

1 Einleitung

Nach den Herz-Kreislaufkrankungen stellen maligne Tumoren die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Etwa jeder Fünfte stirbt an einer Krebserkrankung. Aufgrund der Fortschritte der modernen Medizin steigt die Lebenserwartung der Bevölkerung und damit auch die Zahl der Krebsfälle. Die Behandlungsmöglichkeiten maligner Tumoren sind jedoch nach wie vor begrenzt. Die therapeutischen Maßnahmen bestehen zur Zeit in Operation, Strahlenbehandlung und Chemotherapie. Die Versorgung von Krebspatienten konnte durch Kombination und Optimierung der genannten Maßnahmen ständig verbessert werden. So gibt es im Bereich der Chemotherapie Bemühungen, einheitliche Protokolle zur Anwendung bei bestimmten Tumorarten zu entwickeln. Diese Protokolle stellen Richtlinien zur optimalen Behandlung einer Tumorentität dar und sollen auch länderübergreifend angewendet werden. Zudem wird die Wirksamkeit von Hochdosischemotherapien mit autologer Stammzelltransplantation getestet, um Krebszellen durch eine Erhöhung der Zytostatikadosis effizienter abtöten zu können. Die konventionellen Therapiekonzepte sind oft mit starken Nebenwirkungen behaftet, die den Patienten zusätzlich belasten. Das Hauptproblem der Behandlung maligner Erkrankungen ist zudem häufig nicht der Primärtumor, sondern die Bildung von Metastasen, die auch mit verbesserten Behandlungsschemata kaum verhindert werden kann. Trotz intensiver Bemühungen die konventionellen Therapieformen zu optimieren, besteht die Notwendigkeit, neue effektive Konzepte zu entwickeln, die sich durch eine geringere Toxizität bei möglichst hoher Wirksamkeit auszeichnen. Eine vielversprechende neue Methode ist die Immuntherapie, die die humoralen und zellulären Komponenten der Immunabwehr zur Bekämpfung der Tumorzellen nutzt. Hierbei wird entweder das Immunsystem des Patienten stimuliert (Tumorstoffe, Präsentation von Tumorantigenen durch dendritische Zellen) oder es werden Antikörper zugeführt, die spezifisch gegen Tumorgewebe gerichtet sind.

1.1 Immuntherapie maligner Erkrankungen

1.1.1 Tumorstoffe und dendritische Zellen

Mit diesen Methoden soll die Immunabwehr des Patienten spezifisch gegen seinen Tumor stimuliert werden. Hierbei wird im Idealfall eine humorale und zelluläre Immunität angestrebt. Für die aktive Immunisierung mit Vakzinen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Es können autologe oder allogene Tumorzellen, Tumorantigene, Epitope oder Tumor-cDNA verabreicht werden. Die Behandlung mit Tumorzellen hat gegenüber der Verwendung von Antigenen oder Epitopen den Vorteil, daß eine Immunreaktion gegen viele verschiedene Antigenepitope, die auf der Tumorzelle vorhanden sind, ausgelöst wird. Antigene oder gar Epitopvakzinen induzieren eine Immunantwort, die zunächst auf bestimmte Antigene beschränkt ist. Sie haben jedoch den Vorteil, daß sie leichter herzustellen sind als

Tumorzellvakzinen. Vor allem autologe Impfstoffe, die ein Reinfundieren patienteneigener Tumorzellen voraussetzen, sind zumeist nicht in ausreichender Menge zu kultivieren. Daher werden hauptsächlich allogene Vakzinen verwendet, die mit weniger Laboraufwand auch aus Zelllinien hergestellt werden können.

Antikörper erkennen tumorassoziierte Antigene, die von der Vakzine exprimiert werden und zerstören Tumorzellen durch Interaktion mit Effektorzellen im Rahmen einer antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität oder durch Komplementlyse. Durch die Auflösung von Tumorzellen werden weitere freiwerdende Antigene von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, exprimiert und so dem Immunsystem zugänglich gemacht. Es kommt also zu einer Immunreaktion, die nicht mehr nur gegen die Epitope der Vakzine gerichtet ist (Herlyn & Birebent, 1999). Vielversprechende Ergebnisse konnten bisher vornehmlich mit Melanom-Vakzinen erzielt werden (Chan & Morton, 1998, Tuting et al., 1999, Nawrath et al., 1999). Die Nebenwirkungen von Tumorimpfstoffen sind gering und erstrecken sich auf typische lokale Impfreaktionen sowie Fieber, Abgeschlagenheit und Myalgien. Bisher ist noch keine Tumorzellvakzine als Medikament zugelassen. Es befinden sich jedoch mehrere, meist auf Tumorzellen basierende Impfstoffe bereits in klinischen Phase III Studien.

Dendritische Zellen (DCs) besitzen eine große Kapazität für Antigenaufnahme und -präsentation. Zur Gruppe der dendritischen Zellen gehören z.B. die Langerhans-Zellen in der Haut. Weiterhin findet man diese antigenpräsentierenden Zellen im interstitiellen Gewebe, in afferenten Lymphgefäßen, in Lymphknoten und in der Milz. Nach der Antigenaufnahme migrieren die dendritischen Zellen in T-Zell-Areale der Lymphknoten und lösen dort eine Immunantwort aus.

Tumoren weisen oftmals eine niedrige MHC-Dichte auf, was zu einer ineffektiven Antigenpräsentation führt. Zudem ist die Zahl dendritischer Zellen im Blut von Tumorpatienten häufig vermindert. Es erscheint daher sinnvoll, die T-Zell-Antwort durch Gabe von dendritischen Zellen, welche tumorassoziierte Antigene präsentieren, zu stimulieren. Der Therapie mit dendritischen Zellen liegt also ein ähnliches Prinzip zugrunde wie der Vakzinierung. Es werden jedoch keine reinen Antigene oder Tumorzellen verabreicht, sondern Zellen, die Tumorantigene in Verbindung mit MHC präsentieren und somit gezielt eine T-Zell-Reaktion auslösen können. Labortechnisch ist dieses Verfahren recht aufwendig, da dendritische Zellen aus Patientenblut generiert und mit tumorspezifischen Peptiden, Antigenen oder mRNA beladen werden (Luykx-de Bakker et al., 1999). DCs können auch mit Tumorzellen fusioniert oder mit Vektoren transfeziert werden, die Gene für tumorassoziierte Antigene tragen (Avigan, 1999).

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige klinische Daten für die Anwendung dendritischer Zellen in der Tumorthherapie. Es konnten jedoch in einigen Versuchen eine spezifische Immunantwort sowie Tumorremissionen nachgewiesen werden (Hsu et al., 1996, Nestle et al., 1998). Die Therapie war sehr gut verträglich, es konnten keine Nebenwirkungen festgestellt werden.

1.1.2 Antikörper

Diese Form der Immuntherapie basiert auf Antikörpern, die spezifisch gegen Tumoroberflächenantigene gerichtet sind und die Zerstörung maligner Zellen induzieren. Um Toxizitäten in anderen Geweben zu vermeiden, richten sich die Antikörper gegen Antigene, die nur auf malignen Zellen vorhanden sind oder von diesen in hohem Maße überexprimiert werden. Die meisten bisher verwendeten Antikörper stammen von der Maus und induzieren als Fremdprotein eine Immunreaktion, die den Therapieerfolg beeinträchtigen kann (Meredith et al., 1993). Da sich die anti-Maus Antikörper hauptsächlich gegen den Fc-Teil richten, kann man diese Komplikation durch den Einsatz von Antikörperfragmenten umgehen, die den Fc-Teil nicht mehr enthalten (Fab-Fragmente). Darüber hinaus ermöglicht die rekombinante DNA-Technologie die Aufreinigung und Klonierung von Antikörpern, die aus einer Mausvariablen-Region und einem humanen Fc-Teil bestehen (Vaughan et al., 1998).

Aufgrund ihrer relativ großen Molekülmasse von ca. 150 kDa ist die Penetration von Immunglobulinen in Tumoren nur beschränkt möglich. Da Antikörper häufig mit Toxinen oder Medikamenten konjugiert werden, kommt es zu einer weiteren Herabsetzung der Gewebegängigkeit. Um dies zu vermeiden, können auch einzelsträngige, variable Antikörperfragmente, sogenannte scFvs (single chain variable fragments) verwendet werden. ScFvs bestehen nur aus der antigenbindenden Region der variablen schweren (VH) und leichten (VL) Kette eines monoklonalen Antikörpers, die durch einen Peptidlinker (Gly₄Ser)₃ miteinander verbunden sind (Huston et al., 1988). Die kodierenden Sequenzen werden vornehmlich in Bakterien kloniert und exprimiert.

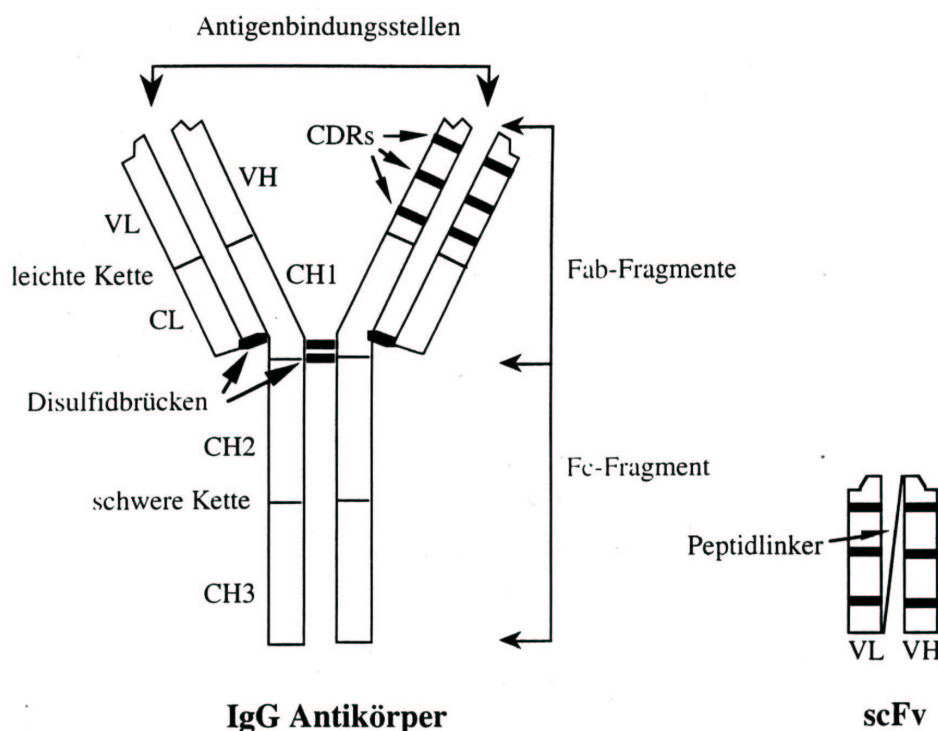


Abbildung 1.1.2 Schematische Darstellung eines IgG Antikörpers und eines scFv.

Die rekombinant hergestellten scFvs haben eine durchschnittliche Molekülmasse von nur 30 kDa und verfügen über Bindungsaffinitäten, die denen der zugehörigen monoklonalen Antikörper vergleichbar sind. Es besteht die Möglichkeit, scFvs genetisch mit Genen von Toxinen oder anderen Effektormolekülen zu verbinden und diese als Fusionsproteine in Bakterien zu produzieren (Huston et al., 1993).

Die antikörpervermittelte Krebstherapie hat sich bisher als die vielversprechendste Methode in der Immuntherapie erwiesen. Es konnten bereits Antikörper gegen verschiedene Antigene der wichtigsten Tumorarten entwickelt werden (Scott & Welt, 1997). Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß es auch mit Hilfe dieser Medikamente kaum möglich sein wird, größere Tumormassen vollständig zu zerstören. Zur Auflösung unerkannter Mikrometastasen sowie in Kombination mit konventionellen Behandlungsmethoden wird die Antikörpertherapie in Zukunft gleichwohl einen hohen Stellenwert einnehmen. Dies belegt auch die Tatsache, daß bereits zwei Antikörper für die Behandlung von Tumorerkrankungen zugelassen wurden und mit großem Erfolg in der Klinik eingesetzt werden (Rituximab/Lymphom, Trastuzumab/Mammakarzinom).

