

Therapeutische Antikörper

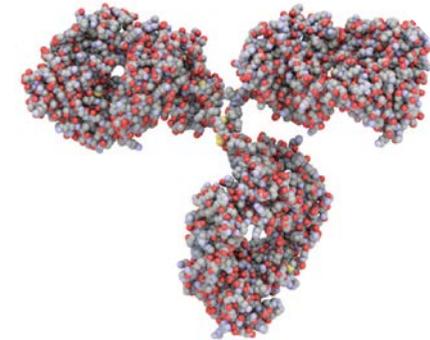
Herstellung, Wirkung und neue Entwicklungen

Prof. Dr. Cornelia Halin

Pharmazeutische Immunologie
Institut für Pharmazeutische
Wissenschaften, ETH Zürich
cornelia.halin@pharma.ethz.ch

15. November 2018
Pharmazeutische Gesellschaft Zürich

Einige Fakten zu therapeutischen Antikörpern



- > 200 therapeutische Proteine sind auf dem Markt
- Antikörper stellen eine rasant wachsende Kategorie von therapeutischen Proteinen dar
- > 60 monoklonale Antikörper wurden bisher von der FDA zugelassen.
10 der 46 von der FDA zugelassenen neuen Medikamente im Jahr 2017 waren Antikörper.
ca. 550 Antikörper in der klinischen Entwicklung (> 50 in Phase-III-Studien)
- 7 der 10 umsatzstärksten Medikamente im Jahr 2016 waren therapeutische Proteine und 4 davon Antikörper

10 umsatzstärksten (Bio-)Pharmazeutika im Jahr 2016

Table 8 Top ten biopharmaceutical drugs in 2016 by revenue

Name	Lead company	Molecule type	Approved indications	2016 worldwide sales (\$ millions)	
				US	Worldwide
Humira anti-Tumor Necrosis Factor (TNF) α	AbbVie	mAb	RA, juvenile RA, Crohn's disease, PA, psoriasis, ankylosing spondylitis, UC, Behçet Syndrome	10,432	16,078
Harvoni	Gilead Sciences	Small molecule	Hepatitis C (antiviral)	4,941	9,081
Rituxan (rituximab) anti-CD20	Roche	mAb	RA, chronic, lymphocytic leukemia/small cell lymphocytic lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, antineutrophil cytoplasmic antibodies-associated vasculitis, indolent NHL, diffuse large B-cell lymphoma	3,994	7,454
Revlimid	Celgene	Small molecule	Multiple myeloma, myelodysplastic syndrome, mantle cell lymphoma - NHL	4,417	6,974
Avastin anti-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A	Roche	mAb	Colorectal cancer, breast cancer, non-small cell lung cancer, renal cell cancer, ovarian cancer, brain cancer (malignant glioma; AA and GBM), cervical cancer	3,016	6,901
Herceptin anti-HER-2	Roche	mAb	Breast cancer, gastric cancer	2,563	6,900
Enbrel	Amgen	Protein	RA, psoriasis, ankylosing spondylitis, PA, juvenile RA	4,137	6,817
Prevnar 13	Pfizer	Vaccine	Pneumococcal (<i>Streptococcus pneumoniae</i>) vaccines (antibacterial)	3,645	5,718
Lantus (insular glargine injection)	Sanofi	Peptide	Diabetes mellitus, type I, diabetes mellitus, type II	3,917	5,287
Neulasta (pegfilgrastim)	Amgen	Protein	Neutropenia/leukopenia	3,925	4,658

mAb, monoclonal antibody; AA, Anaplastic astrocytoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; GBM, glioblastoma; PA, psoriatic arthritis; RA, rheumatoid arthritis; UC, ulcerative colitis.
Source: BioMedTracker and Medtrack, a product of Informa Pharma Intelligence.

Antikörper

Physiologische Funktion:

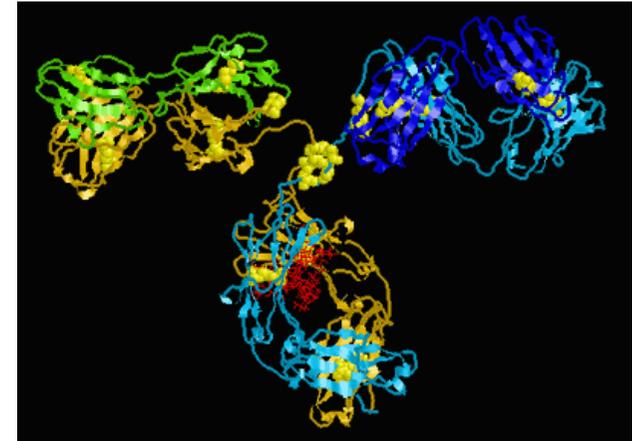
- Wichtig für den Immunschutz
- Binden an fremde Substanzen (Antigene)
(z.B. *Diphtherietoxin, Viren, Bakterien*)

Für die Therapie:

- biotechnologische Herstellung von menschlichen Antikörpern
- Spezifisch für die körpereigene Strukturen
(*Proteine auf Tumorzellen, Zytokine, etc.*)

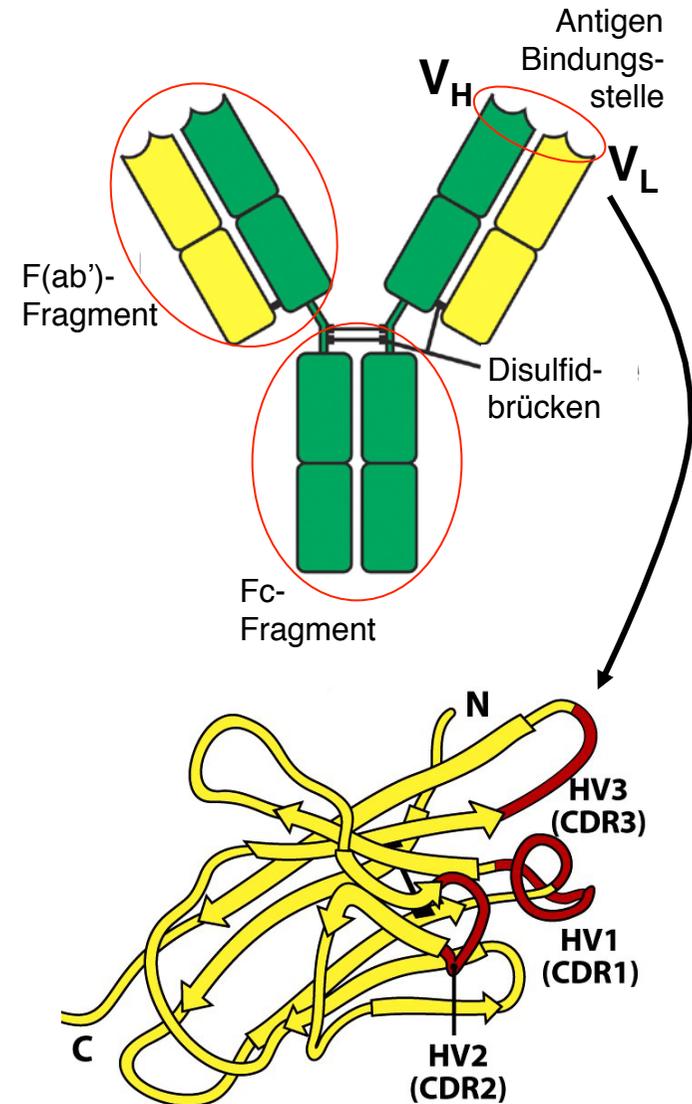
Anwendungsbereiche:

- *Chronische Entzündungen*
- *Autoimmunerkrankungen*
- *Krebs*
- *Transplantationsmedizin*
- *Infektionen*
- *Osteoporose*
- *Cholesterinsenkung*



