Eines der wesentlichen Ziele in der Weiterentwicklung der Therapie maligner Tumore ist die Verbesserung der Selektivität antineoplastischer Medikamente. Monoklonale Antikörper sind seit ihrer Erstbeschreibung durch Koehler und Milstein vor über zwanzig Jahren in dieser Hinsicht große Hoffnungsträger gewesen, aber erst Mitte der 1990er Jahre wurden in nennenswertem Maße Antikörper zur Tumortherapie zugelassen. Ihr Einsatz ist weiterhin beschränkt, und die bisher zugelassenen Präparate sind überwiegend Antikörper der zweiten oder dritten Generation (siehe unten), das heißt chimärisierte oder humanisierte komplette Antikörper aus der Maus.

Molekularbiologische Techniken erlauben die gentechnologische Herstellung von antikörperbasierten Molekülen mit veränderten physiologischen Eigenschaften. Zu diesen zählen die rekombinant exprimierten beiden unterschiedlichen variablen Fragmente der leichten und der schweren Kette eines Antikörpers, die zusammenhängend durch eine Verbindungssequenz funktionell korrekt aneinandergelagert sind. Ein solches sogenanntes Einzelkettenfragment eines Antikörpers (scFv, englisch single-chain-Fragment variable) ist im Gegensatz zu einem kompletten IgG-Molekül zwar nur monovalent und lässt daher nur die Hälfte seiner Affinität erwarten, hat mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa jedoch auch einen deutlich kleineren räumlichen Durchmesser, was im Hinblick auf die Biodistribution im Gewebe günstigere Diffusionseigenschaften erwarten lässt.

Derartige gentechnologisch modifizierte Moleküle eröffnen eine weitere Möglichkeit: die Kombination der Zielfunktion des monoklonalen Antikörpers mit gänzlich anderen Effektorfunktionen. Dabei kann als Effektor ein Toxin oder ein Radioisotop an den Antikörper gekoppelt werden, der dem Antikörper dann eine direkt zytotoxische Wirkung verleiht. Ein weiterer therapeutischer Ansatz in diesem Zusammenhang ist die antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie (im Englischen als "antibody directed enzymprodrug therapy" bezeichnet und im Weiteren mit ADEPT abgekürzt).

Hierbei wird kein zytotoxischer Effektor an den Antikörper gekoppelt, sondern ein Enzym, das eine nicht-toxische Vorstufe eines Chemotherapeutikums, eine sogenannte Prodrug, in eine zytotoxisch aktive Wirksubstanz umwandeln kann. Da dieses bifunktionelle Antigenbindende Molekül an einem Zielantigen des Tumorgewebes bindet, findet die Aktivierung der Prodrug nur lokalisiert im Tumorgewebe statt. Hierfür wurden bisher bei

erfolgsversprechenden klinischen Studien überwiegend chemisch gekoppelte Antikörperkonstrukte verwendet.

An dieser Stelle der bisherigen Entwicklung setzt die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ein: Gentechnologische Methoden erlauben die Herstellung rekombinanter, kleinerer Antikörpermoleküle ohne physiologische Effektorfunktionen wie die erwähnten Single-Chain-Fragmente. Diese können direkt mit neuartigen Effektoren wie Enzymen zur therapeutischen Nutzung oder mit Fluoreszenzfarbstoffen zur diagnostischen Anwendung gekoppelt werden. Während das gentechnologische Entwerfen und Klonieren solcher Moleküle und ihre Herstellung im kleinen experimentellen Maßstab in Säugetierzellen vergleichsweise wenig Probleme aufwerfen, hat sich die Herstellung in einem pharmakologisch verwertbaren Maßstab bisher als schwierig herausgestellt. Eine ökonomische Möglichkeit zur Herstellung rekombinanter Proteine besteht in Bakterien, doch jenseits einer Proteingröße von maximal 70 kDa sind diese kaum noch zur Expression funktioneller Moleküle in der Lage. Darüber hinaus besteht hier das Problem der korrekten post-translationalen Modifizierung bei komplexeren Molekülen. Säugetier-Zellkulturen sind frei von diesen Limitationen, der Aufwand für Kultur und Expression ist aber um ein vielfaches höher, wobei die Ausbeute an gewünschtem Protein erheblich geringer ist. Hefezellen stellen einen Mittelweg dar: Ihre Kultivierung und die verwendbaren molekularbiologischen Techniken sind denen für Bakterien sehr ähnlich, als Eukaryonten erlauben sie jedoch die korrekte Expression von größeren und komplexeren Molekülen in funktioneller Form

Thema der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines Expressionssystems für Fusionsproteine eines Single-Chain-Fragments mit verschiedenen Effektormolekülen, das langfristig für die Therapie des kolorektalen Karzinoms entwickelt werden soll.

Während der Rahmen des Gesamtprojekts auf die Etablierung einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie abzielt, war konkretes Ziel dieser Arbeit, die grundsätzliche Exprimierbarkeit funktionsfähiger Fusionsproteine im Hefesystem mit dem Stamm *Pichia pastoris* zu überprüfen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen möglichen Weg zur Etablierung eines solchen Expressionssystems mit dem Hefestamm *Pichia pastoris* zur Herstellung von bifunktionellen Fusionsantikörpern auf.

Um bei der Etablierung eines Expressionssystems einen direkt nachweisbaren bifunktionalen Fusionsantikörper zur Verfügung zu haben, wurde ein Expressionssystem für einen Fusionsantikörper etabliert, bei dem ein gegen das A33-Zielantigen gerichtetes A33-Single-Chain-Fragment und ein Green-Fluorescent-Protein (GFP) fusioniert sind. Dieser Fusionsantikörper eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, das Zielantigen für eine antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie zu detektieren und somit pathophysiologische Untersuchungen durchzuführen.

Als Zielantigen einer antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie beim kolorektalen Karzinom kann das A33-Oberflächenprotein fungieren, da es auf Kolonkarzinomzellen exprimiert wird. Die Expression von Fusionsantikörpern mit einem A33-Single-Chain-Fragment und einer Enzymkomponente eröffnet die Möglichkeit zur Etablierung eines ADEPT-Ansatzes für das kolorektale Karzinom.

#### 1.1. Das kolorektale Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist mit geschätzten 678.000 Neuerkrankungen jährlich und 394.000 Sterbefällen der vierthäufigste solide Tumor weltweit. Hiervon treten in Deutschland geschätzte 55.000 Neuerkrankungen auf. Damit ist dieses Karzinom das dritthäufigste bei Männern und das zweithäufigste bei Frauen in Deutschland (1).