Bei den antikörpergestützten Immuntherapien lassen sich zwei Hauptstrategien unterscheiden. Der erste Ansatz nutzt das körpereigene Immunsystem zur Zerstörung der Tumorzellen. Es kommt zu einer gezielten, antikörpervermittelten Immunantwort, die durch unkonjugierte oder bispezifische Antikörper hervorgerufen wird. Die zweite Strategie verwendet Antikörper als Trägermoleküle, um zytotoxisch wirksame Substanzen gezielt zu malignen Zellen zu transportieren. Antikörper können an bakterielle oder pflanzliche Toxine, Zytostatika und an radioaktive Isotope gekoppelt werden (Clark & Weiner, 1995).

1.1.2.1 Unkonjugierte Antikörper

Unkonjugierte monoklonale Antikörper (moAks) binden an die Oberfläche von Tumorzellen und können eine Reihe von Reaktionen auslösen, die zur Zerstörung der Tumorzelle führen. Der Fc-Teil des Antikörpers vermittelt eine Aktivierung der Komplementkaskade und damit eine Lyse der Zelle. Weiterhin werden über den Fc-Teil Effektorzellen an die Tumorzelle gebunden, die die sogenannte antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität auslösen und so ebenfalls zur Vernichtung von Tumorzellen beitragen. Durch Blockade von Zytokin- oder Wachstumsrezeptoren können Antikörper Apoptose und nachfolgenden Zelltod induzieren.

Der erste in der Krebstherapie eingesetzte monoklonale Antikörper wurde 1998 durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zugelassen. Rituximab (IDEC/Genentech) ist ein chimärer Antikörper mit humanem Fc-Teil und murinen variablen Regionen, welcher den pan-B-Zell-Marker CD20 erkennt. Der Antikörper ist zugelassen für die Behandlung niedrigmaligner B-Zell-non-Hodgkin-Lymphome (NHL) (Mc Laughlin et al., 1998), wird aber auch auf seine Wirksamkeit bei anderen Lymphomarten (Coiffier et al., 1998) sowie chronisch lymphatischer Leukämie getestet. Die Therapie mit Rituximab zeigt eine hohe Effizienz mit einem 50%igen Ansprechen und nur geringen Nebenwirkungen (Davis et al., 1999, Onrust et al., 1999, Tedder & Engel, 1994).

Der zweite zugelassene Antikörper trägt den Warennamen Herceptin® (Trastuzumab, Genentech/Roche) und ist gegen den HER2-Rezeptor gerichtet. Herceptin® eignet sich für die Behandlung von Brustkrebspatientinnen mit einer Überexpression des HER2/neu-Rezeptors. Diese geht mit einer schlechten Prognose und aggressivem Tumorwachstum einher. 25-30% der Mammakarzinome zeigen eine Überexpression von HER2/neu (Baselga et al., 1999). Herceptin® wird sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Zytostatika wie Cisplatin oder Paclitaxel eingesetzt (Pegram & Slamon, 1999). Auch dieser Antikörper erwies sich als gut verträglich.

Bispezifische monoklonale Antikörper (Bi-moAks) enthalten zwei unterschiedliche Bindungsstellen für Antigene. Eine Bindungsdomäne ist gegen ein tumorassoziiertes Antigen gerichtet, die andere bindet immunologische Effektorzellen wie Makrophagen, T-Zellen oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Durch den bispezifischen Antikörper ist es also möglich, Tumorzellen mit Zellen des Immunsystems zu vernetzen, welche in der Lage sind, die malignen Zellen zu lysieren. Am häufigsten werden T-Zellen (CD3), Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen (CD64) und NK-Zellen (CD16) als Ziel für bispezifische Antikörper verwendet (de Gast et al., 1997). Erste klinische Studien mit einem anti-CD16/CD30 Antikörper für die Behandlung des Hodgkin-Lymphoms erbrachten sehr gute Ergebnisse (Hartmann et al., 1998). Auch mit bispezifischen Antikörpern, welche CD64 sowie ein tumorassoziiertes Antigen auf soliden Tumoren erkennen, konnte ein Ansprechen erreicht werden (Curnow, 1997). Die beobachteten Nebenwirkungen waren meist gering und äußerten sich in Fieber, Schmerzen, Myalgien und Blutdruckabfall.

1.1.2.2 Konjugierte Antikörper

Antikörper können an bakterielle oder pflanzliche Toxine gekoppelt werden, welche nach Internalisierung die Tumorzelle durch Inhibierung der Proteinbiosynthese zerstören. Solche Antikörperkonstrukte werden auch als Immuntoxine (ITs) bezeichnet. Für die Herstellung können ganze Antikörper, Fab-Fragmente oder scFvs verwendet werden. Durch den tumorspezifischen Antikörper wird gewährleistet, daß die Wirkung des Toxins auf maligne Zellen beschränkt ist und keine anderen Gewebe betroffen sind. Die meisten Toxine bestehen aus einer Bindungs- und einer Toxindomäne, so daß zur Herstellung von Immuntoxinen die unspezifische Bindungsstruktur durch einen tumorspezifischen Liganden ersetzt werden kann. Es werden sowohl Diphtherie-Toxin (DT) und Pseudomonas-Exotoxin (PE) (Collier, 1975, Iglewski et al., 1977) als auch das pflanzliche Toxin Ricin (Endo et al., 1987) verwendet. Ein wichtiges Charakteristikum von ITs ist die Notwendigkeit der Aufnahme in die Tumorzelle. Es können daher zur Herstellung von Immuntoxinen keine Antikörper verwendet werden, die gegen nicht internalisierende Antigene gerichtet sind. Dies ist z.B. bei Radioimmunkonjugaten oder bispezifischen Antikörpern sehr wohl möglich.

Der klinische Einsatz von Immuntoxinen beschränkt sich zur Zeit noch auf Tumoren des hämatologischen und lymphatischen Systems. Lymphome weisen eine sehr gute Vaskularisation auf, so daß eine gute Tumorpenetration ermöglicht wird. Zudem besitzen diese Tumor-

zellen zahlreiche tumorassoziierte Antigene, die als Ziel für Immuntoxine dienen (CD25, CD30, B4). Klinische Studien wurden unter anderem mit anti-CD25 Ricin Konjugaten für das Hodgkin Lymphom (Schnell et al, 1998) sowie mit anti-B4 Ricin Konstrukten für NHL (Multani et al., 1998) und multiples Myelom (Grossbard, 1998) durchgeführt.

Die Anwendung von Immuntoxinen in der Therapie solider Tumoren ist noch mit einigen Schwierigkeiten behaftet. Die schlechte Vaskularisation und ein erhöhter interstitieller Druck verhindern ein tieferes Eindringen des Medikamentes, so daß sich die Wirkung nur auf Randbereiche des Tumors erstreckt (Reiter & Pastan, 1998). Zudem weisen solide Tumoren oft eine geringere Oberflächendichte von Antigenen auf. Gute Ergebnisse konnten in klinischen Studien mit dem gegen das Le(Y)-Antigen gerichteten Konstrukt LMB-1 erzielt werden (Pai et al., 1996).

Die Hauptnebenwirkungen einer Therapie mit Immuntoxinen sind dem sogenannten Vascular Leak Syndrom (VLS) zuzuordnen. Es kommt durch das Toxin zu einer Schädigung von Endothelzellen mit nachfolgendem Flüssigkeits- und Proteinverlust. Dies führt dosisabhängig zu Ödembildung, Gewichtszunahme, Hypotonie, Tachykardie, Müdigkeit und Schwäche. Neuste Erkenntnisse zeigen, daß die endothelschädigende Wirkung der Toxine auf ein Motiv von nur drei Aminosäuren zurückzuführen ist (Baluna et al., 1999). Durch Deletion dieser Aminosäuren oder durch Mutation kann somit zukünftig die therapeutische Breite von ITs verbessert werden.

Neben den erwähnten Toxinen können auch andere Zellgifte mit Antikörpern konjugiert werden. Hierbei kommen vor allem die in der Chemotherapie verwendeten Substanzen zum Einsatz. Konventionelle Zytostatika haben aufgrund ihrer hohen Toxizität eine sehr geringe therapeutische Breite. Sie wirken nicht nur auf sich schnell teilende Tumorzellen, sondern unspezifisch auch auf alle anderen Gewebe mit rascher Zellteilung, wie z.B. Haarzellen, Darmepithelzellen, Zellen des Knochenmarks und Keimepithelzellen. Um die hierdurch hervorgerufenen Nebenwirkungen zu verhindern, werden chemotherapeutische Medikamente an Antikörper gekoppelt, welche die Substanzen gezielt an die Tumorzelle transportieren (Reisfeld et al., 1989). Dies führt zu einer geringeren allgemeinen Toxizität und zu einer erhöhten Tumorspezifität. Die Wirkung eines solchen gekoppelten Antikörpers konnte bisher nur in wenigen Studien, vornehmlich bei Kolonkarzinompatienten demonstriert werden (Takahashi et al., 1992).

Radioimmunkonjugate bestehen aus einem spezifisch an die Tumorzelle bindenden Antikörper, der an ein radioaktives Isotop wie Iod, Technetium, Yttrium oder Rhenium gekoppelt ist. Im Vergleich zu Immuntoxinen besitzen Radioimmunkonjugate den Vorteil, daß zur Wirkungsentfaltung keine Internalisierung des Konstruktes erforderlich ist. Es können also auch Antikörper verwendet werden, die an nicht internalisierende Oberflächenantigene binden. Durch die Strahlung wird nicht nur die spezifisch gebundene Tumorzelle vernichtet, sondern Gewebe im Umkreis mehrerer Zelldiameter. Hierzu gehören auch Zellen, die das Antigen nicht tragen und somit über eine Therapie mit anderen gekoppelten Antikörpern nicht erreicht werden könnten. Radioimmunkonjugate sind bis jetzt erfolgreich bei Lymphomen und

Leukämien eingesetzt worden (Rain & Billotey, 1998, Kaminski et al., 1996). In der Behandlung solider Tumoren hat sich dieser Ansatz bisher als weniger effizient erwiesen (Welt et al., 1994). Die Hauptnebenwirkung einer Radioimmuntherapie ist eine Myelosuppression, die dosisabhängig auftritt. Um eine bessere Wirksamkeit zu erzielen, kann die Dosis der radioaktiven Strahlung erhöht werden. Die resultierende Knochenmarksschädigung muß dann mit einer autologen Stammzelltransplantation kompensiert werden.

1.1.3 Immuntherapie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist in den westlichen Industrieländern die häufigste Krebserkrankung der Frau. Etwa jede zehnte Frau wird im Verlauf ihres Lebens ein Mammakarzinom entwickeln. Im Alter zwischen 35 und 40 Jahren ist Brustkrebs sogar die häufigste Todesursache (Rabe, 1990). Man unterscheidet zwei Hauptformen des Mammakarzinoms, das duktales und das lobuläre Karzinom. Das duktales Karzinom besteht aus wechselnd großen Tumorzellen und enthält auch solide, drüsenbildende Abschnitte. Die lobuläre Form ist histologisch durch ein kleinzelliges Bild gekennzeichnet und tritt häufiger als das duktales Karzinom multizentrisch auf. Oft sind auch beide Mammæ betroffen (Martius et al., 1994). 80% der Mammakarzinome gehören der duktal invasiven Form an.

Tumoren der Brustdrüse zeigen ein sehr langsames Wachstum. Es dauert ca. 10-20 Jahre, bis der Tumor eine Größe von einem Zentimeter erreicht hat. Die Metastasierung erfolgt jedoch häufig sehr früh, sowohl lymphogen als auch hämatogen. Metastasen bilden sich bevorzugt in den Knochen (70%) sowie in Lunge, Pleura und Leber. Knochenmetastasen sind zumeist osteolytisch und können starke Schmerzen verursachen. Die Heilungsaussichten sind für das Mammakarzinom nach wie vor als schlecht zu bezeichnen, vor allem, wenn bereits Metastasen in den regionären Lymphknoten vorliegen. So beträgt die 5 Jahre Überlebensrate bei metastasenfreier Axilla 80-85%, bei ein bis drei positiven Lymphknoten nur noch 50% (Schmidt-Matthiesen, 1992).

