

Aus dem
Charité Centrum 14 für Tumormedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Thiel

Habilitationsschrift

Rekombinante Antikörper-Enzym-
Fusionskonstrukte zur zielgerichteten
Therapie kolorektaler Karzinome

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Peter Markus Deckert
aus Berlin

eingereicht Juni 2009

Dekanin: Univ.-Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Dr. rer. medic. Stefan Barth
2. Prof. Dr. med. Alexander Knuth

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
2. Eigene Arbeiten	9
2.1 Chemisch hergestelltes Antikörper-Enzym-Konjugat.....	10
2.2 PEG-konjugierte Antikörper	18
2.3 Fusionsproteine mit grün fluoreszierendem Protein.....	28
2.4 Untersuchungen zur Funktion des A33-Rezeptors	38
2.5 Fusionsproteine mit Cytosindeaminase aus <i>E. coli</i>	48
2.6 Fusionsproteine mit Cytosindeaminase aus Hefen	52
2.7 Optimierung der Produktion rekombinanter Fusionsproteine in <i>Pichia pastoris</i>	61
2.8 Pharmakokinetik und Wirksamkeit <i>in vivo</i>	73
2.9 Bisher unpublizierte Arbeiten	81
Ausweitung des Modells auf Fibroblasten-Aktivierungsprotein alpha	81
Entwicklung eines murinen Tumormodells.....	81
3. Diskussion	83
4. Zusammenfassung	99
5. Literaturverzeichnis	102
6. Danksagung	117
Erklärung	118
Publikationsverzeichnis	119
Originalarbeiten in Erst- oder Seniorautorschaft.....	119
Originalarbeiten in Koautorschaft	120
Übersichtsartikel	122
Buch, Buchkapitel.....	122
Abstracts	122
Vorträge	124

Abkürzungsverzeichnis

Auf dem SI-Einheitensystem oder auf internationalen Konventionen beruhende oder als Eigenamen verwendete Abkürzungen werden nicht angegeben.

5FC	5-Fluorocytosin
5FU	5-Fluorouracil
A33scFv	Einzelkettenfragment des humanisierten A33-Antikörpers
A33scFv::X	Fusionsprotein des A33scFv mit einem zweiten Protein X
ADEPT	antibody-directed enzyme <i>prodrug</i> therapy – Antikörper-gesteuerte Enzym- <i>Prodrug</i> -Therapie
Ag	Antigen
AOX	Alkoholoxidase
CD	Cytosindeaminase (aus <i>E. coli</i>)
CD mn	Cluster of Differentiation, System zur immunphänotypischen Differenzierung und Identifizierung von zellulären Oberflächenmerkmalen
cDNA	complementary DNA – komplementäre DNA, mittels reverser Transkriptase aus der Messenger-RNA eines Transkripts gewonnene kodierende Gensequenz
CDR	complementarity determining region – bindungsbestimmende Region eines Immunglobulins
CDy	Cytosindeaminase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CEA	carcinoembryonales Antigen
CRC	colorectal carcinoma – kolorektales Karzinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epithelial growth factor – epithelialer Wachstumsfaktor
FAP	Fibroblasten-aktivierendes Protein
GFP	green fluorescent protein – grün fluoreszierendes Protein
gpA33	A33-Antigen
huA33	humanisierter monoklonaler IgG-Antikörper gegen das gpA33-Antigen
IgG	Immunglobulin der Klasse G
kDa	Kilodalton, nicht SI-konforme Einheit für die Molekülmasse
mA33	muriner monoklonaler IgG-Antikörper gegen das gpA33-Antigen

Mut ⁺	Methanolutilisation durch methanotrophe Mikroorganismen in normaler Geschwindigkeit
Mut ^S	Verlangsamte Methanolutilisation durch methanotrophe Mikroorganismen
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
scFv	single chain fragment _{variable} – Einzelkettenantikörper bestehend aus den variablen Fragmenten der schweren und leichten Kette
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
VEGF	vascular endothelial growth factor – Vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor

1. Einleitung

Chemotherapeutika sind in der Behandlung von Tumorerkrankungen biologisch hoch wirksam, jedoch wenig spezifisch für Tumorzellen. Systemische Toxizität ist deshalb eines der wesentlichen Hindernisse für den klinischen Erfolg konventioneller Chemotherapie. So werden trotz der erheblichen Fortschritte der letzten Jahre durch die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms mit 5-Fluoropyrimidinen ebenso wie mit Oxaliplatin oder Irinotecan nur in der Minderheit der Fälle klinisch relevante Erfolge erzielt (1).

Monoklonale Antikörper können selektiv auf Tumorgewebe wirken, wie in der Therapie des Kolonkarzinoms der erfolgreiche Einsatz der Antikörper Cetuximab und Bevacizumab gegen den EGF-Rezeptor bzw. den Angiogenese-Faktor VEGF zeigt (2). Auch bei anderen Tumorentitäten, wohl am prominentesten mit Rituximab bei den B-zellulären Lymphomen (3), wurden durch monoklonale Antikörper in den letzten 10 bis 15 Jahren bahnbrechende Erfolge erreicht. Der Weg zum Einsatz von Antikörpern in der Krebstherapie war jedoch länger und schwieriger als bei deren Erstbeschreibung vor drei Jahrzehnten erwartet (4). Ein Grund dafür ist, dass die immunologische Effektorwirkung allein für einen therapeutischen Erfolg häufig unzureichend ist. Tatsächlich ist die Wirkung vieler bisher erfolgreicher Antikörper zu einem nicht geringen Anteil auf die gezielte molekulare Beeinflussung von Signalrezeptoren für Zellproliferation oder Angiogenese zurückzuführen – Wirkungen, in denen diese Antikörper mit *small molecule drugs* wie den Tyrosinkinaseinhibitoren konkurrieren.

Um ihre hohe Spezifität mit einer stärkeren Effektorwirkung zu verbinden, wurden deshalb verschiedene theoretische Therapiekonzepte entwickelt, die auf der Kopplung weiterer Moleküle an den Antikörper basieren. Die beiden naheliegendsten Effektoren waren Radionuklide und chemotherapeutisch wirksame Moleküle, die direkt an den Antikörper gekoppelt werden. Erfolgreiche Vertreter dieser Kategorie sind die vor kurzem als Arzneimittel zugelassenen Substanzen Ibritumomab Tiuxetan, das durch gezielt an den Antikörper konjugierte Kopplungsmoleküle für die Radiojugation in einem nuklearmedizinischen Labor am Anwendungsort vorbereitet ist (5,6), und Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg) (7).

Generell sind bei der direkten Kopplung jedoch nur geringe molare Verhältnisse von Pharmakon zu Antikörper – und damit zur verfügbaren Antigenmenge im Tumorgewebe – erreichbar. Aus diesem Grund kommen für dieses Konzept nur Radionuklide oder extrem toxische Substanzen wie die Maytansinoide (zu denen Ozogamicin gehört) in Frage, die ohne einen Mechanismus zur gezielten Lokalisation überhaupt nicht systemisch verabreicht werden könnten.

Eine Variation dieses Ansatzes ist die Verwendung hoch toxischer biogener Toxine wie Diphtherietoxin, Pseudomonas-Exotoxin A oder Ricin A. Mit Denileukin-Diftitox (Ontak), das allerdings nicht auf einem Antikörper, sondern auf Interleukin 2 als *Targeting*-Komponente basiert (8), hat dieser Ansatz inzwischen den Weg in die Klinik gefunden.

Aufgrund dieser Limitationen wurden verschiedene Konzepte entwickelt, die auf der Kopplung eines anderen biologisch aktiven Proteins an den Antikörper beruhen. In dieser Klasse von Fusionskonstrukten erreichen Zytokine als Kopplungspartner ebenfalls einen unmittelbaren Effekt. Der theoretische Vorteil gegenüber Zytostatika-Konjugaten besteht ähnlich wie bei Radionukliden in der über den Zeitpunkt des Bindens an den Tumor fortdauernden Wirksamkeit. Darüber hinaus bestand die Hoffnung, auf diese Weise durch die Mobilisierung körpereigener Mechanismen eine sanftere Tumorthherapie zu erreichen und auch hier die Nebenwirkungen der ungerichteten systemischen Therapie zu verringern.

Ein weiteres Konzept dieser Art ist ADEPT (für engl. *antibody-directed enzyme-prodrug therapy*), das sich als eine Methode des *PreTargeting* von den anderen bisher genannten dadurch unterscheidet, dass es in zwei Schritten erfolgt. Der Kopplungspartner des Antikörpers ist hier ein Enzym, das den nach erfolgter Antikörperbindung verabreichten Überschuss einer inaktiven *Prodrug* in ein wirksames Chemotherapeutikum umsetzt (9). Idealerweise würde das Chemotherapeutikum auf diese Weise ausschließlich in Tumorgewebe freigesetzt und dort intrazellulär aufgenommen. Dabei erlauben die Entkopplung der Kinetiken von Antikörper und Wirkstoff und die Aktivierung des Wirkstoffes durch ein theoretisch unbegrenzt lange zur Verfügung stehendes Enzym die wiederholte Gabe der *Prodrug* in einem Vielfachen der molaren Antikörperdosis und damit die Freisetzung einer Vielzahl Wirkstoffmoleküle je besetztem Antigenmolekül.

Das ADEPT-Konzept wurde von den Arbeitsgruppen um Bagshawe und Begent am weitesten entwickelt. Verschiedene klinische Studien, unter anderem mit dem Carboxypeptidase-G₂-Konjugat eines anti-CEA-Antikörpers bei Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom (10,11), haben das Potential von ADEPT aufgezeigt, aber auch die folgenden Hindernisse für seine weitere Entwicklung:

1. Pharmakokinetische Faktoren wie lange Diffusionsstrecken und hoher intratumoraler Druck erschweren den Transport von Makromolekülen in Tumoren (12-15),
2. Heterogene Tumorzellpopulationen und Selektionsdruck bewirken inkonsistente Expression tumorassoziierter Antigene im zeitlichen Verlauf (16-18).
3. Abgabe des Zielantigens in die Blutbahn (*Shedding*) führt zu zirkulierenden Immunkomplexen mit systemischer Aktivierung der *Prodrug* (19),
4. Immunogenität des Antikörper-Enzym-Konjugats erschwert oder verhindert dessen wiederholte Anwendung (20-22).

Wesentliche Strategien, diese Limitationen zu überwinden, liegen in der Auswahl von Antigenen mit hoher Tumorselektivität und geringer Abgabe in die Blutbahn (19), einer Reduktion der Immunogenität durch humanisierte Antikörper und humane Enzyme (23) oder durch Polyethylenglykol-Konjugation fremder Proteine (20) sowie in der Anwendung neutralisierender Antikörper gegen das Konjugat mit dem Ziel höherer Tumor-zu-Blut-Verhältnisse durch beschleunigte Elimination (24), was allerdings die Komplexität weiter erhöht, da aus einem zweischrittigen ein dreischrittiges System wird.

Die Arbeiten der genannten britischen Arbeitsgruppen konzentrierten sich auf Carcinoembryonales Antigen (CEA), einen in der Diagnostik kolorektaler Karzinome etablierten Tumormarker, als Zielstruktur, um im Weiteren wesentliche Beiträge zu Fragen der Antikörper- und der *Prodrug*-Enzym-Kinetik sowie dem speziellen Problem eines möglicherweise notwendigen Antikörpers zur Neutralisierung zirkulierender Antikörper-Enzym-Konjugate zu leisten (25). Zugleich sind diese ADEPT-Systeme die einzigen bisher in klinischen Studien untersuchten. Die Tatsache, dass CEA in die Blutbahn abgegeben wird, stellt allerdings auch einen der Schwerpunkte dieses Konzepts dar, da dies zu einer vermehrten systemischen Prodrug-Aktivierung beiträgt.

Das hier beschriebene Gesamtprojekt ist ebenfalls auf kolorektale Karzinome als Modell gerichtet, als Zielantigen wurde jedoch aus verschiedenen Gründen das A33-Antigen gewählt, das zunächst anhand des Bindungsverhaltens des gleichnamigen* monoklonalen Antikörpers beschrieben worden war (26). Diese Befunde hatten seine Expression in normalem Darmgewebe und in mehr als 95% der Kolonkarzinome, im Gegensatz zu CEA ohne Abgabe in die Blutbahn, gezeigt. Zelllinien anderer gastrointestinaler Tumoren sind ebenfalls gpA33-positiv, so etwa die Hälfte der Zelllinien aus Magen- oder Pankreaskarzinomen (27) – systematische Untersuchungen zur Frequenz in Patientenresektaten liegen noch nicht vor.

In klinischen Studien zur Radio-Immuntherapie mit ¹³¹I-markiertem A33-Antikörper zeigten Ganzkörper-Szintigramme initial eine Anreicherung auch in normalen Dickdarmanteilen, die sich innerhalb von sieben bis acht Tagen jedoch vollständig zugunsten einer selektiven und sensitiven Darstellung der mit Referenzmethoden erkannten Primärtumoren und Metastasen zurückbildete. Hervorzuheben ist, dass sich dabei klinisch sowohl mit dem ¹²⁵I- wie mit dem ¹³¹I-markierten Antikörper allenfalls milde gastrointestinale Toxizität zeigte, die limitierende unerwünschte Wirkung war Myelotoxizität (28,29). Zwar erfuhren die erheblich vorbehandelten Studienpatienten fortgeschrittener Krankheitsstadien allenfalls geringe Verbesserungen des Krankheitsverlaufs ohne

* In der Literatur wurde zuerst der murine A33-Antikörper als A33 bezeichnet, das Antigen erhielt später dieselbe Bezeichnung. Zur Klarheit wird in dieser Arbeit mit *gpA33* das Antigen bezeichnet, Antikörper werden durch Präfix (*huA33*) bzw. Suffix (*A33scFv*) identifiziert.

statistische Signifikanz. Gute Toleranz mit nur geringer gastrointestinaler Toxizität und die beschriebene Tumorspezifität haben jedoch zu weiteren klinischen Studien ermutigt (30,31).

Auf zellulärer Ebene zeigte sich, dass gpA33 nach Bindung des Antikörpers in Mikrovesikeln internalisiert und wieder an die Zelloberfläche rezykliert wird, wobei sich ein Fließgleichgewicht intrazellulärer und oberflächengebundener Moleküle in einem Verhältnis von ca. 40:60 einstellt (32).

Christoph Rader in der Arbeitsgruppe von Carlos Barbas III hatte Mitte der neunziger Jahre mittels *phage display* einen Einzelkettenantikörper gegen das A33-Antigen hergestellt, dessen cDNA als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Fusionsproteinen in diesem Projekt zur Verfügung stand (33).

5-Fluorocytosin ist ein zur Anwendung am Menschen zugelassenes Antimykotikum, das durch Cytosindeaminase (CD) zu 5-Fluorouracil (5FU) umgesetzt wird. 5FC hat keine zytotoxische Wirkung auf Säugetiere, während 5FU als Chemotherapeutikum unter anderem für die Behandlung kolorektaler Karzinome zugelassen ist. Dieses *Prodrug*-System wurde bereits präklinisch als ADEPT-Ansatz untersucht (34,35).

In dem hier beschriebenen Projekt wurde zunächst in Folge der ermutigenden Ergebnisse zur Radiotherapie die grundsätzliche Einsetzbarkeit des A33-Antigens als Zielstruktur für *Drug-Targeting* in Form von ADEPT untersucht. Hierzu wurde ein auf den ersten Blick technisch einfach, nämlich durch chemische Konjugation herzustellendes, Antikörper-Enzym-Konjugat mit boviner Carboxypeptidase und Methotrexat-Phenylalanin als Substrat gewählt. Dennoch war bereits zu diesem Zeitpunkt klar, dass langfristig rekombinante Fusionsproteine die experimentellen chemischen Konjugate ablösen mussten. Da parallel dazu auch Grundlagenfragen zur Funktion des gpA33 geklärt werden sollten, wurde zunächst ein Fusionsprotein des A33scFv mit dem Fluorophor *green fluorescent protein* (grün fluoreszierendes Protein, GFP) projiziert, das sich im weiteren Verlauf auch tatsächlich als sinnvoll einsetzbar für die Untersuchung von Fragen der intrazellulären Lokalisation des A33-Antigens erwies. Zur Herstellung therapeutisch im Rahmen von ADEPT einsetzbarer Konstrukte wurde das oben beschriebene 5FC–5FU-System mit Cytosindeaminase verfolgt – einem Enzym, das aufgrund seiner Abwesenheit im Säugerorganismus und seiner einfachen genetischen Verfügbarkeit wahlweise aus Bakterien- oder Hefezellen als besonders geeignet erschien. Tatsächlich erwies sich die Herstellung eines solchen Fusionsproteins jedoch als erhebliche technische Herausforderung, die schließlich am erfolgreichsten mit dem Isoenzym aus *Saccharomyces cerevisiae* in der Hefe *Pichia pastoris* als Expressionswirt realisiert werden konnte. Mit diesem Material waren schließlich sinnvolle Untersuchungen des vollständigen ADEPT-Systems im Tierversuch möglich, die die grundsätzliche Umsetzbarkeit dieses Systems *in vivo* zeigten.

2. Eigene Arbeiten

Die im folgenden wiedergegebenen Arbeiten zur Entwicklung eines ADEPT-Systems auf der Basis des A33-Antigens zeichnen den Weg von einem ersten chemisch hergestellten Enzymkonjugat zur Aktivierung einer Methotrexat-*Prodrug* über die Entwicklung eines rekombinanten Konzepts mit einem diagnostischen Fusionsprotein als Pilotprojekt, das zugleich für funktionelle Grundlagenuntersuchungen zum A33-Rezeptor genutzt werden konnte, und verschiedene Entwicklungsstufen eines therapeutischen Fusionsproteins bis zu dessen präklinischer Erprobung im Tiermodell nach. Sie werden hier in dieser gedanklichen Reihenfolge wiedergegeben, die nicht immer der Reihenfolge der Publikation der jeweiligen Arbeit entspricht.