#### 1.1.1. Prognose

Nach Daten der American Cancer Society beträgt die mittlere Überlebensrate für ein Jahr 82 %, für fünf Jahre 61 % und für 10 Jahre 55 % (2). Diese Zahlen variieren jedoch wie bei den meisten Tumorerkrankungen ganz erheblich in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium bei Diagnosestellung. So beträgt die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate bei lokalisierten Tumoren 90 %, nur 37 % der Tumore werden jedoch in diesem Stadium diagnostiziert. Bei regional metastasierten Tumoren beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate noch 65 % und sinkt bei fernmetastasierten Tumoren auf 8 %. Aufgrund dieser schlechten Prognose des metastasierten kolorektalen Karzinoms werden neben der im Folgenden beschriebenen Standardtherapie eine Vielzahl experimenteller Therapieansätze verfolgt. Zu diesen gehören unter anderem immunologische Therapiekonzepte, die bei der adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms bereits klinisch getestet wurden.

#### 1.1.2. Diagnose

Nach den Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft (3) bleiben Anamnese, insbesondere Familienanamnese und Risikofaktoren, und die klinische Untersuchung die Basis der Diagnostik. Sie werden ergänzt durch Koloskopie und Biopsie oder Doppelkontrasteinlauf mit Rektoskopie und Biopsie bei auffälligem Befund. Weiterhin wird eine Sonographie des Abdomens, ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen und eine Bestimmung des Tumormarkers CEA als Verlaufsparameter der Therapie durchgeführt. Bei unklarem Ergebnis werden diese Untersuchungen um eine Spiral-Computertomographie oder eine Kernspintomographie erweitert. Bei Verdacht auf eine Harnblaseninfiltration erfolgt schließlich eine Zystoskopie, bei Verdacht auf eine Uterusinfiltration eine gynäkologische Untersuchung.

## **1.1.3. Staging**

Das pathologische Staging nach der TNM-Klassifikation (Tabelle 1.1.) dient der Einteilung der Erkrankung in Bezug auf die Größe des Primärtumors (T), das Ausmaß des Lymphknotenbefalls (N) und die Metastasierung (M).

T	Primärtumor				
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden				
Т0	kein Anhalt für einen Primärtumor				
Tis	Carcinoma in situ				
T1	Tumor infiltriert die Submukosa				
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria				
Т3	Tumor infiltriert die Subserosa bzw. das nicht-				
	peritonealisierte parakolische bzw. pararektale Gewebe				
T4	Tumor perforiert das viszerale Peritoneum und /				
	oder infiltriert direkt andere Organe				
N	regionale Lymphknoten				
NX	regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden				
N1	Metastasen in 1-3 parakolischen-pararektalen Lymphknoten				
N2	Metastasen in mehr als 4 parakolischen-pararektalen				
	Lymphknoten				
M	Fernmetastasen				
MX	vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden				
M0	keine Fernmetastasen				
M1	Fernmetastasen				

Tabelle 1.1. TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (modifiziert nach Böckler 2001 (4))

Entscheidende prognoserelevante Übergänge beim Staging (Tabelle 1.2.) sind das Überschreiten der Muscularis propria, das den Unterschied zwischen UICC I/Dukes A zu UICC II/Dukes B markiert, und das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (UICC III/Dukes C) oder Fernmetastasen (UICC IV/Dukes D).

Aus der TNM-Klassifikation lässt sich die klinische Stadieneinteilung ableiten, die Entscheidungsgrundlage für die Therapiewahl sowie Prognosefaktor ist (5):

UICC Stadium	TNM-Klassifikation			Dukes	5-Jahres- Überlebensrate
Stadium 0	Tis	N0	M0		
Stadium I	T1-T2	N0	M0	Dukes A	90-95%
Stadium II	T3-T4	N0	M0	Dukes B	60-80%
Stadium III	Jedes T	N1-N2	M0	Dukes C	30-50%
Stadium IV	Jedes T	jedes N	M1	(Dukes D)	<10%

Tabelle 1.2. Stadiengruppierung aus der TNM-Klassifikation nach UICC und Dukes (6)

# 1.1.4. Standardtherapie

Die etablierten Therapieformen des kolorektalen Karzinoms lassen sich nach ihrer Intention in kurativ, adjuvant und palliativ unterteilen (7):

#### 1.1.4.1. Kurative Operation

Die R0-Resektion des Tumors ist die einzige kurative Option beim kolorektalen Karzinom. Dementsprechend stellt der operative Eingriff die Grundlage der onkologischen Therapie dar, wobei eine kurativ intendierte Resektion des Tumors grundsätzlich auch bei metastasierten Tumoren möglich ist. So wird bei R0-Resektion von bis zu fünf Lebermetastasen oder aber bei mehr als fünf Lebermetastasen, wenn diese durch Lebersegmentresektion komplett zu entfernen sind, von einer 5-Jahres-Überlebensrate von 20-40 % berichtet (8). Aus der intraund postoperativen pathohistologischen Diagnostik ergibt sich die endgültige Einteilung in die TNM-Klassifikation.

# 1.1.4.2. Adjuvante Therapie

Eine adjuvante Therapie nach R0-Resektion des Primärtumors wird im Stadium UICC III empfohlen und für das Stadium UICC II untersucht. Verschiedene Kombinationsschemata werden eingesetzt, wobei 5-FU (5-Fluoruracil) eine zentrale Rolle spielt (Tabelle 1.3.).

5-FU ist eine zytotoxische Substanz, die zur Substanzklasse der Pyrimidinanaloga zählt. Dabei beruht die zytotoxische Wirkung auf zwei Mechanismen: Zum einen bildet 5-FU (in der Zelle als aktiviertes 5-Fluordesoxyuridinmonophosphat) einen Komplex mit der Thymidin-Synthetase und verhindert so die Bildung von Thymidinnucleotiden. Zum anderen wird 5-FU als "falsches" Nucleotid in die RNS eingebaut (9).

