Antikörper in der Immuntherapie

Bispezifische Antikörper: Hoffnungsträger in der Krebsimmuntherapie

KATHARINA STADLBAUER, GERHARD STADLMAYR, FLORIAN RÜKER,
GORDANA WOZNIAC-KNOPP

CHRISTIAN DOPPLER LABOR FÜR INNOVATIVE IMMUNTHERAPEUTIKA, INSTITUT FÜR
MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE, DEPARTMENT FÜR BIOTECHNOLOGIE, UNIVERSITÄT
FÜR BODENKULTUR (BOKU), WIEN

Nearly seventy years have passed since the first attempts to fuse the antibodies, „magic bullets“ with exquisite target specificity, into multispecific agents that can connect a targeted cell with an effector immune cell. Such efforts have triggered a plethora of engineering advancements to optimize the antigen engagement. Even the most conserved domains of the antibody molecule have been modified to achieve two unique chains pairing, or with an introduction of novel antigen binding sites.

DOI: 10.1007/s12268-021-1618-0
© Die Autorinnen und Autoren 2021

■ Die enorme Vielfalt der Antikörper, die in der Immunantwort entstehen können, verleiht diesen Molekülen die einzigartige Fähigkeit, ihre Zielstrukturen hochspezifisch zu erkennen und sie in einer nicht kovalenten, jedoch sehr starken Wechselwirkung zu binden. Diese Eigenschaften ermöglichen, zusammen mit der hohen molekula-

ren Stabilität, die Expression von Immunglobulinen in rekombinanten Systemen und erlauben deren Anwendung als Therapeutika und diagnostische Mittel für Medizin und Forschung.

In den 1980er-Jahren wurde erstmals ein Antikörper (CD3-reaktiver OKT3) für die Hemmung der Immunantwort nach Organ-

transplantationen zugelassen. Dessen Format, das Grundgerüst eines Mausantikörpers, kann im Menschen eine unerwünschte Immunantwort auslösen, weshalb man über Jahrzehnte die Angleichung an menschliche Aminosäuresequenzen anstrebte: Zuerst wurden die variablen Domänen, die hauptsächlich für die Antigenbindung verantwortlich sind, mit konstanten Domänen menschlichen Ursprungs kombiniert (**Abb. 1**).

Die Weiterentwicklung solcher „chimären“ Antikörper waren humanisierte Antikörper: Die wichtigen Bindungs determinanten konnten in ein humanes Gerüst eingebettet werden. Die Wechselwirkung mit dem Antigen blieb bestehen, das Molekül bestand jedoch schon zu 90 Prozent aus humaner Sequenz. In den letzten zwei Jahrzehnten dienten synthetisch hergestellte Bibliotheken, in denen die Vielfalt der menschlichen Immunantwort auf der Oberfläche einfacher Organismen dargestellt wird, als Quelle rekombinanter Antikörper. Auch Antikörper, die durch Immunisierung transgener Tiere – beispielsweise Mäuse, Ratten oder Hühner mit genomisch integrierten humanen Antikörperbindungsregionen – gewonnen werden, bestehen aus rein menschlichen Antikörpersequenzen.

▲ **Abb. 1:** Therapeutische Antikörper bestehen zunehmend aus menschlichen Bauteilen (grün: Maus; blau: menschliche Sequenz).

▲ **Abb. 2:** Rekombinante Technologie ermöglicht Herstellung der monospezifischen Antikörper (oben links als Diagramm und rechts als 3D-Modell), Verbindung der variablen Domänen eines Antikörpers in „einkettige Antikörper“, die auch in ein bispezifisches Format kombiniert werden können (Mitte links als Diagramm), Produktion der bispezifischen Antikörper mittels Heterodimerisierung der C_H3 -Domänen (Mitte rechts als Diagramm) und Herstellung bispezifischer Antikörper mit einer zweiten Antigenbindungsstelle in den konstanten Domänen (mAb^2) (unten links als Diagramm und rechts als 3D-Modell).

Entstehung der bispezifischen Antikörper

In den späten 1980er-Jahren gelang es erstmals, den nur aus variablen Domänen beste-

henden Teil eines Antikörpers rekombinant herzustellen. Da die Wechselwirkung zwischen variablen Domänen der schweren und leichten Kette eher schwach ist, wurden die

beiden Untereinheiten mit einem flexiblen Linker verknüpft (**Abb. 2**, [1]). Die Verbindung mehrerer einkettiger (*single-chain Fv*) Antikörperfragmente führte zu einem multispezifischen Molekül, wobei man zur Optimierung der Produktionseigenschaften oder eines biologischen Effekts die einzelnen Untereinheiten frei wählen konnte.

