

# Immunogenicitet af biologiske lægemidler

## Erfaringer med betainterferon, EPO og anti-TNF

Klaus Bendtzen

Behandling med biofarmaka – her forstået som (glyko)proteiner produceret ved rekombinant genteknologi – formodes at blive en betydelig del af fremtidens medicinske behandlingstilbud. Det er nu muligt at producere biofarmaka, som er identiske eller næsten identiske med naturligt forekommende humane proteiner. Mange har derfor formodet, at disse medikamina kan administreres med ingen eller ringe risiko for udvikling af specifik T- og B-lymfocytreaktivitet, idet patienter antages at være immunologisk tolerante over for egne proteiner. Dette har desværre vist sig ikke at holde stik, idet selv såkaldt 100% humane biofarmaka er potentielt immunogene (**Tabel 1**). I det følgende omtales kort egne erfaringer inden for terapeutisk anvendelse af interferon (IFN) og erythropoietin (EPO) samt antistofkonstruktioner til neutralisation af tumornekrotiserende faktor (TNF).

### Betainterferon

Blandt de først introducerede biofarmaka hører type I IFN, idet rekombinant leukocyt IFN, rIFN- $\alpha$ , benyttedes til be-

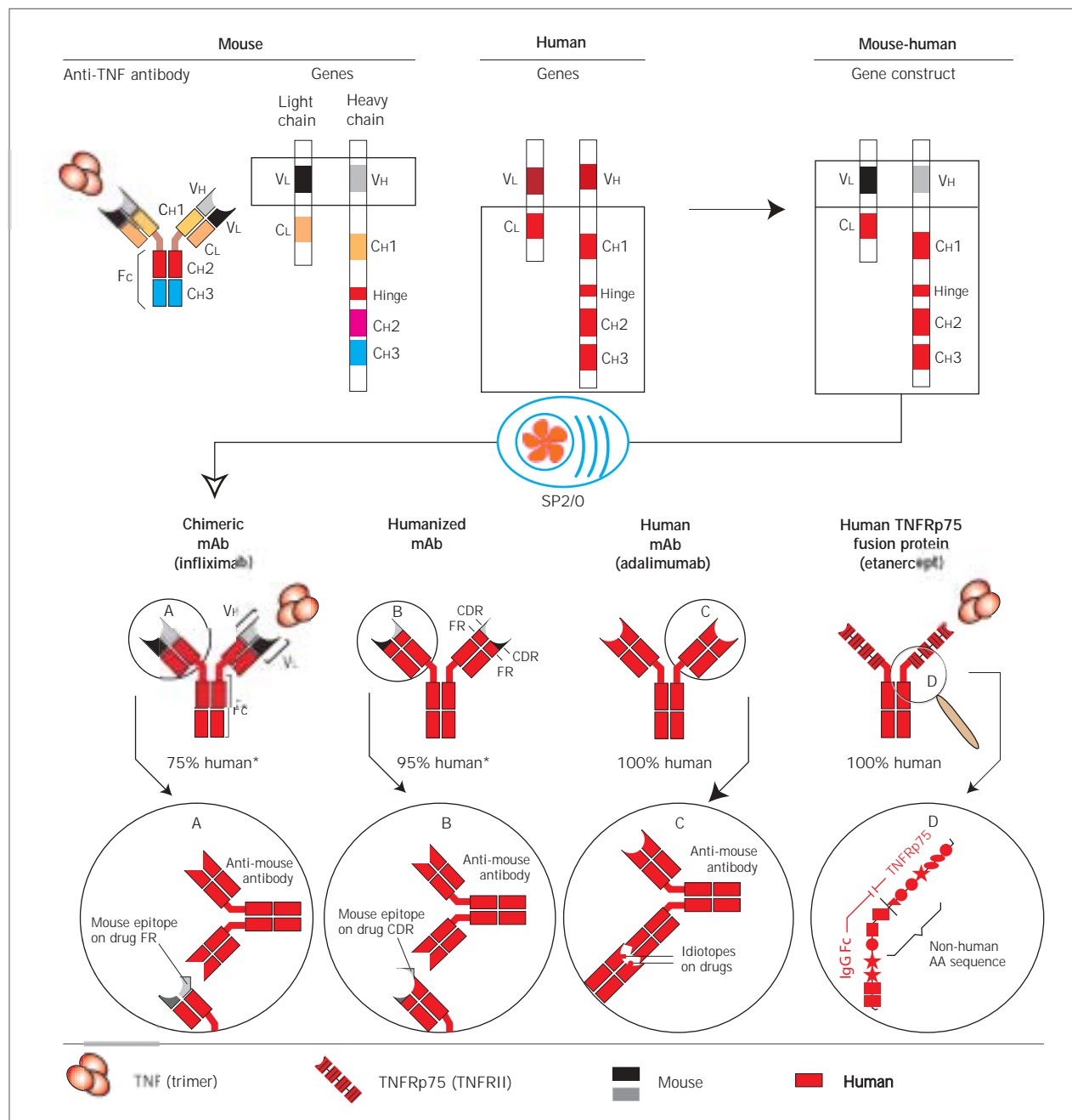
handling af virusinfektioner, kort efter at generne for ca. 25 år siden blev karakteriseret. Og rekombinant fibroblast IFN, rIFN- $\beta$  (betainterferon), har fået stor klinisk betydning, efter at det i 1993 vistest at have effekt på sygdomsforløbet ved dissemineret sklerose (DS) [1].