Mit den heute zur Verfügung stehenden Behandlungsmethoden kann meist keine dauerhafte Heilung erzielt werden. Die Therapie besteht in einer operativen Entfernung des Primärtumors, Bestrahlung der Brustdrüse, um ein Lokalrezidiv zu verhindern und nachfolgender Chemo- oder Hormontherapie. Das Problem besteht, wie bei anderen Tumorarten auch, in der Ausmerzung der Metastasen, die oft nur unzureichend gelingt. Mit einer Hochdosischemotherapie kann zwar die Tumormasse stärker als mit einer konventionellen Zytostatikatherapie gesenkt werden, eine signifikant höhere Überlebensrate konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden.

Zur Bekämpfung von Metastasen werden auch bei der Behandlung des Mammakarzinoms zunehmend immuntherapeutische Ansätze verfolgt. Die Immuntherapeutika werden zumeist in Kombination mit konventionellen Behandlungsstrategien verwendet. Ein sehr gutes Beispiel für die erfolgreiche Entwicklung eines immuntherapeutischen Medikamentes ist der bereits beschriebene anti-HER2/neu Antikörper Herceptin®. Dieser wird mit großem Erfolg in der Behandlung HER2-überexprimierender Mammakarzinome eingesetzt. Herceptin® hat

allerdings den Nachteil, daß es nur auf HER2-positive Tumoren wirkt. Es können also nur 25-30% der Patientinnen von diesem Antikörper profitieren.

Auch andere immuntherapeutische Ansätze konzentrieren sich auf das HER2/neu-Antigen. Die meisten befinden sich jedoch noch in der präklinischen Phase. Es wurden sowohl ein bispezifischer anti-HER2/CD64 Antikörper (Watanabe et al., 1999) als auch ein anti-HER2 Ricin Immuntoxin (Boyer et al., 1999) entwickelt. Beide Konstrukte führten in vitro zur Zytolyse von Brustkrebszellen. Weiterhin gibt es Versuche, durch Vakzinierung eine Immunantwort gegen den HER2-Rezeptor zu erzeugen (Brugger et al., 1999).

Eine weitere Mammakarzinom-Vakzine (Theratope®, Biomira Inc.) befindet sich bereits in klinischen Phase III Studien. Sie enthält das STn-Antigen, eine Carbohydratstruktur des MUC-1-Antigens, welche in Mammakarzinomzellen stark sialysiert und daher sehr immunogen ist (Segal-Eiras & Croce, 1997). Da ca. 90% der Mammakarzinome MUC-1 exprimieren kann mit Medikamenten, die sich gegen dieses Antigen richten, ein breites Patientenkollektiv erreicht werden. MUC-1 ist auch auf normalen Brustepithelzellen vorhanden, das Antigen zeigt jedoch auf Karzinomzellen eine andere Glykosylierungsstruktur als auf normalen Zellen. So entsteht ein nur für maligne Zellen spezifisches Epitop, das auch als Ziel für Antikörper dienen kann (Fiorentini et al., 1997, DeNardo et al., 1997).

Aussichtsreich sind auch Vakzinierungsstrategien mit CEA (Carcinoembryonales Antigen)- und MAGE-3-Epitopen (Morse et al., 1999, Celis et al., 1994). Da diese Antigene jedoch nur auf 20-26% der Mammakarzinome vorkommen, ist die Anwendbarkeit stark eingeschränkt.

1.2 Generierung neuer tumorspezifischer Antikörper für die Immuntherapie

1.2.1 Die Hybridom-Technologie

Mit der Entwicklung der Hybridom-Technologie durch Köhler und Milstein (1975) standen monoklonale Antikörper definierter Spezifität für den Einsatz in der Krebsbehandlung zur Verfügung. Das Prinzip der Hybridom-Technik besteht in der Immortalisierung antikörperproduzierender Zellen durch Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen. Um Antikörper gegen ein definiertes Antigen zu erhalten, werden Mäuse mit dem entsprechenden Antigen immunisiert und die B-Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten oder peripherem Blut mit Myelomzellen fusioniert. Die so entstandenen Hybridome produzieren jeweils nur einen Antikörper bestimmter Spezifität. Um Klone zu detektieren, die Antikörper gegen das gewünschte Antigen produzieren, müssen oftmals mehrere Tausend Hybridom-Klone auf ihre Bindungsfähigkeit getestet werden. Für dieses Screening werden zumeist ELISA-Tests eingesetzt. Das Antigen wird an 96 Vertiefungen („wells“) einer sogenannten Mikrotiterplatte gebunden und in jede Vertiefung wird der Antikörper enthaltende Überstand einer Hybridomzelle pipettiert. Eine Antigenbindung wird über einen anti-Maus Antikörper nachgewiesen.

Routinemäßig werden 40 Platten mit je 96 wells gescreent (Pirofsky et al., 1990). Positive Hybridome werden rekloniert und produzieren Antikörper, welche sich im Zellkulturüberstand befinden. Jeder Klon produziert nur einen Antikörper gegen ein spezifisches Antigen, es werden also „monoklonale Antikörper“ gebildet.

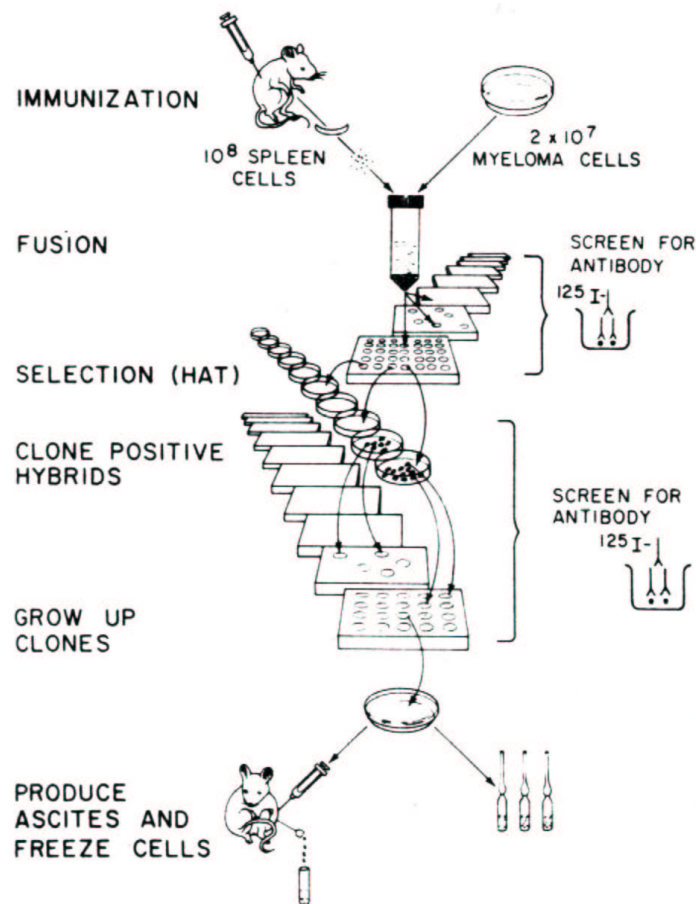


Abbildung 1.2.1 Generierung monoklonaler Antikörper unter Verwendung der Hybridom-Technologie. (Quelle: Pirofsky et al., 1990)

Im Gegensatz zu polyklonalen Seren haben monoklonale Antikörper den Vorteil, daß sie kaum Kreuzreaktivitäten zeigen und nicht unspezifisch an andere Antigene binden. Dennoch eignet sich die Hybridom-Technologie nur bedingt zur Generierung tumorspezifischer Antikörper für die Immuntherapie. Da die B-Lymphozyten, die zur Herstellung von Hybridomen eingesetzt werden, von der Maus stammen, werden Maus-Antikörper produziert, die im Menschen eine Antikörper-Reaktion gegen das artfremde Protein hervorrufen. Eine solche Immunreaktion könnte durch die Verwendung humaner Hybridome vermieden werden. Die Herstellung humaner Antikörper mittels Hybridom-Technik ist jedoch mit vielen Schwierigkeiten behaftet. So ist eine gezielte Immunisierung von Patienten mit Tumorantigenen aus ethischen Gründen nicht möglich. Menschliche B-Lymphozyten müssen daher *in vitro* mit einem bestimmten Antigen stimuliert werden (Epstein & Epstein, 1986). Sowohl die Immortalisierung humaner B-Lymphozyten als auch die anschließende Kultivierung ist sehr viel weniger effi-

zient als bei Maus-Hybridomen (Vetterlein, 1989). Zudem ist die Suche nach Klonen, die tumorspezifische Antikörper produzieren, labortechnisch sehr aufwendig und zeitintensiv (Cote et al., 1996).

Aufgrund der erwähnten Nachteile der Hybridom-Technologie werden zunehmend andere, molekularbiologische Methoden eingesetzt, um neue tumorspezifische Antikörper für einen Einsatz in der Immuntherapie zu generieren. Hierzu gehört die sogenannte „phage display“ Technik, die es ermöglicht, aus einem großen Repertoire von Fab-Fragmenten oder scFvs Antikörperstrukturen gegen ein bestimmtes Antigen zu selektionieren.

1.2.2 Die phage display Technik

1.2.2.1 Das Prinzip: Exprimierung von Antikörpern auf der Oberfläche filamentöser Phagen

Die phage display Technik basiert auf der Verwendung filamentöser Phagen als Vektoren, welche Antikörperstrukturen auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die DNA-Sequenz für ein scFv oder auch ein Fab-Fragment wird in das Genom eines filamentösen Phagen kloniert und die Antikörperstruktur wird als Fusionsprotein mit einem Phagenoberflächenprotein exprimiert.

Filamentöse Phagen besitzen eine fadenähnliche Struktur mit einem Durchmesser von ca. 7 nm und einer Länge von 1-2 μm . Die bisher am besten charakterisierten Phagen sind M13, fl und fd. Die Phagenhülle wird von etwa 2700 Kopien des p8-Proteins gebildet. Sie umschließt als Zylinder die einzelsträngige Phagen-DNA, welche für zehn Gene kodiert und zudem eine Startregion für die DNA-Replikation sowie eine Verpackungssignal enthält. An der Spitze eines Phagenpartikels befinden sich fünf Kopien des p3 Proteins, das bei der Infektion von E.coli an den F'-Pilus der Bakterien bindet.

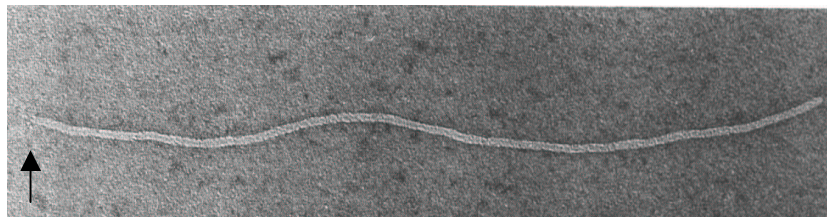


Abbildung 1.2.2.1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines filamentösen M13 Phagen. Der Pfeil deutet auf den Kopf des Phagen mit den p3 Proteinen. (Quelle: Kay et al., 1996)

Die meisten filamentösen Phagenvektoren exprimieren Antikörper als Fusionsprotein mit p3. 1985 beschrieb Smith erstmals den Einsatz filamentöser Phagen zur Präsentation rekombinanter Fusionsproteine auf deren Oberfläche („phage display“). Smith konnte nachweisen, daß ein mit einer fremden Sequenz (EcoR I Endonuklease) fusioniertes p3-Kapsidprotein korrekt an der Phagenoberfläche exprimiert wird und die Infektiosität erhalten bleibt. Weiterhin konnte in diesen Experimenten gezeigt werden, daß es durch Selektion eines „pools“ von EcoR I-p3-Fusionsphagen und Wildtypphagen an einem anti-EcoR I-Antikörper zu einer mehr als 1000fachen Anreicherung der EcoR I-tragenden Phagen kam.