Studie	Lokalisation /	Stadium	Adjuvante Behandlung	5-Jahres
	Studiendauer			Überleben(%)
NSABP C-04	Colon	II-III	5-FU, Levamisol	69
			5-FU, Leucovorin	74
Wolmark 1999 (10)	1989-1990		5-FU, Levamisol, Leucovorin	72
Intergroup-0089	Colon	II-III	5-FU, Leucovorin LD (6 Mon.)	71 <sup>a</sup>
			5-FU, Leucovorin HD (12 Mon.)	70 <sup>a</sup>
Haller 1997 (11)			5-FU, Levamisol, Leucovorin LD (6 Mon.)	73 <sup>a</sup>
			5-FU, Levamisol (12 Mon.)	67 <sup>a</sup>
NCCTG 89-46-51	Colon	II-III	5-FU, Levamisol (6 Mon.)	60
Can Cancer Inst.	Colon		5-FU, Levamisol (12 Mon.)	68
O'Connell 1998 (12)	1989-1991		5-FU, Levamisol, Leucovorin (6 Mon.)	70
			5-FU, Levamisol, Leucovorin (12 Mon.)	63

LD = low dose (20 mg/m<sup>2</sup> Leucovorin), HD = high dose (500 mg/m<sup>2</sup> Leucovorin), a= 4-Jahres-Überlebensrate

Tabelle 1.3. Kombinationstherapien basierend auf 5-Fluoruracil (5-FU) der adjuvanten Chemotherapie beim kolorektalen Karzinom.

#### 1.1.4.3. Palliative Therapie

Das Ziel der palliativen Therapie ist die Verbesserung der Lebensqualität des Patienten sowie eine Verlängerung der Lebenszeit. Bevor man mit der palliativen Therapie beginnt, muss interdisziplinär geklärt sein, ob der Tumor inoperabel ist. Auch in diesem Fall kann die Resektion des Primärtumors indiziert sein, um die Darmpassage zu erhalten. Die operative Resektion von Fernmetastasen kann bei Funktionsbeeinträchtigung des befallenen Organs sinnvoll sein.

Die palliative Chemotherapie beruht ebenfalls hauptsächlich auf 5-Fluoruracil. Diese besteht aus der Kombination von 5-FU und Folinsäure allein oder mit Irinotecan oder Oxaliplatin. Verschiedene Schemata wurden hierfür erprobt. Während sich die mit 5-FU erreichbare 15 %ige Ansprechrate teilweise verbessern ließ, konnte eine signifikante Verlängerung der 5-Jahres-Überlebensrate dadurch bisher nicht erreicht werden.

# 1.1.4.4. Unerwünschte Wirkungen der Chemotherapie

Die akute und chronische Toxizität bei 5-Fluoruracil besteht aus folgenden unerwünschten Wirkungen (13): Häufig finden sich Myelosupression, Nausea, Hautausschlag, Alopezie. Selten treten lokale Irritationen an der Injektionsstelle oder Fieber auf. In seltensten Fällen werden allergische Reaktionen beobachtet. Betrachtet man die Organtoxizität von 5-Fluoruracil, so treten häufig Mukositis, Diarrhoe, Stomatitis und Anorexie auf.. Selten sind dagegen Kardio-, Hepato- und Neurotoxizität.

#### 1.1.5. Weiterentwickelte Chemotherapeutika

Um bei der chemotherapeutischen Behandlung des kolorektalen Karzinoms die genannten Nebenwirkungen des Wirkstoffes 5-Fluoruracil zu vermindern, wurden weitere Substanzen, die die Thymidin-Synthetase hemmen, entwickelt. Tegafur ist dabei eine Vorläufersubstanz, die im Körper zu 5-Fluoruracil umgewandelt wird. Diese wird zur Wirkungssteigerung in Kombination mit dem Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Inhibitor Uracil oral verabreicht. Mit dieser oralen Therapie konnten zwar Nebenwirkungen abgeschwächt werden, doch ergab sich keine verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zur Standardchemotherapie (14). Capecetabin ist ebenfalls ein oral verabreichter Wirkstoff, der auch in 5-Fluoruracil umgewandelt wird. Dabei zeigte sich eine geringfügige Steigerung der Ansprechrate im Vergleich zu einer Therapie mit 5-Fluoruracil/Leucovorin (15). Für den Thymidin-Synthetase-Inhibitor Raltitrexed kann ebenfalls ein Wirkungsnachweis erbracht werden (16). Außerdem gibt es Wirkstoffe bei der Therapie des kolorektalen Karzinoms, die nicht zu der Klasse der Thymidin-Synthetase-Inhibitoren zählen. Dazu gehört der Platin-Wirkstoff Oxaliplatin, der synergistische Effekte mit 5-Fluoruracil zeigt, aber auch als Einzelsubstanz

wirksam ist (17). Weiterhin wird der Topoisomerase-I-Hemmer Irinotecan bei der Behandlung des kolorektalen Karzinoms verwendet (18).

#### 1.1.6. Immunologische Therapieansätze

Die immunologischen Therapieansätze haben zum einen das Ziel, das körpereigene Immunsystem gegen Tumorzellen zu mobilisieren. Hierbei müssen tumoreigene Antigene vom Immunsystem als Zielantigen erkannt werden, damit eine gerichtete Abwehrreaktion gegen das Tumorgewebe ablaufen kann. Diese Therapieansätze ermöglichen im Gegensatz zur Chemotherapie auch die Wirkung gegen nicht proliferierende Tumorzellen. Zur Immuntherapie werden unter anderem die Vakzinierungs- und die Antikörpertherapie gezählt. Zum anderen können Antikörper mit Radioistopen (19), Toxinen (20) oder Enzymen gekoppelt werden. Damit bekommt der Antikörper nicht mehr die Aufgabe, das Immunsystem gegen den Tumor zu aktivieren, sondern die gebundenen Antikörper wirken direkt toxisch oder wandeln eine nicht toxische Vorläufersubstanz in einen zelltoxischen Wirkstoff um.

#### 1.1.6.1. Vakzinierungstherapie

Bei einer in Phase III getesteten Vakzinierungstherapie wurden Tumorzellen der Patienten entnommen und anschließend bestrahlt, um ihre Teilungsfähigkeit zu zerstören. Diese Tumorzellen wurden dann dem selben Patienten appliziert, um eine Immunantwort gegen verbliebenes oder neu entstehendes Tumorgewebe auszulösen. Dabei wirken die verschiedenen Oberflächenproteine auf den Tumorzellen antigen. Diese Oberflächenmoleküle werden von Antigen-präsentierenden-Zellen prozessiert und in Fragmenten präsentiert, wodurch CD4 positive T-Helferzellen zur Produktion von Immunmediatoren angeregt werden, die zum einen die Produktion von Antikörpern in B-Zellen anregen und zum anderen CD8 positive, zytotoxische T-Killerzellen gegen den Tumor aktivieren. In dieser Studie mit 254 Patienten mit einem Kolonkarzinom in Stadium II oder III ist gezeigt worden, dass eine Immunisierung mit bestrahlten Tumorzellen sechs Monate nach einer chirurgischen Resektion bei 44% der Patienten das Intervall der Tumorprogression im Vergleich zu nicht

immunisierten Patienten verlängerte. Dabei wurde aber keine Zunahme der Gesamtlebenszeit erreicht (21).