2.1 Chemisch hergestelltes Antikörper-Enzym-Konjugat

Um zunächst mit möglichst geringem Aufwand das Prinzip auf dem A33-Antikörper basierender ADEPT zu prüfen, wurde ein vergleichsweise einfach herzustellendes chemisches Konjugat projektiert. Dem lag eine von der Arbeitsgruppe um Frank M. Huennekens entwickelte *Prodrug* zugrunde, Methotrexat-Phenylalanin, die durch bovine Carboxypeptidase A zu Methotrexat und Phenylalanin gespalten wird. Auch eine zweiseitige Herstellung durch Bindung von Linkergruppen an Antikörper und Enzym, die dann bei Mischung beider so vorbereiteter Substanzen zu einer nicht-kovalenten Bindung in stöchiometrischem Verhältnis führte, war durch die Gruppe von Huennekens bereits etabliert worden. Tatsächlich erwies sich die direkte Übertragung dieser Methode auf den humanisierten Antikörper A33 jedoch als nicht durchführbar. Unterschiede in der Zahl der verfügbaren reagiblen Aminosäurereste gegenüber dem von Huennekens verwendeten CC49-Antikörper schienen hierfür eine maßgebliche Rolle gespielt zu haben. Letztlich wurde eine eigene Konjugationsmethode komplett neu etabliert.

In-vitro-Versuche zeigten dann die Bifunktionalität, das heißt erhaltene Antigenbindung und Enzymaktivität, des Konjugats, und schließlich die Spezifität beider Reaktionen und ihre Eignung zur selektiven *Prodrug*-Aktivierung in Zytotoxizitätsassays und in einem etablierten Xenotransplantat-Modell der Kolonkarzinom-Zelllinie SW1222 (36).

Diese Untersuchungen zeigten zusammenfassend das Funktionieren des ADEPT-Ansatzes *in vitro* sowie eine spezifische Aufnahme des Konjugats in Tumorgewebe. Seine Tumoranreicherung im Vergleich zu Blut und Normalgeweben fiel jedoch deutlich niedriger aus als mit dem nativen, unkonjugierten IgG-Antikörper, was in erster Linie die mit zunehmender Molekülgröße schlechteren Diffusionseigenschaften widerspiegelte.

Deckert PM, Bornmann WG, Ritter G, Williams C Jr, Franke J, Keilholz U, Thiel E, Old LJ, Bertino JR, Welt S.

Specific tumour localisation of a huA33 antibody-carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine.

Int J Oncol 2004;24(5):1289-1295.

2.2 PEG-konjugierte Antikörper

Ein wesentliches Problem bei der medizinischen Anwendung fremder Proteine generell ist deren Immunogenität, die neben allergischen Reaktionen zur Bildung neutralisierender Antikörper führt und damit die wiederholte Anwendung erschwert oder unmöglich macht. Dies gilt umso mehr für die hier vorgestellten Fusionsproteine und Konjugate: während Antikörper mit verschiedenen Methoden von der Chimärisierung über die Humanisierung bis zu artefiziellen komplett humanen Systemen menschlichen Proteinen soweit angepasst werden können, dass ihre Immunogenität deutlich verringert wird, müssen die für ADEPT eingesetzten Enzyme definitionsgemäß solche sein, die im menschlichen Organismus nicht vorkommen. Zwar werden auch hier Deimmunogenisierungsstrategien entwickelt, indem versucht wird, immunogene Epitope der tertiären und quartären Proteinstrukturen vorherzusagen und ohne Funktionsverlust durch weniger immunogene zu ersetzen. Dieser Prozess ist jedoch aufwendig und keineswegs vorhersagbar erfolgreich.

Eine von der Sequenz und Struktur des Proteins unabhängige Möglichkeit, die Immunogenität zu reduzieren, ist die Konjugation mit Polyethylenglykol (PEG). Dadurch kann neben der Immunogenität auch eine eventuelle Toxizität von Proteinen reduziert und ihre Zirkulationsdauer im Blut verlängert werden. Pharmazeutische Anwendung fand diese Methode erstmals in dem bei akuten lymphatischen Leukämien eingesetzten Enzym Asparaginase (20,37). Im Gegensatz zur unkonjugierten Form kann die Anwendung von PEG-Asparaginase im Menschen vielfach wiederholt werden. Die Übertragung dieser Möglichkeit auf Antikörper ist jedoch keineswegs trivial, da der Zugang eines kleinen Substratmoleküls zum aktiven Zentrum eines Enzyms zwischen den Polyethylenglykol-Polymeren sterisch leichter möglich erscheint als die großflächige Protein-Protein-Interaktion der Antikörperbindung an ein Antigen.

In einem weiteren Teilprojekt wurde deshalb modellhaft der Effekt der PEG-Konjugation auf Immunogenität, Antigenerkennung, Pharmakokinetik und Tumorkonlokalisierung des huA33 untersucht. Diese Arbeiten zeigten eine über 99-prozentige Reduzierung der Immunogenität des Antikörpers durch PEG-Konjugation bei wiederholter Gabe in immunkompetenten Mäusen. Absolute und relative Tumordosis im Vergleich zum Blut nahmen je um etwa ein Drittel ab, in einem etablierten Xenograft-Modell wurde der Antikörper jedoch unverändert immunologisch spezifisch in den Tumorknoten angereichert. Mit einer zeitlichen Verzögerung von mehreren Stunden wurde mit dem PEG-konjugierten Antikörper die gleiche homogene Anfärbung des gesamten Tumorquerschnitts wie mit dem nativen Antikörper erzielt. Diese Untersuchungen zeigten, dass PEG-Konjugation grundsätzlich erfolversprechend zur Reduktion der Antigenität des Antikörperkonstrukts im Tumor-*Targeting* einsetzbar ist.

Deckert PM, Jungbluth A, Clark M, Montalto N, Williams C Jr, Carswell-Richards E, Bertino JR, Old LJ, and Welt S.

Pharmacokinetic and immunohistochemical characterization of polyethylene glycol-modified humanized A33 antibody targeted to colon cancer xenografts in mice.

Int J Cancer 2000;87: 382-390.

2.3 Fusionsproteine mit grün fluoreszierendem Protein

Die Grundlage für die folgenden Untersuchungen zur Herstellung und Anwendung rekombinanter antikörperbasierter Fusionsproteine bildete A33scFv, ein in *Phage-display*-Technologie entwickelter Einzelkettenantikörper gegen das A33-Antigen (33). Aus den vorangegangenen Untersuchungen, insbesondere den Versuchen zur PEG-Konjugation, war klar geworden, dass eine Größenzunahme des Gesamtmoleküls über die ca. 150.000 kDa eines kompletten IgG-Antikörpers hinaus eine verringerte Tumorkonlokalisierung des Proteins erwarten ließ. Weitere theoretische Überlegungen zu Diffusionseigenschaften und intratumoralem Druckgradienten (13) legten nahe, dass möglichst kleine Proteine eine optimale Tumorpeneetration erreichen sollten. Deshalb konzentrierte sich das weitere Projekt zunächst auf Einzelkettenmoleküle der variablen Fragmente (scFv) als Grundlage für die zu entwickelnden bifunktionalen rekombinanten Fusionsproteine.

Als methodisches Pilotprojekt wurde ein Fusionsprotein mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) entwickelt. Dieser Fusionspartner bot verschiedene Vorteile: seine DNA ist in konfektionierten Plasmidvektoren kommerziell verfügbar, und die erfolgreiche Expression kann durch die Fluoreszenz des Proteins direkt überprüft werden.

Die DNA des A33scFv wurde für diese Arbeiten zunächst mittels RT-PCR mit einer Glycin-Serin-Linkersequenz sowie mehreren an den Leserahmen angepassten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen versehen, um eine spätere Exzision und Ligation in mehrere in Frage kommende Bakterien-, Hefen- und Säugervektoren zur Expression oder Einschleusung der DNA zu ermöglichen. Durch Ligation in einen bakteriellen Expressionsvektor, Transfektion verschiedener *E. coli*-Stämme und Expression wurde die Identität und Funktion des Antikörperfragments bestätigt. Im wesentlichen mit derselben Methodik wurde die DNA für verschiedene Varianten des GFP-Moleküls mit passenden Restriktionsschnittstellen versehen in diesen Leserahmen kloniert und – nach Probeexpression des solitären Proteins – durch Exzision und Ligation zu der DNA für ein Fusionsprotein in der Leseabfolge 5'-A33scFv-Linker-GFP-3' zusammengefügt. Dieses Fusionsprotein wurde zunächst mittels eines bakteriellen Expressionsvektors in dem *E. coli* Stamm BL21 exprimiert. Das Fusionsprotein wurde komplett hergestellt und war bifunktional aktiv (es band spezifisch das A33-Antigen und leuchtete grün), die Ausbeute war jedoch auch nach verschiedenen Optimierungsversuchen zu gering für weitergehende Versuche. Aus diesem Grund wurde auf *Pichia pastoris* als Expressionssystem umgestellt (zu Methodik und Hintergrund dieses Expressionssystems siehe Abschnitt 2.6). Mit diesem System gelang schließlich eine erheblich gesteigerte und auch für Tierversuche ausreichende Proteinausbeute des Fusionsproteins A33scFv::GFP.

Fluoreszenzzytometrische und -mikroskopische Untersuchungen an Zelllinien und Gewebsschnitten dokumentierten die seine antigenspezifische Bindung und erhaltenen Fluoreszenzeigenschaften. Erste Lokalisationsstudien mit radiomarkiertem A33scFv::GFP in Mäusen, denen gpA33-positive Tumorzellen xenotransplantiert worden waren, zeigten auch *in vivo* Spezifität des Fusionsproteins für Tumorgewebe. Ähnlich wie bei den chemischen Enzymkonjugaten des kompletten IgG-Antikörpers war das Tumor-zu-Blut- und Tumor-zu-Gewebe-Verhältnis jedoch im Vergleich zu den nativen IgG-Antikörpern huA33 oder mA33 vermindert, was wahrscheinlich der geringeren Avidität des monovalenten Antikörperfragments zuzuschreiben ist. Dennoch stellte sich dieses Fusionsprotein als ein in Herstellung wie Anwendung robustes Werkzeug heraus, das sowohl als Referenz für Expressionsversuche weiterer Fusionsproteine als auch zum Studium funktioneller Aspekte des gpA33 erfolgreich einsetzbar war.

Petrausch U, Dervedde J, Coelho V, Panjideh H, Frey D, Fuchs H, Thiel E, Deckert PM.
**A33scFv–Green Fluorescent Protein, a Recombinant Single-Chain Fusion Protein for
Tumor *Targeting*: Cloning, Expression in *P. pastoris*, and Functional Analysis.**
Protein Eng Des Sel 2007;20(12):583-90.

2.4 Untersuchungen zur Funktion des A33-Rezeptors

Die Funktion des gpA33 ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. Wie viele andere Proteine in der Ära monoklonaler Antikörper wurde es zuerst durch den mAb A33 definiert und teilweise funktionell beschrieben und erst danach isoliert und als Protein charakterisiert. Mittlerweile liegt die Sequenz des Glykoproteins vor, die es als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ausweist und einen kleinen intrazellulären, einen transmembranären und einen extrazellulären Anteil mit der klassischen Struktur einer Immunglobulin-Domäne unterscheiden lässt. Damit weist gpA33 wesentliche Eigenschaften eines Adhäsionsmoleküls auf, so dass es gegenwärtig als solches klassifiziert wird (38).

Seine tatsächliche biologische Funktion bleibt dennoch weiterhin unbekannt. Eine Besonderheit, die aus zellulären Radiografieexperimenten mit ¹³¹I-markiertem A33-Antikörper in LIM-1215-Kulturzellen bekannt ist, ist seine Fähigkeit zur Internalisierung und Reexpression an der Zelloberfläche. Aufgrund dieser Beobachtung und weiteren Untersuchungen wird eine mögliche antigenpräsentierende Funktion von in der Darmmukosa aufgenommenen Antigenen gegenüber extraluminale Lymphozyten diskutiert. Dem entspricht das räumliche Expressionsmuster, das gpA33 an den lateralen und basalen, aber nicht an den luminalen Oberflächen von Darmepithelzellen zeigt.

Eine weitere Besonderheit besteht in der zeitabhängigen Spezifität von A33-Antikörpern für Karzinome gegenüber gesundem Kolongewebe: während initial auch das gesunde Kolon in Szintigrafien von mit ¹³¹I-huA33 behandelten Patienten markiert wurde, waren nach 10 bis 14 Tagen nur noch bekannte Tumorkolonisationen szintigrafisch nachweisbar. Weitere bisher unpublizierte Befunde deuten darauf hin, dass die Menge des an der Zelloberfläche nachweisbaren gpA33 weniger von seiner Genexpression abhängen könnte als von dem Lokalisationsgleichgewicht zwischen internalisierten und oberflächlich exponiertem Antigen. Eine genauere Kenntnis des zugrundeliegenden Mechanismus könnte von Bedeutung für die diagnostische und therapeutische Ausnutzung des gpA33 sein.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde der intrazelluläre Weg von antigengebundenem A33scFv::GFP mittels konfokaler Lasermikroskopie verfolgt. Dabei konnte der intrazelluläre Transport in Membranvesikeln gezeigt werden. Außerdem wurden mRNA-Spiegel und Oberflächenexpression des Antikörpers unter verschiedenen Zellkulturbedingungen und bei gezielter Zellzyklusunterbrechung verglichen. Zusammenfassend konnte eine Abhängigkeit von Kulturdicke und Zellzyklus gezeigt werden, jedoch keine Korrelation zur Produktion von mRNA, so dass die Schlussfolgerung einer überwiegenden Steuerung durch Lokalisationsveränderungen im Gegensatz zur Genexpression nahe liegt.

Frey D, Coelho V, Petrusch U, Schaefer M, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM.

Surface expression of gpA33 is dependent on cell density and cell cycle phase and is modulated by intracellular migration rather than gene transcription.

Cancer Biother Radiopharm 2008;23(1): 65-73.

2.5 Fusionsproteine mit Cytosindeaminase aus *E. coli*

Ein erster Schritt zu therapeutisch in ADEPT einsetzbaren Fusionsproteinen war die Herstellung eines als A33scFv::CD bezeichneten Fusionsproteins in *E. coli*. Hierzu wurde in der bereits beschriebenen Expressionskassette das bakterielle Enzym Cytosindeaminase aus *E. coli* in Leserichtung hinter dem A33scFv eingesetzt und in einem bakteriellen Expressionssystem produziert. Die Herstellung des Fusionsproteins gelang allerdings erst nach Versuchen mit einer Vielzahl von Expressionsvektoren und Bakterienstämmen, und die Ausbeute blieb dennoch zu gering, um im Labormaßstab ausreichende Mengen z.B. für Tierversuche zu produzieren.

Darüber hinaus war auch die katalytische Aktivität des Fusionsproteins mit $0,8 \mu\text{mol}/\text{min}$ gering im Vergleich zum solitären Enzym aus dem gleichen Expressionssystem ($2,5 \mu\text{mol}/\text{min}$). Die Ursache dafür ist in der funktionellen Struktur der Cytosindeaminase als Hexamer zu suchen. Die Hexamerisierung dürfte durch den anhängenden Einzelkettenantikörper erheblich erschwert werden. Zudem ist fraglich, ob sich spontan ausreichend Hexamere bilden, bevor diese an das gpA33 der Zelloberfläche binden, oder ob Hexamere erst nach Bindung monomerer Fusionsproteine an der Zellmembran gebildet werden. Diese Frage abschließend zu beantworten wurde in diesem Projekt nicht verfolgt, nachdem mit dem Isoenzym aus Hefen eine geeignete Alternative zur Verfügung stand.

Trotz dieses Hindernisses (dessen theoretischer Hintergrund erst kurz vor der Publikation unserer Ergebnisse bekannt wurde) zeigten diese Untersuchungen *in vitro*, dass es möglich ist, auf der Basis von Fusionsproteinen aus A33scFv und Cytosindeaminase ein funktionierendes ADEPT-System zu etablieren: In Zytotoxizitätsassays zeigte sich eine selektive zytotoxische Wirkung, die von Antikörperbindung und katalytischer Enzymaktivität abhängig war. So zeigte das Fusionsprotein alleine keinerlei Wirkung auf die Proliferation gpA33-positiver LIM1215-Zellen, ebensowenig die *Prodrug* 5-Fluorocytosin (5FC) alleine. Erst, wenn die Zellen konsekutiv mit dem A33scFv::CD-Fusionsprotein und, nach entsprechenden Waschschritten, mit der *Prodrug* 5FC inkubiert wurden, kam es zu einer annähernd vollständigen Abtötung der Kulturzellen wie bei alleiniger Inkubation mit 5-Fluorouracil, wobei allerdings etwa zehnfach höhere molare Dosen der *Prodrug* im Vergleich zum aktiven Zytostatikum benötigt wurden. Wurde das Fusionsprotein A33scFv::CD durch das zuvor beschriebene A33scFv::GFP ersetzt, zeigte sich dagegen ebensowenig eine zytotoxische Wirkung wie bei Anwendung des kompletten ADEPT-Systems auf Kulturen der gpA33-negativen Zelllinie HT29.

Deckert PM, Renner C, Cohen LS, Jungbluth A, Ritter G, Bertino JR, Old LJ, Welt S.
**A33scFv-cytosine deaminase: a recombinant protein construct for antibody-directed
enzyme-*prodrug* therapy.**
Br J Cancer 2003;88(6): 937-939.

2.6 Fusionsproteine mit Cytosindeaminase aus Hefen

Die bisher beschriebenen Versuche zeigten, dass die Grundelemente des verfolgten ADEPT-Konzepts funktionierten. Für eine Anwendung in Tierversuchen waren jedoch deutlich größere Mengen des Fusionskonstruktes notwendig als bis dato verfügbar. Tatsächlich erwies sich die Produktion des Fusionskonstruktes als kritischer Punkt des gesamten Projekts – wie auch der Projekte anderer Arbeitsgruppen zu Antikörper-Enzym-Fusionsproteinen. Über die Gründe hierfür kann auch weiterhin nur anhand der schließlich erfolgreichen Lösungsstrategien spekuliert werden. Eine wesentliche Rolle dürfte die Verfügbarkeit geeigneter Chaperone in den verschiedenen Wirtsspezies spielen (39,40).

Aus zwei Gründen wurde deshalb eine Änderung des Konstruktes und des Expressionssystems verfolgt: Zum einen erschienen Hefen, und darunter insbesondere *Pichia pastoris*, als preiswerte eukaryotische Expressionssysteme attraktiv, um eine höhere Proteinausbeute zu erzielen. Zum anderen erschienen in dieser Zeit grundlegende Arbeiten zur Struktur und Funktion von Cytosindeaminase aus *E. coli* sowie aus *S. cerevisiae*, die zeigten, dass im Gegensatz zum Hexamer des bakteriellen Isoenzym das Gegenstück aus Hefen als Dimer katalytisch aktiv ist, was sie für den Einsatz in einem Antikörper-Fusionsprotein wesentlich geeigneter erscheinen ließ.