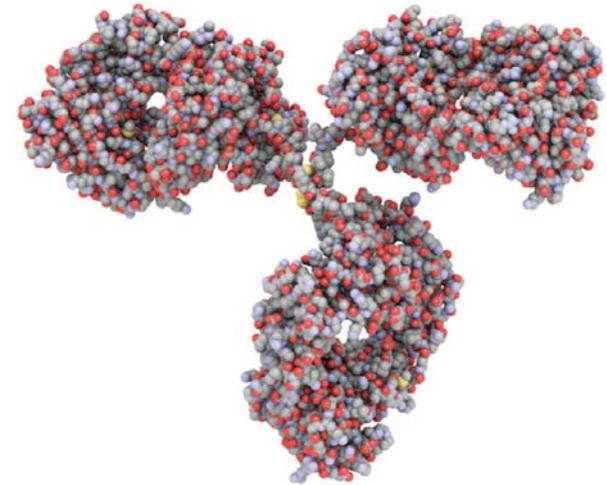
Aufbau von Antikörpern

- Immunoglobulin Faltung (Domänen)
 - 2 schwere Ketten (50 kD)**
 - 2 leichte Ketten (25 kD)**
 } 150 kD
- durch Disulfidbrücken verbunden
- Antigen (Ag) Bindungsstelle: gebildet durch je **3 Peptid-Schlaufen (Loops)** in der variablen schweren Kette (V_H) und in der variablen leichten Kette (V_L)
- Fc Fragment wichtig für Immunfunktion
 - bindet an Fc-Rezeptoren auf Immunzellen (z.B. Makrophagen, Natürlichen Killerzellen)
 - aktiviert Komplementsystem
- Therapeutische Antikörper sind IgGs

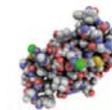


Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (2-3 Wochen)
 - Fc-medierte Effektorfunktionen
 - Möglichkeit des Protein-Engineerings
- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - komplexe Moleküle (Herstellung, Qualitätskontrolle)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (z.B. Kühlkette)
 - potenziell immunogen



Antikörper
150'000 daltons



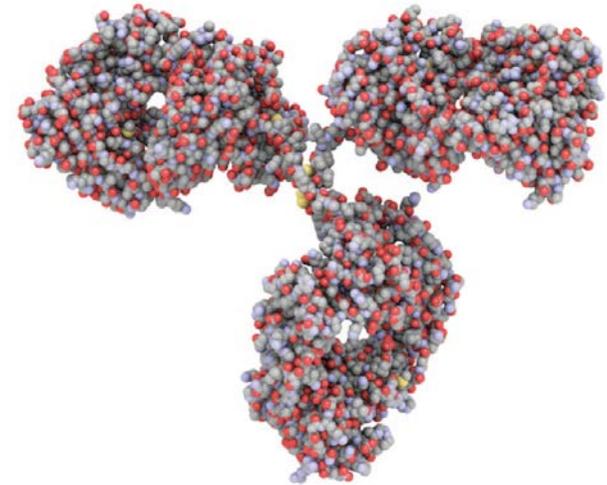
Insulin
5808 daltons



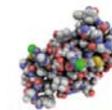
Aspirin
180 daltons

Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (2-3 Wochen)
 - Fc-medierte Effektorfunktionen
 - Möglichkeit des Protein-Engineerings
- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - komplexe Moleküle (Herstellung, Qualitätskontrolle)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (z.B. Kühlkette)
 - potenziell immunogen



Antikörper
150'000 daltons



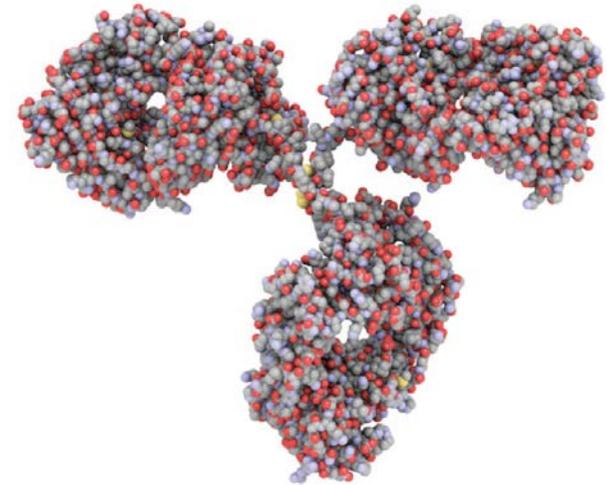
Insulin
5808 daltons



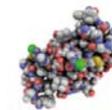
Aspirin
180 daltons

Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (2-3 Wochen)
 - **Fc-medierte Effektorfunktionen**
 - Möglichkeit des Protein-Engineerings
- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - komplexe Moleküle (Herstellung, Qualitätskontrolle)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (z.B. Kühlkette)
 - potenziell immunogen



Antikörper
150'000 daltons



Insulin
5808 daltons

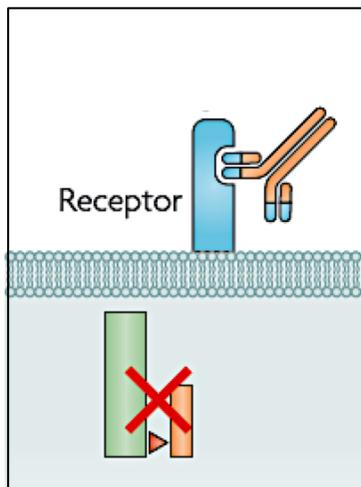


Aspirin
180 daltons

Wirkungsmechanismen von Antikörpern (I)

Neutralisation von Liganden und Rezeptoren, oder Aktivierung von Rezeptoren

- **Blockierung / Aktivierung eines Membranrezeptors**

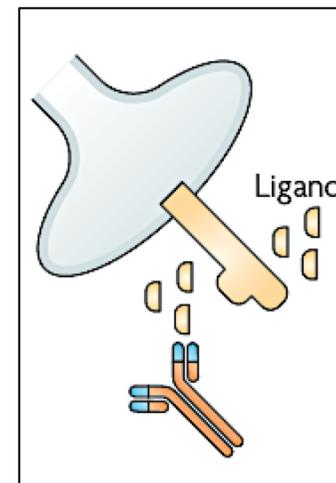


Tocilizumab (*anti-IL6R*)

Ipilimumab (*anti-CTLA-4*)

Nivolumab (*anti-PD1*)

- **Blockierung eines Liganden**
(z.B. Zytokin, Wachstumsfaktor)

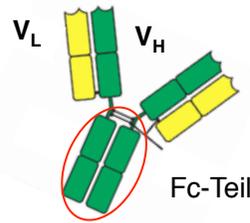


Bevazizumab (*anti-VEGF-A*)

Adalimumab (*anti-TNF α*)

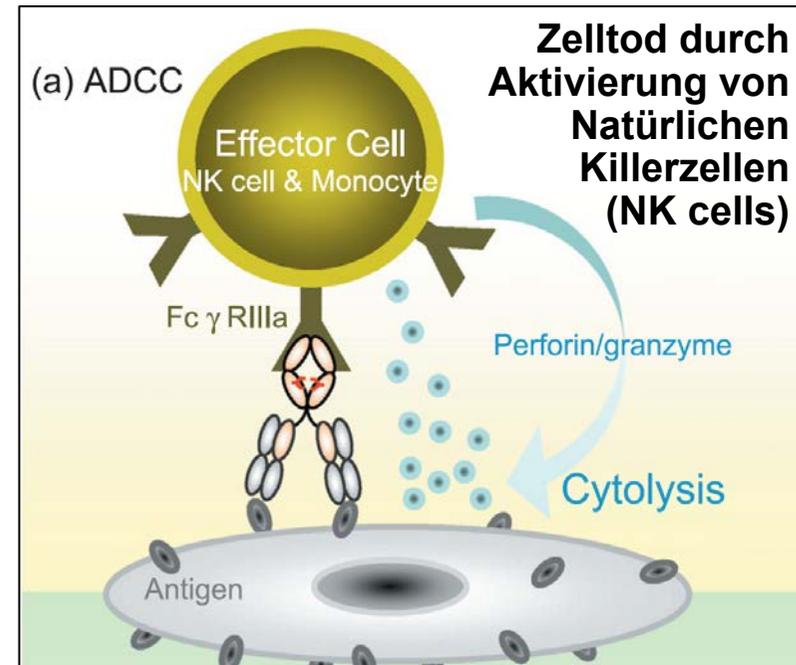
Weitere Wirkungsmechanismen von Antikörpern (II)