#### 1.1.6.2. Antikörpertherapie

Für die Antikörpertherapie wurden Antikörper entwickelt, die gegen ein Zielantigen auf Tumorgewebszellen gerichtet sind. Diese werden appliziert, um an das Zielantigen zu binden und dieses somit für das Immunsystem als Angriffspunkt zu markieren. Dabei soll am Tumor eine Komplement- oder Antikörper-vermittelte zytotoxische Reaktion ausgelöst werden. Um eine zielgerichtete Therapie zu ermöglichen, müssen die Zielantigene entweder im Vergleich zu gesundem Gewebe von den Tumorzellen überexprimiert oder – idealerweise - nur von ihnen exprimiert werden.

Zur Zeit wird der Antikörper Edrecolomab in klinischen Studien erprobt. Dieser ist gegen das Zelloberflächenglykoprotein 17-1A gerichtet. In einer randomisierten Studie wurde seine Wirksamkeit beim kolorektalen Karzinom im Stadium Dukes C gezeigt (22). Eine Zunahme der Überlebenszeit im Vergleich zu einer nicht mit Edrecolomab behandelten Kontrollgruppe war jedoch nicht zu beobachten (23).

Außerdem wird der Antikörper Cetuximab auf seine Wirksamkeit beim kolorektalen Karzinom getestet. Dieser bindet an den Epidermal Growth Factor, ein transmembranäres Zelloberflächenprotein. In einer Phase II Studie bei Patienten mit refraktärem Kolonkarzinom gegen 5-Fluoruracil und Irinotecan wurde Cetuximab mit Irinotecan eingesetzt. Dabei zeigten 27 % der Patienten ein partielles Ansprechen und 9 % ein Nicht-Fortschreiten der Erkrankung (24).

#### 1.2. Therapeutische Antikörperkonstrukte

Die Entwicklung und Herstellung von Antikörperkonstrukten lässt die Einteilung in fünf verschiedene Antikörpergenerationen zu.

Zur ersten Generation zählen polyklonale Antikörper, die an eine Vielzahl von Antigenen binden können und somit nicht in der Lage sind, ein definiertes Zielantigen spezifisch zu erkennen. Mit ihnen ist eine definierte Immuntherapie nicht zu realisieren (25). Diese

Generation kommt in Form von Antiseren zum Beispiel bei einer Digoxin-Intoxikation zum therapeutischen Einsatz (26).

Die zweite Generation sind monoklonale Antikörper gegen tumorzellspezifische- oder tumorgewebespezifische Antigenstrukturen, die eine gezielte Verwendung von Antikörperbasierten Therapieansätzen möglich macht (27). Die Antikörper werden durch Immunisierung von Mäusen gegen ein Tumorantigen generiert. Um die Herstellung der spezifischen Antikörper in Zellkultursystemen zu ermöglichen, werden die antikörperproduzierenden Zellen des murinen Immunsystems anschließend mit Lymphomzelllinien fusioniert. Durch dieses Verfahren werden Hybridomzellen erzeugt, die die Antikörperproduktion der murinen Zelle mit der "Unsterblichkeit" einer Tumorzelle vereinen. Die hierbei erzeugten Antikörper haben bei der therapeutischen Nutzung den Nachteil, dass sie als körperfremde Proteine erkannt werden und selbst zum Ziel des Immunsystems werden (28).

Mit der dritten Generation wurde versucht, dieses Hindernis zu überwinden. Diese Antikörper sind rekombinant modifizierte, murine Antikörper, die sich in chimäre und humanisierte einteilen lassen. Bei den chimären Antikörpern ist das Antikörperrückgrat in Form des Fc-Fragments und der konstanten Region humaner Herkunft, während die variablen Regionen aus einer immunisierten Spezies stammen (29). Eine weitere Verringerung der Immunogenität wurde durch humanisierte Antikörper erreicht. Diese Gruppe von rekombinanten Antikörpern besteht aus einem kompletten humanen Immunglobulin, bei dem nur noch die das Antigen bindenden hypervariablen Regionen (im Englischen als "Complementarity Determining Region", CDR, bezeichnet) aus der ursprünglich immunisierten Spezies stammen (30).

Durch Phage-display-Technologie lassen sich rekombinante Antikörper der vierten Generation erzeugen. Hierfür bedarf es keiner Immunisierung lebender Tiere mit einem Antigen. Statt dessen werden Vektoren benutzt, die in Phagen aufgenommen werden können. Diese Vektoren kodieren zum einen für die DNA-Sequenz eines Oberflächenproteins des Phagen und zum anderen für rekombinante, natürliche, humane Antikörpersequenzen oder für eingefügte randomisierte Sequenzen aus DNA-Bibliotheken in einem Antikörperrahmen (31). Bei der Proteinsynthese des Oberflächenproteins entsteht somit die Antigen-bindende Proteinstruktur, die auf der Phagenoberfläche präsentiert wird. Durch Selektion nach der Bindungsaffinität zum Zielantigen können Phagen gefunden werden, die eine spezifische Antigen-bindende Proteinstruktur auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei dieser Methode liegen DNA-Sequenz des Antigen-bindenden Moleküls und dessen Proteinstruktur zugleich

und identifizierbar im Phagen vor. Die DNA-Sequenzen lassen sich sequenzieren und anschließend in anderen Vektoren und Mikroorganismen funktionell exprimieren (32).