Die Klonierung und Expression folgte im Wesentlichen demselben Vorgehen wie bereits für das Fusionsprotein A33scFv::GFP beschrieben. Kurz zusammengefasst wurde aus der bereits zuvor für das bakteriell exprimierte Konstrukt verwendeten Klonierungskassette die cDNA der bakteriellen Cytosindeaminase mittels Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten und durch die zuvor mittels PCR mit passenden Restriktionsschnittstellen versehene cDNA der Hefe-Cytosindeaminase ersetzt.

Für den Transfer des rekombinanten Fusionsgens in die Hefezelle wurden zwei verschiedene Shuttle-Vektoren der pPIC-Familie, pPIC-9 und pPIC-Z alpha parallel untersucht. Beide Plasmide führen bei der Transformation von *Pichia-pastoris*-Stämmen zu unterschiedlichen Integranten und sind außerdem mit unterschiedlichen, ebenfalls integrierten Selektionsmarkern versehen. Gemeinsam ist beiden jedoch die Ausnutzung einer Besonderheit des Stoffwechsels von *Pichia* species, der Fähigkeit zur Verwendung von Methanol als alleiniger Kohlenstoffquelle. Hierzu verfügt die Hefe über zwei Alkoholoxidasen (AOX-1 und AOX-2), die bei Fehlen geeigneterer Kohlenstoffquellen in unterschiedlichem Maße exprimiert werden: Der AOX-1-Promotor induziert eine deutliche stärkere Expression als der AOX-2-Promotor, die Aktivität des schwächeren reicht jedoch aus, um den Stoffwechsel der Zelle aufrecht zu erhalten. Wird das zu exprimierende rekombinante Gen unter die Kontrolle des AOX-1-Promotors gestellt, führt deshalb die Umstellung des Nährmediums von

Glucose auf Methanol als Kohlenstoffquelle zu dessen selektiver Überexpression. Dabei sind zwei Genotypen und entsprechende Phänotypen zu unterscheiden: Ist das AOX-1-Gen selbst noch neben dem rekombinanten Zielgen vorhanden, ist die Zelle zu einer hohen Methanolverwertung in der Lage (Mut⁺-Phänotyp). Wurde dagegen das AOX-1-Gen durch das rekombinante Gen ersetzt, steht nur noch die deutlich geringere, aber ausreichende AOX-2-Aktivität für den Energiestoffwechsel der Zelle zur Verfügung, so dass nur noch eine deutlich langsamere Methanolutilisation möglich ist (Mut^s-Phänotyp, von engl. *slow*). Die Mitexpression des sogenannten alpha-Paarungsfaktors ermöglicht außerdem, dass das rekombinante Zielprotein in einen extrazellulären Sekretionsweg eingeschleust und in den Überstand sezerniert wird.

Gegenstand der Untersuchung in diesem Zusammenhang war die empirische Ermittlung optimaler Expressionsparameter, so dass hier auf eine erschöpfende Darstellung der Biologie von *Pichia pastoris* verzichtet wird. Aus unveröffentlichten Vorversuchen war jedoch schnell klar, dass gegenüber der intrazellulären Produktion mit der Notwendigkeit von Zellyse und anschließender Proteinisolierung die Sekretion in den Überstand deutliche Vorteile versprach. Neben der erheblich vereinfachten Reinigung des rekombinanten Proteins lagen diese vor allem in der Möglichkeit, produzierende Klone direkt anhand der Funktion des Überstandes zu identifizieren.

Zusammenfassend ergaben diese Expressionsversuche, dass sich mit beiden Vektoren produzierende Klone erzielen ließen, pPIC-Z alpha sich jedoch vor allem im Hinblick auf eine effizientere Screening-Methode produzierender Klone als überlegen erwies. Mit beiden Vektoren wurden im *Pichia*-System jedoch deutlich höhere Proteinmengen produziert als zuvor in Bakterien, so dass erstmals Tierversuche möglich wurden.

Nach Aufreinigung von A33scFv::CDy aus *P. pastoris* wurde fluoreszenzzytometrisch die selektive Bindung des Proteins an A33-positive LIM1215-Zellen direkt und durch Inhibition der Bindung von A33scFv::GFP gezeigt. Wie zuvor für das bakterielle Fusionsprotein konnte die selektive Bifunktionalität aus Antikörper- und Enzymkomponente im kompletten ADEPT-Ansatz *in vitro* gezeigt werden. Auch hier erreichte die *Prodrug* 5FC nach Präinkubation mit dem Antikörper-Enzym-Fusionsprotein dieselbe Zytotoxizität wie die direkte Anwendung des Zytostatikums 5FC, während A33scFv::GFP als Kontroll-Fusionsprotein keinerlei toxizitätssteigernde Wirkung auf 5FC hatte.

Coelho V, Dervedde J, Petrusch U, Panjideh H, Fuchs H, Menzel C, Dübel S, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM.

Design, construction, and in vitro analysis of A33scFv::CDy, a recombinant fusion protein for antibody-directed enzyme *prodrug* therapy in colon cancer.

Int J Oncol. 2007;31(4): 951-7.

2.7 Optimierung der Produktion rekombinanter Fusionsproteine in *Pichia pastoris*

Die im vorangehenden Kapitel beschriebene Arbeit hatte gezeigt, dass die Verwendung von Cytosindeaminase aus *Saccharomyces* und die Expression im *Pichia*-Hefesystem einen erfolgversprechenden Weg zur Expression größerer, für Tierversuche ausreichender Mengen eines bifunktionalen Fusionsproteins für das hier verfolgte ADEPT-Konzept wiesen. Dennoch blieben verschiedene Probleme bestehen, die eine weitere Optimierung des Produktionsverfahrens erforderten. Dies war übrigens kein alleiniges Problem dieses Forschungsprojekts. So konnte auch ein in der Arbeitsgruppe am Ludwig Institute for Cancer Research Ende der 1990er Jahre begonnenes Projekt zur Expression des singulären A33scFv (ohne Fusionspartner) in *P. pastoris* erst 2004 in Kooperation mit einem semiindustriellen Partnerinstitut abgeschlossen werden (41).

Vor allem zeigte sich ein erheblicher Verlust an funktionellem Protein durch den Aufreinigungsprozess. Besonders gut konnte dies am A33scFv::GFP verfolgt werden, das in unbehandelten Hefeüberständen die höchste Aktivität relativ zur Proteinmenge zeigte (weshalb Aliquots einer Charge dieses Materials der Arbeitsgruppe lange Zeit als Referenzmaterial in vergleichenden Untersuchungen dienten). Diese Überstände enthielten zum größten Teil eine undefinierte Mischung aus einer Vielzahl hefeproduzierter sowie mit dem Nährmedium zugeführter Proteine, die jedoch offensichtlich eine stabilisierende Wirkung auf das hergestellte Fusionsprotein ausübten. Aufreinigungen waren möglich, gingen jedoch mit erheblichem Funktionsverlust des Proteins einher. Aus diesem Grund wurden die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen in einem weiteren Schritt einer grundlegenden Revision unterzogen und eine Vielzahl modifizierender Ansätze zur Optimierung des Herstellungsverfahrens erprobt.

Die Untersuchungen hierzu wurden aus Praktikabilitätsgründen wiederum überwiegend am GFP-Konstrukt geführt und ihre Ergebnisse dann am A33scFv::Cytosindeaminase-Fusionsprotein bestätigt.

Zur Expression rekombinanter Antikörper-Enzym-Fusionsproteine wurden die bereits beschriebenen Expressionskassetten auf der Basis der Vektoren pPIC9/pPIC9-K und pPIC-Z alpha für *P. pastoris* entwickelt. Die flankierenden Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen waren so ausgewählt und angeordnet, dass sich vorhandene Segmente leicht untereinander austauschen und zusätzliche Komponenten einfügen ließen, wodurch auch ein Wechsel des Expressionssystems erleichtert wurde.

Als die letztlich wichtigsten Punkte für die erfolgreiche Optimierung der Proteinausbeute stellten sich in der Expression die Verwendung des synthetischen Kulturmediums WM IX anstelle des

üblicherweise verwendeten BMMY-Mediums und in der Aufreinigung die Elution des Proteins von einer Protein-L-Sepharose-Matrix durch Magnesiumchlorid anstelle der sauren Elution mit Glycin heraus. Nach diesen Optimierungen war das Protein reproduzierbar in einer Größenordnung von bis zu 12 Milligramm pro Liter Kultur herzustellen. Insbesondere die Elution mit Magnesiumchlorid hat sich dabei als bedeutend erwiesen, da sie nicht nur die Proteinausbeute wesentlich steigerte, sondern außerdem das eluierte Fusionsprotein eine wesentlich höhere biologische Aktivität aufwies. (Gegenwärtig laufen Versuchsreihen zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse durch Koexpression mittlerweile in ihrer Sequenz bekannter Chaperone.)

Auf der Basis dieser Voruntersuchungen im Labormaßstab konnte schließlich ein standardisierter Produktionsprozess für die A33scFv-basierten Fusionsproteine im Biofermenter etabliert werden, mit dem die reproduzierbare Produktion ausreichender Mengen an Fusionsprotein für die Durchführung mehrerer Tierversuchsserien gelang. Die methodische Bedeutung dieser Arbeit, aber auch die Notwendigkeit der Optimierung in jedem Einzelfall zeigt sich darin, dass dieselbe Herstellungsprozedur mit einzelnen Abweichungen im Detail von unserer Arbeitsgruppe inzwischen erfolgreich für andere Antikörper-Enzym-Fusionsproteine angewandt wird.

Panjideh H, Coelho V, Dervede J, Fuchs H, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM.

Production of bifunctional single-chain antibody-based fusion proteins in *Pichia pastoris* supernatants.

Bioprocess Biosyst Eng 2008;31(6):559-568.

2.8 Pharmakokinetik und Wirksamkeit *in vivo*

Die erfolgreiche Produktion des Fusionsproteins A33scFv::CDy ermöglichte endlich die Überprüfung des Prinzips *in vivo*. Zu diesem Zweck wurde das Protein mit der Chloramin-T-Methode ¹³¹Iod-markiert und seine verbliebende Funktion analysiert. In Untersuchungen der Bindungsaffinität wurde die Gleichgewichtskonstante K_D mit 15,8 nM und die maximale Bindungskapazität gpA33-positiver LIM1215-Zellen mit 2,5 nM/10⁶ Zellen ermittelt. Das Fusionsprotein band unverändert hochspezifisch an das zelluläre gpA33-Antigen. Diese Ergebnisse waren weitgehend unabhängig vom Iodierungsgrad, so dass die gewählte Radionuklidmarkierung geeignet für die Beobachtung des Bindungsverhaltens *in vivo* war. Darüber hinaus legen diese Ergebnisse nahe, dass eine Radionuklidkonjugation als therapeutisch anwendbares Prinzip im Sinne einer Radioimmuntherapie oder kombinierten Radio-Enzym-*Prodrug*-Therapie ebenfalls praktikabel sein kann.

Zur Ermittlung der Biodistribution erhielten athymische Nacktmäuse subkutane Xenografte der Zelllinie LIM1215 oder der gpA33-negativen Kontrolllinie HT29. Nachdem ein Tumor definierter Größe gewachsen war, erhielten die Tiere 20 kBq (50 µg) ¹³³I-A33scFv::CDy i.v. injiziert, und zu bestimmten Zeitpunkten von 6 und 96 h wurden Gruppen von Tieren getötet und mittels Gamma-zähler die aufgenommenen Radionuklidmengen im Tumor sowie in Blut, Lunge, Herz, Leber und Nieren bestimmt. Die Ergebnisse zeigten eine effektive Anreicherung von ¹³³I in den LIM1215-Xenograften, während die gpA33-negativen Vergleichstumoren allenfalls eine geringe Aufnahme des Radionuklids zeigten. Dabei zeigte sich ein günstiges Verhältnis der Anreicherung von Tumor zu Blut (Tumor:Blut-Ratio), das sein Maximum reproduzierbar nach 47 h mit einem etwa neunmal höheren Wert im Tumor erreichte. Dadurch übertraf das monovalente Einzelkettenkonstrukt A33scFv::CDy den vollständig humanisierten IgG-Antikörper huA33, für den eine Tumor:Blut-Ratio von 2,5 berichtet wurde (42). (Ein direkter Vergleich war dieser Arbeitsgruppe nicht möglich, da der für klinische Studienzwecke hergestellte komplette IgG-Antikörper während des Arbeitszeitraums vom herstellenden Institut nicht zur Verfügung gestellt werden konnte.)

Nachdem diese Daten zur Biodistribution und *In-vivo*-Spezifität von A33scFv::CDy weitere Hinweise für seine grundsätzliche Eignung geliefert hatten, konnte dieses ADEPT-Konzept erstmals *in vivo* überprüft werden.

Für die ersten Untersuchungen wurde das zuvor ermittelte Maximum der Fusionsprotein-Anreicherung im Tumor nach 47 h als Zeitpunkt für die Injektion der *Prodrug* 5FC gewählt. Aufgrund der vorhandenen Erkenntnisse über 5FC konnte von einer umgehenden Verteilung der *Prodrug* im Blut und von einer schnellen Tumorpenetration ausgegangen werden. In einem Pilotexperiment wurden in athymischen Mäusen wie beschrieben LIM1215-Xenografte in der Flanke etabliert. Nach

Erreichen der vordefinierten Tumorgröße wurden jeweils 50 µg A33scFv::CDy und nach 47 h 15 mg 5FC i.v. injiziert. Der Tumordurchmesser wurde im Verlauf gemessen. Im Vergleich zu einer placebobehandelten Kontrollgruppe, in der bei allen Tieren der Tumor weiter wuchs, zeigte sich in den behandelten Mäusen zwar ein geringer, aber durchweg nachweisbarer Rückgang der Tumorgröße.

Eine Limitation dieses Versuchs liegt jedoch in der Tatsache, dass die LIM1215-Xenografte nach einigen Wochen von sich aus ihr Wachstum verzögerten, so dass der therapeutische Effekt der Behandlung womöglich durch das Experiment unterschätzt wird. Aus diesem Grund wurde die Verbesserung des Tumormodells durch Etablieren einer gpA33-transfizierten murinen Tumorzelllinie begonnen. Ein solches Tierversuchssystem könnte außerdem immunologische Effekte der Behandlung im Sinne von Immunaktivierungen gegen den Tumor ebenso wie neutralisierende Antikörper gegen das Fusionsprotein sichtbar machen, da es in immunkompetenten Tieren ausgeführt werden könnte. Dennoch zeigte der hier beschriebene Versuch das grundsätzliche Funktionieren dieses ADEPT-Systems, so dass der Beweis des Prinzips (*proof of principle*) als erbracht gelten darf.

Panjideh H, Coelho V, Dervede J, Bachran C, Foerster GJ, Franke J, Fasold P, Fuchs H, Thiel E, Deckert PM.

Biodistribution and efficacy of [¹³¹I]A33scFv::CDy, a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer.

Int J Oncol 2008;32: 925-930.

2.9 Bisher unpublizierte Arbeiten

Ausweitung des Modells auf Fibroblasten-Aktivierungsprotein alpha

Als weiteres Zielantigen wurde in diesem Projekt Fibroblasten-Aktivierungsprotein (FAP α) untersucht. FAP α wird von reaktiven Zellen des Tumorstromas exprimiert. Diese nicht maligne transformierten Zellen haben kaum die Fähigkeit der Tumorzellen, erfolgreich auf den Selektionsdruck der Therapie zu antworten (43). BIBH1 (Sibrotuzumab), ein humanisierter Antikörper gegen FAP α , hat in klinischen Studien eine spezifische Anreicherung in Tumorgewebe, allerdings ohne klinische Wirkung, gezeigt (44,45). Da FAP α auch in regenerierendem Bindegewebe exprimiert wird, ist die Beobachtung wesentlich, dass der Antikörper in Wundgewebe nicht angereichert wurde und keine Wundheilungsstörungen auftraten. Brocks et al. (Arbeitsgruppe Prof. Pfizenmaier, Stuttgart) haben mittels *Phage display* einen Einzelkettenantikörper, mb36, hergestellt, der sowohl murines als auch humanes FAP α erkennt und damit ein murines Modell für FAP α -Targeting ermöglicht (46), das im Rahmen dieses Projekts ebenfalls untersucht, bisher jedoch noch nicht publiziert wurde.

Basierend auf den bisher vorgestellten Fusionsproteinen wurden Fusionskonstrukte von mb36 mit GFP und mit CDy kloniert und exprimiert. Außerdem wurden bivalente Fusionsproteine erstellt, bei denen zwei scFv hintereinander, verbunden durch eine Linkersequenz, in die Expressionskassette inkloniert wurden. Weitergehende Versuche zu ADEPT mit diesem Konstrukt sind gegenwärtig in Arbeit.

Entwicklung eines murinen Tumormodells

Xenograft-Modelle, wie sie für Untersuchungen wie die hier vorgestellten häufig verwendet werden, haben erhebliche Nachteile wie das kostenträchtige, aber auch Ergebnisse verfälschende Erfordernis immundefizienter Versuchstiere und damit auch das Fehlen einer Immunantwort gegen das eingesetzte Antikörperkonstrukt. Erstrebenswert wäre deshalb ein rein murines Tumormodell. Das murine Äquivalent unterscheidet sich vom humanen zu gpA33 jedoch so weit, dass gegen das eine generierte Antikörper nicht mit dem anderen kreuzreagieren. Eine Verwendung nativer muriner Tumorzelllinien bietet deshalb ebenfalls keine Lösung. Aus diesen Gründen wurde anhand der bekannten Sequenz des gpA33 (38) mittels reverser Transkription und anschließender Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) die Sequenz des Gens für gpA33 amplifiziert und in den Plasmidvektor pcDNA6/V5 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) ligiert. Da dieser Vektor auch für Proteinexpressionen in Eukaryonten geeignet ist, konnten murine CT26-Kolonkarzinomzellen aus BALB/c-

Mäusen erfolgreich mit dem Plasmid transfiziert werden. Die Generierung von gpA33-exprimierenden CT26-Zellen soll so die Etablierung genuin muriner gpA33-positiver Tumoren in immunkompetenten BALB/c-Mäusen erlauben.