To hovedtyper af rIFN- $\beta$  anvendes, rIFN- $\beta$ -1b og rIFN- $\beta$ -1a. Førstnævnte produceres af *E. coli* og er derfor ikke som nativt IFN- $\beta$  glykosyleret. Stoffet afviger endvidere for to aminosyrers vedkommende fra den native sekvens. rIFN- $\beta$ -1a produceres af ovarieceller fra kinesiske hamstre; det er glykosyleret – om end ikke på samme måde som det naturlige cytokin – og aminosyresekvensen er identisk med nativt IFN- $\beta$ . Virkemåden af rIFN- $\beta$  ved DS er ikke præciseret, og da behandlingen for begge stoffers vedkommende ikke er helbredende, strækker den sig ofte over flere år.

De første års erfaringer viste ingen sikker relation mellem udvikling af anti-IFN- $\beta$ -antistoffer og manglende effekt ved DS. Det skyldtes bl.a. sygdommens lunefulde individuelle forløb og mangel på viden om udvikling af antistoffer ved pro-

**Table 1.** Factors influencing the immunogenicity of recombinant biologicals.

Factor	Comment
<i>Producer cell</i>	Often a crucial determinant; e.g., <i>E. coli</i> produces more immunogenic molecules than do mammalian cells
<i>Structure</i>	
– sequence	Complete homology with native protein is usually, but not necessarily, required for low immunogenicity
– glycosylation	Non-glycosylated proteins are often more immunogenic than glycosylated proteins
<i>Formulation and storage</i>	
– aggregates	Increase immunogenicity
– contaminants/impurities	May act as adjuvants (e.g., endotoxin and silicone). May increase oxidation/deamination, which promotes immunogenicity
– stabilisers	Decrease aggregation (see above)
– freeze-drying and prolonged storage	Allow protein oxidation and aggregation (see above)
<i>Administration</i>	
– dose/frequency and length of therapy	Frequent and prolonged administration is most immunogenic. (Exception: high doses given intravenously may induce tolerance). Dose-dependencies are clear but vary among biologicals
– routes	Epi- and subcutaneous routes are most immunogenic. Intramuscular and intravenous routes are less immunogenic
<i>Patient characteristics</i>	
– disease	Patients with impaired immunity (e.g., due to cancer), are less likely to develop antibodies. Patients with primary gene deficiencies often develop antibodies; they lack immune tolerance to products of the defective genes
– concomitant therapies	Immunosuppressives suppress antibody responses



The upper part of the figure shows the light- and heavy-chain genes encoding an anti-TNF IgG1 antibody produced by B cells in the spleen of a mouse immunised with human rTNF. The murine constant regions are then replaced by their human counterparts. The final gene construct (upper right) is transfected into, and expressed by, mouse myeloma SP2/O cells as a chimeric mouse-human monoclonal antibody (mAb). Since the development of this construct (Infliximab/Remicade<sup>®</sup>), several other genetically engineered anti-TNF biologicals have been produced and tested clinically (middle part). A recently developed human mAb produced by phage-display technology has a 100% human amino acid (AA) sequence (adalimumab/Humicade<sup>®</sup>). The same is true for a human type II TNF receptor (TNFRp75): human IgG1 Fc construct (etanercept/Enbrel<sup>®</sup>).

