

## 5. Zusammenfassung

Fusionsantikörper sind bifunktionale, rekombinante Moleküle aus einem Antigen-bindenden Antikörperfragment und einem weiteren Molekül, zum Beispiel einem Enzym. Solche Fusionsantikörper werden im Wesentlichen für die Anwendung in der antineoplastischen Chemotherapie konzipiert. In diesem Zusammenhang ist die antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie (ADEPT) ein zweistufiges Behandlungskonzept, wobei im ersten Schritt der Fusionsantikörper an ein tumor- oder tumorgewebespezifisches Antigen bindet. Im zweiten Schritt wandelt ein mit diesem Antikörper fusioniertes Enzym eine systemisch applizierte, ungiftige Arzneimittelvorstufe (Prodrug) im Tumorgewebe in ein aktives Chemotherapeutikum um, wodurch dessen zytotoxische Wirkung auf den Tumor fokussiert wird.

Aufgrund der bisher unbefriedigenden Ergebnisse der Behandlung des kolorektalen Karzinoms stellt die antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie eine möglicherweise verbesserte adjuvante oder palliative Therapiestrategie dar.

Das A33-Antigen wird von 95% der Kolonkarzinome präsentiert und kann genutzt werden, um sowohl Primärtumoren wie Metastasen mit hoher Sensitivität zu detektieren. Es bietet sich damit als Zielantigen einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie an.

Um den experimentellen oder klinischen Einsatz von Fusionsantikörpern für ADEPT zu realisieren, sind Expressionssysteme notwendig, die komplexe Proteine in löslicher und funktionaler Form in größerem Maßstab exprimieren können.

Mit den vorgestellten Ergebnissen wurde ein solches Expressionssystem zur Herstellung von Fusionsantikörpern in Hefen des Stammes *Pichia pastoris* etabliert. Dabei wurde beispielhaft der Fusionsantikörper A33rbGFP exprimiert. Er besteht aus dem gegen das A33-Antigen gerichtete A33-Single-Chain-Fragment und einem Green-Fluorescent-Protein (GFP). Das Green-Fluorescent-Protein wurde für dieses Pilotprojekt gewählt, da mit diesem Fusionsprotein einschrittige Fluoreszenzanalysen zum Bindungsverhalten des Fusionsantikörpers durchführbar waren. Das spezifische Bindungsverhalten des Konstrukts an verschiedenen Kolonkarzinomzelllinien konnte vergleichend gezeigt werden.

Darüber hinaus wurde versucht, den A33rbCD Fusionsantikörper zu exprimieren, bei dem das Green-Fluorescent-Protein gegen eine bakterielle Cytosindeaminase (CD) als Effektorenzym für ADEPT ausgetauscht wurde. Die Cytosindeaminase katalysiert die Umwandlung der

ungiftigen Arzneimittelvorstufe 5-Fluorocytosin in die zytotoxische Wirksubstanz 5-Fluoruracil. Dabei war festzustellen, dass die DNA-Sequenz dieses Fusionsantikörpers in der vorliegenden Form nicht im Hefesystem zu exprimieren war. Es wurde deshalb ein analoges Fusionskonstrukt entworfen und kloniert, in dem anstelle des bakteriellen Enzyms die aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammende Cytosindeaminase (CDy) verwendet wird. Auf diese Weise soll eine Expression dieses Fusionsantikörpers für ADEPT in der Hefe *Pichia pastoris* ermöglicht werden.