Zur Herstellung großer Antikörperbibliotheken kommen hauptsächlich M13 Phagen und sogenannte Phagmidvektoren zum Einsatz. Diese Vektoren leiten sich von pUC-Plasmiden ab und enthalten Replikationsursprung und Verpackungssignal der Phagen sowie Replikationsursprung und Genexpressionssystem des Plasmids. Phagmide beinhalten lediglich das Gen3, welches als Fusionsprotein mit der Sequenz für einen Antikörper exprimiert wird. Alle anderen Hüllproteine fehlen und müssen bei der Herstellung rekombinanter Phagen von Helferphagen produziert werden, die einen defekten Replikationsursprung besitzen. Die Generierung fusionsproteintragender Phagen erfolgt durch die Infektion phagmidtragender Bakterien mit Helferphagen, die den Phagenreplikationsursprung des Phagmids aktivieren, die Phagenhüllproteine synthetisieren und Phagmid-DNA in neue Phagenpartikel verpacken. Die so entstandenen filamentösen Phagen tragen das Phagmidgenom sowie auf ihrer Oberfläche eine Mischung aus Wildtyp-p3 und Fusions-p3. Es entsteht also ein Partikel, der kloniertes Protein (scFv, Fab-Fragment) auf seiner Oberfläche exprimiert und gleichzeitig die dafür kodierende DNA enthält.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Phagenvektor pCANTAB6 handelt es sich um ein Derivat des Phagmids pHEN1 (Hoogenboom et al., 1991). Zwischen der Klonierungsstelle der Antikörperfragmente und dem Gen3 für das p3-Hüllprotein befindet sich ein Amber-Stop-Codon. Wird der Phage in einem E.coli „suppressor“-Stamm (z.B. TG-1) vermehrt, kann das Amber-Codon als Glutamin translatiert und das Fusionsprotein an der Phagenoberfläche exprimiert werden. In einem „non suppressor“-Stamm (z.B. HB 2151) wird das Stop-Codon als solches gelesen und lösliches scFv gebildet, welches nicht an der Phagenoberfläche erscheint, da keine Fusion mit p3 vorliegt. Am Ende der Klonierungsstelle für das scFv befindet sich ein Nachweismarker in Form eines c-myc-tags. Sowohl scFv als auch Fusionsprotein können mit dem anti-c-myc Antikörper 9E10 nachgewiesen werden (Munro & Pelham, 1986). Der Vektor pCANTAB6 (McCafferty et al., 1994) besitzt noch einen zusätzlichen His6-tag-kodierenden Abschnitt, der es ermöglicht, das scFv über eine Affinitätschromatographie aufzureinigen.

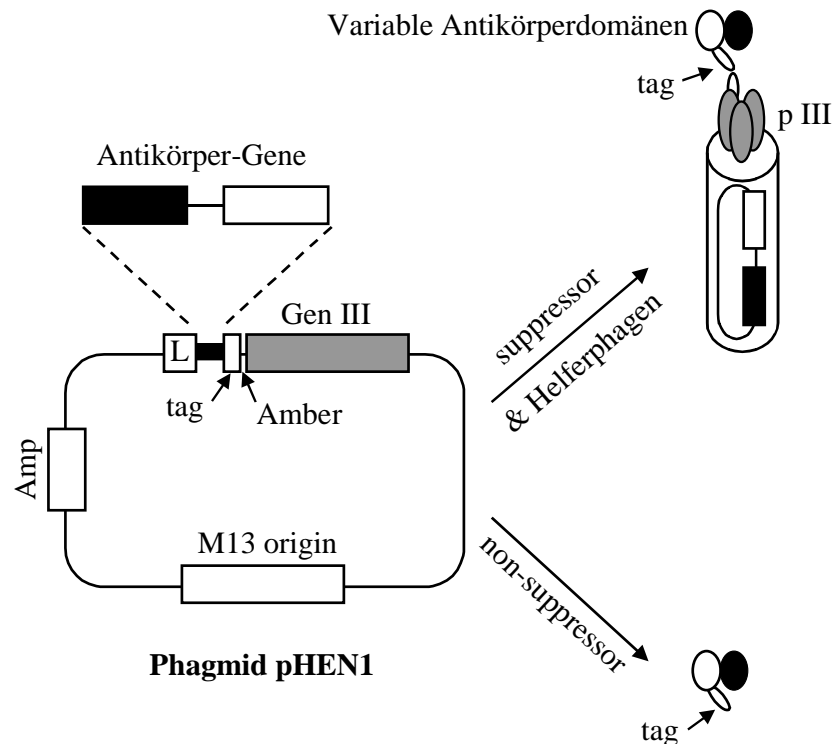


Abbildung 1.2.2.1.2 Schematische Darstellung des Phagmidvektors pHEN1.

AMP = Ampicillin-Resistenz-Gen; L = Signalpeptid-Sequenz; tag = c-myc Peptid-Sequenz; Amber = Amber-Stop-Codon; Gen III = Gen, das für das p3 Protein kodiert; M13 origin = Startregion für die DNA-Replikation und DNA-Verpackungssignal.

1.2.2.2 Erstellung von phage display Antikörperbibliotheken

Aus B-Lymphozyten des peripheren Blutes, der Milz oder der Lymphknoten können mittels PCR die variablen Regionen der schweren und leichten Immunglobulinketten amplifiziert werden. In einer sogenannten „assembly-PCR“ werden die schweren und leichten variablen Regionen durch „splicing by overlap extension“ (Horton et al., 1989) nach dem Zufallsprinzip zusammengelagert. Die so entstandene scFv-DNA wird in den Phagmidvektor ligiert und dieser in Bakterien elektroporiert. Diese produzieren nach Infektion mit Helferphagen filamentöse Phagen, die Antikörperfragmente an ihrer Oberfläche tragen. Die so entstandene scFv-Bibliothek enthält ca. 10^7 - 10^{10} unterschiedliche Klone.

Eine solche Antikörperbibliothek kann an einem bestimmten Antigen oder auf Tumorzellen selektioniert werden. Hierbei werden die Phagen mit Antigen inkubiert und nicht bindende Partikel gewaschen. Bindende Phagen werden vom Antigen eluiert, in Bakterien vermehrt und für eine erneute Selektion verwendet. Durch mehrere Selektionsrunden können die Phagen angereichert werden, die spezifisch an das Antigen binden. Da diese Phagen das Gen für den bindenden Antikörper tragen, steht die DNA-Sequenz zur Verfügung, so daß der Antikörper nach Umklonierung auch in einem bakteriellen oder eukaryotischen Expressionssystem rekombinant hergestellt werden kann.

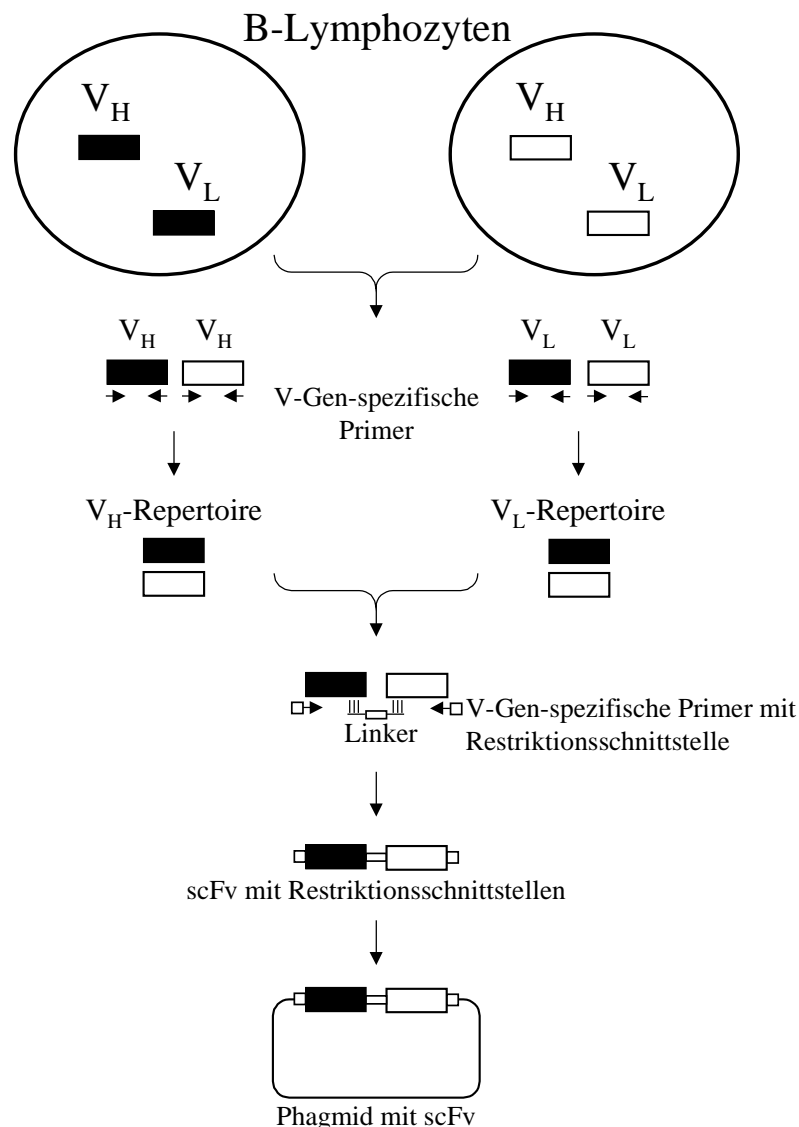


Abbildung 1.2.2.2 Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen zur Erstellung einer scFv phage display Bibliothek. V_H = Gene der variablen Regionen der schweren Ketten, V_L = Gene der variablen Regionen der leichten Ketten.

Mit der Selektion einer solchen Antikörperbibliothek an einem Antigen oder an Tumorzellen kann die natürliche Immunreaktion des Körpers simuliert werden. So wie jeder B-Lymphozyt ein bestimmtes Immunglobulin auf seiner Oberfläche trägt, exprimiert auch jeder Phage einer Bibliothek ein spezielles scFv. B-Zellen und Phagen werden durch Bindung am Antigen selektioniert. Nachfolgend proliferieren die B-Lymphozyten und differenzieren zu Plasmazellen. Auch die spezifisch an ein Antigen bindenden Phagen werden nach der Elution vom Antigen vermehrt. Nach der Umwandlung in Memory B-Zellen kommt es im Verlauf der natürlichen Immunreaktion zu Hypermutationen in den V-Genen. Dies führt bei erneuter Konfrontation mit dem Antigen zur Selektion der am besten bindenden Immunglobuline. Eine solche Auswahl wird auch durch mehrmalige Selektion der scFv-Bibliothek am gleichen An-

tigen erzielt. Auch hier werden diejenigen Phagen angereichert, die scFvs tragen, welche eine hohe Affinität für das eingesetzte Antigen besitzen.

Die Quellen humaner V-Gene für die Herstellung von Antikörperbanken sind abhängig davon, welche Art von Antikörpern selektioniert werden sollen. So können B-Zellen gesunder Spender oder aber Lymphozyten sogenannter „immuner“ Patienten mit bestimmten Erkrankungen verwendet werden. Bibliotheken gesunder Spender werden auch als naive Bibliotheken bezeichnet (Vaughan et al., 1996). Aus solchen Immunglobulinbanken können Antikörper gegen jedes beliebige Antigen selektioniert werden. Bibliotheken „immuner“ Spender werden aus B-Zellen von Probanden mit Autoimmun-, Tumor- oder viralen Erkrankungen hergestellt (Marks et al., 1991). Diese Banken enthalten besonders viele Antikörper, die spezifisch gegen pathogene Antigene gerichtet sind, da das Immunsystem des Spenders bereits mit diesen Antigenen reagiert hat. In Bibliotheken dieser Spender finden sich weiterhin Antikörper, die einer Affinitätsreifung unterworfen waren und daher hochaffin sind (Hoogenboom et al., 1998). Zur Generierung tumorspezifischer Antikörper werden daher scFv-Bibliotheken von Tumorpatienten an Tumorzellen oder bereits bekanntem Tumorantigen selektioniert.

1.2.2.3 Selektion von phage display Antikörperbibliotheken

Um neue Antikörper für den Einsatz als Immuntherapeutika in der Krebsbehandlung zu definieren werden phage display Antikörperbibliotheken auf reinem Tumorantigen oder auf ganzen Tumorzellen selektioniert („Biopanning“). Hierzu werden Platten oder Kunststoffröhrchen mit Antigen bzw. Tumorzellen beschichtet und die Selektionsrunden wie beschrieben durchgeführt. Durch Bindung an Antigene, Wegwaschen der nichtbindenden Phagen und Vermehrung der affinen Binder kommt es zu einer Anreicherung des antigenspezifischen Klons.