Die am breitesten vertretene Klasse von Antikörpern im Plasma, Immunglobulin G, formt ein stabiles Dimer, was der stark anziehenden Wechselwirkung der C-terminalen Domänen der schweren Ketten, den C_H3 Domänen, zuzuschreiben ist. Die Strategie, wenige Aminosäuren in dieser Kontaktfläche so zu verändern, dass eine Kette selektiv nur mehr an die komplementäre binden kann, gelang durch das Einbauen von Aminosäuren mit großen, voluminösen Seitenketten in die eine Hälfte und kleinen Seitenketten in die andere Hälfte des Antikörpermoleküls. Diese effiziente Methode, genannt „Knobs-into-

Hier steht eine Anzeige.

Springer

▲ **Abb. 3:** Im domänengetauschten Antikörper ersetzt ein C_H3/C_H3 -Paar C_H1 und C_L in dem Fab-Fragment und ermöglicht die korrekte Paarung der leichten Kette in bispezifischen Antikörpern (z. B. im SEED-Format). Auch der Einbau einer neuen Antigenbindungsstelle ist auf diese Weise möglich (Diagramme oben). Im Vergleich zum mAb^2 bietet das domänengetauschte Format eine Mehrzahl an Antigenbindungsstellen an (Diagramm unten).

holes“ (Noppen in Löcher), ergab ein über 95 Prozent korrekt gepaartes heterodimerisches Produkt (**Abb. 2**, [2]) und wurde später durch weitere Mutationen verbessert.

Veränderungen der konstanten Domänen in bispezifischen Antikörpern

Den konstanten Domänen eines Antikörpers wurden hauptsächlich das Auslösen der Effektorfunktionen und Interaktionen mit Liganden, die eine lange Halbwertszeit ermöglichen, zugeschrieben. Deshalb war die Idee, in den konstanten Domänen eine neue Antigenbindungsstelle zu schaffen und ein neues Format symmetrischer, homodimerer Antikörpermoleküle zu bilden, gewagt und herausfordernd. Das Beispiel eines Fc-Fragments, das mit hoher Affinität an den Tumormarker Her2 binden kann, spezifische Abtötung der Zielzellen mithilfe der natürlichen Killerzellen hervorruft und eine lange Halbwertszeit *in vivo* aufweist, deutete die

Möglichkeit an, dass derartige bispezifische Antikörper, genannt auch mAb^2 , herstellbar und therapeutisch interessant sein könnten [3].

Ein besonderes Merkmal dieser mAb^2 -Moleküle ist die Multiplizität der Bindungsstellen, da zwei Fab-Arme und zwei Fc-Hälften einen bis zu tetravalenten Bindungspartner darstellen können (**Abb. 3**). So erscheinen sie besonders gut geeignet für die Anwendung in der Immunonkologie, einem therapeutischen Gebiet, das auf die Aktivierung bestimmter Zelltypen des Immunsystems durch Blockade oder Aktivierung kritischer Moleküle (*immune-checkpoints*) abzielt, um das körpereigene Immunsystem gegen die Tumorzellen zu richten. Die bisher validierten monospezifischen Antikörper gegen Zielmoleküle wie CTLA-4, PD-1 und PD-L1 sind sehr effizient, allerdings spricht nur ein kleiner Anteil der Patienten auf die Therapie an. In diesem Kontext sind bispezifische Antikörper, die multiple Zielmoleküle gleichzeitig binden können, sehr vielver-

Hier steht eine Anzeige.

Springer

sprechend. Derzeit werden auch neue immunregulatorische Zielmoleküle mit wichtigen Funktionen als sicher bestätigt, wie beispielsweise LAG-3 [4]. Dieses Protein verhindert zelluläre Aktivierung und Proliferation, unterstützt die negative Wirkung der regulatorischen T-Zellen und hält zytotoxische T-Zellen in einem inaktiven Zustand. Eines von drei mAb²-Molekülen, die sich derzeit in klinischer Erprobung befinden, ist gegen PD-L1 und LAG-3 gerichtet (FS118) [5]. Neben dem gleichzeitigen Blockieren beider Zielmoleküle bewirkt es die Abspaltung von LAG-3 von der Oberfläche der Immunzellen, wodurch einer Erschöpfung der T-Zellen entgegengewirkt wird und es zu einem „Boost“ des Immunsystems kommt.