Beruhend auf diesen Synthesestrategien finden sich in der fünften Generation Antikörperkonstrukte, die nicht mehr das komplette Antikörperrückgrat aufweisen. Zu diesen zählen zum Beispiel rekombinant herstellbare F(ab)'-Fragmente oder Single-Chain-Fragmente (33). Ein Single-Chain-Fragment besteht aus den variablen Regionen der leichten und schweren Kette eines Antikörpers, die über eine Aminosäurenbrücke (im Folgenden als "Linker" bezeichnet) verbunden sind. Beide Teilketten zusammen bilden die Antigenbindende Region. Im Vergleich zum Single-Chain-Fragment besitzt das F(ab)'-Fragment noch die konstanten Domänen der leichten und schweren Kette eines Antikörpers und hat damit das doppelte Molekulargewicht. Beide binden an das Zielantigen, ohne aber eine Effektorfunktion im Sinne einer gezielten Aktivierung des Immunsystems gegen ein Antigen zu besitzen. Diese Antigen bindenden Moleküle können mit weiteren Komponenten wie Toxinen, Radioisotopen oder Enzymen verbunden werden und erhalten dadurch eine zusätzliche Funktion. Diese Verbindung ist durch chemische Konjugation (34) oder durch rekombinante Fusion (35) der DNA-Sequenzen des Antikörperfragments und der Effektorkomponente möglich.

#### 1.2.1. Antikörpergesteuerte Enzym-Prodrug-Therapie (ADEPT)

Bei der antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie handelt es sich um ein Zweistufenkonzept wie es in Abb. 1.1. dargestellt ist. Während der ersten Stufe bindet ein Antikörper an ein tumorspezifisches- oder tumorgewebespezifisches Antigen. Dieser Antikörper besitzt außerdem eine enzymatische Komponente, die als chemisches Konjugat (36) oder als Teil eines Fusionsproteins (37) an den Antikörper gekoppelt ist.

Nach der systemischen Applizierung und einer pharmakologischen Wirkzeit muss das nicht am Tumor gebundene bifunktionelle Antikörperkonstrukt aus dem Organismus eliminiert werden, um eine gezielte enzymatische Aktivierung der Prodrug am Tumor zu ermöglichen (38).

Als zweite Stufe wird mit der systemischen Gabe einer Prodrug begonnen. Diese Prodrug wird durch die enzymatische Komponente der Antikörper-Enzym-Verbindung respektive des

Fusionsantikörpers in eine zytotoxische Substanz umgesetzt, die am Tumor und dessen assoziiertem Gewebe, wie zum Beispiel Blutgefäßen, wirken kann (39).

In den ersten Beschreibungen des ADEPT-Prinzips wurden murine Antikörper verwendet (36), die eine hohe immunogene Potenz haben (40). Diese kann durch Humanisierung (41) oder Polyethylen-glycol-Modifizierung (42) des Antikörpers reduziert werden.

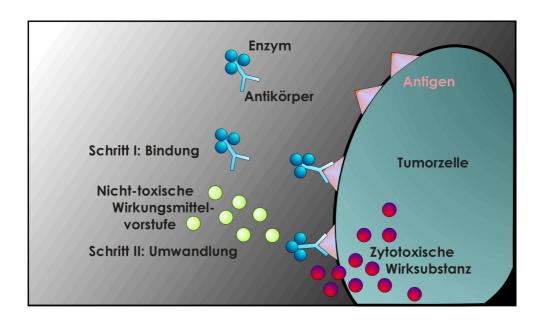


Abb. 1.1. Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie (ADEPT). Nach der Applizierung des Fusionsantikörpers bindet dieser an das tumorspezifische Zielantigen (Schritt I). Anschließend wird die nicht-toxische Prodrug durch die Enzymkomponente in eine zytotoxische Wirksubstanz umgewandelt, die dann auf das Tumorgewebe wirken kann (Schritt II).

Da das Tumorgewebe eine geringe Aufnahme von Makromolekülen, wie zum Beispiel kompletten Antikörpern, zeigt (38), muss es das Ziel sein, die Aufnahme des Antikörpers in das Tumorgewebe so weit wie möglich zu steigern. Durch Verwendung von kleineren Molekülen, wie F(ab)'-Fragmenten (43) und Single-Chain-Fragmenten (44), ist dieses möglich.

Neben der Penetration des Tumorgewebes muss eine schnelle systemische Elimination des verwendeten Fusionsantikörpers erfolgen, um die systemische Aktivierung einer Prodrug durch die enzymatische Komponente des Moleküls zu verhindern (45). Je schneller das bifunktionelle Makromolekül aus dem Körper eliminiert wird und je stärker die Penetration

des Tumors ist, desto ausgeprägter verschiebt sich der relative Konzentrationsunterschied von aktivierter Prodrug im Tumorgewebe und zirkulierender Prodrug im Blut und in anderen Geweben zu Gunsten des Tumorgewebes. Damit werden auf der einen Seite systemische Nebenwirkungen reduziert, auf der anderen Seite wird die Konzentration der Wirksubstanz im Tumor erhöht (46).

Die gekoppelten oder fusionierten Enzyme sollten eine spezifische Reaktion katalysieren, die von keinem zirkulierenden, körpereigenen Enzym ebenfalls katalysiert werden kann. Darüber hinaus sollte die enzymatische Aktivität unter den körpereigenen Bedingungen nicht abgeschwächt sein.

Es gibt Enzyme, die kein Äquivalent in Säugetierorganismen haben, wie z.B. die Cytosindeaminase (47). Diese haben den Vorteil, dass es zu keiner systemischen Aktivierung der Prodrug durch körpereigene Enzyme kommen kann. Dem gegenüber steht eine hohe immunogene Potenz.

Weiterhin gibt es säugetierfremde Enzyme, die aber ein körpereigenes Äquivalent haben. Ein Beispiel hierfür ist die β-Galaktosidase (48). Diese Enzyme sollten in einer geringen Konzentration im Blut vorliegen, um die systemische Aktivierung der Prodrug so gering wie möglich zu halten. Das körperfremde Enzym sollte des Weiteren eine höhere katalytische Aktivität als das körpereigene Enzym aufweisen.

Als letzte Gruppe sind die körpereigenen Enzyme zu nennen. Hierzu zählen die alkalische Phosphathase oder die Carboxypeptidase A. Ihr Hauptvorteil ist die Reduktion der immunogenen Potenz. Mit diesen Enzymen kann es allerdings zur systemischen Aktivierung der Prodrug kommen (40).

# 1.2.2. Anwendung der antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie beim kolorektalen Karzinom

Ein mögliches Zielantigen beim kolorektalen Karzinom ist ein durch den A33-Antikörper erkanntes Zelloberflächenprotein, das als A33 Antigen bezeichnet wird. Ein dieses Zielantigen nutzendes ADEPT-System (Abb. 1.2.) kann auf einem Fusionsantikörper basieren, dessen zwei Komponenten das A33-Single-Chain-Fragment und das Enzym Cytosindeaminase sind (49).