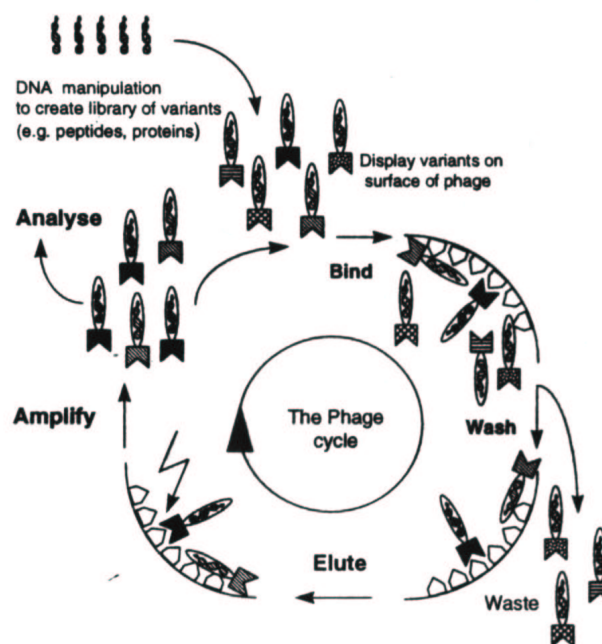


Abbildung 1.2.2.3 Selektion von phage display Antikörperbibliotheken auf Antigen. (Quelle: Hoogenboom et al., 1998)

Mit der phage display Technik konnten aus verschiedenen Bibliotheken scFvs gegen mehrere Tumorantigene isoliert werden, wie z.B. gegen Mesothelin (Chowdhury et al., 1998), Lewis-Antigen (Mao et al., 1999), erbB-2 (Schier et al., 1995), MUC1 (Henederixx et al., 1998) und HMW-MAA (High Molecular Weight-Melanoma Associated Antigen) (Desai et al., 1998). Durch Selektion von Antikörperbibliotheken an ganzen Tumorzellen sollen tumorspezifisch bindende scFvs generiert werden, welche an Oberflächenantigene binden. Der Vorteil dieser Methode ist, daß Antikörper gegen nahezu das gesamte Antigenrepertoire der Tumorzelle generiert werden können. Für die Selektionsrunden werden zumeist Tumorzelllinien verwendet, die entweder als Monolayer oder nach Trypsinierung in Suspension mit der phage display-Bibliothek inkubiert werden. Um spezifische Binder zu erhalten, ist es oftmals notwendig, die Antikörperbibliothek vor der Selektion auf Tumorzellen einem sogenannten Depletionsschritt zu unterziehen. Die Phagen werden mit irrelevanten Zellen, die kein Tumorantigen exprimieren (z.B. periphere Blutmonozyten) inkubiert, um unspezifische Binder zu depletieren. Das Biopanning auf ganzen Zellen weist einige Schwierigkeiten auf, die vor allem von Hoogenboom et al. (1999) beschrieben wurden. So können Antigene, die nur in geringer Konzentration auf der Tumorzelle vorhanden sind, mit dieser Methode nicht detektiert werden. Um einen Antikörper zu selektionieren, muß das Antigen also eine hohe Dichte auf der Zelloberfläche aufweisen. Zudem sind manche Antigene durch eine sterische Hinderung anderer Proteine für antikörpertragende Phagen nicht zugänglich (Hoogenboom et al., 1998). Auch gegen Oberflächenstrukturen, die aufgrund einer nur kleinen extrazellulären Domäne eine geringe Antigenität besitzen, können laut Hoogenboom et al. (1999) keine scFvs generiert werden. Der überragende Vorteil einer Selektion auf Tumorzellen ist die Möglichkeit, Antikörper gegen neue, noch unbekannte Tumorantigene zu isolieren und somit das Spektrum der Immuntherapeutika zu erweitern. Bisher konnten vor allem melanomspezifische single chain Antikörper erfolgreich an Zelllinien selektioniert werden (Cai & Garen, 1996, Kupsch et al., 1999).

1.2.2.4 Charakterisierung der selektionierten Antikörper

Mit der phage display Technologie können neue Antikörper für den Einsatz in der immunologischen Tumorthherapie gewonnen werden. Um die Eignung als Immuntherapeutikum zu verifizieren, müssen die Bindungseigenschaften der isolierten Antikörperfragmente möglichst genau untersucht werden. Wichtig ist vor allem die Tumorspezifität, um eine Schädigung anderer Gewebe auszuschließen. Eine Standardmethode zur Charakterisierung neuer Antikörper ist der ELISA-Test mit mehreren Tumorzelllinien sowie Zelllinien normaler Gewebe, um eine spezifische Bindung an Tumorzellen nachzuweisen. Diese Bindungsanalysen können auch im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) mit neoplastischen und normalen Zellen durchgeführt werden. Da eine Reaktion des Antikörpers mit der Zelllinie auch auf der Bindung an ein Antigen beruhen könnte, das nur in Zellkultur, aber nicht im Tumor in vivo exprimiert wird, sollten zusätzlich immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten erfolgen. Daher wird die Bindung des Antikörpers auf Schnitten verschiedener Tumorarten und Normalgewebe untersucht. Die genannten Tests ermöglichen eine Charakterisierung des Antikörper-

bindungsspektrums auf malignen und normalen Zellen, geben aber keinen Aufschluß über die Beschaffenheit des Antigens. Für eine Verwendung des selektierten Antikörpers in der Tumorthherapie sind Informationen über das Zielantigen jedoch von großer Bedeutung. So ist es z.B. wichtig, ob der Antikörper gegen eine bereits bekannte Antigenklasse gerichtet ist oder ein neues Antigen erkennt, welches als Ziel für Immuntherapeutika dienen kann. Handelt es sich um ein bekanntes Antigen, so stehen wichtige Informationen über Struktur, Expressionsmuster, mögliches Shedding sowie Internalisierung bereits zur Verfügung, so daß der Antikörper rasch zur Konstruktion neuer Medikamente verwendet werden kann.

Die Definition des Zielantigens eines tumorspezifischen Antikörpers kann z.B. über das Screening einer cDNA-Expressionsbank erfolgen. cDNA aus Tumorprimärmaterial oder aus einer Tumorzelllinie wird in einen Expressionsvektor kloniert und somit eine tumorspezifische cDNA-Expressionsbibliothek erstellt. Zellen dieser Bibliothek produzieren tumorspezifische Antigene und tragen gleichzeitig die genetische Information für diese Proteine. Bindet der bereits auf Tumorzellen selektierte Antikörper an Antigene der cDNA-Expressionsbank, so kann dies mit den entsprechenden Sekundärantikörpern sichtbar gemacht werden. Über die DNA-Sequenz des antigentragenden Klons der cDNA-Bibliothek kann dann das Antigen bestimmt werden. Bislang stehen noch keine gut etablierten und routinemäßig anwendbaren Methoden zur Verfügung, die es ermöglichen, das Antigen eines über phage display isolierten Antikörpers durch Screening einer cDNA-Expressionsbank zu ermitteln.

1.3 Detektion neuer tumorassoziierter Antigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie

Dem pathologischen Wachstumsverhalten von Tumoren liegen komplexe, physiologische Störungen zugrunde, die als Folge der Expression viraler oder mutierter Gene sowie der deregulierten Expression normaler Gene auftreten können. Viele neoplastisch transformierte Zellen tragen daher auf ihrer Oberfläche Proteine, die in normalem Gewebe nicht oder nur in geringerer Konzentration vorhanden sind. Derartige Moleküle werden als tumorassozierte Antigene (TAA) bezeichnet. Man unterscheidet verschiedene Klassen von tumorassozierten Antigenen. Glykoproteine (TAG-72, Ep-CAM, MUC-1) und Glykolipide (GD2, GD3) zeichnen sich meist durch eine aberrante Glykosylierung aus und kommen hauptsächlich auf epithelialen Tumoren vor. Auch Carbohydratantigene wie Le(Y) und Ca-125 sind charakteristisch für Neoplasien epithelialen Ursprungs, ebenso wie das Vorkommen von Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, HER2/neu). Eine weitere Gruppe tumorassoziierter Antigene bilden die oncofetale Proteine, deren physiologische Expression auf fetales Gewebe beschränkt ist. Bekanntester Vertreter dieser Antigenklasse ist das carcinoembryonale Antigen (CEA). Für Tumoren des hämatologischen und lymphatischen Systems ist das Auftreten von sogenannten Differenzierungsantigenen kennzeichnend. Solche Marker finden sich physiologischerweise auf Zellen bestimmter Differenzierungsstadien. Hierzu gehören z.B. CD30 + CD25 (Hodgkin

Lymphom), CD19 + CD22 (B-Zell-Lymphome) sowie CD5 (T-Zell-Leukämie). Gegen viele der genannten Antigengruppen sind bereits Antikörper oder scFvs entwickelt worden, die sich in unterschiedlichen klinischen Testphasen befinden. Zur klinischen Anwendung kamen bisher nur die erwähnten anti-CD20 und anti-HER2/neu Antikörper. Um neben Antikörpern auch neue Antigenstrukturen für die Immuntherapie nutzbar zu machen und somit das Therapiespektrum zu erweitern, müssen Methoden zur Detektion tumorassoziierter Antigene entwickelt werden.

1.3.1 Detektion tumorassoziierter Antigene mit T-Zellen

Durch die Inkubation von Tumorzellen mit autologen Blutlymphozyten oder autologen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten können sogenannte cytolytische T-Lymphozyten (CTLs) generiert werden, die spezifisch gegen Tumorzellen gerichtet sind und diese zerstören. Mit diesen CTLs können *in vitro* Antigen-Deletionsmutanten der Tumorzellen bestimmt werden, die gegen die Lyse durch einen bestimmten CTL-Klon resistent sind, also ein bestimmtes Antigen verloren haben. Durch Transfektion dieser Deletionsmutanten mit Tumor-DNA und anschließender Inkubation mit dem CTL-Klon können Tumorzellen selektioniert werden, die wieder eine T-Zell-Antwort hervorrufen, meßbar als Proliferation der CTLs mit TNF-Produktion. Transfizierte Tumorzellen, die eine Lymphozytenaktivität hervorrufen, tragen die genetische Information für das Antigen. Durch Sequenzierung kann das Antigen bestimmt werden (Boon et al., 1994). Mit dieser Methode war es möglich, das MAGE-1-Gen (Traversari et al., 1992) und das Enzym Tyrosinase (Brichard et al., 1993) als tumorassozierte Antigene zu identifizieren. Bisher wurden jedoch nur Melanom-Antigene definiert, da sich Melanomzellen im Gegensatz zu vielen anderen Tumorzellen sehr gut *in vitro* kultivieren lassen und zudem sehr immunogen sind.

1.3.2 Screening von cDNA-Expressionbanken

Durch die Synthese von cDNA, welche den zur mRNA komplementären Strang bildet, erhält man die DNA-Sequenzen der Gene, die in der Zelle aktiv sind, also in mRNA transkribiert werden. Um die Expression von Genen in bestimmten Zellen oder Geweben zu analysieren, wird die Gesamt-mRNA isoliert, cDNA synthetisiert und diese in prokaryotische Expressionsvektoren kloniert. Es entstehen cDNA-Bibliotheken, die im Idealfall den gesamten mRNA-Pool einer Zelle repräsentieren. In den verschiedenen Expressionsvektoren stehen die klonierten cDNA-Inserts unter dem Einfluß eines starken Promotors, so daß sie abgelesen und -sofern sie sich im richtigen Leseraster befinden- die zugehörigen Proteine gebildet werden. Auf diese Weise können auch cDNA-Expressionsbanken von Tumorgewebe erstellt und auf das Vorliegen bestimmter Proteine getestet werden. Von besonderem Interesse ist hierbei die Untersuchung der Antigenexpression.

1.3.2.1 Lambda-Phagen-Vektoren

Große cDNA-Expressionsbanken können in Plasmidvektoren oder in λ -Phagen kloniert werden. λ -Phagen gehören, wie die bereits beschriebenen filamentösen Phagen, zur Gruppe der Bakterienviren, die sich in *E. coli* vermehren. λ -Phagen bestehen aus einem ikosaedrischen Kopf, welcher die Phagen-DNA enthält, sowie aus einem Schwanzteil, durch den die DNA in das infizierte Bakterium eingeschleust wird.