Ein weiteres mAb²-Molekül, FS222, derzeit auch in der klinischen Erprobung, verhindert die immunsupprimierende Wirkung von PD-L1 und stimuliert gleichzeitig die T-Zell-Aktivierung und zytotoxische Aktivität durch Clusterbildung und Aktivierung des agonistischen T-Zell-Markers CD137 [6]. Die Ergebnisse der präklinischen Studien berichteten von verstärkter Zytokinausschüttung und T-Zell-Proliferation, was in der Folge zu einer stärkeren Regression der Tumore führte – verglichen mit einer Behandlung, die aus je einem PD-L1-bindenden und einem CD137-bindenden Antikörper bestand. Da die tetravalente Bindung für Clusterbildung von Bedeutung ist, erscheint das mAb²-Format herausragend in der Kategorie der bispezifischen Antikörper, die ähnliche Funktionen ausüben könnten.

Ebenso wichtig ist die Fähigkeit, multiple Moleküle der agonistischen Marker CD137 und OX40, die beide auf der Oberfläche der tumorinfiltrierenden Lymphozyten vorkommen, zu verbinden. Bei der Behandlung mit gegen CD137 gerichteten agonistischen Antikörpern wurde in mehreren Fällen von unerwünschten Nebeneffekten, vor allem Leberentzündungen, berichtet. Der klinische Kandidat mAb² FS120 wird nur bei einer gleichzeitigen Bindung an die beiden T-Zell-Oberflächenstrukturen aktiv [7] und die Aktivität dient lediglich dem „Aufwecken“ der T-Zell-Klone in der immunsupprimierenden Mikroumgebung des Tumors.

Die einzigartige biologische Aktivität, die sich aus der Multiplizität der Interaktionen mit dem Antigen ergeben kann, und die Toleranz der Antikörpermoleküle für die Veränderungen in den konstanten Domänen, führte zu der Frage, ob es noch weitere potenzielle Antigenbindungsstellen im Antikörpermo-

lekül gibt. Es gelang tatsächlich, die antigenbindenden C_H3-Domänen an einer ungewöhnlichen Stelle im Antikörpergerüst zu positionieren: Die konstante Domäne der leichten und die erste konstante Domäne der schweren Kette wurden durch jeweils eine C_H3-Domäne ersetzt und so entstand ein „domänengetauschter“ Antikörper (Abb. 3, [8]).

Erweiterungen des domänengetauschten Antikörperformats

Um diese Erkenntnisse an einer bispezifischen Plattform anzuwenden, versuchten wir die Frage der korrekten Paarung der leichten Ketten in einem bispezifischen Format unter Anwendung der Domänen-Austauschstrategie anzugehen. Wenn vier verschiedene Ketten eines bispezifischen Antikörpers in einer Zelle gemeinsam exprimiert werden, dürfte sich nur das native Paar (C_H1/C_L) und das Domänen-vertauschte Paar (C_H3/C_H3) zusammenfinden. Ein neuartiger heterodimerer *strand-exchanged-engineered-domain* (SEED)-Antikörper, der mit einem Arm an die Tumorzellen und mit dem anderen an die Effektorzellen binden kann, wurde durch Tausch der konstanten Domänen in einem der beiden Fab-Fragmente modifiziert (Abb. 3, [9]). Die perfekte Paarung zwischen den vier unterschiedlichen Ketten wurde bestätigt und dieser neuartige Antikörper erzielte den erwünschten biologischen Effekt, nämlich die spezifische Tötung von Tumorzellen.

Wäre es nun auch tatsächlich möglich, an dieser unkonventionellen Stelle im Antikörper antigenbindende C_H3-Domänen einzufügen? Wir verwendeten hier eine C_H3-Domäne, welche das Tumorcytokin VEGF mit hoher Affinität im Verhältnis 1:1 bindet und seine biologische Aktivität hemmt (Antigen 2 in Abb. 3). In dem Gerüst von Herceptin, einem klinischen *blockbuster* (anti-Her2-Antikörper), der hauptsächlich gegen Brustkrebs und Magenkrebs eingesetzt wird, kann dieses neuartige Konstrukt mittels multivalenter Bindung an VEGF eine Clusterbildung und starke Internalisierung der Her2-Rezeptoren verursachen [10]. Als Folge verschwindet Her2 von der Oberfläche der Krebszellen und deren Her2-abhängige Proliferationssignale werden unterbrochen. Durch den Tausch der Domänen gewann ein bispezifischer anti-VEGF/anti-Her2-Antikörper zwei Bindungsstellen für VEGF im Gegensatz zu einer in einem mAb²-Molekül, und damit eine verbesserte Fähigkeit der Kreuzvernetzung der Her2-Rezeptoren. Die Behandlung

einer stark positiven Her2-Zelllinie zeigte eine effizientere Entfernung der Oberflächen-Her2-Moleküle als anti-Her2/anti-VEGF-mAb² mit gleichen molekularen Bausteinen.