3. Diskussion

Noch Mitte der 1990er Jahre war 5-Fluorouracil die einzige chemotherapeutische Substanz mit klinischer Wirksamkeit für Patienten mit kolorektalem Karzinom (47). Vor diesem Hintergrund entstand das hier vorgestellte Projekt mit dem Ziel, Wirksamkeit und Verträglichkeit dieser Substanz durch ihre zielgerichtete Freisetzung im Tumorgewebe zu verbessern. Seither hat sich durch die Einführung der neuen Zytostatika Oxaliplatin und Irinotecan und der Antikörper Cetuximab und Bevacizumab die Therapie des Kolonkarzinoms in adjuvanter Intention und bei metastasierter Erkrankung grundlegend verbessert. Dennoch erreichen von allen Patienten mit Kolonkarzinom nur etwa 55 % eine Langzeitremission oder klinische Heilung, annähernd die Hälfte der Patienten versterben weiterhin an ihrer Tumorerkrankung (48). Dies ist zwar eine annähernde Verdoppelung der Überlebenschance, angesichts der zunehmenden Inzidenz kolorektaler Karzinome jedoch unverändert dringender Grund zur weiteren Verbesserung. Ebenfalls unverändert bildet 5-Fluorouracil weiterhin die zentrale Säule der zytostatischen Behandlung kolorektaler Karzinome. Seine erhebliche Toxizität insbesondere bei längerfristiger oder höher dosierter Behandlung erfordert deshalb weitergehende Optimierung dieses Therapieansatzes.

Das Konzept der Antikörper-gesteuerten Enzym-*Prodrug*-Therapie (ADEPT) wurde in seinen Grundzügen erstmals 1974 von Philpott beschrieben (49). Wesentliche Arbeiten zu seiner grundlegenden präklinischen und ersten klinischen Entwicklung folgten über Jahrzehnte durch die Arbeitsgruppen von Begent und Bagshawe in Großbritannien, basierend auf verschiedenen eigens synthetisierten Prodrugs, die durch Carboxypeptidase G2 aktiviert werden (11,50). Huennekens entwickelte Methotrexat-Phenylalanin mit Carboxypeptidase als Konversionsenzym (51), und die Arbeitsgruppe von P. Senter schlug erstmals die Verwendung des Antimykotikums 5-Fluorocytosin vor, das von verschiedenen Pilzgattungen durch eine im Säugerorganismus nicht vorkommende Cytosindeaminaseaktivität in 5-Fluorouracil umgewandelt wird und dann als Pyrimidin-Antimetabolit auf verschiedenen Ebenen die RNA- und DNA-Synthese blockiert (52).

Ein entscheidendes Moment von ADEPT als *PreTargeting*-Strategie ist die Entkopplung der Kinetiken von Antikörperbindung und Effektorwirkung auf die Tumorzelle. Dies bedeutet insbesondere einen Vorteil gegenüber direkten Antikörper-Zytostatikum-Konjugaten, denn auf diese

Weise wird einerseits der Nachteil der im Vergleich zu „small molecules“ langsameren Diffusion des Antikörpers in Tumorgewebe ausgeglichen, zum anderen besteht durch die enzymatische Aktivierung die Möglichkeit, über die Zeit das Zytostatikum in einem Vielfachen der im Tumor gebundenen molaren Antikörpermenge einzubringen. In der Theorie wird dadurch eine selektive Konzentration der zytostatischen Wirkung im Tumorgewebe erreicht, während idealerweise keine systemische Aktivierung der *Prodrug* im Blutkreislauf oder in tumorfreien Organen stattfindet, so dass die therapeutische Breite der zytostatischen Therapie und damit ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit erhöht werden sollte. Legt man die Toxizitätsunterschiede zwischen der jeweiligen *Prodrug* und *Drug* zugrunde, könnte dieser Unterschied bei den verschiedenen in der Literatur vorgestellten Modellen theoretisch zwei bis vier Zehnerpotenzen betragen, der höchste Unterschiedsfaktor wurde kürzlich von Tietze et al. für eine neu synthetisierte *Prodrug* mit über 4500 berichtet (53). Im Fall von 5-Fluorocytosin und 5-Fluorouracil ermittelten wir in Übereinstimmung mit der Literatur (52) mit ca. 300 einen Faktor im Mittelfeld des bisherigen Spektrums.

In der Praxis hat sich die Entwicklung von ADEPT dennoch als etwas sperrig erwiesen. Obwohl zur gleichen Zeit wie die Erstbeschreibung der monoklonalen Antikörpertechnologie erstmals vorgetragen, gibt es trotz erfolgversprechender klinischer Studien (54-57) bis heute keine in der Klinik eingesetzte Form dieser Therapie. Dies ist sicherlich bereits durch deren Komplexität zu erklären, die nicht nur die Entwicklung eines geeigneten Antikörper-Enzym-Konstrukts und eines passenden *Prodrug-Drug*-Paares erfordert, sondern außerdem ein genau abgestimmtes zeitliches Zusammenspiel der Applikation beider Substanzen. Schließlich ist womöglich noch der Einsatz einer dritten Substanz, nämlich eines Eliminierungsantikörpers (engl. clearing antibody) erforderlich, der den Abbau ungebundenen oder aus dem Tumorgewebe wieder freigesetzten Antikörper-Enzym-Konstrukts beschleunigt, um eine systemische Aktivierung der *Prodrug* zu verhindern (25,58). Alternativ zu einem solchen dreischrittigen System wurde die Nutzung des Mannoserezeptors als eines schnellen hepatischen Eliminationsmechanismus durch Mannosylierung des Fusionsproteins untersucht (59).

Tatsächlich stellt ADEPT jedoch darüber hinaus eine Vielzahl Anforderungen im Einzelnen, die teils in Widerspruch zueinander stehen:

- Das Zielantigen muss möglichst spezifisch für Tumorzellen sein, um eine Aktivierung in nicht befallenen Organen oder systemische Aktivierung der *Prodrug* zu verhindern. Aus demselben Grund sollte es möglichst nicht in den Blutkreislauf abgegeben werden. Es muss an der Zelloberfläche exprimiert werden. Unklar ist der Einfluss einer Internalisierung des Antigens.

- Der Antikörper sollte einerseits eine hohe Affinität zum Zielantigen haben, um nach erfolgter Bindung möglichst lange im Tumorgewebe zu verweilen und nicht wieder in die Zirkulation abgegeben zu werden. Andererseits wurde jedoch das Problem der *binding site barrier* beschrieben (13), nach dem eine sehr hohe Affinität eines Antikörpers dazu führen kann, dass die gefäßnahen, zuerst erreichbaren Antigenmoleküle die verfügbare Antikörpermenge binden und einen Einstrom in tiefere Regionen des Tumorgewebes verhindern. Auf Basis dieser Theorie entwickelte mathematische Modelle deckten sich weitgehend mit Versuchsergebnissen zur Antikörpermarkierung von Tumoren (13,60).
- Das Enzym muss eine chemische Reaktion katalysieren, die im Empfängerorganismus nicht vorkommt. Da der Metabolismus von Säugern insgesamt jedoch evolutionär recht stark konserviert ist, kommen damit *de facto* fast nur Enzyme aus anderen biologischen Klassen in Frage, die sich meist durch eine hohe Immunogenität auszeichnen. Eine Ausnahme von dieser Aussage bilden solche humanen oder mammalen Enzyme, die nur außerhalb der Blutbahn aktiviert werden. Dies sind insbesondere Verdauungsenzyme, die im Pankreas als Proenzyme synthetisiert und dann im Darmlumen durch Trypsin aktiviert werden.
- Das Antikörper-Enzym-Konstrukt soll möglichst wenig immunogen sein, um eine wiederholte Anwendung zu erlauben. Sowohl in konventionellen Chemotherapien wie in den heutigen Antikörpertherapien sind wiederholte Anwendungen zum Erreichen des Therapieerfolgs notwendig, da sich stets nur ein Teil der Tumorzellen in einer für den jeweiligen Wirkmechanismus sensiblen Phase des Zellzyklus bzw. der Antigenexpression befindet. Die wiederholte Anwendbarkeit ist deshalb für einen Erfolg des Konzepts kritisch.

Dieser Aspekt wird häufig als unüberwindlicher Kritikpunkt gegen ADEPT vorgebracht. Tatsächlich hat dieses Problem sich jedoch mit Techniken wie „Deimmunisierung“ (engl. *de-immunization*, in Original wie Übersetzung ein irreführender Begriff, er müsste eigentlich „Deimmunogenisierung“ heißen) oder PEG-Konjugation mittlerweile als grundsätzlich lösbar erwiesen (61,62).

- Das *Prodrug-Drug*-Paar sollte einen möglichst großen Unterschied in der Zytotoxizität haben, die *Prodrug* also möglichst ungiftig, das aktive Zytostatikum möglichst giftig sein. Zugleich sollte die *Prodrug* möglichst effektiv das Tumorgewebe perfundieren, andererseits jedoch möglichst schnell wieder aus dem Organismus eliminiert werden, um eine systemische Aktivierung zu verhindern. Schließlich sollte der aktive Metabolit eine möglichst kurze chemische Halbwertszeit haben, um ebenfalls systemische Toxizität durch ein *leak back*, eine Diffusion des aktiven Pharmakons aus dem Tumor in die Zirkulation, zu verhindern (25).

Im Rahmen des hier berichteten Projekts konnte auch für das im Zentrum der Arbeiten stehende ADEPT-System ein Teil dieser Fragen geklärt werden.

Das gpA33 als Zielantigen gerichteter Tumortherapie

Idealerweise würde ein Zielantigen zum Tumor-*Targeting* ausschließlich auf Tumorzellen, dort aber reichlich exprimiert. Diese Bedingung ist nur selten, z.B. bei virusinduzierten Tumoren mit Oberflächenpräsentation viraler Antigene oder bei der tumorspezifischen Reexpression embryonaler oder der Demaskierung sonst unzugänglicher Antigene, erfüllbar. Die meisten heute als Zielstrukturen der Tumortherapie genutzten Antigene stellen deshalb insofern Kompromisse dar, als sie auch von gesunden Zellen exprimiert werden. Soweit das Antigen dabei einen kausalen funktionellen Zusammenhang mit der Tumorigenese hat – wie z.B. bei Wachstumsfaktoren (Bevacizumab) oder deren Rezeptoren (Cetuximab) sind die unerwünschten Wirkungen häufig tolerabel und gelten sogar als Indikatoren für die Antitumorwirkung (48). In anderen Fällen wie dem Pan-B-Zell-Marker CD20 als Zielstruktur des gegen B-zelluläre Lymphome eingesetzten Antikörpers Rituximab ist die Expression eines physiologischen Antigens aufgrund des weitgehenden Überwiegens des malignen Klons unter den dieses Antigen tragenden Zellen zunächst unschädlich, allerdings zeigt sich gerade im Beispiel des Rituximab im Verlauf mehrerer Therapiezyklen meist ein anhaltender, aber reversibler therapieinduzierter Immundefekt (63).

Die Tumorspezifität des gpA33 nimmt in diesem Kontext durch ihre Zeitabhängigkeit eine interessante Sonderstellung ein. In klinischen Studien mit ¹²⁵I- oder ¹³¹I-dotiertem A33-Antikörper zeigten szintigrafische Untersuchungen, dass der Antikörper initial vom gesamten Gastrointestinaltrakt aufgenommen wurde, gesundes Darmgewebe jedoch im Gegensatz zu Karzinomgewebe innerhalb weniger Tage wieder verließ, so dass sich nach etwa zwei Wochen eine spezifische Lokalisierung des Antikörpers in Tumorgewebe einstellte, die bis zu sechs Wochen anhielt (28). Die Grundlage dieses Verhaltens ist nicht eindeutig geklärt.

Das A33-Antigen wurde wie viele andere Oberflächenmoleküle zuerst durch den gleichnamigen monoklonalen Antikörper definiert (64) und ist seither unter verschiedenen Aspekten auf Struktur und Funktion untersucht worden (38,64-69). Strukturell erwies es sich als ein Transmembranmolekül mit einer intrazellulären Palmitoylierungsstelle und zwei durch Disulfid-Brückenbildung stabilisierten Immunglobulin-Domänen, von denen die äußere drei den CDRs (*complementarity determining regions*) von Antikörpern analoge Domänen enthält, so dass diese Region als wahrscheinliche Ligan- denbindungsstelle angesehen wird (38). Durch diese strukturellen Eigenschaften und die zugrunde-

liegenden DNA-Homologien wurde das neu beschriebene Oberflächenmolekül als Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie klassifiziert (38). Dem entspricht seine Expression an den basolateralen Zelloberflächen im Gewebe (68).

Die Funktion des gpA33 gibt dennoch weiterhin Rätsel auf. Zelluläre Bindungsstudien zeigten bereits Mitte der 1990er Jahre eine Internalisierung des an das A33-Antigen gebundenen Antikörpers in Mikrovesikeln und eine spätere erneute Exposition an der Zelloberfläche (32). Dieses Verhalten des gpA33 wurde als Schlüssel für seine Funktion gesehen, und aufgrund einer cysteinreichen Region seiner intrazellulären Domäne wurde eine Steuerung dieses Prozesses durch Palmitoylierung diskutiert (69). Es liegt bei einer polar orientierten Zellart wie dem Darmepithel nahe, dass ein solcher Mechanismus einer Barrierefunktion oder dem gezielten Transport über die Epithelbarriere hinweg dient und wahrscheinlich im intakten Epithel in gerichteter Form erfolgt. Einen solchen Weg zur Präsentation aufgenommener Antigene gegenüber gastrointestinalen Zellen des Immunsystems schlägt Van Niel als Funktion des gpA33 vor (70).

Ein fast zeitgleich mit unserer Publikation zur zellulären Lokalisation des gpA33 erschienener Artikel stellt allerdings genau diese Internalisierung und Reexpression zumindest als ein generelles Phänomen in Frage und beschreibt für mehrere Zelllinien eine sehr konstante Oberflächenexpression und die Internalisierung des A33-Antigens als eine Besonderheit der auch hier verwendeten Zelllinie LIM1215 (66).

Für ein reines Strukturmolekül etwa der *tight junction*, als das gpA33 von einigen Autoren angesehen wird (66,67), erscheint ein solcher Internalisierungsweg tatsächlich wenig sinnvoll. Für Adhäsionsmoleküle sind jedoch unabhängig von der Frage nach einer intrazellulären Migration interzelluläre signalübertragende Funktionen in der Regulation von Wachstum und Differenzierung beschrieben (71). Ein natürlicher Ligand als putativer Signalgeber wurde für gpA33 allerdings bisher ebenfalls nicht identifiziert.

Ob jedoch der zumindest in Zelllinien beobachtete Internalisierungsprozess oder lediglich der Weg der Darmepithelzellen von der Tiefe zur Spitze der Krypten und ihre schließliche Abschilferung die Grundlage der Oberflächenregulation des gpA33 und der relativen Spezifität für Tumor gegenüber gesundem Darmgewebe ist, blieb damit weiterhin ebenso unklar wie seine physiologische Funktion. Der physiologische Ablauf des putativen Internalisierungsprozesses ist darüber hinaus schwierig zu untersuchen, da der Effekt sich nur in lebendem Darmgewebe zeigen ließe und jedenfalls nicht an immortalisierten Zelllinien.

Die weiteren Untersuchungen zum gpA33 konzentrierten sich auf dessen genetische Regulation. Sie zeigten unter anderem eine rostrokale Orientierung seiner Expression im Verlauf der Embryonalentwicklung von Mäusen, die eine regulatorische Bedeutung dieses Moleküls für die gastrointestinale Ontogenese nahelegt (65).

In unserer Arbeit zu diesem Themenkomplex konnten wir an Zellen der Linie LIM 1215 nachweisen, dass der Konfluenzgrad in einer Zellkultur oder die Zellzyklusphase verschiedener Kolonkarzinom-Zelllinien zwar mit mRNA-Konzentration und Oberflächendichte des A33 korrelierten, die beiden letztgenannten Variablen jedoch nicht miteinander. Mit anderen Worten: die Oberflächendichte scheint nicht abhängig von der Genexpression zu sein. Dagegen konnten wir mittels des A33scFv::GFP-Fusionskonstrukts, auch als Fluobody bezeichnet, den intrazellulären Weg des gebundenen Antikörpers und damit mutmaßlich des Antigens nachvollziehen und erstmals mittels konfokaler Lasermikroskopie sichtbar machen. Die zeitliche Verfolgung von Internalisierung und erneuter Oberflächenpräsentation lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass tatsächlich dieser intrazelluläre Weg in Mikrovesikeln, also die Bereitstellung bereits produzierten gpA33-Moleküls und nicht dessen Genexpression seine Oberflächendichte bestimmt (72).

Wie für die zitierte Arbeit von Ackerman et al. (66) und die meisten übrigen Studien zu diesem Thema gilt auch hier die Einschränkung, dass kein Vergleich zwischen gesundem und maligne transformiertem Gewebe möglich war, sondern es sich lediglich um Studien an Kulturzellen handelt. Deshalb bleibt die Grundlage der bemerkenswerten zeitabhängigen Tumorspezifität des gpA33 weiterhin unklar. Grundsätzlich lassen sich hierzu folgende Hypothesen bilden:

- *Hypothese 1: gpA33 spielt als Adhäsionsmolekül eine Rolle in der Kontrolle des Zellwachstums und ist in dieser Funktion in Tumorzellen alteriert.*

Walker et al. zeigten, dass Adhäsionsmoleküle derartige Funktionen ausüben können (71). Eine solche Funktion des gpA33 wird durch die Abhängigkeit seiner Oberflächenexpression vom Konfluenzgrad der Zellkultur nahegelegt. Da dieser Befund an maligne transformierten Kulturzellen erhoben wurde, könnte der beobachtete Abfall der Oberflächenexpression nach Erreichen vollständiger Konfluenz bereits Ausdruck einer Funktionsänderung in Tumorzellen sein.