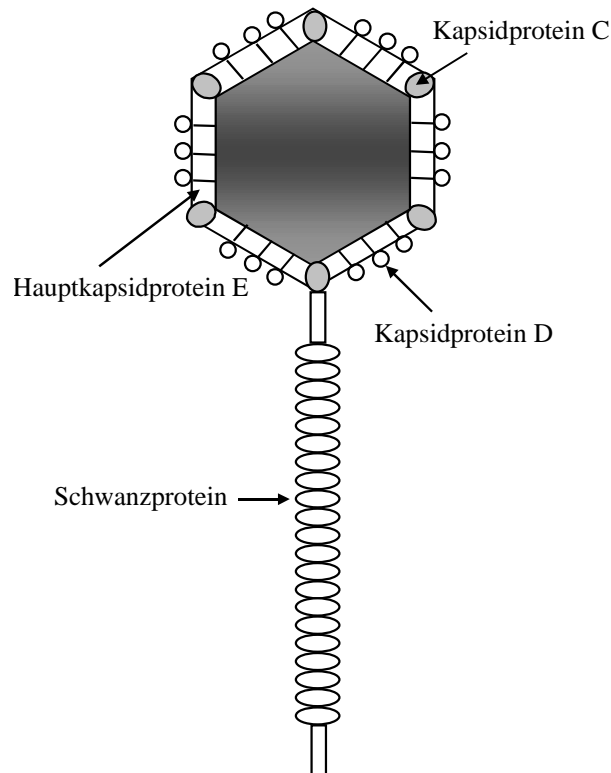


Abbildung 1.3.2.1.1 Morphologie des λ -Phagen. (Quelle: Winnacker, 1984)

Die λ -Phagen-DNA ist doppelsträngig und hat eine Länge von 48.502 bp (Sanger et al., 1982). Die DNA besitzt überhängende Enden, die komplementär sind und als „kohäsive Enden“ oder „cos sites“ bezeichnet werden. Durch Verbindung der „cos sites“ werden viele monomere DNA-Moleküle zur sogenannten konkatemeren Phagen-DNA zusammengelagert. Nur in dieser Form kann die DNA während des Infektionszyklus in Phagenköpfe verpackt werden. Pro Kopf wird von dem langen DNA-Faden durch das Phagenprotein A ein DNA-Molekül abgeschnitten und in den Kopf eingeschleust. Kopf und Schwanz lagern sich automatisch aneinander. Auf die beschriebene Art und Weise entstehen in einem Bakterium bis zu 100 neue λ -Phagen. Im Gegensatz zu filamentösen Phagen, die aus dem Bakterium ausgeschleust werden ohne es zu zerstören, besitzen λ -Phagen einen lytischen Vermehrungszyklus. Die Wand der *Coli*-Zelle wird durch das Phagenlysozym aufgelöst und die neuen Phagen werden freigesetzt. In einem geschlossenen Bakterienrasen entsteht an der Stelle, an der sich lytische Phagen vermehren, ein Loch, ein sogenannter Plaque.

Die Genkarte der λ -Phagen enthält in ihrem mittleren Teil allerdings auch die Gene, die für eine lysogene Vermehrung kodieren. In diesem Fall wird die Phagen-DNA nach der Infektion in das bakterielle Genom eingebaut und nicht abgelesen. Für Expressionsvektoren bevorzugt man den lytischen Infektionszyklus, denn die Phagen-DNA soll ja mitsamt der inserierten cDNA vermehrt und abgelesen werden. Da die mittleren Gene für die lytische Infektion nicht essentiell sind, können sie zur Konstruktion eines Vektors entfernt werden. Durch Deletion des mittleren Gensegments („stuffer fragment“) entstehen sogenannte Substitutionsvektoren, in die fremde DNA anstelle der entfernten Gene kloniert werden kann.

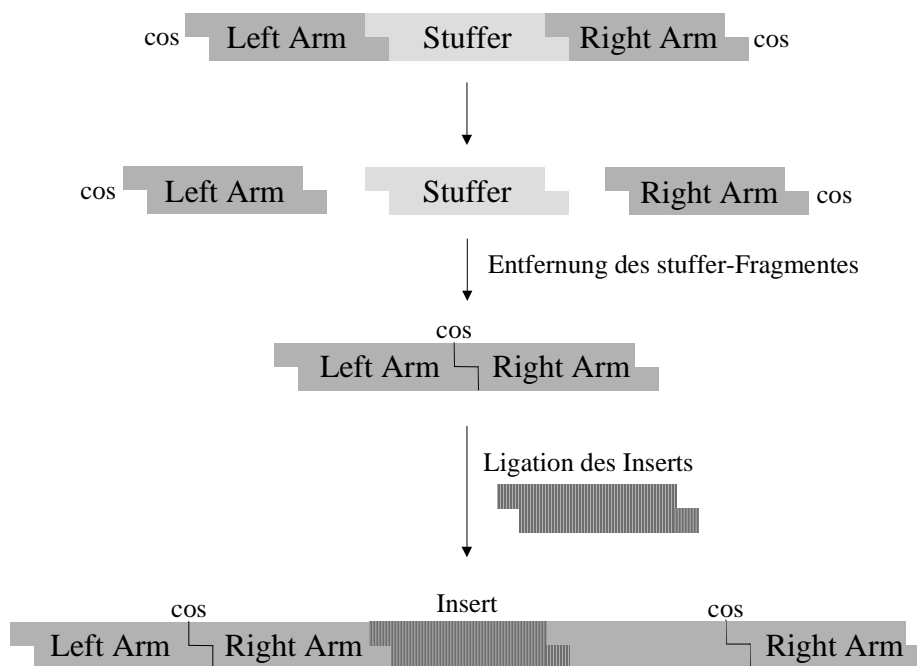


Abbildung 1.3.2.1.2 λ -Phagen-Substitutionsvektor.

Left Arm = linkes Gensegment, kodierend für Kopf- und Schwanz-Gene; Right Arm = rechtes Gensegment, kodierend für regulatorische Gene der DNA-Replikation und Lyse; stuffer = mittleres Gensegment, kodierend für Lysogenie, wird entfernt; cos = komplementäre, kohäsive Enden; Insert = klonierte Fremd-DNA. (Quelle: Rodriguez & Denhardt, 1988)

Die so entstandene rekombinante DNA wird in Phagen verpackt (packaging reaction) und es entstehen infektiöse Phagenpartikel, die in *E. coli* vermehrt werden können. Für die Verpackung der DNA stehen kommerzielle „Verpackungsextrakte“ zur Verfügung, die neben Kopf- und Schwanzproteinen sämtliche Enzyme enthalten, die für die Synthese neuer Phagen notwendig sind.

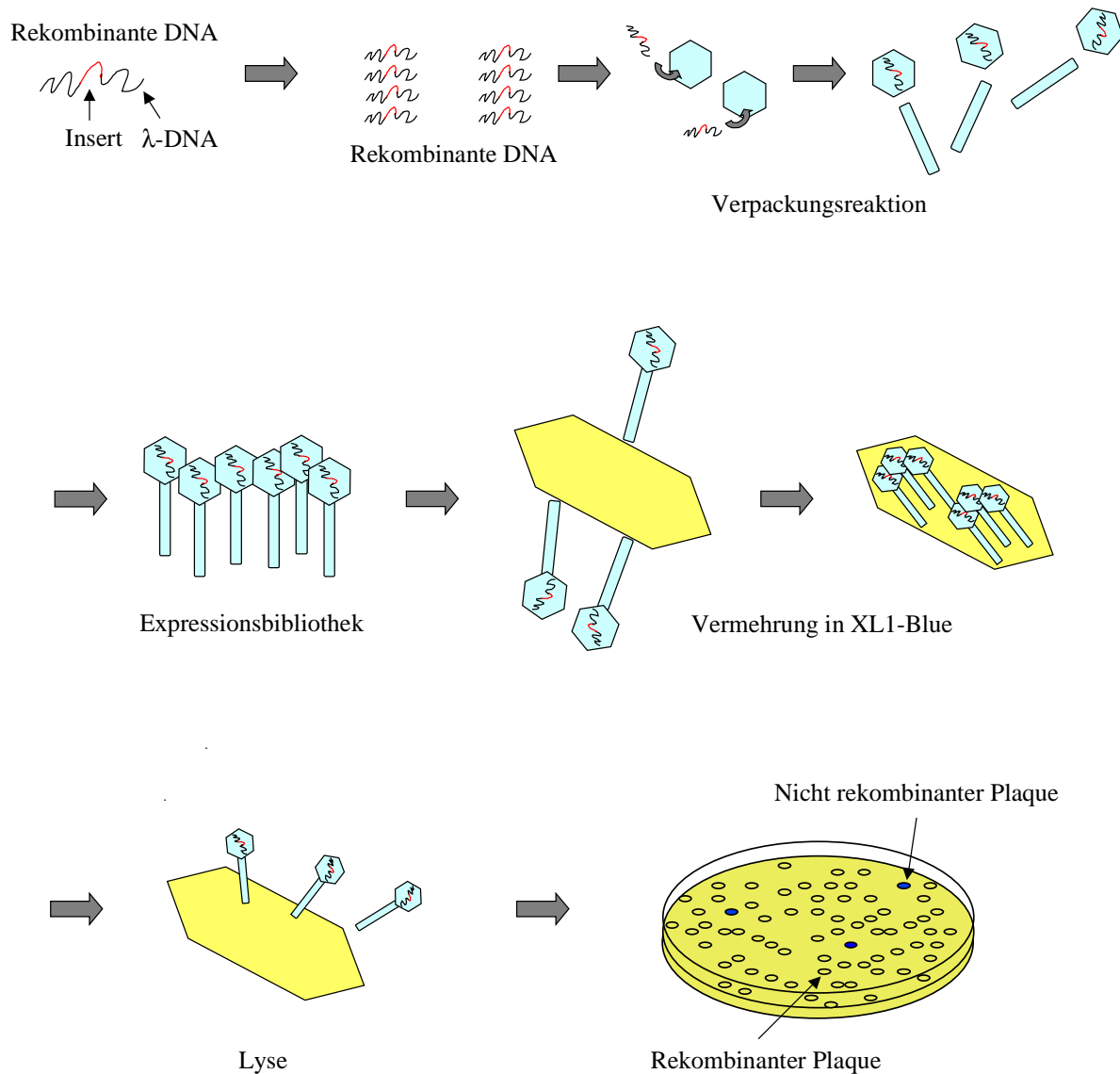


Abbildung 1.3.2.1.3 Erstellung einer cDNA-Expressionsbank in λ -Phagen.

λ -Phagen weisen gegenüber dem Klonieren in Plasmidvektoren mehrere Vorteile auf. Es können sehr viel größere DNA-Stücke inseriert werden (bis 20 kb), so daß die Chance, vollständige Gene zu klonieren, steigt. Plasmide können lediglich cDNA bis zu einer Größe von etwa 5 kb aufnehmen. Die Klonierungseffizienz in λ -Phagen ist sehr viel höher, da die Verpackung rekombinanter Phagen-DNA effektiver funktioniert als die Transformation von DNA in Bakterien. Mit einer Transformation in Bakterien kann eine Zahl von bis zu 10^7 Molekülen pro μg Plasmid erzielt werden. Durch das sogenannte „in vitro packaging“ können durch Verpacken der Phagen-DNA ca. 10^{10} Moleküle pro μg λ -DNA kloniert werden (Boulnois, 1987). Schließlich können λ -Phagen-Bibliotheken, im Gegensatz zu Bakterien, jahrelang unter Zusatz von Chloroform auch bei 4°C gelagert werden.

λ -Phagen-Vektoren exprimieren kloniertes Protein nicht wie filamentöse Phagen auf ihrer Oberfläche, sondern die inserierte cDNA wird im Verlauf des normalen Vermehrungszyklus abgelesen und das klonierte Protein innerhalb der Bakterien gebildet. Nach Lyse der Wirtszellen liegt das rekombinante Protein frei in den sogenannten Plaques im Bakterienrasen und kann mit Antikörpern detektiert werden. Pro 15 cm Agarplatte können bis zu 50.000 Plaques, also 50.000 Phagenklone ausplattiert werden. Das in den Plaques befindliche Protein wird durch Auflegen von Nitrozellulosefiltern auf die Platten an diese Matrix gebunden. Die Filter werden mit Antikörpern inkubiert und eine Bindung durch eine enzymatische Farbreaktion nachgewiesen.