Durch den **Fc-Teil** vermittelte Effektor-Funktionen



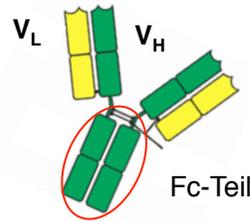
Induktion des Zelltods in der gebundenen Zelle durch:

- Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC)



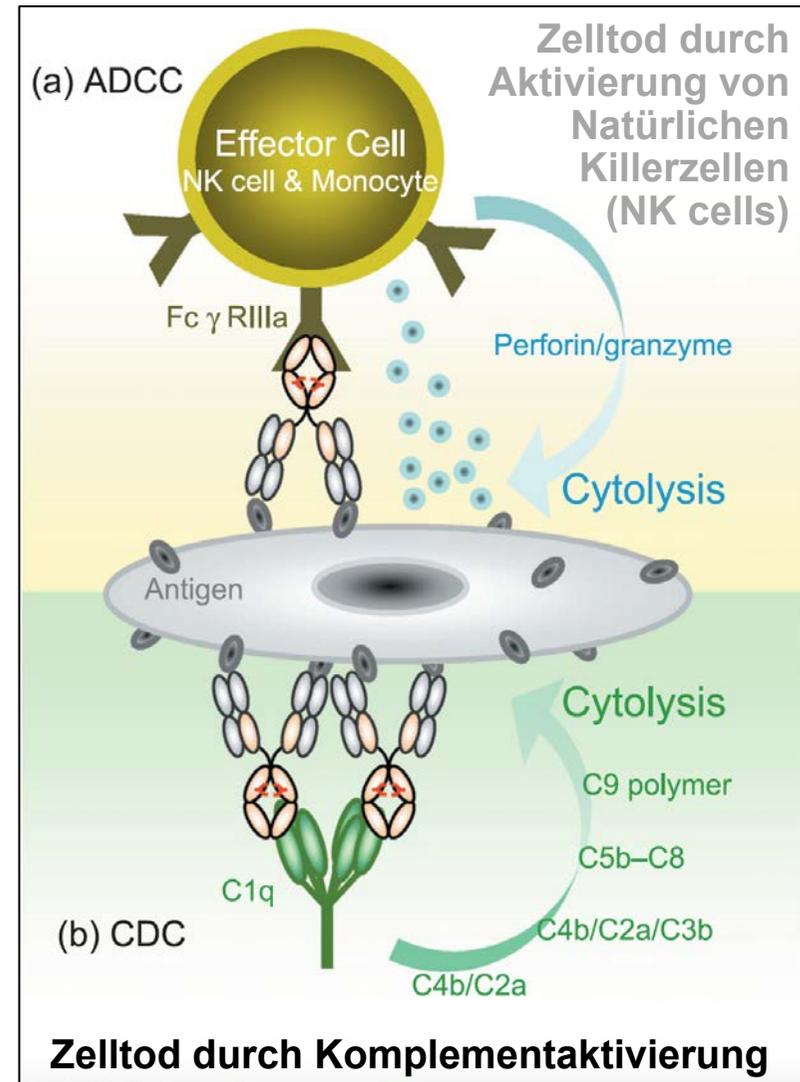
Weitere Wirkungsmechanismen von Antikörpern (II)

Durch den **Fc-Teil** vermittelte Effektor-Funktionen



Induktion des Zelltods in der gebundenen Zelle durch:

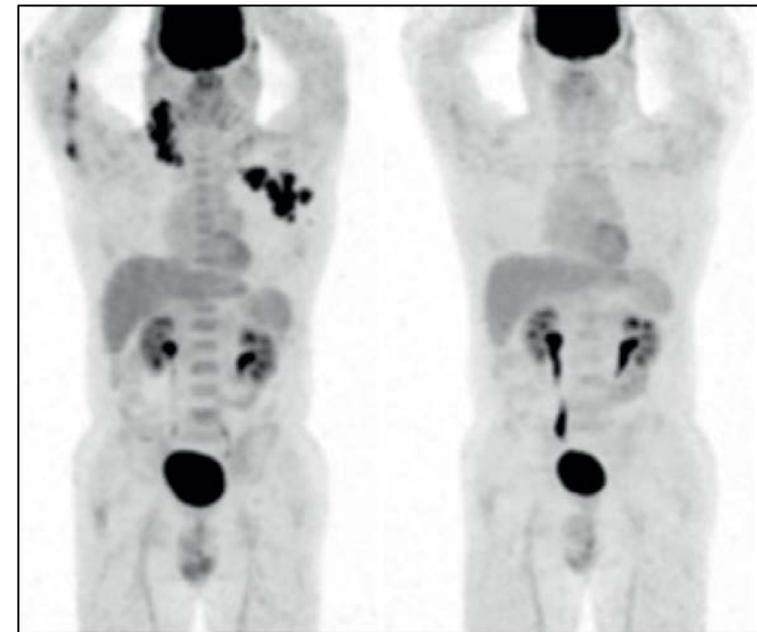
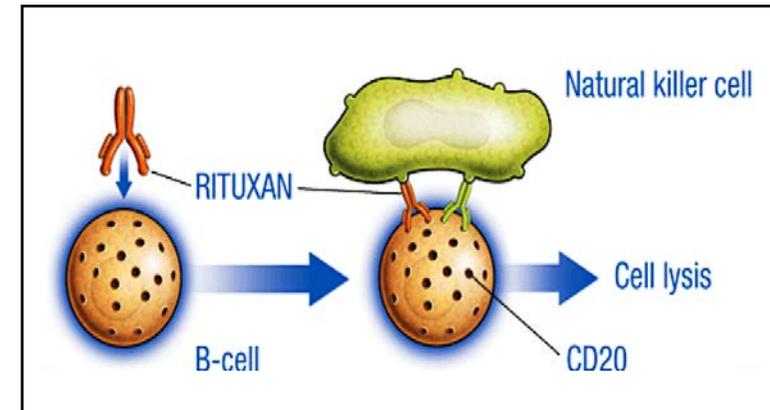
- Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity; ADCC)
- Antikörper-abhängige komplement-vermittelte Zytotoxizität
(complement-dependent cytotoxicity; CDC)



Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität:

Wirkungsmechanismus von Rituxan und Gazyva:

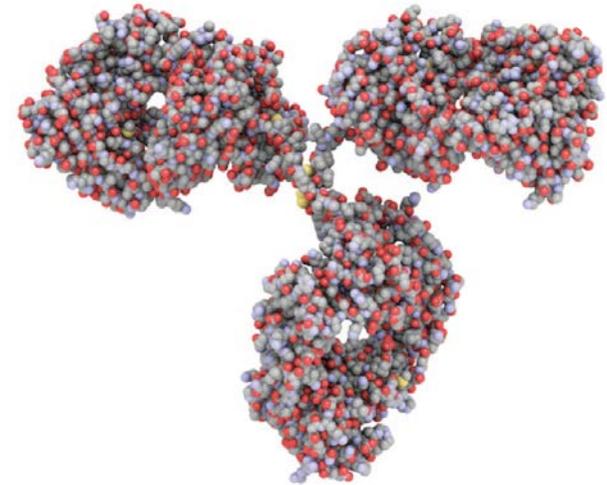
- Rituximab, Obinutuzumab
- binden an CD20, ein Oberflächenprotein auf B Zellen (*Antikörperproduzierende Lymphozyten*)
- induziert die Zerstörung der B Zellen durch Natürliche Killer Zellen
- Zugelassen für die Behandlung von malignen B-Zell-Tumoren (u.a. Non-Hodgkin Lymphom)



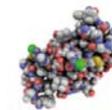
Positronen-Emissions-Tomografie (PET) Aufnahme eines Patienten mit Non-Hodgkin vor (links) und nach (rechts) der Behandlung mit Rituxan plus Chemotherapie.

Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (2-3 Wochen)
 - Fc-medierte Effektorfunktionen
 - Möglichkeit des Protein-Engineerings
- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - komplexe Moleküle (Analytik, Qualitätskontrolle)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (z.B. Kühlkette)
 - **potenziell immunogen**



Antikörper
150'000 daltons

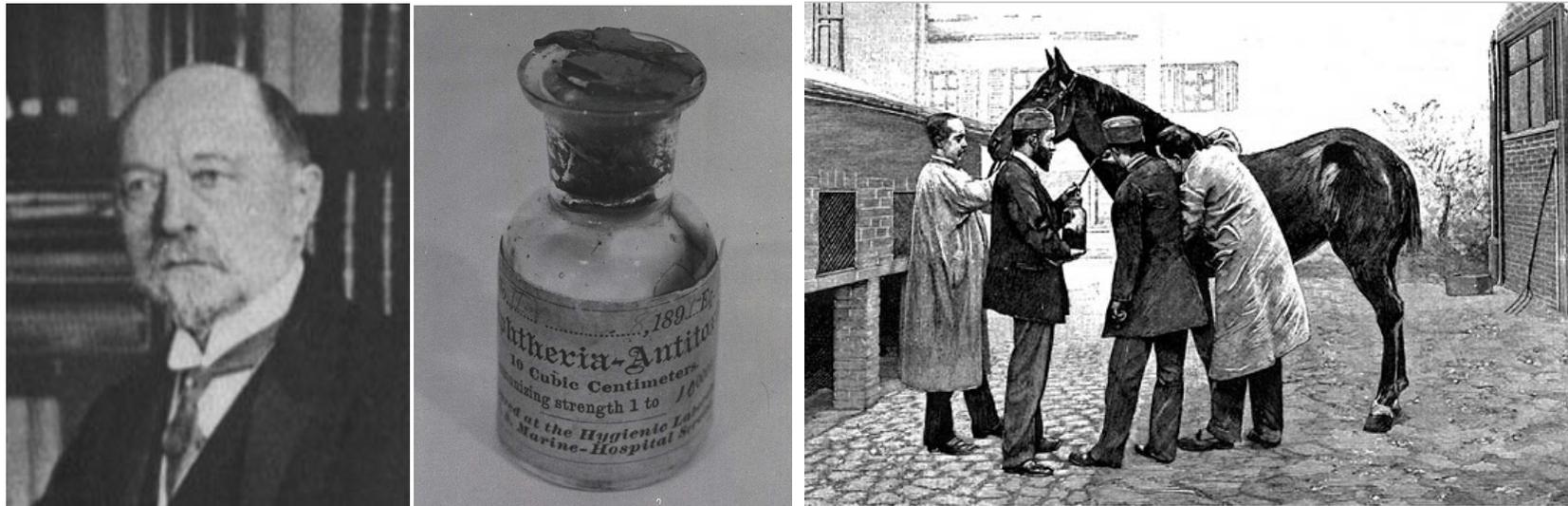


Insulin
5808 daltons



Aspirin
180 daltons

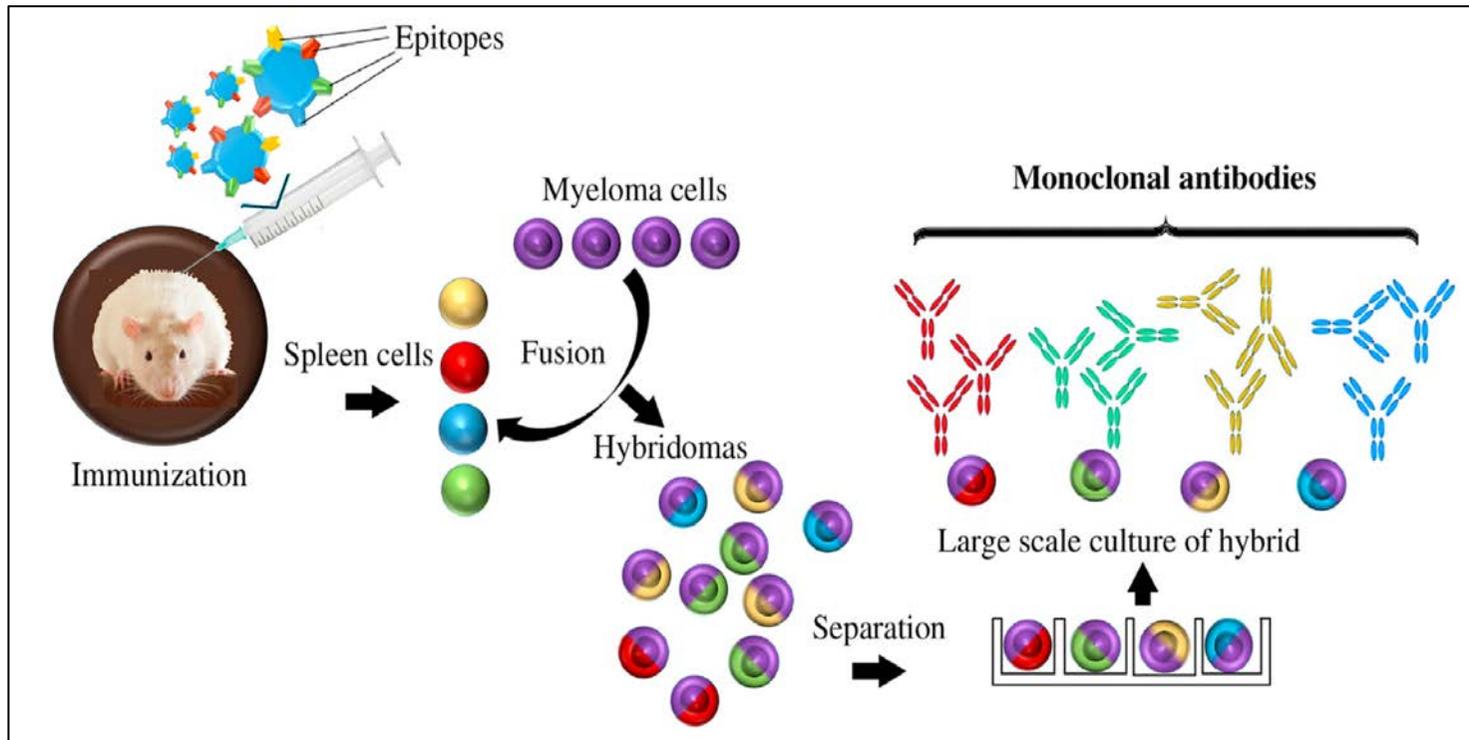
Serumtherapie zur Behandlung der Diphtherie



aus der Zeitschrift Scientific American, 1894

- Emil von Behring (1854 -1917)
- Behandlung von Diphtherie-Patienten mit *Antiserum* von Pferden
- Polyklonale Antikörper
- 1. Nobelpreis für Medizin (1901)

Hybridoma Technologie: Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAb)



DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00016-6>

- 1975 durch Cesar Milstein und Georges Köhler entwickelt
- 1984 Medizin Nobelpreis für Medizin & Physiologie
- Erster zugelassener monoklonaler Ab: OKT-3 (anti-CD3, Muronomab) 1986
(Verhinderung der Nierentransplantations-Abstossung)

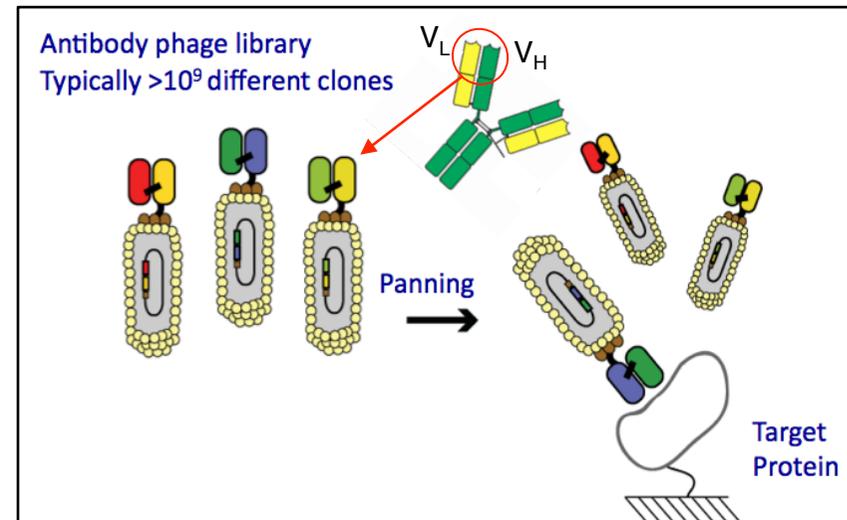
Herstellung von menschlichen Antikörpern

- **Transgene Mäuse**



- Mäuse, mit einem menschlichen Immunglobulin-Lokus
- Stellen nach Immunisierung menschliche Antikörper her
- Diverse kommerzielle Anbieter
(HuMab-Mouse, Xenomouse, TransChromo-Mouse)

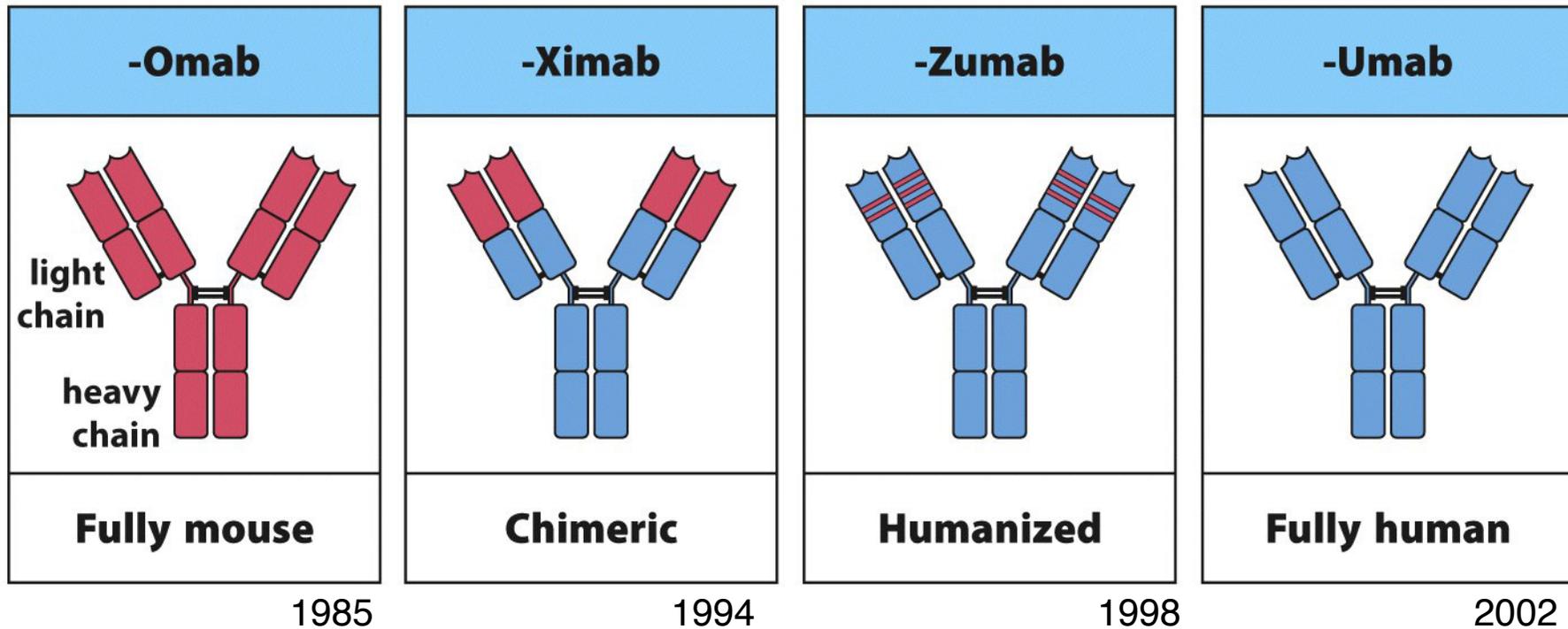
- **Kombinatorische Antikörper Bibliotheken**



- Beispiel: Phagen-Display und in vitro Selektion von Antikörpern
- Nobelpreis für Chemie 2018 and George P. Smith und Sir Gregory Winter

Generierung von weniger immunogenen Antikörpern:

Chimerisierung => Humanisierung => vollständig humaner Antikörper



- Murine Sequenz
- Humane Sequenz

Nomenklatur von monoklonalen Antikörpern:

Adalimumab, Rituximab, Trastuzumab, Pembrolizumab, Palivizumab



1) Prefix

Präfix; keine besondere Bedeutung, sollte für jedes Medikament eindeutig sein.

2) 1. Infix: Beschreibung der Indikation / Zielstruktur

Gibt an, wofür der Antikörper verwendet wird

Beispiele:

- ci(r)	- cardiovascular
- tu(m)	- for miscellaneous tumors
- li(m)	- immunomodulator
- vi(r)	- viral
- ki(n)	- interleukin

3) 2. Infix: Beschreibung der Herkunft / Herstellung

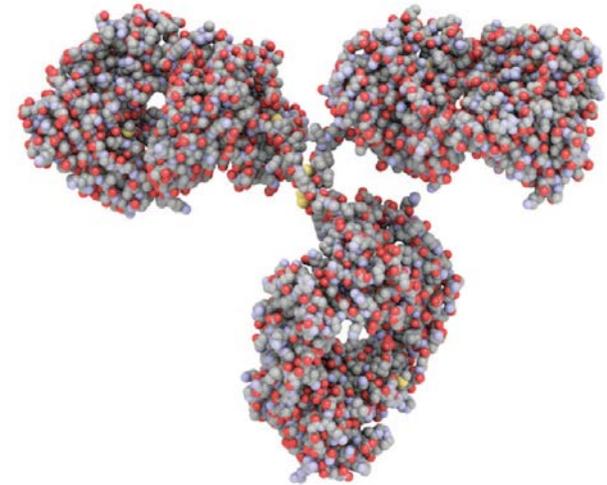
Der Infix vor dem Suffix "mab" bezeichnet die (tierische) Herkunft des Antikörpers

Beispiele:

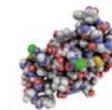
-o-	mouse	-xi-	chimeric
-zu-	humanized	-u-	human

Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (2-3 Wochen)
 - Fc-medierte Effektorfunktionen
 - Möglichkeit des Protein-Engineerings
- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - **komplexe Moleküle** (Herstellung, Qualitätskontrolle)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (z.B. Kühlkette)
 - potenziell immunogen