Sollte diese Hypothese zutreffen, wäre naheliegend, dass die Alteration eine Rolle in Entstehung und Erhalt des Tumorwachstums spielt, etwa, indem die Verminderung der Oberflächenexpression einen proliferationsinhibierenden Signalweg hemmt und so vermehrtes Zellwachstum ermöglicht. Ein solcher Zusammenhang wird auch durch die Arbeit von Abud et al. nahe gelegt, die eine steuernde Funktion in der embryonalen Darmentwicklung postuliert (65). Die beobachtete spezifische Mehranreicherung des A33-Antikörpers in Tumorgewebe wäre in diesem Fall dadurch zu erklären, dass ein verminderter Umsatz des Internalisierungs- und Reexpositionsprozesses eine größere Fraktion der ursprünglich mit dem Antikörper beladenen gpA33-Moleküle im Zellinnern hält, wodurch der Abstrom des einmal gebundenen Antikörpers gegenüber Zellen mit einem normalen, höheren gpA33-Umsatz verzögert wird.

- *Hypothese 2 (Nullhypothese zu 1): gpA33 steht in keinem Zusammenhang mit Tumorgenese und -etablierung, und die beobachtete Spezifität ist ein zufälliges Epiphänomen.*

Tatsächlich lässt sich die in Hypothese 1 skizzierte Erklärung der zeitabhängigen Tumorspezifität des A33-Antikörpers als Folge eines verminderten zellulären Antigenumsatzes zwanglos auch ohne jede Funktion von gpA33 in der Proliferations- und Wachstumssteuerung anwenden: Wenn gpA33 lediglich eine Rolle in der „Arbeitsfunktion“ der Epithelzelle spielt, ist es möglich, dass diese Funktion in einer zu maximaler Proliferation transformierten Tumorzelle reduziert wird, so dass die Reexposition internalisierter Antigen-Antikörper-Komplexe ebenfalls verzögert und damit der Abstrom des Antikörpers verlangsamt wird.

Diese Hypothese wird durch die Annahme einer „Arbeitsfunktion“ in der Antigenpräsentation gestützt, die von Van Niel (70) und von Mallegol (73) untermauert, aber ebenfalls nicht bewiesen wurde.

Die wiedergegebenen Annahmen über die Funktion des gpA33 müssen sich allerdings keineswegs widersprechen: gpA33 kann in der Embryonalzeit wie in der Maus beschrieben eine wachstums- und differenzierungskontrollierende Funktion und zugleich im adulten Organismus eine Funktion der Antigenpräsentation oder der Zell-Zell-Interaktion wahrnehmen. Unter maligner Transformation könnte die embryonale Funktion reaktiviert werden. Ebenso könnte der in einigen Zelllinien beschriebene, in anderen widerlegte Internalisierungsprozess in Wirklichkeit auf unterschiedlichen Differenzierungsstufen der diesen Linien zugrundeliegenden Karzinome beruhen.

Auch wenn die Funktion des gpA33 damit vorerst weiter ungeklärt bleibt, hat sich dieses Antigen auf empirischer Ebene als geeignet für die zielgerichtete Radioimmuntherapie von Tumoren erwiesen, und die hier vorgestellten Resultate zeigen seine grundsätzliche Eignung für ADEPT.

Eine Internalisierung – ob als temporäres oder konstitutionelles Phänomen – steht der Nutzung als therapeutische Zielstruktur dabei nicht notwendig entgegen. Für die Radiotherapie erklärt sich diese Aussage selbst, denn hier spielt die Zugänglichkeit des gebundenen Antikörpers für eine nachfolgend verabreichte Substanz keine Rolle, und die durch Internalisierung erreichte räumliche Nähe zum Zellkern ist eher als günstig anzunehmen (32) und könnte den Einsatz von Radionuklidern mit extrem kurzer Reichweite ermöglichen. Für ADEPT ist ebenfalls eine Präsenz des *Prodrug*-konvertierenden Enzyms an der Zelloberfläche jedenfalls dann nicht notwendig, wenn die *Prodrug* problemlos in das Zellinnere gelangen kann, wie dies bei 5-Fluorocytosin durch einen aktiven Transportprozess der Fall ist (74).

Ein wesentlicher Vorteil des gpA33 als Zielantigen liegt jedoch in seiner fehlenden Abgabe in den Blutkreislauf (26). Dies unterscheidet es insbesondere vom carcinoembryonalen Antigen (CEA), das Zielstruktur der ADEPT-Ansätze der britischen Arbeitsgruppe von Begent ist (55) und die Anwendung eines *clearing antibody* zur Entfernung zirkulierender Antigen-Antikörperkonstrukt-Komplexe notwendig machte (58,75,76).

A33-scFv als Basis von Fusionskonstrukten zur gerichteten Tumorthherapie

Bei dem hier eingesetzten Antikörper gegen gpA33 handelt es sich um ein mittels *Phage-display*-Technologie affinitätsoptimiertes Einzelkettenfragment der variablen Regionen (33,77). Es erkennt dasselbe Antigen wie der ursprüngliche murine IgG-Antikörper A33 und seine humanisierte Variante huA33 (33). Wie unsere eigenen Affinitätsstudien zeigten, erreichte der von uns produzierte A33scFv etwa die Hälfte der Affinität von huA33. Dabei wurde letztlich die Avidität des divalenten IgG-Antikörpers mit dem monovalenten scFv verglichen, so dass die tatsächliche chemische Affinität beider Formen etwa gleich war.

Die Diskussion über die optimale Affinität eines Antikörpers zum Tumor-*Targeting* ist, wie oben skizziert, nicht abgeschlossen. Ein Vergleich von Antikörperkonstrukten mit unterschiedlicher Affinität wäre deshalb sinnvoll und ist auch für die weitere Fortsetzung des Projekts geplant. Bisher standen Einzelkettenfragmente mit unterschiedlicher Affinität nicht zur Verfügung, da dies die Wiederholung der Affinitätsreifung im *phage display* erfordert hätte. Ein alternativer Weg wäre der Vergleich eines divalenten sogenannten Minibody oder Diabody mit dem scFv – hier würden jedoch tatsächlich wieder Aviditäten verglichen, außerdem handelte es sich trotz der Miniaturisierung der divalenten Antikörperstruktur um ein deutlich größeres Molekül, so dass die Versuchsbedingungen nicht gleich wären. Trotz dieser Einschränkungen wurde ein Minibody-basiertes Fusionsprotein kloniert und exprimiert, die Ergebnisse der Untersuchungen mit diesem Konstrukt stehen jedoch noch aus.

Eine weitere Alternative stellen VHH-Antikörper aus Lamas und anderen Cameliden dar, von denen inzwischen DNA-Bibliotheken für die *Phage-display*-Selektion zur Verfügung stehen und deren Expression in *Pichia* aufgrund ihrer Thermostabilität sogar ein deutlich vereinfachtes Aufreinigungsverfahren mit hoher Ausbeute erlaubt (78). Die Familie der Kamelartigen verfügt neben dem klassischen IgG-Heterotetramer aus je zwei schweren und leichten Ketten über eine eigene Antikörperklasse, deren vollständige Antigenbindungsdomänen von Schwereketten-Homodimeren gebildet werden (79). Diese seit wenigen Jahren biotechnologisch genutzte Antikörper-Architektur hat gegenüber Fragmenten muriner und humaner IgG-Antikörper den Vorteil, ein mit 13 kD für

das Monomer nochmals kleineres, vor allem aber aus einem natürlichen Selektionsprozess hervorgegangenes Molekül mit den Bindungseigenschaften eines Antikörpers zu sein (80).

Abgesehen davon, dass dieses System für die bisherige Entwicklung des hier beschriebenen Projekts noch nicht zur Verfügung stand, spricht dennoch vieles für die Verwendung eines Einzelkettenfragments möglichst hoher Affinität als Basis der Fusionskonstrukte (81). Die eigenen Untersuchungen an PEG-konjugiertem im Vergleich zu nativem A33-IgG (Kapitel 2.2) zeigten eine Abnahme der Tumorpenetration mit zunehmender Molekülgröße. Aus diesen Beobachtungen haben wir für die Konzeption der hier vorgestellten ADEPT-Untersuchungen geschlossen, dass ein möglichst kleines Molekül mit einer möglichst hohen Affinität den größten Erfolg verspricht.

Diese Annahme hat bezogen auf solitäre Einzelkettenantikörper (scFv) ihre Grenzen bereits in früheren Tierversuchen darin gezeigt, dass eine schnelle renale Elimination die Zirkulationsdauer und damit die verfügbare Zeit zur Diffusion in Tumorgewebe verringert (81). Da die maximale Anreicherung im Tumor nach verschiedenen eigenen Untersuchungen mit A33 oder abgeleiteten Konstrukten nach 12 bis 48 Stunden erreicht wird, ist eine diesen Zeitrahmen abdeckende Zirkulationsdauer für eine suffiziente Tumoranreicherung entscheidend. Gegenüber dem solitären A33scFv allein hatten die Fusionskonstrukte mit grün fluoreszierendem Protein oder mit Cytosindeaminase aus *Saccharomyces cerevisiae* jedoch ein Molekulargewicht von 53 bzw. 46 kDa. A33scFv::CDy bildet darüber hinaus in Lösung Dimere, so dass es faktisch bereits als Diabody mit dem doppelten Molekulargewicht (und der doppelten Avidität) vorliegt. Beide liegen damit in ihrer Molekülgröße in der Größenordnung von Albumin, das in der gesunden Niere nicht glomerulär filtriert wird. Die pharmakokinetischen Beobachtungen im Tierversuch bestätigten diese Annahmen. Obwohl eine vergleichende empirische Überprüfung noch aussteht, sprechen deshalb die erzielten Ergebnisse ebenso wie theoretische Überlegungen für die hier gewählte Form des scFv-Fusionsproteins.

Enzym-*Prodrug*-Systeme

Die Auswahl des geeigneten Enzyms ist eng mit der des *Drug-Prodrug*-Systems verknüpft. So versprach der zuerst verfolgte Abbau von Methotrexat-Phenylalanin zu Methotrexat durch Carboxypeptidase A Vorteile insbesondere hinsichtlich der Enzymkomponente. Dabei handelt es sich um eine als Proenzym im Pankreas sezernierte Exopeptidase, die im Darm durch Trypsin aktiviert wird und nicht im Blut zirkuliert (82). Auf diese Weise bestand die Aussicht, ein rein humanes Fusionsprotein von möglichst geringer Immunogenität zu konstruieren, ohne eine systemische Aktivierung der *Prodrug* erwarten zu müssen (83).

Dass dieses System prinzipiell für ein A33-basiertes *Targeting*konzept des Kolonkarzinoms einsetzbar ist, konnten wir *in vitro* – aus Verfügbarkeitsgründen am weitgehend homologen bovinen Isoenzym – zeigen (84). Die Expression des humanen Proteins bekannter Sequenz (85) jedoch gelang uns in bakteriellen Expressionssystemen gar nicht und in eukaryotischen Systemen nur als Proenzym. Eine auf die aktive Sequenz trunkeierte cDNA führte auch mit verschiedenen Modifikationen bezüglich Start-Codons und Promotorsequenzen nicht zu dem entsprechenden Expressionsprodukt (unpublizierte Daten). Dieses Ergebnis war nicht unerwartet, da die abzuspaltenden Aktivierungsregionen N-terminal der Sequenz des aktiven Enzyms liegen. Die Annahme ist naheliegend, dass diese N-terminalen Sequenzen für die korrekte Faltung des Proteins notwendig sind und erst durch ihre Abspaltung bewirkte Ladungs- und Konformationsänderungen zur Ausbildung des aktiven katalytischen Zentrums führen.

Aus diesen Gründen wäre nur die Alternative der Expression des kompletten Proenzym und dessen nachträglicher Behandlung mit Trypsin geblieben, die allerdings zur unkontrollierten Verdauung weiterer Stellen im Antikörperanteil des Moleküls geführt hätte. Um dies zu verhindern, hätte entweder der rekombinante Einzelkettenantikörper durch gezielte Mutagenese so modifiziert werden müssen, dass er keine Trypsin-Erkennungsstellen mehr enthält, oder die Schnittstellen im Carboxypeptidase-Molekül hätten durch exklusive Erkennungsstellen für eine andere Peptidase ersetzt werden müssen. Diese Eingriffe in das jeweilige Molekül wären jedoch so umfangreich gewesen, dass ein Erfolg im Sinne erhaltener Funktion von Antikörper- und Enzymkomponenten unwahrscheinlich erschien. Da die enzymologischen Aspekte nicht im Mittelpunkt dieses Projekts standen und die materiellen Ressourcen begrenzt waren, wurde dieser Ansatz nicht mehr verfolgt, sondern ein alternatives Enzym-*Prodrug*-System gesucht.

Bakterielle Cytosindeaminase aus *E. coli* wurde erstmals von P. Senter für die Anwendung in ADEPT als Katalysator der Umsetzung von 5-Fluorocytosin in 5-Fluorouracil verwendet (52). Dieser Vorschlag wäre womöglich unterblieben, hätten zu diesem Zeitpunkt die strukturellen Studien von Ireton et al. (86) bereits vorgelegen, denen zufolge bakterielle Cytosindeaminase als Hexamer der in ihrer Sequenz bekannten Einzelproteine aktiv ist. Auch zu Beginn unserer Arbeiten lagen diese Ergebnisse jedoch noch nicht vor, so dass ein erstes Konstrukt auf der Basis des bakteriellen Enzyms hergestellt wurde, das sich als funktionsfähig in einem ADEPT-Modell *in vitro* erwies (87). Hierfür lassen sich zwei Erklärungen postulieren: Entweder weist auch das Monomer noch katalytische Aktivität auf oder die Hexamerisierung wurde durch den anhängenden scFv nicht wesentlich beeinträchtigt. Wobei diese letztere Erklärung wiederum die beiden Möglichkeiten offen lässt, dass entweder die Fusionsproteine bereits in Lösung Hexamere bilden, was die Avidität fördern, die Diffusion in Tumorgewebe aber hemmen würde, oder dass dies erst nach Bindung des Antikörper-

anteils an der Zelloberfläche geschieht, was eine deutliche Verzögerung und Verringerung der katalytischen Aktivität vermuten ließe.

Zwei Gründe ließen uns auf das Isoenzym aus *S. cerevisiae* umstellen: Zum einen ließ dies – wie später bestätigt – eine ergiebigere Expression in dem projektierten Hefe-Expressionssystem *P. pastoris* erwarten, zum anderen veröffentlichten Ireton et al. in der Zwischenzeit die kristallografische Analyse des Hefe-Isoenzym und zeigten, dass dieses als Dimer aktiv ist (88).

Eine wesentliche Erleichterung für das hier vorgestellte 5FC/5FU-basierte ADEPT-Konzept ist die Tatsache, dass beide beteiligten Pharmaka, *Prodrug* und *Drug*, zur Therapie im Menschen zugelassene und gut erforschte Medikamente sind. So erforderte die hier vorgestellte Arbeit nur wenige Untersuchungen zur Eignung dieses pharmazeutischen Paares. Im wesentlichen galt es dabei, die unterschiedliche Toxizität beider Substanzen zu quantifizieren, um ihre Eignung für das Therapiekonzept und zugleich die Eignung der verwendeten Testsysteme für die weiteren Untersuchungen zu zeigen. Mit dem ermittelten Unterschiedsfaktor von 300 bis 1000 in verschiedenen Testsystemen deckten sich unsere Ergebnisse im Wesentlichen mit den Literaturangaben (34,35). Obwohl 5FU an sich kein nur durch *Targeting*-Systeme zu kontrollierendes „Supergift“ ist wie die Maytansinoide, erscheint dieser Toxizitätsunterschied ausreichend für die Verwendung in ADEPT.

Bifunktionale Fusionsproteine

Ein wesentliches Arbeitsfeld dieses Projekts lag in der Entwicklung geeigneter Antikörper-Enzym-Konstrukte. Dazu wurde initial in dem Carboxypeptidase-Methotrexat-Teilprojekt ein konventioneller Ansatz der chemischen Antikörper-Enzym-Konjugation verfolgt. Die theoretisch vorhergesagten Probleme realisierten sich dabei annähernd vollständig. Zwar gelang nach aufwendiger Optimierung des chemischen Linkersystems die Konjugation in verschiedenen stochastischen Mengenverhältnissen. Eine exakte Vorhersage der Anzahl gebundener Enzymmoleküle je Antikörpermolekül war jedoch nicht möglich, sondern es lag stets ein Gemisch von Konjugaten unterschiedlicher Antikörper-Enzym-Relationen vor. Durch Gelelektrophorese ließen sich definierte Konjugate isolieren, insgesamt war eine solche Aufreinigung jedoch aufwändig und mit so großen Verlusten verbunden, dass die dadurch erzielte Ausbeute an Konjugat bezogen auf den eingesetzten monoklonalen Antikörper bei wenigen Prozent lag (unpublizierte Daten), so dass für die Folgeexperimente auf diesen für pharmazeutische Anwendungen geforderten Reinheitsgrad verzichtet und nur das Konjugatgemisch von unreaktierten Ausgangssubstanzen gereinigt wurde. Auf diese Weise konnte eine

Ausbeute von bis zu 16 % des eingesetzten Antikörpers als limitierender Ressource erreicht werden (das Enzym war relativ preiswert kommerziell verfügbar).

Erschwert wurde dieses Verfahren weiter durch ein zweites vorhergesagtes Problem, die mangelnde Stabilität des Konjugats. Bereits nach wenigen Tagen Külschranklagerung war in der Gelelektrophorese gereinigten Materials eine deutliche Anreicherung von Einzelprodukten nachweisbar, so dass für jedes Experiment frisch hergestelltes und aufgereinigtes Konjugat verwendet werden musste, was die Reproduzierbarkeit nicht förderte. (Diese Schwierigkeiten erklären, weshalb diese zuerst begonnene und methodisch am Anfang des Projekts liegende Arbeit erst spät publiziert wurde.)

Es war deshalb von Beginn der Untersuchungen an geplant, rekombinante Fusionsproteine zu entwickeln, sobald mit dem – vermeintlich einfach herzustellenden – chemischen Konjugat der Nachweis des Prinzips erfolgt sei. Dies stieß jedoch vor allem auf die oben geschilderten Schwierigkeiten der Expression rekombinanter Carboxypeptidase A, so dass die einzigen Aussagen zu diesem ADEPT-System letztlich doch nur anhand des chemischen Konjugats gewonnen werden konnten.

Damit konnte immerhin das Funktionieren eines A33-basierten ADEPT-Ansatzes mit dem von Huennekens vorgestellten Methotrexat-Phenylalanin-System gezeigt werden. *In vivo* wurde außerdem demonstriert werden, dass das radioaktiv markierte Konjugat für knapp drei Tage in signifikanten Mengen im Blut zirkulierte und dabei eine spezifische Anreicherung im Tumorgewebe mit Erreichen der maximalen Tumor/Blut-Ratio nach etwa 24 h zeigte. Der Unterschied zwischen Tumor und Blut oder gesunden Geweben war jedoch gering, und die Anwendung des kompletten ADEPT in Tumor-xenotransplantierten Mäusen zeigte allenfalls einen minimalen und nicht signifikanten Effekt auf das weitere Tumorstadium.