Das A33 Zielantigen ist ein ca. 43 kDa großes Zelloberflächenmolekül, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es wird von normalem gastrointestinalem Gewebe und von 95% der Kolonkarzinome – sowohl Primärtumoren wie Metastasen - exprimiert. Auf anderen Gewebetypen wird das A33-Antigen kaum exprimiert (50).

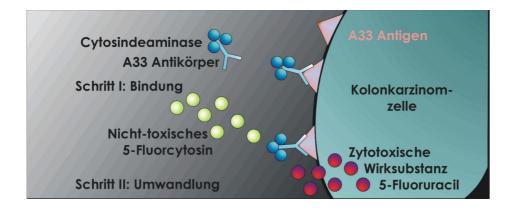


Abb. 1.2. Darstellung der antikörpergesteuerten Enzym-Prodrug-Therapie für das kolorektale Karzinom. Der Fusionsantikörper besteht aus dem A33-Single-Chain-Fragment sowie einer fusionierten Cytosindeaminase. Er bindet im ersten Schritt an das A33-Zielantigen und wandelt im zweiten Schritt die nicht-toxische Prodrug 5-Fluorcytosin in die zytotoxische Wirksubstanz 5-Fluoruracil um.

Der murine A33 Antikörper fand bereits Anwendung in einer klinischen Studie der Phase I/II und zeigte hier eine hohe Spezifität für das Kolonkarzinomgewebe, bei dem die Bindung bis zu 6 Wochen nachweisbar blieb, wo hingegen der Antikörper auf normalem gastrointestinalen Gewebe nach 5 bis 6 Tagen nicht mehr detektierbar war. Dieser Antikörper trug als zytotoxische Komponente <sup>131</sup>Jod oder <sup>125</sup>Jod (51, 52). Die murine Version des Antikörpers wurde humanisiert (41) und in einer klinischen Studie der Phase I/II eingesetzt (51). Das bakterielle Enzym Cytosindeaminase katalysiert die Umwandlung des für Säugerzellen ungiftigen 5-Fluorcytosin zu 5-Fluoruracil (53), dessen Bedeutung für die chemotherapeutische Behandlung bereits dargelegt wurde.

## 1.3. Expressionssysteme für rekombinante Proteine

#### 1.3.1. Expression von A33 Fusionsantikörpern in Escherichia coli

Die beiden funktionellen Anteile des hier vorgestellten rekombinanten Fusionsantikörpers der fünften Antikörpergeneration sind das A33-Single-Chain-Fragment und das Green-Fluorescent-Protein (GFP).

Der A33rbGFP Fusionsantikörper besteht aus vier DNA-Sequenzen, die in den bakteriellen Expressionsvektor pET 25 (Invitrogen, Groningen) ligiert wurden. Diese DNA-Sequenzen kodieren für die leichte und schwere Kette des A33-Single-Chain-Antikörper (54), einen "Linker" und das Green-Fluorescent-Protein (siehe auch Abb. 3.1.).

Die Sequenzen sind so kloniert, dass bei der Translation zuerst die variablen Regionen der leichten Kette synthetisiert werden. Im Anschluss folgt der als "Linker" bezeichnete DNA-Abschnitt, der durch seine Proteinstruktur eine sterische Flexibilität zwischen der leichten Kette und der schweren Kette des Single-Chain-Fragments erlaubt. Diese Funktion wird durch eine Sequenz des "Linkers" erreicht, die für mehrere Glycin- und Serinreste kodiert (55). Als letztes folgt die DNA-Sequenz des Green-Fluorescent-Protein.

Der A33rbGFP Fusionsantikörper bietet die Möglichkeit, seine Bifunktionalität nach einer erfolgreichen Expression durch einstufige, funktionelle Assays nachzuweisen (Abb. 1.3.). Dabei bindet zum einen der A33-Single-Chain-Antikörper an das A33-Zielantigen. Zum anderen ist das Green-Fluorescent-Protein in der Lage, nach Anregung mit UV-Licht grünes Licht abzustrahlen (56). Diese Bifunktionalität des A33rbGFP Fusionsantikörpers kann durch semiquantitative Fluoreszenzmikroskopie oder als quantitative Durchflusszytometrie dargestellt werden. Dabei kann nach Anregung mit UV-Licht der relative Fluoreszenzunterschied zwischen nativen Tumorzellen und solchen, an denen der A33rbGFP Fusionsantikörper gebunden hat, beurteilt werden.

Damit ist der A33rbGFP Fusionsantikörper ein Werkzeug für die schnelle Beurteilung von Expressionssystemen in Bezug auf ihre Fähigkeit, lösliche und funktionelle Proteine zu exprimieren.

Darüber hinaus ist mit ihm auch die Nachweisführung gegen das A33-Zielantigen auf Zelloberflächen möglich. Dabei ist ein zu überprüfender Aspekt, ob die Dichte der A33-Oberflächenantigene auf verschiedenen Tumorzelllinien unterschiedlich stark ist. Dieses ist

für die tierexperimentelle oder klinische Anwendung des ADEPT-Systems von Interesse, da nur Tumoren mit einer A33-Antigenexpression auf ihren Zellen mit diesem ADEPT-System behandelt werden können. Die Oberflächenpräsentation des A33-Antigens ist durch die Fluoreszenz des gebundenen A33rbGFP Fusionsantikörpers am Antigen zu bewerten.

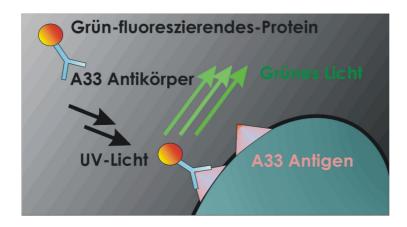


Abb. 1.3. Darstellung der Funktionsweise des A33rbGFP-Fusionsantikörpers. Das A33-Single-Chain-Fragment bindet am A33-Zielantigen. Als zweite funktionelle Komponente besitzt er das Green-Fluorescent-Protein (GFP), das nach der Anregung durch UV-Licht grünes Licht abstrahlt.