The lower part of the figure shows potential immunogenic sites on each drug. Even though a drug is constructed of 100% human AA sequences, such drugs may be recognised by the immune system as *non-self* and thus be immunogenic (anti-idiotypic and anti-allotypic responses). In the case of etanercept, linear AA sequences overlapping the TNFR and Fc regions may be recognised by T and B cells as foreign<sup>10</sup> (lower right). Non-linear epitopes on the final construct may also be recognised as non-self, because the immune system has never before been exposed to molecules with the same tertiary structure as that of the drug.

#### Antibody structures:

VL and VH: Variable regions (on light and heavy chains, respectively).

Fc: Crystallisable fragment of antibody.

CDR: Complementarity-determining region; i.e., the region in direct contact with antigen.

FR: Framework region; this region together with CDR constitutes the variable region.

\*) The degree of humanisation of an anti-TNF mAb is often shown as the amount constituted by the human part(s) of the construct. However, because of a high degree of sequence homology between the mouse and human VL/VH regions, the overall homology, which presumably governs drug immunogenicity, is much higher.

Fig. 1. Genetically engineered anti-TNF constructs.

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

traherede behandlingsforløb. Men det skyldtes også variable og ofte modsatrettede informationer om præparaternes induktion af antistoffer i DS-patienter [2].

Anti-IFN-antistoffer kvantificeres oftest ved brug af bindings-*assays* og ved forskellige typer af neutralisations-*assays*. I alle tilfælde gør manglen på international standardisering og referencepræparationer det næsten umuligt at sammenligne resultater fra forskellige laboratorier. Hertil kommer, at ukritisk anvendelse af bindings-*assays* som ofte giver falsk positive resultater (f.eks. ELISA), har forplumret den kliniske brug af disse analyser. Lang tids brug af en biologisk test for neutraliserende antistoffer mod rIFN- $\beta$ -designet på en måde, der har ringe terapeutisk relevans, har yderligere bidraget til uklarheden.

Takket være brugen af klinisk relevante målemetoder ved vi nu, at hos op mod 80% af DS-patienter i behandling med rIFN- $\beta$ -1b udvikles der neutraliserende antistoffer inden for 6-12 måneder [3], og der er kliniske holdepunkter for, at behandlingseffekten aftager eller ophører hos flere af disse patienter [4]. Sammenlignet med rIFN- $\beta$ -1b har det mere »humane« rIFN- $\beta$ -1a vist sig mindre immunogent, idet administrationsmåde og dosering dog har stor betydning: Subkutan administration og høj dosering giver tidlig induktion af antistoffer hos de fleste, mens intramuskulær administration inducerer sent og kun hos et fåtal patienter.

Erfaringerne understreger betydningen af en fortløbende og klinisk relevant monitorering af patienter behandlet med potentielt immunogene biofarmaka.

## EPO

Rekombinant erythropoietin (EPO (rEPO)) blev introduceret i 1989 primært til behandling af anæmi i tilknytning til kronisk nyreinsufficiens - nyren er hovedproducent af EPO, og dette glykoprotein er en afgørende vækstfaktor for erythrocytforstadier i knoglemarven.

Indtil 1998 havde rEPO været anvendt som et relativt sikkert lægemiddel til hundrede tusinder patienter, men fra 1998 er der rapporteret om flere tilfælde af potentielt dødelig *pure red cell aplasia* (PRCA) karakteriseret ved anæmi med meget lave reticulocytantal og knoglemarv uden erythroide forstadier [5]. Næsten alle tilfælde er set hos nyreinsufficente patienter, som behandlede med rEPO fra en bestemt medicinalvirksomhed. I alle tilfælde var der hos patienterne udviklet antistoffer, som krydsreagerede og neutraliserede både rekombinant og nativt EPO. Komplikationen er heldigvis sjælden, idet anti-EPO medieret PRCA hidtil kun er set hos en for hver 1.000-10.000 behandlede patienter.

