet sind (Davis et al., 1988). Die leichten Ketten sind ähnlich denen des IgG-Moleküls, die schweren Ketten haben ein Molekulargewicht jeweils zwischen 65 und 67 kD, sie besitzen mehr Kohlenhydrat- und Neuraminsäureanteile als die des IgG-Moleküls (Martin, 1968). Als Pentamer haben sie dann ein Molekulargewicht von ca. 900 kDa.

In einer Studie mit chimären IgM-Antikörpern zeigten sich zwei Hauptunterschiede zwischen IgM in der Form eines Pentamers und IgM als Hexamer: Erstens findet man im Pentamer eine

J-Kette, im Hexamer nicht, und zweitens aktiviert das Hexamer das menschliche Komplementsystem 4-13-fach effektiver als das Pentamer (Collins et al., 2002). In anderen Studien wurden die von menschlichen B-Zellen sezernierten IgM-Antikörper bezüglich ihrer Fähigkeit, das Komplementsystem zu aktivieren, getestet. In verschiedenen Lyse-Assays aktiviert IgM als Hexamer das Komplementsystem 20-fach effektiver als IgM als Pentamer (Davis, et al., 1989).

Die J-Kette, eine Polypeptidkette von 15 kDa, reguliert die Struktur und Funktion der polymerisierten IgM-Moleküle (Randall et al., 1992), und verbindet über Disulfidbrücken fünf Monomere zu einem IgM-Pentamer. Durch die Bindung von IgM an die J-Kette werden die Disulfidbindungen des Antikörpers beeinflusst und dadurch deren zytolytische Aktivität behindert (Wiersma et al., 1998). C1q, das erste Protein der Komplementkaskade, ist ein hexameres Molekül (Svehag, S.E., 1972). Es ist möglich, dass der Fc-Teil des hexameren IgM deshalb besser geeignet ist, das C1q-Molekül zu binden (Randall et al., 1990).

2.6. Das Komplementsystem

Einer der Hauptmechanismen in der Wirkung monoklonaler Antikörper in der Krebstherapie ist die Aktivierung des Komplementsystems (Ragupathi et al, 2005). Das Komplementsystem besteht aus Proteinen, die im Serum oder auf Zelloberflächen vorkommen, und die in der Lage sind, in den Organismus eingedrungene Fremdkörper zu inaktivieren. Es wird über den klassischen, den alternativen oder den Lektin-Weg aktiviert. Der alternative Weg wird durch die Bindung einer spontan aktivierten Komplementkomponente an die Oberfläche eines Pathogens ausgelöst, der Lektin-Weg durch Bindung von einem Serumlektin, dem mannanbindenden Lektin (MBL), an mannosehaltige Kohlenhydrate auf Mikroorganismen und der klassische Weg durch Antigen-Antikörper-Komplexe (Richiani et al., 2005). Jeder dieser Wege führt zur Bildung eines C3-Konvertase-Komplexes an der Oberfläche der Zielzellen.

Die Komplementkaskade über den klassischen Weg findet statt, wenn C1q an den Fc-Teil der sich im Komplex mit dem Antigen befindlichen Antikörper bindet (Hughes-Jones, Gardner 1979). Zusammen mit zwei Serinproteasen, C1r und C1s, bildet C1q den C1-Komplex, die erste Komponente des Komplementsystems (Idusogie et al., 2000). C1q ist ein Glykoproteinkomplex mit einem Molekulargewicht von ca. 410 kDa, der im menschlichen Serum in einer Konzentration von ca. 70 µg/ml vorliegt (Cooper, 1985).

Die CH2-Domäne der schweren Kette des Antikörpers ist verantwortlich für die Bindung des ersten Komplementfaktors und der darauf folgenden Komplementaktivierung (Mi-Hua Tao et al., 1993). Binden IgG- oder IgM-Antikörper an eine (Tumor-) Zelle, werden die Kohlehydratketten der CH2-Domäne des Antikörper-Moleküls durch eine Konformationsänderung für das Komplementsystem zugänglich gemacht, C1 bindet an die CH2-Domäne, und mehrere Antikörper werden über den C1-Komplex des Komplementsystems miteinander verbunden (Bokemeyer, Panse, 2005). Aktiviertes C1s spaltet C4, C4b bindet an das Pathogen und bindet C2. C2 wird auch von C1s gespalten und es entsteht der C4b2a-Komplex, die C3-Konvertase. Die gebildete C3-Konvertase schneidet C3 in C3b, die Haupteffektorkomponente des Komplementsystems, und in C3a. C3b ist einerseits als Opsonin an den pathogenen Zellen gebunden und aktiviert Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen zur Elimination der Immunkomplexe, andererseits aktiviert es weitere Komplementkomponenten zur Bildung des Membranangriffskomplexes (del Conde et al., 2005).

C5 wird durch die C5-Konvertase in C5a und C5b gespalten. C3a und C5a sind Anaphylatoxine. C5b bindet an C6, und zusammen mit C7, C8 und C9 bildet sich ein stabiler Komplex, der Membranangriffskomplex, der die Zerstörung der Zellmembran verursacht und zur Lyse der Zelle führt (Goldlust et al., 1974).