Antikörper
150'000 daltons

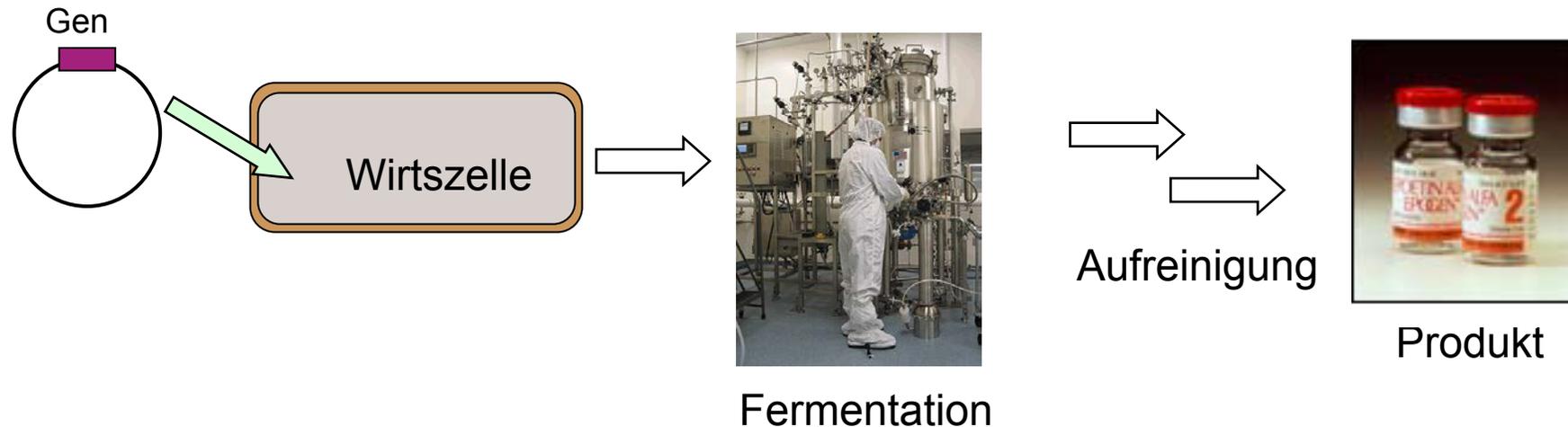


Insulin
5808 daltons



Aspirin
180 daltons

Herstellung von therapeutischen Antikörpern



- Antikörper sind äusserst komplexe Moleküle
- Herstellung nur in in Säugetierzellen möglich
- Wachstum in Serum-freien Nährmedium
- Ausbeute von bis zu 4 g/L



Produktion in Säugetierzellen

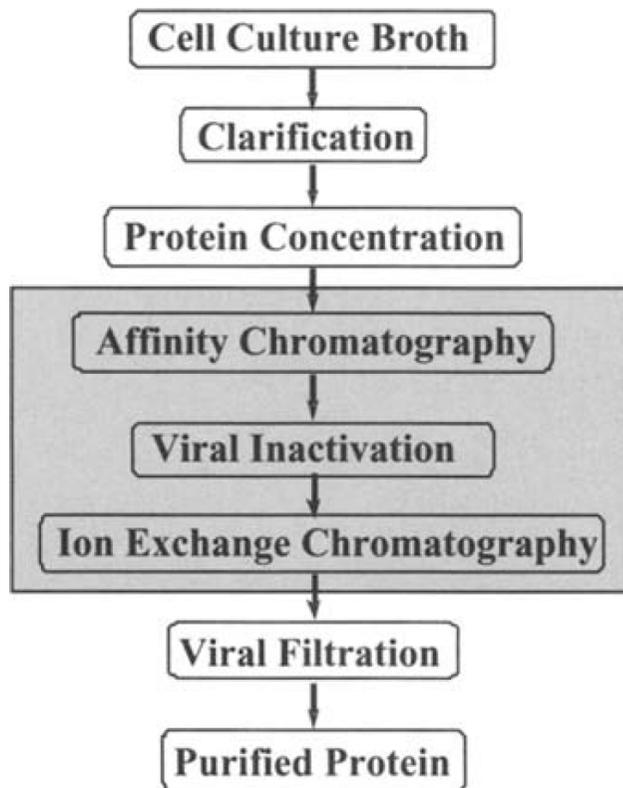


- Zellen aus der Zellbank auftauen
- ⇒ Expansion der Zellzahl in Zellkultur
- ⇒ Grossproduktionstanks (10'000 - 20'000 L Bioreaktoren; $5-20 \times 10^6$ Zellen/ml)
- ⇒ Produktion während ca. 2 Wochen

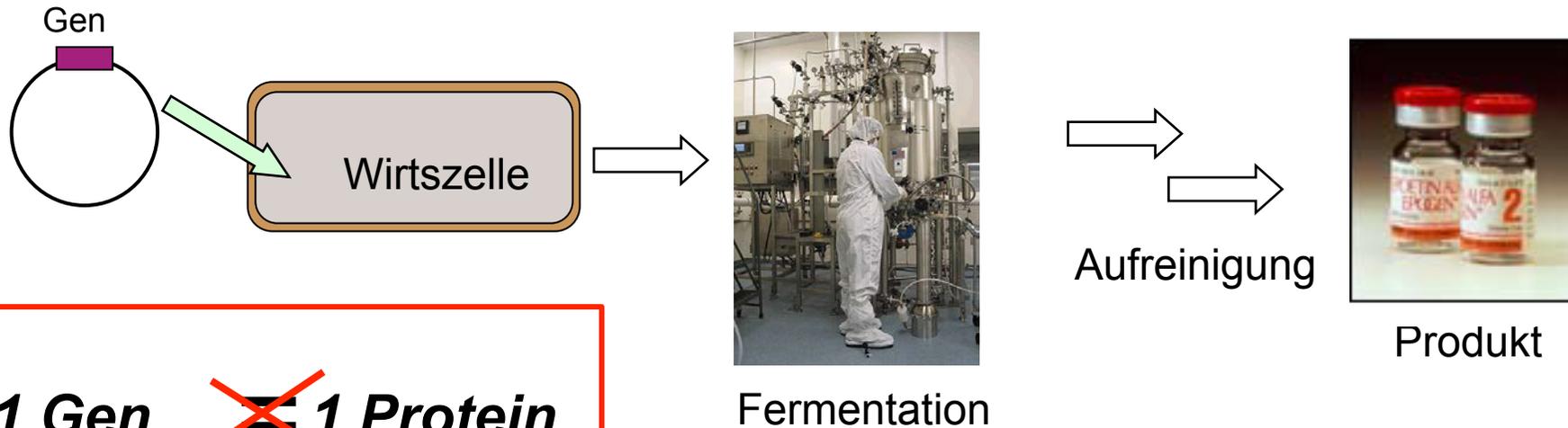


A 12,000 liter bioreactor used for growing cell cultures
<https://www.gene.com/stories/the-beauty-of-manufacturing>

Aufreinigung *via Filtration and Chromatographie*



Herstellung von therapeutischen Antikörpern



1 Gen ~~=~~ 1 Protein

Faktoren:

- Zelllinie
- Nährmedium
- Fermentationsbedingungen
- Aufreinigungsmethode

Biochemische/ biophysikalische Unterschiede:

- Protranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung, Asp Deamidation, Oxydation, Addition von C-terminalen Lysin)
- Proteinfaltung
- Proteolyse
- Aggregate

Einfluss auf:

- **Pharmakokinetik**
- **Immunogenizität**
- **Wirkung**

Biosimilars



Wirkstoff-ähnliche Nachfolgeprodukte von biopharmazeutische hergestellten Produkten, **Nicht Generika**.