Hændelsen er næppe betinget af forskelle i opbygningen af det aktive stof, idet nøje analyser viser identitet mellem præ- og post-1998 rEPO. Derimod falder antistofudviklingen sammen med en ændring i formuleringen af lægemidlet. Fra at anvende rEPO i hætteglas med tilsætning af humant serum albumin (HSA) som stabilisator gik man i 1998 over til at be-

nytte rEPO fra samme kilde, men uden HSA - dette skete på baggrund af udviklingen af kogalskab i England og en deraf følgende appel fra de europæiske myndigheder om at undgå anvendelse af irrelevante proteiner i biofarmaka. Man gik endvidere over til at administrere rEPO i silikoniserede glas-sprøjter. Formodningen er derfor, at den nye formulering og/eller administration har gjort rEPO immunogent. Dette understreges af, at rEPO fra den samme kilde ikke har givet anledning til PRCA på det amerikanske marked, hvor stoffet fortsat administreres som i Europa før 1998.

Mekanismen bag ovenstående skift i immunogenicitet er ukendt. Det er sandsynligt, at en nøjere udredning af mekanismen i aktuelle tilfælde ikke kan tilvejebringes uden at undersøge præparatets effekt på immunceller fra de (få) afficerede patienter. En så sjælden immunologisk komplikation er formentlig individrelateret beroende på en sjælden kombination af immunrespons-gener hos de ramte patienter. Udvikling af testmetoder for effekter direkte på patienters immunceller, herunder betydningen af individrelaterede opløselige immunfaktorer (f.eks. komplement), kan vise sig værdifuld i denne sammenhæng [6].

Ovennævnte forløb viser betydningen af at monitorere enkeltindivider for udvikling af neutraliserende antistoffer, som ved krydsreaktivitet med native proteiner kan medføre livstruende komplikationer. Det understreger endvidere, at formulering og administrationsmåde kan have indflydelse på biofarmakas immunogenicitet. Endelig antyder disse fund, at dyreforsøg og individuspecifikke laboratorieforsøg i visse tilfælde kan komme til kort som analyseredskaber for immunogenicitet.

## Anti-TNF

TNF er en central betændelsesfremmende faktor, og hæmmet produktion/virkning af dette cytokin har længe været et ønskemål ved behandling af en række betændelsestilstande [7].

Fig. 1 viser fire anti-TNF-biofarmaka, udviklet ved rekombinant genteknologi. Det første, infliximab, er et kimærantistof (mus-menneske-IgG), og det har haft markant effekt bl.a. hos patienter med reumatoid artrit [8]. Effekten mentes først at bero på specifik neutralisation af TNF og dermed hæmning af den TNF-medierede cytokinkaskade. Men det vides nu, at infliximab ved binding til TNF på overfladen af betændelses-celler aktiverer komplement, hvorved stoffet får cytotoxisk virkning over for TNF-producerende (og TNF-responderende?) celler.

Der er siden udviklet andre anti-TNF-biofarmaka, dels for at opnå en »ren« anti-TNF-virkning, dels for at nedsætte mængden af artsfremmed protein i det aktive stof (Fig. 1). For eksempel kan man nu producere anti-TNF-proteiner udelukkende bestående af humane komponenter, hvilket mange har troet ville eliminere immunogeniciteten.

Det er umiddelbart forståeligt, at anti-TNF-konstruktioner bestående af murine sekvenser kan være immunogene (Fig. 1)

De fleste biofarmaka, selv de såkaldt 100% humane, kan inducere antistoffer ved langtidsbehandling (se Tabel 1).

Alvorlige komplikationer kan opstå, hvis biofarmaka inducerer antistoffer mod native proteiner.

Klinisk relevant monitorering af antistoffer mod biofarmaka er en specialistopgave og bør formentlig udføres uafhængigt af industrien.

Undersøgelser af immunrespons mod biofarmaka kan kræve individspecifikke målemetoder.