Außerdem wurde ein für das ADEPT-Konzept beim kolorektalen Karzinom nutzbarer Fusionsantikörper von Deckert et al. mittels eines pET25-Vektorkonstrukts in *Escherichia coli* exprimiert. Dieser besteht aus dem A33-Single-Chain-Fragment und einer bakteriellen Cytosindeaminase (im Weiteren als "A33rbCD Fusionsantikörper" bezeichnet). Nach seiner Renaturierung zeigte er funktionelle Eigenschaften in Bezug auf die Antikörperund Enzymfunktion (siehe auch Abb. 3.2.).

Es standen ebenso Hefeklone zur Verfügung, die bereits mit einem pPIC 9 (Invitrogen, Groningen) Vektor, der die A33rbCD DNA-Sequenz trug, transfiziert waren. Ein Test auf ihr Expressionsverhalten war noch nicht vorgenommen worden.

# 1.3.2. Verwendung von Hefen als Expressionssystem im Vergleich zu bakteriellen Expressionssystemen

Bakterielle Expressionssysteme zur Herstellung von Fusionsmolekülen beinhalten strukturelle Nachteile, die bei der Herstellung funktioneller Proteine in größerer Menge hinderlich wirken.

Da Bakterien als prokaryontische Organismen über keine membrangetrennten Zellorganellen verfügen (Abb. 1.4.), werden die Proteine direkt im reduzierend wirkenden Zytosol synthetisiert und können sich hier zu Aggregaten zusammenlagern (57). Diese Aggregate werden als Einschlusskörper (inclusion-bodies) bezeichnet. Sie sind meist unlöslich und funktionslos. Außerdem sind häufig die Disulfidbrücken aufgrund der reduzierenden Umgebung nicht oder fehlerhaft ausgebildet, wodurch die sterische Form des Antikörpers nicht korrekt ausgebildet wird. Dieses macht ein anschließendes Verfahren zur Renaturierung der Proteine nötig (58). Um die Löslichkeit der exprimierten Antikörper zu erreichen, müssen fehlerhaft ausgebildete Disulfidbrücken durch Reduktion getrennt werden (59). Die sterisch korrekte und funktionale Faltung des Antikörpers zur Ausbildung korrekter Disulfidbrücken wird dann durch oxidierende Verfahren erreicht (60).

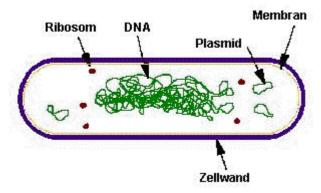


Abb. 1.4. Schematische Darstellung einer prokaryontische Zelle, bei der alle Organellen sowie der Zellkern nicht durch Membranen getrennt im Zytosol liegen. (mit freundlicher Genehmigung von Ernst Georg Beck, Zentrale für Unterrichtsmedien im Internet e.V.)

Demgegenüber stehen die eukaryontischen Expressionssysteme, bei denen die Zellen einen vom Zytoplasma abgegrenzten Zellkern sowie Zellorganellen mit eigenen Membranen besitzen, wie die Mitochondrien, das endoplasmatische Reticulum und den Golgi-Apparat. (Abb. 1.5). Die Stoffwechselreaktionen finden nicht mehr alle im Zytoplasma statt, sondern sind auf die verschiedenen membrangetrennten Zellorganellen aufgeteilt, wodurch komplexere Stoffwechsel-bzw. Syntheseschritte, wie zum Beispiel die Glykolysierung, realisiert werden können.

Für diese Expressionssysteme stehen Säugetier-, Insekten-, und Hefezellen zur Verfügung. Säugetierzellenexpressionssysteme zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, dass sie alle Signale zur Synthese, zur post-translationalen Modifizierung und zur Sekretion erkennen können (61). Dadurch ist der Anteil der funktionellen Antikörper hoch, wobei aber der

Gesamtertrag an exprimiertem Protein deutlich unter dem Niveau der prokaryontischen Expression bleibt (62).

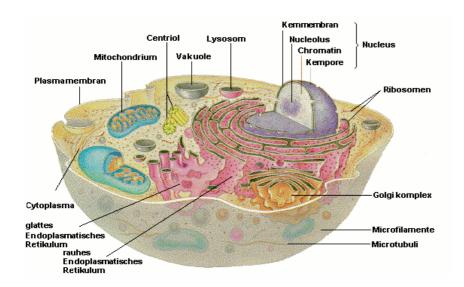


Abb. 1.5. Schematische Darstellung einer eukaryontischen Zelle mit ihren durch Membran getrennten Organellen. (mit freundlicher Genehmigung von Ernst Georg Beck, Zentrale für Unterrichtsmedien im Internet e.V.)

Insektenzellenexpressionssysteme hingegen erlauben die Expression von großen Mengen an Protein (63). Auch Insektenzellen sind in der Lage, Signale bei der post-translationalen Modifizierung zu erkennen und umzusetzen (64). Beide Systeme haben aber den Nachteil, dass sie nur unter aufwendigen Wachstumsbedingungen zu kultivieren sind.

Im Gegensatz zu den beschriebenen eukaryontischen Expressionssystemen, sind Hefen bei leicht zu erreichenden Wachstums- und Expressionsbedingungen einfach zu kultivieren (65). Sie bieten ein niederes eukaryontisches Organellensystem, wodurch die Prozessierung, Faltung und post-translationale Modifikation ermöglicht werden. Dazu zählen zum Beispiel die proteolytische Spaltung, die Ausbildung von Disulfidbrücken und die Glykolysierung von Proteinen. Hiermit wird es möglich, komplexe, biologisch aktive Proteine zu exprimieren (66). Die intrazellulär synthetisierten Proteine können mit Hilfe von Signalsequenzen durch posttranslationale Prozessierung ins Medium sezerniert werden.

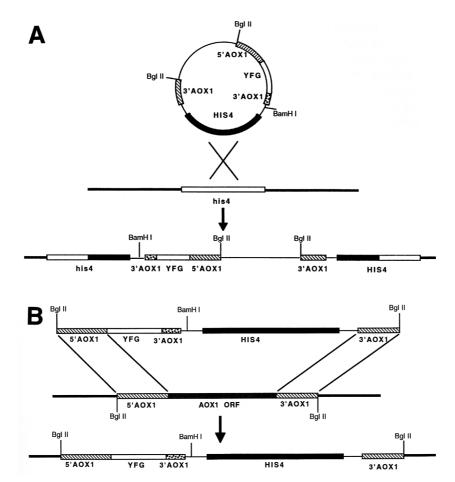


Abb. 1.6. Integration des Expressionsvektors in das *Pichia pastoris* Genom:

(A)Einfache Crossover-Insertion in den Genlocus His4 der Histidinsynthetase mit Einführung der Alkoholoxidase (AOX) und des zu exprimierenden DNA-Abschnitts (YFG).
(B)Ω-Integration durch Ersetzen des AOX 1 Gens (AOX1 ORF) durch ein Vektorkonstrukt mit einer Histidinsynthetase (HIS4) und dem zu exprimierenden DNA-Abschnitt (YFG).
(modifiziert nach Cregg et al.)