Diese Ergebnisse lassen sich so interpretieren, dass auch ein Molekül von der doppelten Größe des IgG-Antikörpers in der Lage ist, ausreichend für eine spezifische Markierung in Tumorgewebe einzudringen, dass die Faktoren Affinität, Diffusionskinetik und Stabilität dieses chemischen Konstrukts jedoch – im Gegensatz zu Ergebnissen von Begent et al. (89), die ebenfalls chemische Antikörperkonjugate verwendet hatten – insgesamt für eine therapeutische Wirkung nicht ausreichen.

Nach den Arbeiten von Austin und Huber (90,91) erschien die Anwendung von Cytosindeaminase zur Konversion von 5-Fluorocytosin in 5-Fluorouracil ein deutlich attraktiveres Feld für die Realisierung des rekombinanten Ansatzes, da dieses zuerst aus *E. coli* beschriebene Enzym sich leicht in bakteriellen Wirtssystemen exprimieren ließ. Dasselbe galt für den Einzelkettenantikörper A33scFv sowohl im Ursprungslabor als auch in unseren eigenen Versuchen. Erste Ansätze zur Produktion eines Fusionsproteins aus beiden Komponenten gestalteten sich jedoch schwierig. Im Austausch

mit anderen Arbeitsgruppen, die ähnliche Projekte verfolgten, erwies sich dies als ein in Veröffentlichungen verständlicherweise kaum diskutiertes, aber häufiges Problem der Expression heterogener Fusionsproteine – in diesem Fall eines humanen Antikörperanteils und eines bakteriellen Enzyms. Fragen der Glykosylierung, ebenfalls ein häufiges Problem der rekombinanten Expression komplexer Proteine (92-94), spielen in diesem Fall wahrscheinlich keine wesentliche Rolle, da die Sequenz des A33scFv (33) keine typischen Glykosylierungsstellen aufweist. Andere mögliche Erklärungen für dieses Problem sind die Abwesenheit für das Protein notwendiger Chaperone im Wirtsmikroorganismus (40) und ein möglicher Mangel an Transfer-RNA für bestimmte Basentriplets aufgrund klassenspezifischer Unterschiede in der Verwendung des genetischen Codes (*Codon usage*) (95,96).

Beiden Erklärungsmodellen widerspricht allerdings die problemlose Expression des solitären Antikörperanteils in *E. coli*. Eine zunächst naheliegendere Erklärung waren deshalb sterische Hindernisse in der korrekten Faltung des synthetischen Proteins, die möglicherweise durch längere Linkersequenzen und damit eine weitere räumliche Trennung der beiden Komponenten überwindbar wäre (97). Hierzu wurden auch verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die jedoch keine verwertbaren Unterschiede erbrachten (unpublizierte Daten). Dieser Erklärung widersprach die letztlich doch erfolgreiche Expression des Fusionsproteins im bakteriellen System, wobei eine einfache, häufig verwendete Glycin-Serin-Linkersequenz eingesetzt wurde. Die erzielbare Ausbeute blieb dennoch weiterhin gering, insbesondere zu gering für die Durchführung von Tierversuchen.

Als Referenzmodell wurde deshalb das für die Lokalisationsuntersuchungen des gpA33 eingesetzte Fusionsprotein mit grün fluoreszierendem Protein anstelle der Cytosindeaminase entworfen. Dieses Konstrukt wurde als Pilotprotein für die Expressionsversuche in *Pichia pastoris* eingesetzt, da es eine einfache und unmittelbare Kontrolle seiner Expression als bifunktionales Protein erlaubte. Nach ersten erfolgreichen Versuchen wurde dann die Sequenz des bevorzugten Cytosindeaminase-Isoenzym aus *Saccharomyces* anstelle des GFP eingesetzt und ebenfalls erfolgreich, aber weiterhin mit geringerer Ausbeute als von dem *Pichia*-Expressionssystem zu erwarten, exprimiert. Erst die systematischen weiteren, in den einzelnen Publikationen geschilderten Optimierungsschritte bis hin zur industriellen Herstellungstechnologie im Biofermenter erlaubten schließlich eine Expression in ausreichender Menge für die Durchführung von Tierversuchen mit ökonomisch vertretbarem Aufwand. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse zur Herstellung rekombinanter Antikörper-Enzym-Fusionsproteine konnten inzwischen erfolgreich auf Konstrukte, die auf anderen Antikörpern wie mb36 gegen Fibroblasten-Aktivierungsprotein alpha basieren, angewendet werden.

Immunogenität

Ein grundsätzliches Problem aller ADEPT-Ansätze bleibt die Immunogenität des Antikörper-Enzym-Konstrukts (9,98). Dies war ursprünglich ebenfalls ein erhebliches Hindernis der Einführung therapeutischer monoklonaler Antikörper und stellt in deren klinischer Entwicklung und Praxis weiterhin eine präsenzte Schwierigkeit dar. Durch Strategien zur Verringerung der Immunogenität der ursprünglich maus-monoklonalen Antikörper, angefangen von der Chimärisierung, bei der nur die variablen Regionen aus der Maus verblieben und die konstanten Regionen durch solche humanen Ursprungs ersetzt wurden, über die Humanisierung, bei der ein analoges Verfahren selektiv auf die Komplementarität-determinierenden Regionen (CDRs) angewandt wurde, bis hin zur Expression in artifiziellen humanen Generations- und Expressionssystemen konnte dieses Problem jedoch zunehmend überwunden werden, auch wenn selbst humanisierte Antikörper keinen sicheren Schutz vor teils heftigen Immunreaktionen gegen den therapeutischen Antikörper bieten (99).

Diese Strategien stehen jedoch nur zum Teil, nämlich in Bezug auf das Antikörperfragment, für die Fusionskonstrukte zur ADEPT-Anwendung zur Verfügung. Wie bereits erwähnt ist eine Deimmunogenisierung der hierfür geeigneten Enzyme ungleich schwieriger, da diese in der Regel nicht-humanen und sogar nicht-mammalen Ursprungs sind. Dennoch ist es grundsätzlich möglich, die am wahrscheinlichsten immunologisch erkannten Aminosäuresequenzen und konformationellen Epitope zu identifizieren und durch den Ersatz einzelner Aminosäuren weniger immunogen zu machen (61,100). Dies ist jedoch stets mit möglichen Auswirkungen auf die Funktion des Enzyms verbunden, so dass ein solches Vorgehen im Einzelfall extrem aufwändig ist. Aus diesem Grund haben wir die Strategie der Polyethylenglykol-Konjugation („PEGylierung“) verfolgt. Dieses Verfahren hat sich bereits im klinischen Einsatz von Asparaginase (20,37) bei T-zellulären lymphatischen Leukämien bewährt. Seine Wirkung beruht darauf, das Protein mit einer immunologisch inerten Hülle zu umgeben, deren Oberfläche durch die Hydratisierung des Polyethylenglykols im Wesentlichen aus Wassermolekülen besteht. Allerdings erscheint es leichter möglich, auf diese Weise ein Enzym gegen den Kontakt mit anderen Makromolekülen zu schützen und dennoch den Zugang des niedermolekularen Substrats zum katalytischen Zentrum zu erhalten, als einen Antikörper immunologisch zu „maskieren“ ohne seine eigene makromolekulare Bindungsfähigkeit zu beeinträchtigen. Ein möglicher Ausweg aus diesem Dilemma wäre die selektive PEGylierung nur des (höher immunogenen) Enzymanteils durch rekombinante Entfernung möglichst aller als Anheftungsstelle dienenden Lysinreste aus der Sequenz des Antikörperanteils. Dieses Vorgehen beinhaltet jedoch wiederum das Risiko funktioneller Beeinträchtigungen des Antikörpers.

Wir haben deshalb – zunächst nur mit dem kompletten IgG-Antikörper als (nicht perfektem) „Modell“ eines Fusionsproteins – untersucht, ob eine Deimmunogenisierung durch PEGylierung

von A33 ohne Verlust an Bindungsaffinität und –spezifität in Tumorgewebe möglich ist. Die Ergebnisse zeigten eine verzögerte Diffusion in Tumorgewebe mit Erreichen derselben Tumor:Blut-Ratio wie durch den unbehandelten Antikörper in einem Maus-Xenograft-Modell, zugleich jedoch eine weitgehende Aufhebung der Immunogenität des Antikörpers in immunkompetenten Mäusen. PEG-Konjugation erscheint deshalb zumindest als eine von mehreren gültigen Antworten auf das Problem der Immunogenität von Antikörper-Enzym-Konstrukten.

Tumormodell

Die hier vorgestellten *In-vivo*-Untersuchungen zum 5FC/5FU-System zeigen auch die Grenzen des zur Verfügung stehenden Xenograft-Tumormodells auf: Das erhebliche Wachstum dieser wie aller anderen getesteten Zelllinien führt zwangsläufig dazu, dass zwischen Injektion des Antikörper-Enzym-Konstrukts und der Möglichkeit zur ersten *Prodrug*-Injektion (nach Ausscheiden des Fusionskonstrukts aus dem Blutkreislauf) der Tumor bereits um einen erheblichen Anteil neuer, nicht durch das Fusionskonstrukt markierter Zellen gewachsen ist. Damit ist das Modell nicht wirklich realistisch für die tatsächlichen Verhältnisse bei kolorektalen Karzinomen im Menschen, die nur in seltensten Fällen eine Verdopplung innerhalb des Zeitraums von etwa 14 Tagen bis zur maximalen Tumorspezifität der A33-Anreicherung zeigen. In diesem Punkt ist das gewählte Tiermodell deshalb eher pessimistisch. Andererseits wachsen Xenograft-Modelle meist nur lokal am Injektionsort und bilden keine Metastasen, so dass sie in diesem Aspekt ebenfalls ein wenig realistisches Bild der klinischen Situation bieten. Aus diesem Grund wird in unserer Arbeitsgruppe gegenwärtig ein rein murines Tumormodell mit einer mit humanem gpA33 transfizierten murinen Kolonkarzinomlinie entwickelt.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend konnte in den hier vorgestellten Arbeiten die grundsätzliche Anwendbarkeit von gegen gpA33 gerichteten ADEPT-Ansätzen *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden. Damit stände grundsätzlich der Weg zur weiteren pharmazeutischen Entwicklung des vorgestellten rekombinanten Fusionsproteins und darauf basierender ADEPT offen. Dies würde jedoch ein interessiertes pharmazeutisches Unternehmen erfordern, das zu finden nicht realistisch ist. Der Grund liegt in fehlenden Patenten für den Antikörper A33 oder seine daraus abgeleiteten rekombinanten Proteine huA33 und A33scFv sowie für das ADEPT-Konzept an sich. Dieser fehlende Schutz künftiger In-

vestitionen in die Entwicklung eines solchen Konzepts hat industrielle Partner von einem weitergehenden Engagement abgehalten.

Obwohl dieses Projekt deshalb voraussichtlich nicht mehr zu einer konkreten Therapieoption für Patienten mit kolorektalem Karzinom führen wird, konnten dennoch einige grundsätzliche Fragen dahingehend beantwortet werden, dass das gpA33-Antigen als Zielstruktur für ADEPT-Ansätze geeignet erscheint und dass sich auf der Basis dieses Antikörpers Fusionsproteine mit verschiedenen Effektorfunktionen ökonomisch herstellen lassen.

In einer Kooperation mit einem großen pharmazeutischen Unternehmen werden diese Erkenntnisse derzeit erfolgversprechend auf einen dort entwickelten Antikörper gegen ein Antigen des Tumorstromas sowie auf den bereits vorgestellten anti-FAP α -Antikörper mb36 angewandt.

Abschließend ist das ADEPT-Konzept ein Ansatz gerichteter Tumorthherapie, der angesichts einfach applizierbarer molekularer „*targeted therapies*“ als sehr komplex in Entwicklung und Durchführung erscheinen mag. Die bisher geschilderten Schwierigkeiten auf dem Weg zu einem klinisch realisierbaren ADEPT-Konzept, insbesondere die häufig als problematisch gesehene Immunogenität, scheinen inzwischen jedoch überwindbar. Deshalb sehe ich in Kombinationen aus der Zielspezifität monoklonaler Antikörper mit einer durch ebenfalls spezifische Enzymaktivität lokal freigesetzten hohen Zytotoxizität ein bisher erst in Ansätzen realisiertes Konzept, das gerade durch die Verfügbarkeit rekombinanter Technologie zur Herstellung maßgeschneiderter Proteine mit dualer Funktion erhebliches Potential für die Entwicklung künftiger Therapien maligner Erkrankungen erhält.

4. Zusammenfassung

Ungeachtet der Fortschritte seit Mitte der 1990er-Jahre besteht für das kolorektale Karzinom insbesondere in metastasierten Stadien weiterhin ein erheblicher Bedarf zur Verbesserung und Weiterentwicklung der Therapiemöglichkeiten. Da 5-Fluorouracil sowohl beim Kolon- wie beim Rektumkarzinom unverändert eine zentrale Säule der Chemotherapie ist, liegt in der Verbesserung von Wirksamkeit und Verträglichkeit dieses Medikaments ein Potential zur Therapieoptimierung. Der hier verfolgte Ansatz dazu ist die gezielte Aktivierung einer ungiftigen *Prodrug* im Tumorgewebe durch ein bifunktionales Proteinkonstrukt, das die Bindungseigenschaften eines tumorspezifischen monoklonalen Antikörpers mit der katalytischen Aktivität eines geeigneten Enzyms verbindet.

Für dieses als Antikörper-gesteuerte Enzym-*Prodrug* Therapie (ADEPT) bezeichnete Konzept wurden hier das intestinale gpA33-Antigen und der dafür namengebende A33-Antikörper als *Targeting*-System ausgewählt. Nach ermutigenden *proof-of-principle*-Untersuchungen mit einer Methotrexat-*Prodrug*, die durch ein chemisches Konjugat des kompletten IgG-Antikörpers mit Carboxypeptidase aktiviert wurde, folgte die Entwicklung rekombinanter Fusionsproteine eines Einzelkettenfragments des Antikörpers A33 mit Cytosindeaminase-Isoenzymen aus *E. coli* oder *S. cerevisiae*, die die Umsetzung des für Säuger ungiftigen Antimykotikums 5-Fluorocytosin in das Zytostatikum 5-Fluorouracil katalysieren.

Das als Adhäsionsmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie klassifizierte gpA33 wird in gesundem gastrointestinalem Gewebe und in mehr als 95 % der kolorektalen Karzinome exprimiert. Als Besonderheit zeigt es eine zeitabhängige Spezifität für Tumorgewebe in der Weise, dass der A33-Antikörper initial im gesamten Darmtrakt, nach ca. zwei Wochen jedoch nur noch in primären und metastatischen Tumorerkrankungen nachweisbar ist. Die Grundlage dieses Verhaltens ist ebenso wie die genaue Funktion des Moleküls noch nicht eindeutig geklärt, gezeigt und hier bestätigt wurde jedoch, dass gpA33 zumindest in der Zelllinie LIM 1215 nach Bindung des A33-Antikörpers oder eines fluoreszierenden A33scFv-Fusionskonstrukts in Mikrovesikeln internalisiert und später wieder an der Oberfläche reexponiert wird. In eigenen Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression des gpA33 zwar in reproduzierbarer Weise mit dem Konfluenzgrad der Zellkultur und mit der Zellzyklusphase, in der ein medikamentöser Zyklusstopp erzeugt wurde, korreliert, nicht aber mit der zu denselben Zeitpunkten gemessenen gpA33-mRNA. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Regulation der Oberflächenexpression von gpA33 weniger durch die Kontrolle der Gentranskription als durch den intrazellulären Umsatz des internalisierten Antigens erfolgt. Diese Interpretation ist mit einer bereits früher an Mäusen postulierten Signalfunktion des gpA33 in der Embryonalentwicklung, die möglicherweise in maligne

transformierten Zellen reaktiviert ist, ebenso vereinbar wie mit einer adulten Funktion in der Präsentation im Darmlumen aufgenommener Antigene gegenüber abluminalen Zellen des Immunsystems.

Ein wesentlicher Einwand gegen ADEPT ist die Immunogenität der in den meisten Fällen nicht-humanen Enzymkomponenten. Für Enzyme stellt die Konjugation mit Polyethylenglykol jedoch einen erprobten Weg zur immunologischen „Maskierung“ dar. Unklar war, ob dieses Verfahren sich auch für Antikörper mit ihrer größeren Kontaktfläche zum Liganden eignet, ohne das Eindringen in Tumorgewebe durch verschlechterte Diffusionsbedingungen übermäßig zu beeinträchtigen. In einer Untersuchung am kompletten humanisierten A33-Antikörper konnte hier gezeigt werden, dass mit einer zeitlichen Verzögerung dieselbe spezifische Anreicherung in Tumorgewebe durch das PEGylierte wie durch das native Protein erreicht, die Immunogenität in immunkompetenten Mäusen jedoch soweit herabgesetzt wurde, dass eine wiederholte Gabe möglich ist.

Aus theoretischen Überlegungen heraus wurde für die Entwicklung rekombinanter Fusionsproteine für ADEPT die Verwendung von Einzelkettenfragmenten des Antikörpers (scFv) und eines C-terminal über eine Linkersequenz angeschlossenen Enzyms für die sinnvollste Struktur gehalten. Hierfür wurden das in *phage-display*-Technologie von C. Rader entwickelte A33scFv und zunächst die bakterielle Cytosindeaminase eingesetzt. Nach der Überwindung umfangreicher technischer Schwierigkeiten, deren Ursache wahrscheinlich in immanenten Problem der heterologen Proteinarchitektur zu suchen ist, gelang eine Herstellung des projektierten Fusionsproteins in ausreichender Menge für den Nachweis der bifunktionalen Aktivität *in vitro*. Für *In-vivo*-Versuche war die mit diesem Konstrukt erzielbare Ausbeute jedoch zu gering.