- dieselbe Gensequenz wie das Originalprodukt
- schwieriger herzustellen als Generika von niedermolekularen Wirkstoffen
- Herstellungsprozess hat einen kritischen Einfluss auf das Endprodukt (*postranslationale Modifikationen, 3D-Faltung*)
- kleine Unterschiede können erhebliche klinische Folgen haben:
IMMUNOGENITÄT, PHARMAKOKINETIK, WIRKUNG

Biosimilars: Zulassungsverfahren

Die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) und die US Food and Drug Administration (FDA) haben 2005, resp. 2012 Leitlinien für die Zulassung von Biosimilars veröffentlicht.

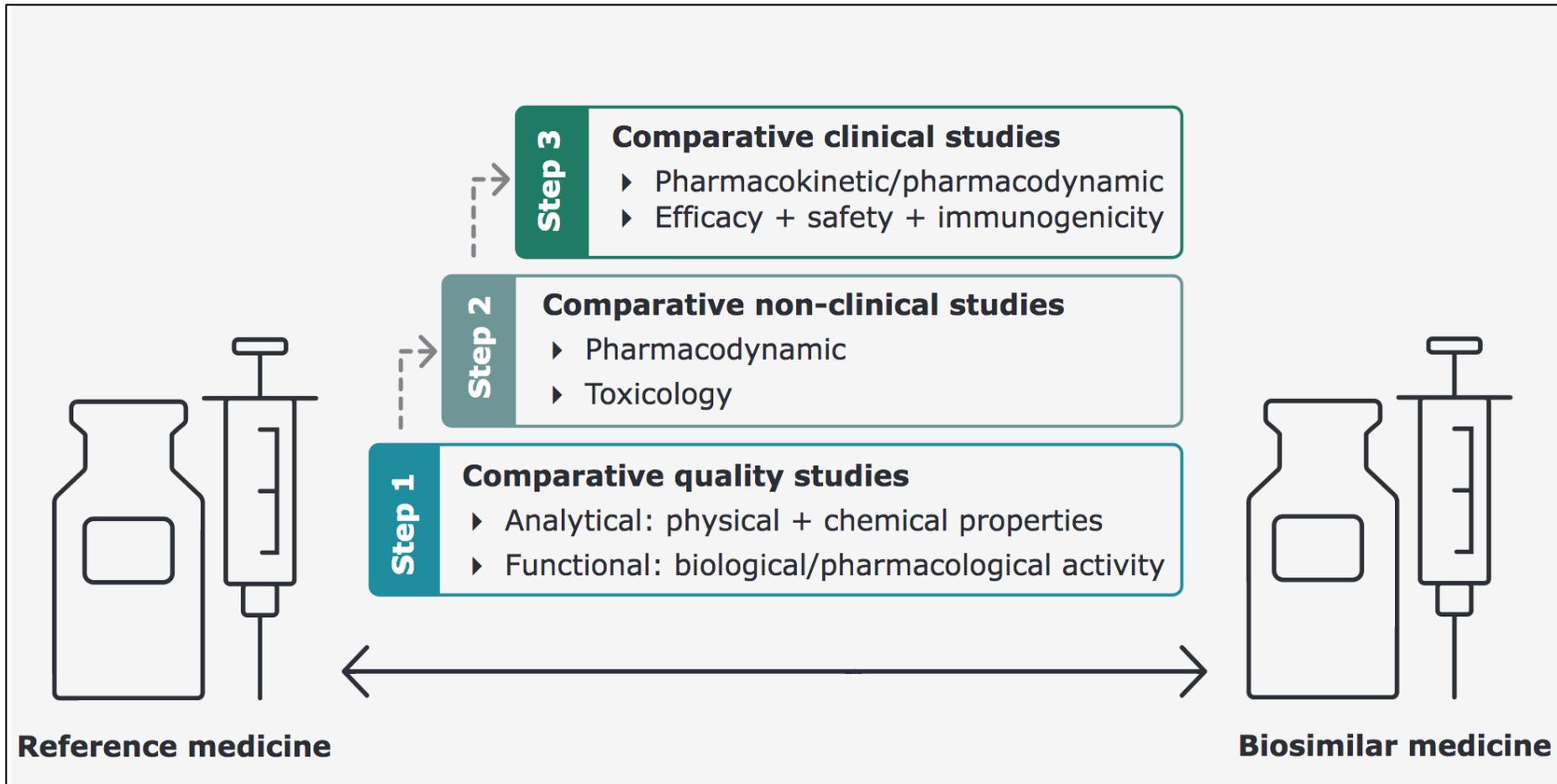
Verlangt wird die Dokumentation der Vergleichbarkeit zwischen Biosimilar und Referenzprodukt in Bezug auf

- **Qualität**
- **Sicherheit**
- **Wirksamkeit**

22 Biosimilar-Antikörper wurden seit 2013 von der EMA zugelassen

Referenzprodukte: *Trastuzumab (Herceptin), Rituximab (Rituxan), Bevacizumab (Avastin), Adalimumab (Humira), Infliximab (Remicade), Etanercept (Enbrel)*

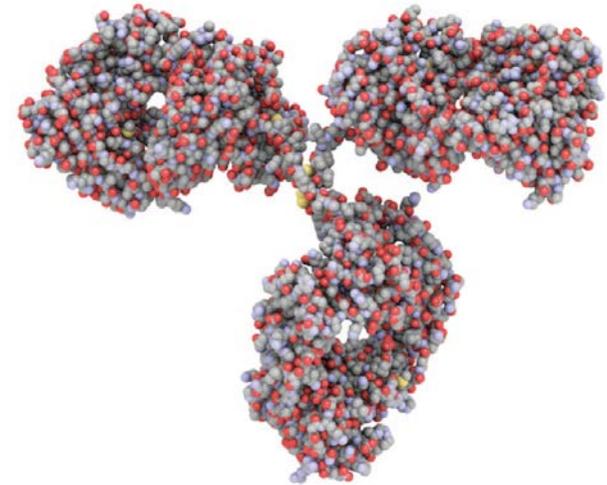
Entwicklung von Biosimilars: Vergleichbarkeit mit Referenzprodukt



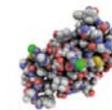
Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (2-3 Wochen)
 - Fc-medierte Effektorfunktionen
 - **Möglichkeit des Protein-Engineerings**

- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - komplexe Moleküle (Herstellung, Qualitätskontrolle)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (z.B. Kühlkette)
 - potenziell immunogen