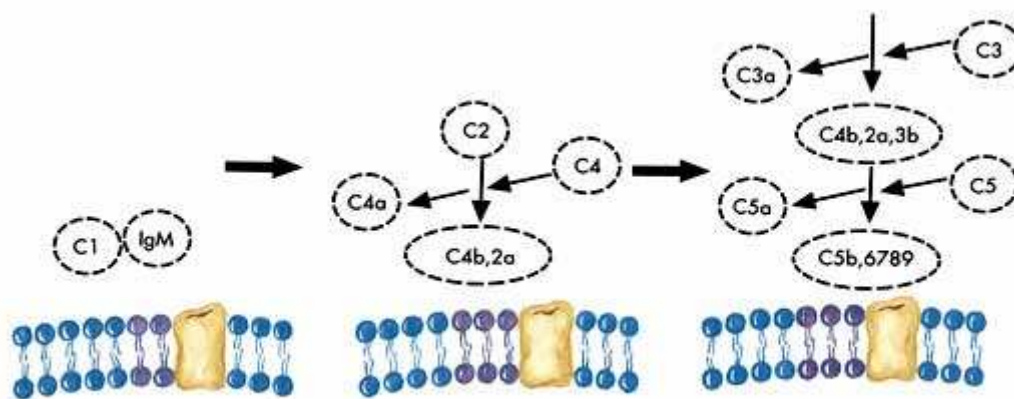


Abbildung 3: Die Komplementkaskade, modifiziert nach Smärta

Die Effektivität der komplementvermittelten Tumorzellyse ist abhängig von den verschiedenen Klassen und Subklassen der Antikörper und deren unterschiedlichen

Fähigkeiten, das Komplementsystem zu aktivieren (Ragupathi et al., 2005). Die Komplementaktivierung wird initiiert, wenn Antikörper im Antikörper-Antigen-Komplex an C1q, der ersten Komponente des klassischen Weges der Komplementaktivierung, binden. Diese Antikörper können entweder IgM- oder IgG-Antikörper sein. IgM-Antikörper können teilweise effizient das Komplementsystem aktivieren, während bei den IgG-Antikörpern nur die Subklassen IgG1 und IgG3 fähig sind, das Komplementsystem effizient zu aktivieren, bei vergleichbarer Affinität der Antikörper (Ragupathi et al., 2005).

Die Bindungsenergie, die für eine C1-Aktivierung durch IgG-Antikörper-Antigen-Komplexe erforderlich ist, wird nur erreicht, wenn mehrere IgG-Moleküle an ein C1-Molekül binden, während das Anheften von C1 an einen einzigen im Plasma vorliegenden IgM-Antikörper-Antigen-Komplex zur Komplementaktivierung führt (Boes et al., 1998).

2.7. CD33-Antigen

Das CD33-Antigen ist ein Typ1-Transmembran-Sialoglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 67 kDa. Es wurde durch den monoklonalen Antikörper anti- MY9 identifiziert (Griffin et al., 1984). Die Expression des CD33-Antigens zeigt sich physiologisch auf mehreren hämatopoetischen Vorläuferzellen, auf Vorstufen von Myelo-Monozyten und reifen myeloischen Zellen, aber nicht auf normalen pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (Andrews et al., 1983; Andrews et al., 1986). Allerdings exprimierten die Leukämiezellen bei 85 bis 90% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie das CD33-Antigen (Dinndorf et al., 1986). Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten durchschnittlich 10380 CD33 Moleküle pro leukämischem Blast im Knochenmark und 9175 Moleküle pro Blast im peripheren Blut (Jilani et al., 2002). Daher wurde dem CD33-Antigen eine wichtige Rolle als Tumor-assoziiertes Antigen zugeschrieben, und es wurde ein Ziel für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie mit monoklonalen Antikörpern (Ravandi et al., 2004).

Wie schon oben beschrieben ist Mylotarg® ein konjugierter monoklonaler Antikörper, dessen Zielantigen das CD33-Antigen auf Leukämiezellen ist. Er wurde im Mai 2000 zur Behandlung von Patienten mit CD33-positiver akuter myeloischer Leukämie zugelassen (Roman et al., 2005).

2.8. Ziel der Arbeit

Als recht viel versprechendes Therapieverfahren stellt die Immuntherapie eines der Hauptziele in der Tumorforschung der letzten Jahrzehnte dar. Um die bisher erfolgreiche Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern voranzutreiben, ist die Entwicklung weiterer monoklonaler Antikörper unerlässlich.

Ein Ansatz besteht darin, neben den momentan in der Klinik zugelassenen IgG-Antikörpern, IgM-Antikörper zu entwickeln, da diese das Komplementsystem effektiver aktivieren. Somit könnte man den Patienten mit einem Antikörper in wesentlich niedrigerer Konzentration therapieren und dadurch auch die Nebenwirkungen der Therapie reduzieren. Das CD33-Antigen stellt als ein Tumor-assoziiertes Antigen einen wichtigen Angriffspunkt für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern dar.

Ziel dieser Arbeit war es, einen monoklonalen IgM-Antikörper zu klonieren, transient zu exprimieren und aufzureinigen. Im Anschluss daran erfolgte die funktionelle Testung dieses Antikörpers auf seine Fähigkeit, spezifisch an das CD33-Antigen von CHO-Zellen zu binden und diese durch Aktivierung des Komplementsystems zu lysieren. Verglichen wurde der anti-CD33-IgM-Antikörper mit einem anti-CD33-IgG-Antikörper.