Es folgte deshalb parallel die Entwicklung eines analog aufgebauten A33scFv::GFP-Fusionsproteins zur Expression in der Hefe *P. pastoris*. Hierdurch wurden bereits deutlich verbesserte, aber immer noch zu geringe Produktionsmengen für Tierversuche erreicht. Dieses Verfahren konnte im weiteren jedoch auf die Expression eines modifizierten Fusionsproteins mit der aufgrund ihrer dimeren Funktionsstruktur gegenüber der notwendigen Hexamerisierung des bakteriellen Isoenzym mittlerweile bevorzugten Cytosindeaminase aus *S. cerevisiae* angewandt werden. Die Herstellung dieses als A33scFv::CDy bezeichneten Konstrukts durchlief umfangreiche Arbeiten zu ihrer Optimierung, bis schließlich ein reproduzierbar einsetzbares und auch auf andere analog aufgebaute Fusionsproteine übertragbares Herstellungsverfahren im Bioreaktor etabliert werden konnte.

Das auf diese Weise hergestellte Fusionsprotein mit hoher Affinität für gpA33 und hoher katalytischer Aktivität zeigte *in vivo* für das therapeutische Ziel verwertbare pharmakokinetische Eigenschaften, so dass die Durchführung von Tierversuchen zur Anwendung des ADEPT möglich wurde. Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter inhibierender Effekt auf das Wachstum von humanen Tumor-Xenotransplantaten in immundefizienten Mäusen.

Diese Untersuchungen beweisen die Durchführbarkeit von ADEPT mit dem gpA33 als Zielantigen und mit einem Enzym-*Prodrug*-System, das ein für das kolorektale Karzinom relevantes Zytostatikum spezifisch im Tumorgewebe freisetzt.

Ungeachtet der fortbestehenden Schwierigkeiten in der therapeutischen Realisierung dieses Konzepts stellen *PreTargeting*-Strategien wie ADEPT in den Augen des Autors einen wesentlichen künftigen Entwicklungsweg für antikörperbasierte Therapien maligner Erkrankungen dar.

5. Literaturverzeichnis

1. Labianca R, Beretta G, Gatta G, de Braud F, Wils J. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:145-70.
2. Iqbal S, Lenz HJ. Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:S32-S39.
3. Fanale MA, Younes A. Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs* 2007;67:333-50.
4. Dimitrov DS, Marks JD. Therapeutic antibodies: current state and future trends - is a paradigm change coming soon? *Methods Mol Biol* 2009;525:1-27.
5. Morschhauser F, Radford J, Van Hoof A, Vitolo U, Soubeyran P, Tilly H, Huijgens PC, Kolstad A, d'Amore F, Gonzalez DM, Petrini M, Sebban C, Zinzani PL, van Oers MH, van Putten W, Bischof-Delaloye A, Rohatiner A, Salles G, Kuhlmann J, Hagenbeek A. Phase III trial of consolidation therapy with yttrium-90-ibritumomab tiuxetan compared with no additional therapy after first remission in advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26:5156-64.
6. Wiseman GA, Witzig TE. Yttrium-90 (90Y) ibritumomab tiuxetan (Zevalin) induces long-term durable responses in patients with relapsed or refractory B-Cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Biother Radiopharm* 2005;20:185-88.
7. Damle NK. Tumour-targeted chemotherapy with immunoconjugates of calicheamicin. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1445-52.

8. Kuzel TM, Li S, Eklund J, Foss F, Gascoyne R, Abramson N, Schwerkoske JF, Weller E, Horning SJ. Phase II study of denileukin diftitox for previously treated indolent non-Hodgkin lymphoma: final results of E1497. *Leuk Lymphoma* 2007;48:2397-402.
9. Sharma SK, Bagshawe KD, Begent RH. Advances in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6:611-15.
10. Martin J, Stribbling SM, Poon GK, Begent RH, Napier M, Sharma SK, Springer CJ. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40:189-201.
11. Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6:1421-31.
12. Baxter LT, Jain RK. Pharmacokinetic analysis of the microscopic distribution of enzyme-conjugated antibodies and prodrugs: comparison with experimental data. *Br J Cancer* 1996;73:447-56.
13. Jain RK. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;46:149-68.
14. Chauhan SC, Jain M, Moore ED, Wittel UA, Li J, Gwilt PR, Colcher D, Batra SK. Pharmacokinetics and biodistribution of ¹⁷⁷Lu-labeled multivalent single-chain Fv construct of the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:264-73.

15. Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *J Cell Biochem* 2007;101:937-49.
16. Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:904-10.
17. Strater J, Hinz U, Hasel C, Bhanot U, Mechtersheimer G, Lehnert T, Moller P. Impaired CD95 expression predisposes for recurrence in curatively resected colon carcinoma: clinical evidence for immunoselection and CD95L mediated control of minimal residual disease. *Gut* 2005;54:661-65.
18. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 2002;3:999-1005.
19. Melton RG, Sherwood RF. Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:153-65.
20. Pasut G, Sergi M, Veronese FM. Anti-cancer PEG-enzymes: 30 years old, but still a current approach. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:69-78.
21. Sharma SK, Bagshawe KD, Melton RG, Sherwood RF. Human immune response to monoclonal antibody-enzyme conjugates in ADEPT pilot clinical trial. *Cell Biophys* 1992;21:109-20.
22. Mayer A, Sharma SK, Tolner B, Minton NP, Purdy D, Amlot P, Tharakan G, Begent RH, Chester KA. Modifying an immunogenic epitope on a therapeutic protein: a step towards

an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Br J Cancer* 2004;90:2402-10.

23. King DJ, Antoniow P, Owens RJ, Adair JR, Haines AR, Farnsworth AH, Finney H, Lawson AG, Lyons A, Baker TS, Balsock D, Mackintosh J, Gofton C, Yarranton GT, McWilliams W, Shochat D, Leichner PK, Welt S, Old LJ, Mountain A. Preparation and preclinical evaluation of humanised A33 immunoconjugates for radioimmunotherapy. *Br J Cancer* 1995;72:1364-72.
24. Haisma HJ, Van Muijen M, Scheffer G, Scheper RJ, Pinedo HM, Boven E. A monoclonal antibody against human beta-glucuronidase for application in antibody-directed enzyme prodrug therapy. *Hybridoma* 1995;14:377-82.
25. Bagshawe KD. Targeting: the ADEPT story so far. *Curr Drug Targets* 2009;10:152-57.
26. Welt S, Divgi CR, Real FX, Yeh SD, Garin-Chesa P, Finstad CL, Sakamoto J, Cohen A, Sigurdson ER, Kemeny N. Quantitative analysis of antibody localization in human metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody A33. *J Clin Oncol* 1990;8:1894-906.
27. Garin-Chesa P, Sakamoto J, Welt S, Real FX, Rettig WJ, Old LJ. Organ-specific expression of the colon cancer antigen A33, a cell surface target for antibody-based therapy. *Int J Oncol* 1996;9:465-71.
28. Welt S, Scott AM, Divgi CR, Kemeny NE, Finn RD, Daghighian F, Germain JS, Richards EC, Larson SM, Old LJ. Phase I/II study of iodine 125-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:1787-97.

29. Welt S, Divgi CR, Kemeny N, Finn RD, Scott AM, Graham M, Germain JS, Richards EC, Larson SM, Oettgen HF, Old LJ. Phase I/II study of iodine 131-labeled monoclonal antibody A33 in patients with advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:1561-71.
30. Welt S, Ritter G, Williams C, Jr., Cohen LS, John M, Jungbluth A, Richards EA, Old LJ, Kemeny NE. Phase I study of anticolon cancer humanized antibody a33. *Clin Cancer Res* 2003;9:1338-46.
31. Welt S, Ritter G, Williams C, Jr., Cohen LS, Jungbluth A, Richards EA, Old LJ, Kemeny NE. Preliminary report of a phase I study of combination chemotherapy and humanized a33 antibody immunotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1347-53.
32. Daghighian F, Barendswaard E, Welt S, Humm J, Scott A, Willingham MC, McGuffie E, Old LJ, Larson SM. Enhancement of radiation dose to the nucleus by vesicular internalization of iodine-125-labeled A33 monoclonal antibody. *J Nucl Med* 1996;37:1052-57.
33. Rader C, Ritter G, Nathan S, Elia M, Gout I, Jungbluth AA, Cohen LS, Welt S, Old LJ, Barbas CF, III. The rabbit antibody repertoire as a novel source for the generation of therapeutic human antibodies. *J Biol Chem* 2000;275:13668-76.
34. Wallace PM, MacMaster JF, Smith VF, Kerr DE, Senter PD, Cosand WL. Intratumoral generation of 5-fluorouracil mediated by an antibody- cytosine deaminase conjugate in combination with 5-fluorocytosine. *Cancer Res* 1994;54:2719-23.

35. Senter PD, Beam KS, Mixan B, Wahl AF. Identification and activities of human carboxylesterases for the activation of CPT-11, a clinically approved anticancer drug. *Bioconjug Chem* 2001;12:1074-80.
36. Barendswaard EC, Scott AM, Divgi CR, Williams CJ, Coplan K, Riedel E, Yao TJ, Gansow OA, Finn RD, Larson SM, Old LJ, Welt S. Rapid and specific targeting of monoclonal antibody A33 to a colon cancer xenograft in nude mice. *Int J Oncol* 1998;12:45-53.
37. Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH. L-asparaginase and PEG asparaginase--past, present, and future. *Leuk Lymphoma* 1993;10 Suppl:153-7:153-57.
38. Heath JK, White SJ, Johnstone CN, Catimel B, Simpson RJ, Moritz RL, Tu GF, Ji H, Whitehead RH, Groenen LC, Scott AM, Ritter G, Cohen L, Welt S, Old LJ, Nice EC, Burgess AW. The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:469-74.
39. Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;74:381-89.
40. Kyratsous CA, Silverstein SJ, DeLong CR, Panagiotidis CA. Chaperone-fusion expression plasmid vectors for improved solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 2009;440:9-15.
41. Damasceno LM, Pla I, Chang HJ, Cohen L, Ritter G, Old LJ, Batt CA. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 2004;37:18-26.

42. Almqvist Y, Steffen AC, Lundqvist H, Jensen H, Tolmachev V, Sundin A. Biodistribution of ²¹¹At-labeled humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Biother Radiopharm* 2007;22:480-487.
43. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7235-39.
44. Hofheinz RD, al Batran SE, Hartmann F, Hartung G, Jager D, Renner C, Tanswell P, Kunz U, Amelsberg A, Kuthan H, Stehle G. Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Onkologie* 2003;26:44-48.
45. Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, Larson SM, Ingle JN, Hoffman EW, Tanswell P, Ritter G, Cohen LS, Bette P, Arvay L, Amelsberg A, Vlock D, Rettig WJ, Old LJ. A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1639-47.
46. Brocks B, Garin-Chesa P, Behrle E, Park JE, Rettig WJ, Pfizenmaier K, Moosmayer D. Species-crossreactive scFv against the tumor stroma marker "fibroblast activation protein" selected by phage display from an immunized FAP^{-/-} knock-out mouse. *Mol Med* 2001;7:461-69.
47. van Triest B, van Groeningen CJ, Pinedo HM. Current chemotherapeutic possibilities in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995;31A:1193-97.

48. Majer M, Akerley W, Kuwada SK. Oncologists' current opinion on the treatment of colon carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:492-503.
49. Philpott GW, Bower RJ, Parker KL, Shearer WT, Parker CW. Affinity cytotoxicity of tumor cells with antibody-glucose oxidase conjugates, peroxidase, and arspenamine. *Cancer Res* 1974;34:2159-64.
50. Napier MP, Sharma SK, Springer CJ, Bagshawe KD, Green AJ, Martin J, Stribbling SM, Cushen N, O'Malley D, Begent RH. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: efficacy and mechanism of action in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:765-72.
51. Esswein A, Hanseler E, Montejano Y, Vitols KS, Huennekens FM. Construction and chemotherapeutic potential of carboxypeptidase- A/monoclonal antibody conjugate. *Dis Markers* 1991;9:233-38.
52. Aboagye EO, Artemov D, Senter PD, Bhujwala ZM. Intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil by monoclonal antibody-cytosine deaminase conjugates: noninvasive detection of prodrug activation by magnetic resonance spectroscopy and spectroscopic imaging. *Cancer Res* 1998;58:4075-78.
53. Tietze LF, Krewer B. Novel analogues of CC-1065 and the duocarmycins for the use in targeted tumour therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 2009;9:304-25.
54. Bagshawe KD, Sharma SK, Springer CJ, Antoniow P, Boden JA, Rogers GT, Burke PJ, Melton RG, Sherwood RF. Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): clinical report. *Dis Markers* 1991;9:233-38.

55. Francis RJ, Sharma SK, Springer C, Green AJ, Hope-Stone LD, Sena L, Martin J, Adamson KL, Robbins A, Gumbrell L, O'Malley D, Tsiompanou E, Shahbakhti H, Webley S, Hochhauser D, Hilson AJ, Blakey D, Begent RH. A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *Br J Cancer* 2002;87:600-607.
56. Martin J, Stribbling SM, Poon GK, Begent RH, Napier M, Sharma SK, Springer CJ. Antibody-directed enzyme prodrug therapy: pharmacokinetics and plasma levels of prodrug and drug in a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997;40:189-201.
57. Springer CJ, Poon GK, Sharma SK, Bagshawe KD. Identification of prodrug, active drug, and metabolites in an ADEPT clinical study. *Cell Biophys* 1993;22:9-26.
58. Kerr DE, Garrigues US, Wallace PM, Hellstrom KE, Hellstrom I, Senter PD. Application of monoclonal antibodies against cytosine deaminase for the in vivo clearance of a cytosine deaminase immunoconjugate. *Bioconjug Chem* 1993;4:353-57.
59. Kogelberg H, Tolner B, Sharma SK, Lowdell MW, Qureshi U, Robson M, Hillyer T, Pedley RB, Verweck W, Contreras R, Begent RH, Chester KA. Clearance mechanism of a mannosylated antibody-enzyme fusion protein used in experimental cancer therapy. *Glycobiology* 2007;17:36-45.
60. Adams GP, Schier R, McCall AM, Simmons HH, Horak EM, Alpaugh RK, Marks JD, Weiner LM. High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res* 2001;61:4750-4755.

61. Afshar S, Asai T, Morrison SL. Humanized ADEPT comprised of an engineered human purine nucleoside phosphorylase and a tumor targeting peptide for treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* 2009;8:185-93.
62. Xiong MP, Kwon GS. PEGylation of yeast cytosine deaminase for pretargeting. *J Pharm Sci* 2005;94:1249-58.
63. Plosker GL, Figgitt DP. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003;63:803-43.
64. Catimel B, Ritter G, Welt S, Old LJ, Cohen L, Nerrie MA, White SJ, Heath JK, Demediuk B, Domagala T, Lee FT, Scott AM, Tu GF, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ, Burgess AW, Nice EC. Purification and characterization of a novel restricted antigen expressed by normal and transformed human colonic epithelium. *J Biol Chem* 1996;271:25664-70.
65. Abud HE, Johnstone CN, Tebbutt NC, Heath JK. The murine A33 antigen is expressed at two distinct sites during development, the ICM of the blastocyst and the intestinal epithelium. *Mech Dev* 2000;98:111-14.
66. Ackerman ME, Chalouni C, Schmidt MM, Raman VV, Ritter G, Old LJ, Mellman I, Wittrup KD. A33 antigen displays persistent surface expression. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57:1017-27.
67. Johnstone CN, White SJ, Tebbutt NC, Clay FJ, Ernst M, Biggs WH, Viars CS, Czekay S, Arden KC, Heath JK. Analysis of the regulation of the A33 antigen gene reveals intestine-specific mechanisms of gene expression. *J Biol Chem* 2002;277:34531-39.

68. Johnstone CN, Tebbutt NC, Abud HE, White SJ, Stenvers KL, Hall NE, Cody SH, Whitehead RH, Catimel B, Nice EC, Burgess AW, Heath JK. Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G500-G510.
69. Ritter G, Cohen LS, Nice EC, Catimel B, Burgess AW, Moritz RL, Ji H, Heath JK, White SJ, Welt S, Old LJ, Simpson RJ. Characterization of posttranslational modifications of human A33 antigen, a novel palmitoylated surface glycoprotein of human gastrointestinal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:682-86.
70. van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001;121:337-49.
71. Walker JL, Fournier AK, Assoian RK. Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:395-405.
72. Frey D, Coelho V, Petrusch U, Schaefer M, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM. Surface expression of gpA33 is dependent on culture density and cell-cycle phase and is regulated by intracellular traffic rather than gene transcription. *Cancer Biother Radiopharm* 2008;23:65-73.
73. Mallegol J, van Niel G, Lebreton C, Lepelletier Y, Candalh C, Dugave C, Heath JK, Raposo G, Cerf-Bensussan N, Heyman M. T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology* 2007;132:1866-76.

74. Hope WW, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4377-86.
75. Sharma SK, Bagshawe KD, Burke PJ, Boden RW, Rogers GT. Inactivation and clearance of an anti-CEA carboxypeptidase G2 conjugate in blood after localisation in a xenograft model. *Br J Cancer* 1990;61:659-62.
76. Sharma SK, Boden JA, Springer CJ, Burke PJ, Bagshawe KD. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). A three-phase study in ovarian tumor xenografts. *Cell Biophys* 1994;24-25:219-28.
77. Rader C, Cheresch DA, Barbas CF. A phage display approach for rapid antibody humanization: Designed combinatorial V gene libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:8910-8915.
78. Omidfar K, Rasaei MJ, Kashanian S, Paknejad M, Bathaie Z. Studies of thermostability in *Camelus bactrianus* (Bactrian camel) single-domain antibody specific for the mutant epidermal-growth-factor receptor expressed by *Pichia*. *Biotechnol Appl Biochem* 2007;46:41-49.
79. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S, Wyns L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4586-91.
80. Cortez-Retamozo V, Lauwereys M, Hassanzadeh GG, Gobert M, Conrath K, Muyldermans S, De Baetselier P, Revets H. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int J Cancer* 2002;98:456-62.

81. Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Schlom J. Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 1992;52:3402-8.
82. Shamamian P, Goldberg JD, Ye XY, Stewart JD, White PJ, Gilvarg C. Evaluation of pro-carboxypeptidase A and carboxypeptidase A as serologic markers for adenocarcinoma of the pancreas. *HPB (Oxford)* 2006;8:451-57.
83. Huennekens FM. Tumor targeting: activation of prodrugs by enzyme-monoclonal antibody conjugates. *Trends Biotechnol* 1994;12:234-39.
84. Deckert PM, Bornmann WG, Ritter G, Williams C, Jr., Franke J, Keilholz U, Thiel E, Old LJ, Bertino JR, Welt S. Specific tumour localisation of a huA33 antibody--carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine. *Int J Oncol* 2004;24:1289-95.
85. Laethem RM, Blumenkopf TA, Cory M, Elwell L, Moxham CP, Ray PH, Walton LM, Smith GK. Expression and characterization of human pancreatic preprocarboxypeptidase A1 and preprocarboxypeptidase A2. *Arch Biochem Biophys* 1996;332:8-18.
86. Ireton GC, McDermott G, Black ME, Stoddard BL. The structure of Escherichia coli cytosine deaminase. *J Mol Biol* 2002;315:687-97.
87. Deckert PM, Renner C, Cohen LS, Jungbluth A, Ritter G, Bertino JR, Old LJ, Welt S. A33scFv-cytosine deaminase: a recombinant protein construct for antibody-directed enzyme-prodrug therapy. *Br J Cancer* 2003;88:937-39.

88. Ireton GC, Black ME, Stoddard BL. The 1.14 Å crystal structure of yeast cytosine deaminase: evolution of nucleotide salvage enzymes and implications for genetic chemotherapy. *Structure (Camb)* 2003;11:961-72.
89. Bagshawe KD, Sharma SK, Begent RH. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) for cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1777-89.
90. Austin EA, Huber BE. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of Escherichia coli cytosine deaminase. *Mol Pharmacol* 1993;43:380-387.
91. Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:8302-6.
92. Cremata JA, Montesino R, Quintero O, Garcia R. Glycosylation Profiling of Heterologous Proteins. In: Higgins DR, Cregg JM, eds. *Pichia Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 1998:95-105.
93. Bretthauer RK. Genetic engineering of Pichia pastoris to humanize N-glycosylation of proteins. *Trends Biotechnol* 2003;21:459-62.
94. Pratap J, Rajamohan G, Dikshit KL. Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from Pichia pastoris: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000;53:469-75.

95. Cortazzo P, Cervenansky C, Marin M, Reiss C, Ehrlich R, Deana A. Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:537-41.
96. Marin M. Folding at the rhythm of the rare codon beat. *Biotechnol J* 2008;3:1047-57.
97. Cutler TA, Mills BM, Lubin DJ, Chong LT, Loh SN. Effect of interdomain linker length on an antagonistic folding-unfolding equilibrium between two protein domains. *J Mol Biol* 2009;386:854-68.
98. Wilkins DK, Mayer A. Development of antibodies for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2006;6:787-96.
99. Ritter G, Cohen LS, Williams C, Jr., Richards EC, Old LJ, Welt S. Serological analysis of human anti-human antibody responses in colon cancer patients treated with repeated doses of humanized monoclonal antibody A33. *Cancer Res* 2001;61:6851-59.
100. Spencer DI, Robson L, Purdy D, Whitelegg NR, Michael NP, Bhatia J, Sharma SK, Rees AR, Minton NP, Begent RH, Chester KA. A strategy for mapping and neutralizing conformational immunogenic sites on protein therapeutics. *Proteomics* 2002;2:271-79.

6. Danksagung

Als erstes sei hier meinen akademischen Mentoren gedankt, die dieses Projekt über seine verschiedenen Stufen gefördert und begleitet haben: Dr. Joseph R. Bertino, MD, Dr. Lloyd J. Old, MD, in New York und Prof. Dr. Dr. Eckhard Thiel und Prof. Dr. Ulrich Keilholz in Berlin. Ohne ihre Unterstützung und Inspiration wäre meine Forschungsarbeit nicht möglich gewesen.

Viele andere haben mich auf diesem Weg mit Rat und Tat begleitet. Unter ihnen nenne ich als erstes Prof. Dr. Christoph Renner, Christoph Rader, Ph.D., und meine Arbeitsgruppenpartner der Berliner Forschungsgruppe, Priv. Doz. Dr. Hendrik Fuchs und Dr. Jens Dervedde sowie den Direktor des Zentralinstituts für Laboratoriumsmedizin, Prof. Dr. Rudolf Tauber, der das Projekt seit Beginn meiner Berliner Zeit mit gefördert hat. Die fruchtbare Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Dübel hätte ich gern früher begonnen, ich bin froh, in ihm einen so enthusiastischen Kooperationspartner gefunden zu haben.

Sie alle haben mir und diesem Projekt einen Vorschuss an Vertrauen und Geduld entgegengebracht, lange bevor sich dies in Publikationen und Fördergeldern auszuzahlen begann.

Ein ganz spezieller Dank gilt meinen Doktoranden und Mitarbeitern an diesem Vorhaben: Dr. Ulf Petrasch, Dr. Vania Casimiro da Silva Coelho, Dr. Hossein Panjideh, Dietmar Frey und Patricia Fasold.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Krebshilfe - Dr. Mildred-Scheel-Stiftung, der Berliner Krebsgesellschaft und einer in diesem Zusammenhang eher unerwarteten Institution, dem U.S. Army Medical Research and Materiel Command.

Ohne die Liebe eines Menschen wäre das alles nicht möglich gewesen, oder ich wäre dabei ein weniger glücklicher Mensch geworden: meine zugleich fordernde und geduldige Ehefrau, Anja Stiller. Und zwei, die immer wieder einen hohen Preis gezahlt haben ohne zu wissen wofür, sind unsere wunderbaren Kinder Leon-Balthasar und Simon Yoshua. Ihnen soll diese Arbeit Ermutigung sein, nicht den gleichen Weg, sondern den eigenen zu gehen.

Das Schwerste für Eltern ist, ihre Kinder loszulassen, ohne ihnen fremd zu werden. Meine Eltern konnten dies, und dafür und für ihren Glauben an meinen Weg danke ich ihnen am meisten.

Gewidmet ist diese Arbeit meinem Vater, der am 9. Oktober 2008 viel zu jung gestorben ist.

Erklärung

nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- dass die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

02.06.2009

Dr. P. Markus Deckert

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten in Erst- oder Seniorautorschaft

	Impact Factor*
1. Deckert M, Franzke A, Buer J, Probst M, Duensing S, Lopez-Haenninen E, Kirchner H, Poliwoda H, and Atzpodien J. Linomide and Interleukin-2 in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. <i>Cancer Biother Radiopharm</i> 1996;11(5), 319-324.	0,84
2. Deckert PM, Ballmaier M, Lang S, Deicher H, and Schedel I. CD4-Imitating Human Antibodies in HIV Infection and Anti-Idiotypic Vaccination. <i>J. Immunol.</i> 1996;156(2), 826-833.	7,85
3. Deckert PM, Jungbluth A, Clark M, Montalto N, Williams C Jr, Carswell-Richards E, Bertino JR, Old LJ, and Welt S. Pharmacokinetic and immunohistochemical characterization of polyethylene glycol-modified humanized A33 antibody targeted to colon cancer xenografts in mice. <i>Int J Cancer</i> 2000;87: 382-390.	3,92
4. Deckert PM, Renner C, Cohen LS, Jungbluth A, Ritter G, Bertino JR, Old LJ, Welt S. A33scFv-cytosine deaminase: a recombinant protein construct for antibody-directed enzyme- <i>prodrug</i> therapy. <i>Br J Cancer</i> 2003;88(6): 937-939.	3,89
5. Deckert PM, Bornmann WG, Ritter G, Williams C Jr, Franke J, Keilholz U, Thiel E, Old LJ, Bertino JR, Welt S. Specific tumour localisation of a huA33 antibody-carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine. <i>Int J Oncol</i> 2004;24(5):1289-1295.	3,06
6. Coelho V, Dervedde J, Petrusch U, Panjideh H, Fuchs H, Menzel C, Dübel S, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM. Design, construction, and in vitro analysis of A33scFv::CDy, a recombinant fusion protein for antibody-directed enzyme <i>prodrug</i> therapy in colon cancer. <i>Int J Oncol.</i> 2007;31(4): 951-7.	2,32

7. Petrausch U, Dervedde J, Coelho V, Panjideh H, Frey D, Fuchs H, Thiel E, Deckert PM. A33scFv–Green Fluorescent Protein, a Recombinant Single-Chain Fusion Protein for Tumor *Targeting*: Cloning, Expression in *P. pastoris*, and Functional Analysis. *Protein Eng Des Sel* 2007;20(12):583-90. 2,66
8. Panjideh H, Coelho V, Dervedde J, Fuchs H, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM. Production of bifunctional single-chain antibody-based fusion proteins in *Pichia pastoris* supernatants. *Bioprocess Biosyst Eng* 2008;31(6):559-568. 1,28
9. Frey D, Coelho V, Petrausch U, Schaefer M, Keilholz U, Thiel E, Deckert PM. Surface expression of gpA33 is dependent on cell density and cell cycle phase and is modulated by intracellular migration rather than gene transcription. *Cancer Biother Radiopharm* 2008;23(1): 65-73. 1,73
10. Panjideh H, Coelho V, Dervedde J, Bachran C, Foerster GJ, Franke J, Fasold P, Fuchs H, Thiel E, Deckert PM. Biodistribution and efficacy of [131I]A33scFv::CDy, a recombinant antibody-enzyme protein for colon cancer. *Int J Oncol* 2008;32: 925-930. 2,32

Originalarbeiten in Koautorschaft

Impact Factor*

1. Atzpodien J, Kirchner H, Lopez-Haenninen E, Körfer A, Fenner M, Menzel T, Deckert M, Franzke A, Jonas U, and Poliwoda HA. European Studies of Interleukin-2 in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Sem Oncol* 1993;20(6 Suppl 9), 22-26. ---
2. Atzpodien J, Kirchner H, Körfer A, Hadam M, Schomburg A, Menzel T, Deckert M, Franzke A, Volkenandt M, Dallmann I, and Poliwoda HA. Expansion of Peripheral Blood Natural Killer Cells Correlates with Clinical Outcome in Cancer Patients Receiving Recombinant Subcutaneous Interleukin-2 and Interferon-alpha-2. *Tumour Biology* 1993;14(6), 354-359. ---
3. Atzpodien J, Kirchner H, Lopez-Haenninen E, Deckert M, Fenner M, and Poliwoda HA. Interleukin-2 in combination with interferon-alpha and 5-

- fluorouracil for metastatic renal cell cancer. *European J Cancer* 1993;29A (Suppl 5), S6-S8. ---
4. Lopez-Haenninen E, Fenner M, Kirchner H, Deckert M, Duensing S, Menzel T, Poliwoda H, and Atzpodien J. Limited efficacy of interferon-alpha and vinblastine as second line biochemotherapy regimen in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Biotherapy* 1993; 8(4), 301-306. ---
 5. Atzpodien J, Kirchner H, Lopez-Haenninen E, Menzel T, Deckert M, Franzke A, Schomburg A, and Poliwoda H. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer Patients with 5-Fluorouracil in Combination with Recombinant Subcutaneous Human Interleukin-2 and alpha-Interferon. *Oncology* 1994;51(3), 273-275. ---
 6. Duensing S, Dallmann I, Grosse J, Buer J, Lopez-Haenninen E, Deckert M, Storkel S, Kirchner H, Poliwoda H, and Atzpodien J. Immunocytochemical Detection of p-Glycoprotein: Initial Expression Correlates with Survival in Renal Cell Carcinoma Patients. *Oncology* 1994;51(4), 309-313. ---
 7. Meffert M, Lopez-Haenninen E, Menzel T, Schomburg A, Duensing S, Dallmann I, Grosse J, Vocke S, Buer J, Deckert M, Kirchner H, Poliwoda H, and Atzpodien J. *In vivo* time and dose dependancy of interleukin-6 secretion in response to low-dose subcutaneous recombinant interleukin-2. *Cancer Biotherapy* 1994;9(4), 307-316. ---
 8. Hütter G, Szelenyi H, Deckert PM, Keilholz U, Thiel E. Phase I/II trial of topotecan given as continuous infusion in combination with oxaliplatin in 5-FU-pretreated patients with colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54(2):178-184. 2,22
 9. Siehl JM, Thiel E, Schmittel A, Hutter G, Deckert PM, Szelenyi H, Keilholz U. Ifosfamide/liposomal daunorubicin is a well tolerated and active first-line chemotherapy regimen in advanced soft tissue sarcoma: results of a phase II study. *Cancer* 2005;104(3):611-7. 4,80

Übersichtsartikel

Deckert PM. Current constructs and targets in clinical development for antibody-based cancer therapy. *Curr Drug Targets* 2009;10(2): 158-175. 4,04

* Impact Factor nach dem Thompson Scientific / ISI Journal Citation Report für das jeweilige Publikationsjahr. Für Publikationen vor 1994 konnten keine Werte mehr ermittelt werden. Für Publikationen nach 2007 wurde der Wert für 2007 eingesetzt, da neuere Werte noch nicht verfügbar sind.

Buch, Buchkapitel

Deckert PM. Anatomie der Sprache, Stimme und Atmung. 2007 Lehmanns Media, Berlin

Deckert PM. Monoclonal and Recombinant Antibodies in Clinical Trials, in: Dübel S (Ed.). Handbook of Therapeutic Antibodies. 2007 Wiley-VCH, Weinheim – New York

Abstracts

Deckert M, Lang S, Ballmaier M, Deicher H, Schedel I. Anti-idiotypic vaccination: monoclonal anti-CD4 antibody IOT4a induces anti-gp120 antibodies in HIV+ individuals.. *Int Conf AIDS* 1993; 9:490 (abstract no. PO-B27-2129).

Cole PD, Gorlick R, Longo G, Deckert PM, Banerjee D, Bertino JR. Development of a quantitative RT-PCR assay for the measurement of gamma-glutamyl hydrolase (GGH). *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998; 39: 433.

Deckert PM, Fan J, Bornmann WG, Clark M, Williams CJ, Chou T-C, Old LJ, Welt S, Huennekens FM, and Bertino JR. Activation of Methotrexate-Phenylalanine by a Conjugate of Carboxypeptidase-A and Humanized Antibody A33. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 1998; 17, 856.

Deckert PM, Jungbluth A, Clark M, Finn R, Williams C, Welt S, Bertino JR, Old LJ. Polyethylene glycol-conjugated huA33 antibody: tumor *Targeting* and pharmacokinetics. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1999; 40: 2357.

- Deckert PM, Renner C, Richards E, Williams C, Bertino JR, Welt S, Old LJ. Cloning and Expression of Recombinant Fusion Proteins of A33-Single Chain Antibodies and Cytosine Deaminase for Antibody-Directed Enzyme *Prodrug* Therapy. Proc Am Assoc Cancer Res 2000; 41: 1815.
- Deckert PM, Renner C, Bertino JR, Welt S, Old LJ, Keilholz U. Recombinant Fusion Proteins of A33-Single Chain Antibody with Cytosine Deaminase for Antibody-Directed Enzyme *Prodrug* Therapy. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2000; Graz
- Deckert PM, Welt S, Old LJ, Huennekens FM, Bertino JR, Bornmann W. Multi-Targeted Antifolate-Phenylalanine: A Novel *Prodrug* for Antibody-Directed Enzyme *Prodrug* Therapy. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2001; Mannheim
- Petrausch U, Cohen L, Welt S, Ritter G, Old LJ, Deckert M. Production of functional antibody-scFv fusion proteins for Antibody-Directed Enzyme *Prodrug* Therapy in a eucaryotic microbial system. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2002; München, ABS-4033-00904
- Deckert PM. *Prodrug* Therapy for Breast Cancer Targeted by Single-Chain Antibodies F19 and 3S193. DAMD 2003; Annual summary report
- Deckert PM, Siehl JM, Thiel E, Schmittel A, Hütter G, Szelényi H, Keilholz U. Phase II study of liposomal daunorubicin and ifosfamide (ID x) as first line chemotherapy in soft tissue sarcoma. J Clin Oncol 2004; 22 (14S): 9011.
- Deckert PM, Coelho V, Petrausch U, Dervedde J. A33scFv::CDy: A recombinant fusion protein of a single-chain antibody with yeast cytosine deaminase for selective *prodrug* activation. 2nd Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology 2006, Berlin, C-07
- Deckert PM, Coelho V, Petrausch U, Dervedde J, Menzel C, Dübel S, Fuchs H. ADEPT beim kolorektalen Karzinom: Konstruktion, Expression und *In-vitro*-Charakterisierung des rekombinanten Fusionsproteins A33scFv::CDy. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie 2006; Leipzig, P643.

Vorträge

Antibody-Directed Enzyme-*Prodrug* Therapy. Molecular Pharmacology Program Spring Meeting, Memorial-Sloan Kettering Cancer Center, 12.04.1997

Activation of Methotrexate-Phenylalanine by a Conjugate of Carboxypeptidase-A and Humanized Antibody A33. Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Poster Discussion, 19.05.1998

The A33 antigenic system as a model for antibody-directed tumor *Targeting*. Klinik I für Innere Medizin, Universität zu Köln, August 1999.

Recombinant Fusion Proteins of A33-Single Chain Antibody with Cytosine Deaminase for Antibody-Directed Enzyme *Prodrug* Therapy. International Society for Biological Therapy of Cancer Annual Meeting, Berlin, 23.09.2000

Recombinante Fusionsproteine des A33-Einzelkettenantikörpers mit Cytosindeaminase zur Antikörper-gesteuerten Enzym-*Prodrug*-Therapie. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Graz, 25.09.2000

Expression rekombinanter Fusionsproteine in eukaryotischen Systemen. Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, März 2002

Recombinant Antibodies for the Treatment of Cancer. Braunschweig Antibody Workshop. Braunschweig, 07.09.2006

Sarkoidose: extrapulmonale Organbeteiligung – Diagnostik und Therapie. Johanniter-Krankenhaus im Fläming, Treuenbrietzen, 17.05.2008

Stammzell-Transplantation: Medizinischer Hintergrund und psychoonkologische Aspekte. Landesarbeitsgemeinschaft onkologische Versorgung Brandenburg, 05.07.2008

Anämien: Rationelle Diagnostik. Gastroenterologisches Kolloquium, Brandenburg, 11.06.2008

Therapie des metastasierten Kolonkarzinoms. Darmkrebsaktion 2008, Potsdam, 06.12.2008

Recombinant fusion proteins for targeted enzyme *prodrug* therapy in colon and pancreatic cancer.
4th Fabisch-Symposium for Cancer Research and Molecular Cell Biology. 02.04.2009