Antikörper
150'000 daltons



Insulin
5808 daltons

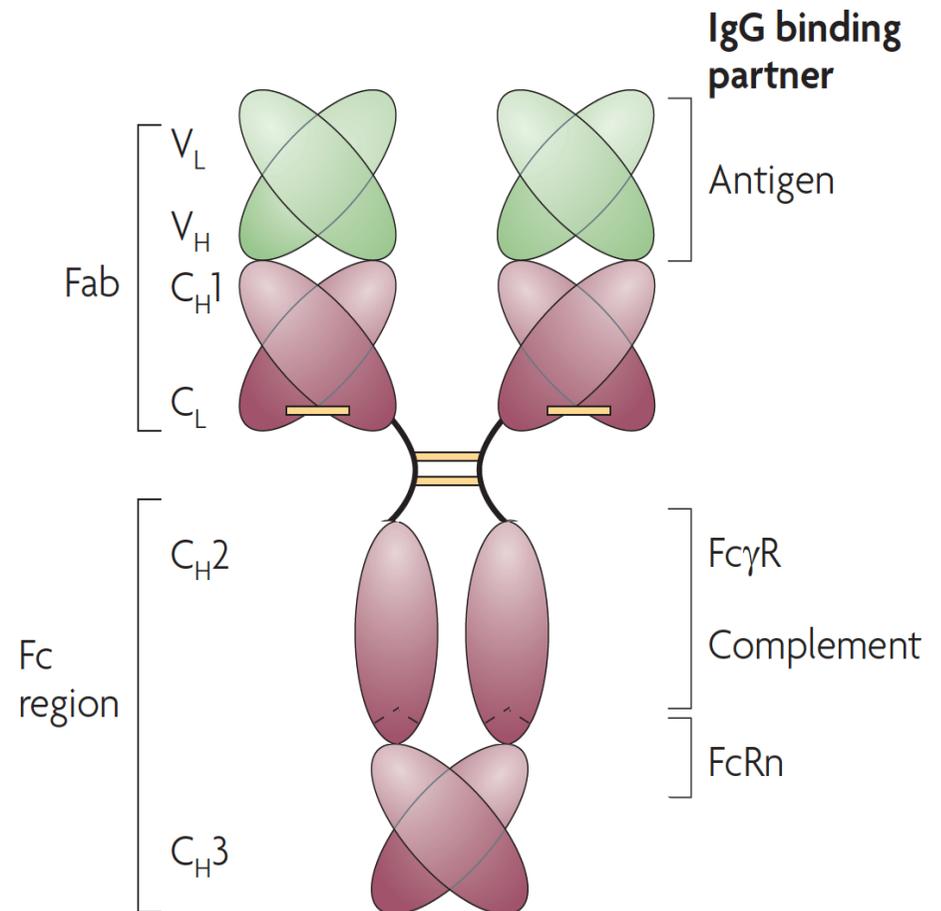


Aspirin
180 daltons

“Neue” Entwicklungen: Antikörper Engineering

Veränderung der

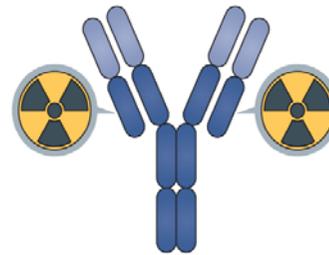
- Bindung zum Antigen
- Reduktion der Immunogenität
- Fc-vermittelten Effektorfunktionen
(Komplementaktivierung, antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität)
- Halbwertszeit im Blut
- Weitere Effektorfunktionen
(z.B. Kopplung an Chemotherapeutika, Radionukleide)



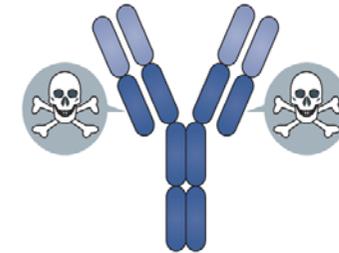
“Bewaffnete” Antikörper und Antikörper Fragmente

Kopplung an:

- Radionukleide
- Chemotherapeutika



Radioimmunoconjugates
 CD20: ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan,
 ^{131}I -tositumomab



Antibody–drug conjugates
 CD22: inotuzumab ozogamicin
 CD30: brentuximab vedotin
 CD33: gemtuzumab ozogamicin
 HER2: ado-trastuzumab
 emtansine

Fragmente:

- Kürzere Halbwertszeit
- Keine Effektorfunktionen

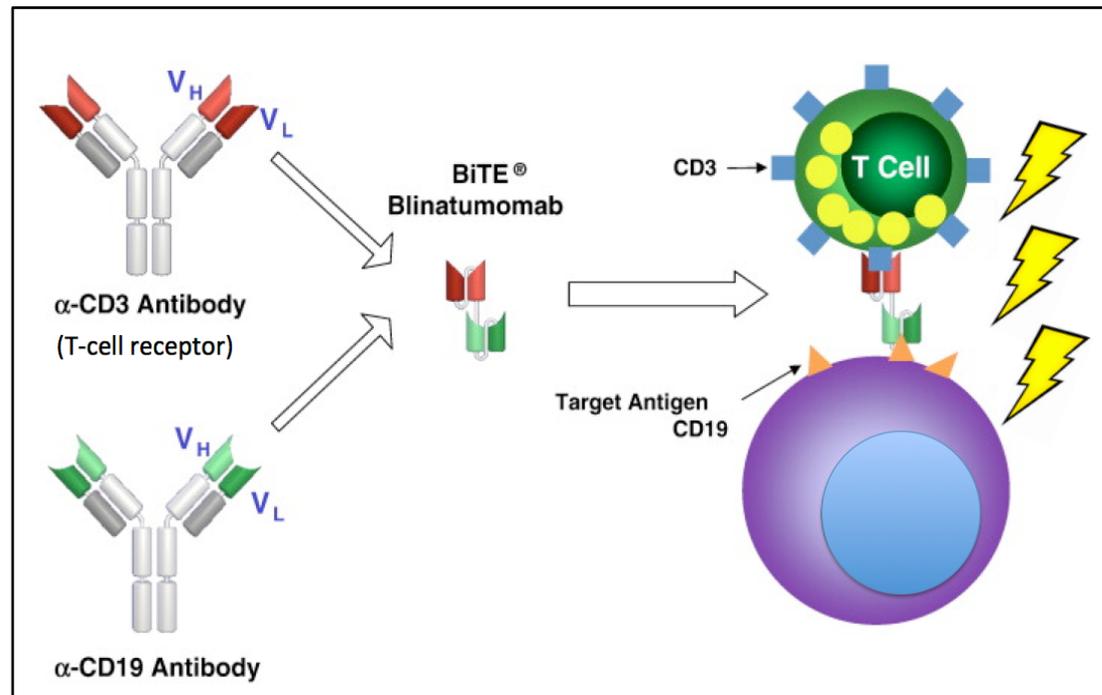


F(ab')–PEG
 TNF: certolizumab
 pegol



Fab
 GPIIb/IIIa, $\alpha_v\beta_3$ -integrin: abciximab
 VEGFA: ranibizumab
 Dabigatran: idarucizumab

Bispezifische Antikörper-Fragmente



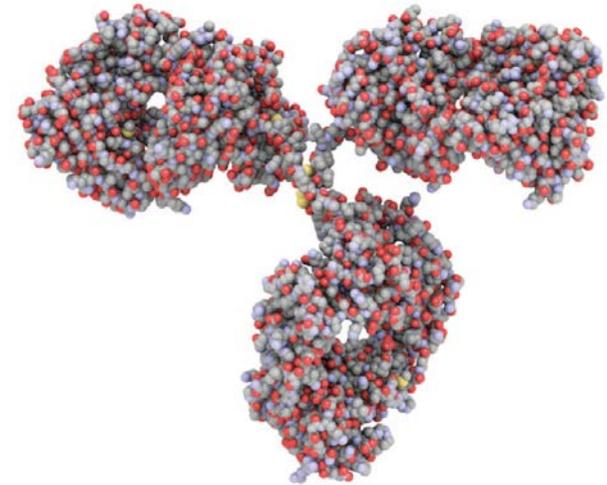
- Adaptoren zwischen Tumorzellen und Killer-Zellen des Immunsystems (*T Zellen, NK Zellen*)
- Induktion des Tumorzelltods
- Blinatumomab (Blincyto; Amgen), 2014 zugelassen
treatment of relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Herzlichen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

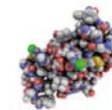
Haben Sie Fragen?

Was ist besonders an therapeutischen Antikörpern?

- Vorteile:**
- Spezifität
 - geringeres Risiko von off-target Toxizität
 - lange Halbwertszeit (*2-3 Wochen*)
 - Fc-medierte Effektorfunktionen
 - Möglichkeit des Protein-Engineerings
- Nachteile:**
- hohe Kosten
 - komplexe Moleküle (*Herstellung, Qualitätskontrolle*)
 - parenterale Verabreichung
 - beschränkt auf extrazelluläre Zielstrukturen
 - Stabilität (*z.B. Kühlkette*)
 - potenziell immunogen



Antikörper
150'000 daltons



Insulin
5808 daltons



Aspirin
180 daltons