Zukunft der neuartigen Moleküle

Die konstanten Domänen eines Antikörpers erscheinen überraschend tolerant für Modifikationen, die zu einer verbesserten Aktivität und Sicherheit der Therapeutika der Zukunft führen. Neben den Immunglobulinen Klasse G können andere Klassen von Antikörpern über ihre konstanten Domänen weitere Effektorzellgruppen aktivieren. So bindet das Fc-Fragment der Immunglobuline Klasse A an den Fc-alpha-Rezeptor der neutrophilen Granulozyten, und das Fc-Fragment der Klasse E an den Fc-epsilon-Rezeptor auf der Oberfläche von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten. Das Engineering solcher konstanten Domänen in bispezifischen Antikörpern zeigt ein unerwartet breites Spektrum an potenziellen therapeutischen Anwendungen auf. Die resultierenden Moleküle sind derzeit in der präklinischen Entwicklung und eröffnen bald neue Horizonte in der Krebstherapie.

Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch das Bundesministerium für Digitalisierung und Wirtschaftsstandort und durch die Nationalstiftung für Forschung, Technologie und Entwicklung sowie die Christian Doppler Forschungsgesellschaft. ■

Literatur

- [1] Skerra A, Plückthun A (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology* 9: 273–278
- [2] Ridgway JB, Presta LG, Carter P (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng* 9: 617–621
- [3] Wozniak-Knopp G, Bartl S, Bauer A et al. (2010) Introducing antigen-binding sites in structural loops of immunoglobulin constant domains: Fc fragments with engineered HER2/neu-binding sites and antibody properties. *Protein Eng Des Sel* 23: 289–297
- [4] Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM et al. (2020) LAG-3: from molecular functions to clinical applications. *J Immunother Cancer* 8: e001014
- [5] Kraman M, Faroudi M, Allen NL et al. (2020) FS118, a bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-L1, enhances T-cell activation resulting in potent antitumor activity. *Clin Cancer Res* 26: 3333–3344
- [6] Lakins MA, Koers A, Giambalvo R et al. (2020) FS222, a CD137/PD-L1 tetravalent bispecific antibody, exhibits low toxicity and antitumor activity in colorectal cancer models. *Clin Cancer Res* 26: 4154–4167
- [7] Gaspar M, Pravin J, Rodrigues L et al. (2020) CD137/OX40 bispecific antibody induces potent antitumor activity that is dependent on target coengagement. *Cancer Immunol Res* 8: 781–793

- [8] Wozniak-Knopp G, Stadlmayr G, Perthold JW et al. (2018) An antibody with Fab-constant domains exchanged for a pair of CH3 domains. *PLoS One* 13: e0195442
- [9] Dietrich S, Gross AW, Becker S et al. (2020) Constant domain-exchanged Fab enables specific light chain pairing in heterodimeric bispecific SEED-antibodies. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 1868: 140250
- [10] Benedetti F, Stracke F, Stadlmayr G et al. (2021) Bispecific antibodies with Fab-arms featuring exchanged antigen-binding constant domains. *Biochem Biophys Rep* 26: 100959

Funding note: Open Access funding provided by University of Natural Resources and Life Sciences Vienna (BOKU).

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Gordana Wozniak-Knopp
Christian Doppler Labor für Innovative Immuntherapeutika
Institut für molekulare Biotechnologie,
Department für Biotechnologie
Universität für Bodenkultur (BOKU), Wien
Muthgasse 18
A-1190 Wien, Österreich
gordana.wozniak@boku.ac.at

ARBEITSGRUPPE

Gerhard Stadlmayr, Katharina Stadlbauer,
Gordana Wozniak-Knopp und Florian Rücker
(v. l. n. r.)

Im Zentrum der Forschung im Christian Doppler Labor für Innovative Immuntherapeutika stehen verschiedene komplementäre Technologien, die auf Antikörpern basieren. Das Ziel der Forschungsgruppe ist es, die biologische Aktivität dieser Moleküle zu erhöhen, indem sie mit Toxinen gekoppelt werden oder indem sie durch zusätzliche Bindungsspezifitäten in ihrer biologischen Wirksamkeit verbessert werden.

Hier steht eine Anzeige.

Springer