Bei dem für diese Arbeit verwendeten λ -Phagen-Vektor ZAP® II handelt es sich um einen Substitutionsvektor. Die Länge des linken und rechten Arms ohne Insert beträgt 41.000 bp. Der Vektor kann cDNA-Inserts von 0-10 kb aufnehmen. Als Wirtszellen dienen XL1-Blue MRF' von Stratagene. In den Vektor ist bereits das gesamte pBluescript-Phagmid hineinkloniert. Das pBluescript-Phagmid enthält neben einer Ampicillin-Resistenz den ColE1-Replikationsursprung für die Vermehrung bakterieller Plasmide, sowie den f1-Replikationsursprung der filamentösen Helferphagen.

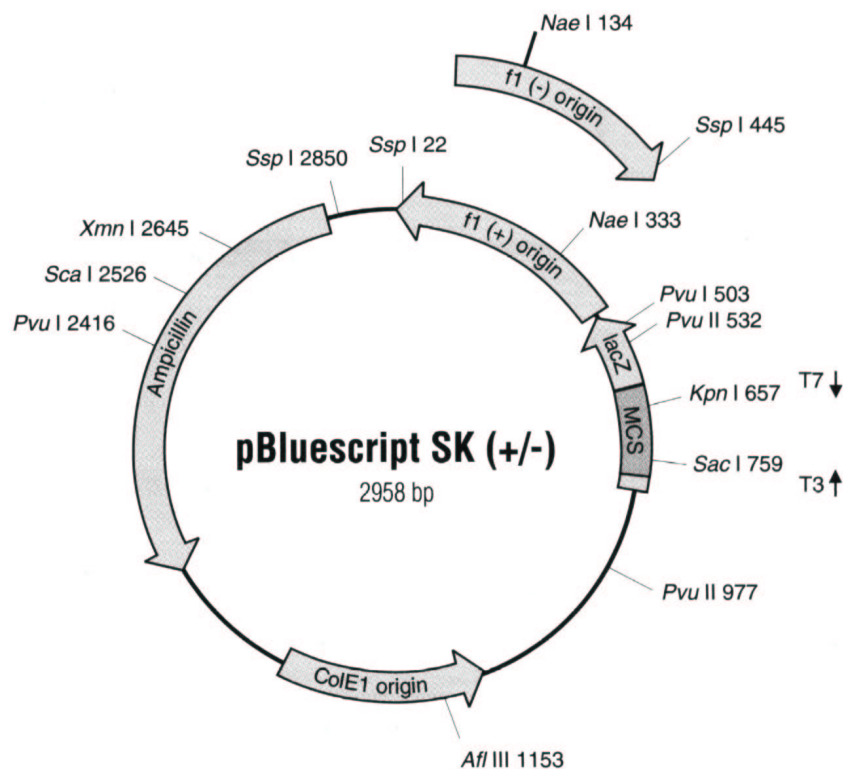


Abbildung 1.3.2.1.4 Expressionsvektor ZAP® II mit pBluescript SK (+/-) Phagmid. Ampicillin = Ampicillin-Resistenz-Gen; f1 (+) origin = Replikationsursprung der filamentösen Helferphagen; lacZ = Gen kodierend für β -Galactosidase; MCS = multiple cloning site; ColE1 origin = Plasmid-Replikationsursprung. (Quelle: Stratagene Katalog, 1999)

Weiterhin befindet sich im Phagmid ein Teil des β -Galaktosidase-Gens, auch lacZ-Gen genannt. Das gesamte Gen ist zu groß, um komplett in den Vektor kloniert zu werden. Daher enthält ZAP® II nur die kodierende Sequenz zur α -Komplementierung des lacZ-Gens (N-Terminus des Enzyms). Der Rest des Gens befindet sich auf dem Episom der XL1-Blue-Zellen, das darüber hinaus noch das Gen für die Ausbildung des Geschlechtspilus (essentiell für die Infektion mit filamentösen Helferphagen), sowie eine Tetrazyklin-Resistenz enthält. Der Einfachheit halber wird die Sequenz für die α -Komplementierung im weiteren als lacZ-Gen bezeichnet. Im lacZ-Gen befindet sich hinter dem lac-Promotor eine „multiple cloning site“ (MCS) mit 21 Restriktionsschnittstellen und sechs Primer-Bindungsstellen. In diese MCS kann die fremde cDNA (Insert), die die gleichen Restriktionsschnittstellen wie der Vektor besitzt, hineinkloniert werden.

Die Lage der MCS innerhalb des lacZ-Gens eröffnet die Möglichkeit der Blau-Weiß-Selektion der nach der Klonierung erhaltenen Plaques. Bei der Vermehrung der Phagen wird deren Genom abgelesen und auch das β -Galaktosidase-Gen in das zugehörige Enzym transkribiert und translatiert. Die β -Galaktosidase setzt in Anwesenheit des Inducers IPTG x-gal zu einem blauen Farbstoff um. Befindet sich ein Insert im Vektor, so ist das Gen unterbrochen, es wird kein Enzym gebildet und somit auch kein blauer Farbstoff. Hieraus ergibt sich, daß weiße Plaques rekombinant sind, d.h. ein Insert enthalten und blaue Plaques nicht rekombinant sind.

Der Name ZAP® II ergibt sich aus der Möglichkeit, von der Arbeit mit λ -Phagen überzugehen auf Phagmide oder Plasmide. Dies geschieht mit Hilfe filamentöser Helferphagen, von der Firma als „ExAssist“ bezeichnet. Die Initiations- und die Terminationssequenz des f1-Helferphagen-Replikationsursprungs wurden separat in den ZAP® II-Vektor kloniert und zwar die Initiationsseite an das eine und die Terminationsseite an das andere Ende des Phagmids.

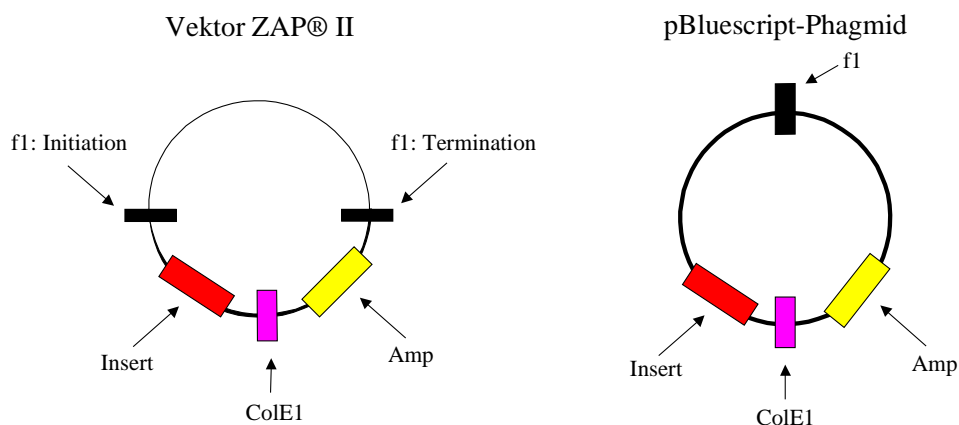


Abbildung 1.3.2.1.5 Schematische Darstellung des Uni-ZAP® II-Vektors und des pBluescript Phagmids. f1 = Replikationsursprung der filamentösen Helferphagen; ColE1 = Plasmid-Replikationsursprung; Amp = Ampicillin-Resistenz.

Werden *E. coli*-Zellen sowohl mit den Insert-tragenden ZAP® II-Phagen als auch mit den Helferphagen infiziert, so erkennen bestimmte Proteine der Helferphagen die f1-Initiationsstelle und lagern sich an einen DNA-Strang an. Es erfolgt die Synthese eines DNA-Einzelstranges bis zum Terminationssignal. Dieser DNA-Strang enthält alles, was zwischen Initiations- und Terminationssite liegt, also das gesamte Bluescript-Phagmid mit Insert. Die neu gebildete Einzelstrang-DNA wird zirkularisiert (hierbei bildet sich auch ein neuer f1-Replikationsursprung), in Phagmidpartikel verpackt und aus den Bakterien ausgeschleust. Nach der Infektion mit beiden Phagen werden die XL1-Blue-Bakterien durch Hitze abgetötet, die Phagmide überstehen die Hitzebehandlung.

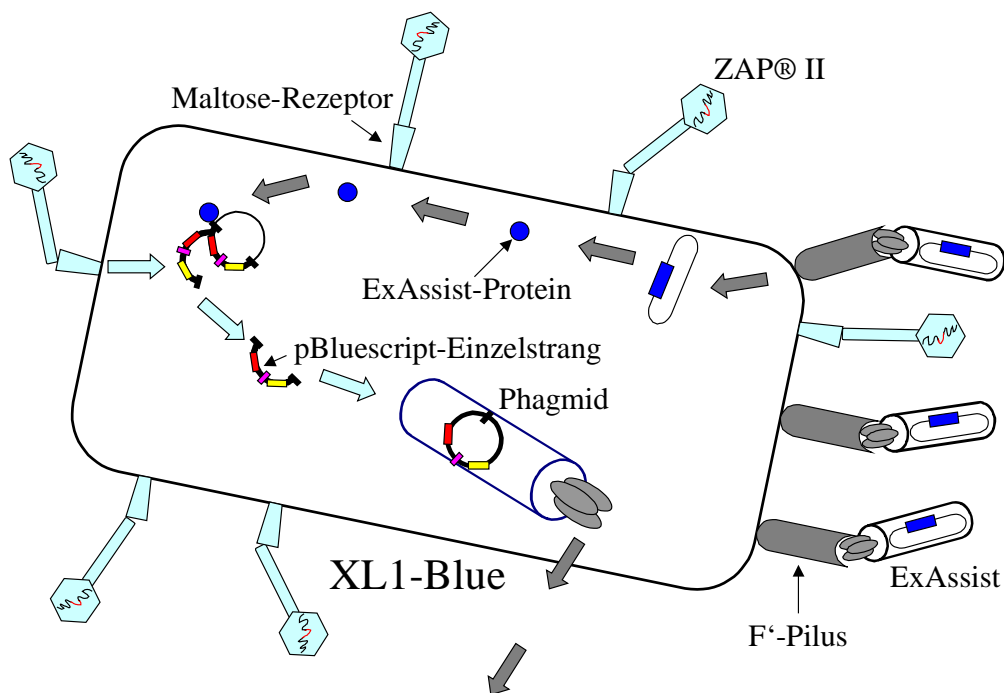


Abbildung 1.3.2.1.6 Infektion von XL1-Blue MRF' mit ZAP® II und ExAssist
→ Produktion von pBluescript-tragenden Phagmiden

Mit den gewonnenen Phagmiden wird nun ein anderer *E. coli*-Stamm infiziert, in dem sich die Helferphagen nicht vermehren können (SOLR-Stamm) und somit nur das Phagmid repliziert wird. In den SOLR-Zellen wird das zirkularisierte, einsträngige Molekül in ein doppelsträngiges umgewandelt. Da das Phagmid den ColE1-Replikationsursprung besitzt, wird das doppelsträngige Phagmid jetzt wie ein normales Plasmid repliziert.

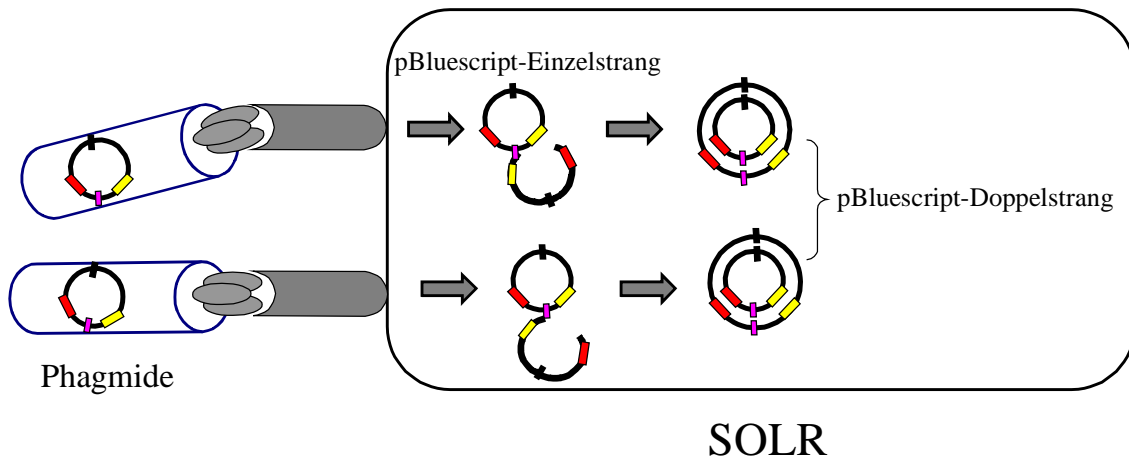


Abbildung 1.3.2.1.7 Infektion von SOLR mit Phagmiden
→ Synthese des 2. Plasmidstranges

Um das Plasmid selektiv aufrechtzuerhalten, werden die SOLR-Zellen auf Ampicillin-Platten ausgestrichen. Die Kolonien können dann für Mini- und Maxi-DNA-Präparationen verwendet werden, um beispielsweise die Insert-DNA zu sequenzieren.