Monitorering af patienter i kronisk behandling med biofarmaka er økonomisk fordelagtig – biofarmaka koster det danske samfund adskillige hundrede millioner kroner om året.

[9]. Men også 100% humane konstruktioner er potentielt immunogene, og det kan ikke udelukkes, at humanisering i visse tilfælde kan øge immunogeniciteten af en kimær grundstruktur [10]. På trods af dette er det for de fleste klinikere umuligt at få patienter monitoreret for udvikling af antistoffer under anti-TNF-behandling. De fleste fabrikanter er endog afvisende over for ønsker om at følge koncentrationen af disse kostbare lægemidler i blodet.

Ovenstående viser, at immunogeniciteten af humane anti-

TNF-konstruktioner kan være af klinisk betydning, og de hidtidige erfaringer understreger vigtigheden af at teste for udvikling af neutraliserende antistoffer også hos patienter, som behandles med humaniserede biofarmaka. Monitoreringen bør formentlig foregå uafhængigt af producentinteresser.

Korrespondance: *Klaus Bendtzen*, Institut for Inflammationsforskning, Finsencentret, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø.  
E-mail: kben@mail.dk Hjemmeside: <http://www.inflammation.dk>

Antaget den 2. oktober 2003.

H:S Rigshospitalet, Finsencentret, Institut for Inflammationsforskning.  
Mere information kan findes på IIR's hjemmeside: <http://www.inflammation.dk>

#### Litteratur

1. Filippini G, Munari L, Incurvaia B et al. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet* 2003;361:545-52.
2. Pachner AR. Measurement of antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2001;58:1299-300.
3. Ross C, Clemmesen KM, Svenson M et al. Immunogenicity of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. *Ann Neurology* 2000;48:706-12.
4. Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM et al. Clinical significance of neutralizing antibodies against interferon-beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* (i trykken).
5. Casadevall N, Nataf J, Viron B et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with rekombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002;346:469-75.
6. Nielsen CH, Leslie RG. Complement's participation in acquired immunity. *J Leukoc Biol* 2002;72:249-61.
7. Bendtzen K. Makrofaghormonerne interleukin 1 (IL-1) og tumornekrotiserende faktor (TNF). *Ugeskr Læger* 1987;149:2191-6.
8. Bendtzen K, Nielsen H, Petersen J. Behandling af reumatoid artrit med anti-TNF $\alpha$  antistof. *Ugeskr Læger* 1995;157:1689-90.
9. Baert F, Noman M, Vermeire S et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:601-8.
10. Clark M. Antibody humanization: a case of the "Emperor's new clothes"? *Immunol Today* 2000;21:397-402

## Kunstig befrugtning af hiv-positive – en risikoreducerende behandling

Peter S.H. Humaidan, Inge Agerholm, Hans Jakob Ingerslev, Court Pedersen, Jan Gerstoft & Anders Nyboe Andersen

Tidligere har man fra lægelig side frarådet par, hvor den ene var hiv-positiv, at forsøge at opnå at få »fælles« barn. Baggrunden var sygdommens alvorlige prognose og risikoen for såvel horisontal som vertikal transmission af virus. Ny og mere effektiv behandling af patienter med hiv-infektion har imidlertid gjort det nødvendigt at tage stilling til, om denne meget restriktive holdning fortsat er rimelig. Livstidsprognosen for hiv-positive, der behandles med potent antiretroviral kombinationsbehandling, er nu 15-20 år eller formentlig længere [1]. Endvidere har man fået større viden om faktorer af betydning

for transmission, og man kan i dag vurdere risikoen for mor til barn-smitte ret nøjagtigt hos den enkelte kvinde [2].

Hiv-positive par er generelt fertile. Risikoen for smitteoverførsel fra den hiv-positive partner skønnes ved et enkelt ubeskyttet samleje at være 0,1-0,2% [3], men den er afhængig af det aktuelle virusniveau i blodet. Ubeskyttet samleje må derfor anses for at være en meget dårlig løsning. Udvikling af medicinsk behandling og andre metoder til at minimere smitterisikoen har medført, at man internationalt og nationalt har argumenteret for, at der bør gives rådgivning og etableres risi-