Cregg et al. haben ein Hefeexpressionssystem mit der Hefe des Stammes *Pichia pastoris* etabliert (67). Diese Spezies ist fakultativ methanoltroph , das heißt, sie kann bei Bedarf Methanol als einzige Kohlenhydratquelle verwenden.

Als Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges gilt die Alkoholoxidase (AOX) (68), welche in zwei Formen - AOX 1 und AOX 2 - vorliegt, von denen AOX 1 den überwiegenden Anteil stellt. Diese Enzyme sind durch ihre Gene auf Transkriptionsebene streng reguliert (69). Dadurch kann der durch Methanol induzierbare AOX1-Promotor für die Überexpression eines rekombinanten Gens verwendet werden, das anstelle des AOX 1Gens in das Hefegenom integriert wurde. Diese Integration kann mit kommerziellen Vektoren wie z.B. pPIC 9, Invitrogen, Groningen) erreicht werden.

Bei der Crossover-Insertion wird der Teil des Vektors am His4 Genlocus so integriert, dass durch den im Vektor enthaltenden Genlocus HIS4 zwei neue komplette Genloci (HIS4 und His4) entstehen, die den zu exprimierenden DNA-Abschnitt flankieren (Abb. 1.6.). Bei der Ω-Insertion dagegen erfolgt zuerst die Anlagerung der flankierenden DNA-Abschnitte des auf dem Vektor vorhandenen AOX 1 Gens mit denen des Hefegenoms. Bei der Replikation des DNA-Stranges erfolgt dann die Integration des Vektors mit der zu exprimierenden DNA-Sequenz. (Abb. 1.6.). Da diese beiden Integrationsarten direkt in das Genom der Hefezelle erfolgen, bleiben sie anders als bei Plasmidvektoren in Bakterien auch dann erhalten, wenn der zur Identifizierung transformierter Klone notwendige Selektionsdruck wegfällt.

Zur Selektion können Histidin-defiziente Medien verwendet werden, wenn der Vektor für Enzyme codiert, welche die Hefe zur Synthese von Histidin nach erfolgter Integration des Vektors befähigt.

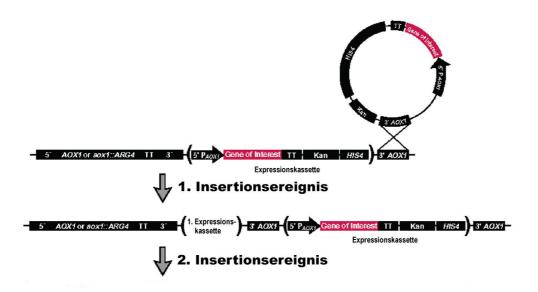


Abb. 1.7. Darstellung der Multiinsertions-Ereignisse als Cross-over-Insertion durch mehrmalige Integration der Expressionskassette mit dem zu exprimierenden DNA-Abschnitt (Gene of Interest). (aus dem Manual für den Vektor pPIC 9 K, Invitrogen, Groningen)

Darüber hinaus kann aber der Selektionsdruck durch ein weiteres Resistenzgen, in diesem Fall gegen Kanamycin, für das Suchen nach Klonen mit häufiger Insertion des transformierten DNA-Abschnitts verwendet werden (Abb. 1.7.). Diese Möglichkeit eröffnet der Vektor pPIC 9 K (Invitrogen, Groningen).

Hierbei wird im ersten Schritt ebenfalls auf die Fähigkeit des Wachsens auf Histidindefizienten Medien untersucht, um anschließend die wachsenden Klone auf Agarplatten mit ansteigender Kanamycinkonzentration zu kultivieren. Dabei korreliert die Fähigkeit der Klone auf Kanamycin-haltigen Agarböden zu wachsen mit der Anzahl der integrierten Resistenzgene und somit auch mit der Integration des zu exprimierenden DNA-Abschnitts, da beide im Vektor verbunden sind. Durch die größere Anzahl von integrierten DNA-Abschnitten soll die Proteinexpression gesteigert werden (70).

# 1.4. Aufgabenstellung der Arbeit

Mit dieser Arbeit soll überprüft werden, ob ein Expressionssystem für die Herstellung des A33rbGFP Fusionsantikörpers zu etablieren ist, das die limitierenden Faktoren eines bakteriellen Expressionssystems in Bezug auf Menge und Funktionalität überwinden kann.

Es muss ein Expressionssystem verwendet werden, das in der Lage ist, einen Fusionsantikörper in löslicher, sterisch korrekter und somit funktioneller Form herzustellen.

Dafür müssen Hefeklone des Stammes *Pichia past*oris generiert werden, die den DNA-Abschnitt für einen Fusionsantikörper bestehend aus dem A33-Single-Chain-Fragment und dem Green-Fluorescent-Protein oder einer bakteriellen Cytosindeaminase tragen, um die Expression des modellhaften A33rbGFP Fusionsantikörpers und des therapeutisch nutzbaren A33rbCD Fusionsantikörpers zu realisieren. Als Weiterentwicklung dieses A33rbCD Fusionsantikörpers kann eine DNA-Sequenz kloniert werden, die für das A33-Single-Chain-Fragment und für eine aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stammende Cytosindeaminase (im Weiteren als A33rbCDy Fusionsgenom bezeichnet) kodiert.

Um diese Aufgabe zu lösen, muss grundsätzlich eine Methodik etabliert werden, die die Generierung von Hefeklonen erlaubt, in deren Genom die DNA-Sequenz des zu exprimierenden Fusionsantikörpers integriert ist. Um die transformierten Hefeklone zu identifizieren, müssen diese auf selektiven Medien kultiviert und mittels PCR auf den integrierten Genabschnitt untersucht werden. Es folgen dann die Expression des Fusionsantikörpers mit anschließender Detektierung des Proteins durch Western Blots, Analysen des Bindungsverhaltens am A33-Zielantigen und Untersuchungen der Funktionalität der fusionierten Komponente.