1.3.2.2 Screening von λ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken mit Antikörpern

Da λ -Phagen-Expressionsbanken die cDNA der in einem bestimmten Gewebe aktiven Gene enthalten, exprimieren sie im Idealfall möglichst viele gewebsspezifische Proteine einschließlich aller Antigenstrukturen. Solche cDNA-Bibliotheken können somit auf das Vorliegen bestimmter Proteine untersucht werden. Die in den Plaques befindlichen Proteine werden an geeignete Filter gebunden und diese mit Antikörpern gegen das entsprechende Protein inkubiert. Positive λ -Phagen-Klone enthalten die cDNA-Sequenz des gesuchten Proteins oder Antigens. Ist die Nukleotidsequenz eines Proteins nicht bekannt, kann sie durch Screening einer cDNA-Bibliothek mit dem zugehörigen Antikörper ermittelt werden. Mit der genauen Basenabfolge stehen auch Informationen über Exonstrukturen, Proteinstruktur und -domänen oder Anzahl der unterschiedlichen Gene, die für das Protein kodieren, zur Verfügung (Schwarzbauer et al., 1983, Landau et al., 1984, Gallin et al., 1985). Weiterhin können cDNA-Banken von Patienten mit Autoimmunerkrankungen mit Antikörpern der zugehörigen Patienten gescreent werden, um Zielantigene der Autoantikörper zu definieren (Dropcho et al., 1987, Tanaka et al., 1998). Für die Detektion neuer Tumorantigene können cDNA-Expressionsbanken aus Tumormaterial eingesetzt werden. Da in den Bibliotheken die Gene für Tumorantigene enthalten sind, besteht die Möglichkeit, daß die von Phagenvektoren produzierten Antigene von Antikörpern der Krebspatienten erkannt werden. Das cDNA-Insert des Phagenklons kann sequenziert und das Antigen bestimmt werden. Eine solche Methode zur Detektion neuer Tumorantigene wurde 1995 (Sahin et al.) erstmals beschrieben und als SEREX (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) bezeichnet.

1.3.2.3 Das SEREX-System

Das SEREX-System basiert auf der Beobachtung, daß Tumorpatienten Antikörper gegen autologe Tumorantigene entwickeln. Diese Antikörper können zur Detektion von Tumorantigenen in cDNA-Expressionsbanken verwendet werden. So begannen bereits Mitte der siebziger Jahre Untersuchungen zur humanen Immunantwort gegen Tumoren. Old entwickelte die Methode der autologen Typisierung. Die Seren von Tumorpatienten wurden auf Reaktivität gegen autologe und allogene neoplastische und nichtentartete Zelllinien getestet, um Antikörper zu detektieren, die spezifische Antigene autologer Tumorzellen erkennen (Old, 1981). Auch das Auftreten spezifischer Antikörper gegen definierte Antigene konnte nachgewiesen werden. So zeigten Croce et al. (1995) mit dem Verfahren der Immunkomplexbildung das Vorliegen einer serologischen Reaktion gegen CEA und MUC-1. Sahin et al. (1995) entwickelten die Methode der autologen Typisierung unter Implementierung molekularer Klonierungstechniken weiter und etablierten das sogenannte SEREX-System. Diese Technik basiert auf dem Screening tumorspezifischer cDNA-Expressionsbanken mit autologen Patientenserum.

Erstellung cDNA-Bibliothek

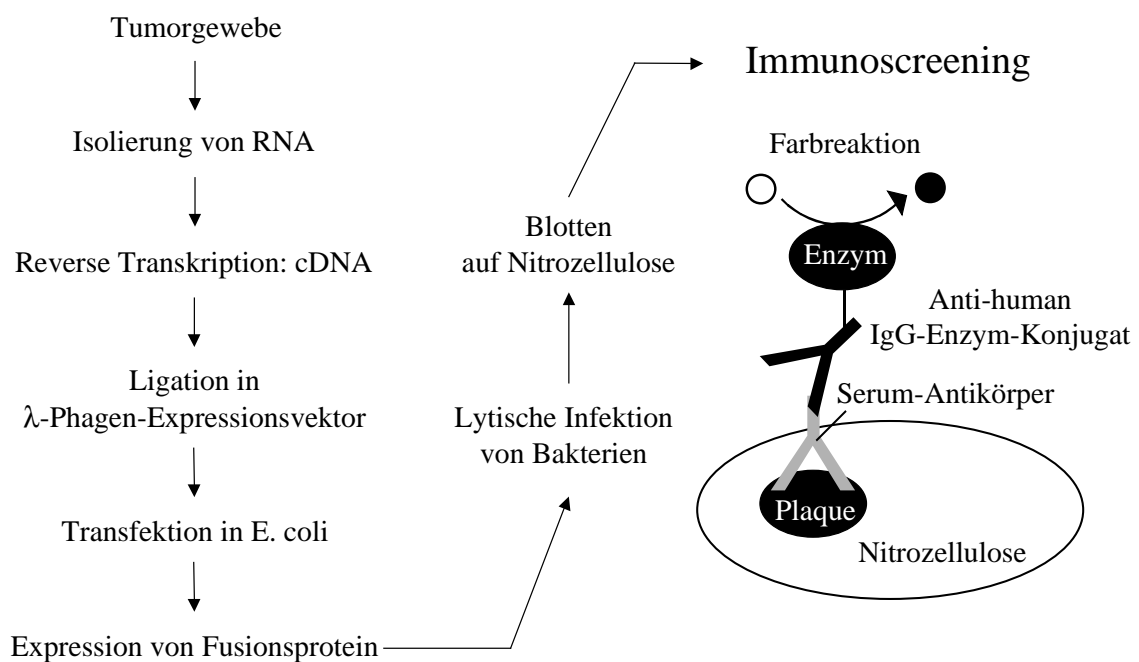


Abbildung 1.3.2.3 Definition tumorspezifischer Antigene mittels SEREX. (Quelle: Türeci et al., 1997)

Die cDNA-Bibliothek wird aus frischem Tumormaterial erstellt und in λ -Phagen kloniert. Rekombinante tumorspezifische Proteine werden während der lytischen Infektion von Bakterien in den Plaques produziert und auf Nitrozellulosefilter übertragen. Diese Filter werden mit verdünntem autologem Patientenserum inkubiert. Gebundene Antikörper werden mit einem

enzymgekoppelten anti-human Antikörper nachgewiesen. Positive Phagenklone werden subkloniert, bis ein vereinzelter Plaque isoliert und die Sequenz der inserierten cDNA ermittelt werden kann.

Unter Verwendung des SEREX-Systems konnte bereits eine Reihe von bekannten sowie neuen Antigenen für unterschiedliche Tumoren identifiziert werden (Chen et al., 1997, Türeci et al., 1997, Scanlan et al., 1998). Diese haben jedoch bisher noch nicht zur Konstruktion neuer Immuntherapeutika beigetragen, da es sich nur bei den wenigsten um tumorassoziierte Oberflächenantigene mit hoher Spezifität handelt. Eine Weiterentwicklung des SEREX-Verfahrens oder eine Kombination mit anderen molekularbiologischen Techniken könnte neue Möglichkeiten in der Suche nach geeigneten Oberflächenantigenen eröffnen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Um Antikörper und Antigene für eine Verwendung in der Immuntherapie von Tumoren zu identifizieren, bedarf es der Weiterentwicklung bestehender Techniken und der Entwicklung neuer Verfahren. Zielsetzung der Arbeit ist es, verbesserte Methoden zur Detektion tumorassoziierten Antigene zu entwickeln, welche auf dem immunologischen Screening von λ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken basieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen tumorassoziierte Antigene für das Mammakarzinom unter Verwendung eines modifizierten SEREX-Systems definiert werden. Mit dem SEREX-Verfahren werden sowohl intrazelluläre als auch Oberflächenantigene in einer cDNA-Bibliothek nachgewiesen. Es werden Banken aus frischem Tumormaterial mit autologem Patientenserum gescreent, welches neben tumorspezifischen Antikörpern auch eine Vielzahl Antikörper anderer Spezifität enthält. Dies führt zu unspezifischen Bindungen an Proteine der cDNA-Expressionsbank und falsch positiven Ergebnissen. Um den Anteil tumorspezifischer Antikörper im Serum zu erhöhen, wird in der vorliegenden Arbeit für das Screening einer Mammakarzinom-spezifischen Bibliothek das Serum immunisierter Mäuse verwendet. Die cDNA-Expressionsbank wird aus RNA der Mammakarzinom-Zelllinien 870-BC und BT-474 erstellt, die aus Primärtumoren hervorgegangen sind. Mäuse werden mit Membranfraktionen derselben Zelllinien immunisiert und das Serum für das Screening der Expressionsbibliothek eingesetzt. Durch die Immunisierung mit Membranfraktionen soll eine Membranantigenspezifische Immunantwort erzielt werden. Das Mausserum sollte also im Idealfall eine hohe Konzentration von Antikörpern gegen Membran- und damit auch gegen Oberflächenantigene der Tumorzellen enthalten. Mit diesen Maßnahmen soll ein SEREX-System etabliert werden, das mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit Tumoroberflächenantigene detektiert, die in der Immuntherapie eingesetzt werden können.

Im zweiten Teil der Arbeit wird eine Verknüpfung zwischen dem phage display System und dem Screening von cDNA-Expressionbanken angestrebt. Es soll eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, das Zielantigen eines mittels phage display isolierten tumorspezifischen Antikörpers zu ermitteln. Zum jetzigen Zeitpunkt können lediglich Angaben über Bindungen an Tumor- und Normalgewebe gemacht, jedoch nicht das Antigen genau bestimmt werden. Es soll gezeigt werden, daß das Zielantigen eines auf filamentösen Phagen exprimierten Antikörpers in einer λ -Phagen-cDNA-Expressionsbank detektiert werden kann. Hierfür werden die bereits in der Einleitung beschriebenen Phagen-Expressionssysteme verwendet. λ -Phagen dienen als Vektor für die Antigen-, filamentöse M13 Phagen als Vehikel für die Antikörper-Expression (Tabelle 1.4).

Als Modellsystem dient das rekombinante CD30-Antigen und das zugehörige anti-CD30 Antikörperfragment Ki-4 scFv. Das CD30-Antigen wird in den Phagen-Expressionvektor ZAP® II kloniert und dieser Klon mit der vorher etablierten Mammakarzinom-spezifischen Phagen-Expressionsbank in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Die Klone der Mammakarzinombank dienen hierbei als irrelevante, CD30-negative Phagen. Es soll gezeigt werden, daß wenige, CD30-exprimierende Phagen in Tausenden irrelevanter, Mammakarzinom-spezifischer Phagen durch Screening mit dem auf filamentösen Phagen exprimierten Ki-4 scFv detektiert werden können. Die gebundenen Phagen werden mit einem anti-M13 Antikörper und einem enzymgekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen.

	Filamentöse Phagen M13 Phage Display	λ -Phagen cDNA-Expressionsbank ZAP® II
Insert	Antikörperfragmente (scFv)	Antigen
Infektionszyklus	Nicht lytisch	Lytisch
Infektion der Wirtszellen	F'-Pilus	Maltose-Rezeptor
Fusionsproteinexpression	p3-Fusionsprotein auf Phagenoberfläche	β -Galactosidase-Fusions- protein innerhalb der Bakterien → nach Lyse in Plaques
Induktion Fusionsprotein- exprimierender Phagen	Infektion Phagmid-tragender Bakterien mit Helferphagen	Infektion von Bakterien mit λ - Phagen, Zugabe von IPTG
Produktion Fusionsprotein	30°C über Nacht	37°C 3,5 Std.
Wirtsbakterien	TG-1	XL1-Blue MRF' XL1-Blue MR

Tabelle 1.4 Charakteristika der in der Arbeit verwendeten Phagen-Expressionsbanken.