

Summary – German

Das Hauptziel der Dissertation ist die „Generierung von Antikörperfragmenten gegen das Tumor-assoziierte Thomsen-Friedenreich Antigen“ unter Verwendung rekombinanter Antikörpertechnologien. Das TF-Disaccharid ist ein Tumor-spezifischer pan-karzinomer Marker, der nur auf Tumoren und so gut wie nicht auf Normalgewebe vorkommt. Die außergewöhnliche Tumorspezifität macht es zu einem wichtigen Ziel für die Tumorthherapie und -diagnose. Trotz der gründlichen Erforschung von TF sind bis heute nur TF-spezifische Antikörper des IgM Typs beschrieben, welche für die Behandlung von kleinen Primärkarzinomen, Metastasen oder der minimalen Resterkrankung nicht geeignet sind.

Im Gegensatz zur relativ einfachen Generierung von scFv gegen Proteinepitope unter Verwendung des Phagendisplay-Systems war es nicht möglich, scFv gegen das kleine ungeladene TF Kohlenhydratepitop zu gewinnen, was an der geringeren intrinsischen Affinität einer einzelnen anti-TF Bindungsstelle lag. Der Durchbruch kam durch die Etablierung eines neuen multivalenten scFv-Phagendisplay-Formats auf Grundlage der Verwendung von scFv mit stark verkürztem Linker (1aa) im Phagemid-System. Es wurden scFv(1aa)-Bibliotheken aus Spleenozyten von immunisierten Mäusen hergestellt. Daraus wurden erfolgreich TF-spezifische multivalente scFv selektioniert und die vielversprechendsten Klone im ELISA, in der Immunzytologie und -histologie, im BIACORE und in der Größenausschlußchromatographie untersucht. Die stufenweise Verkürzung des scFv-Linkers von 18 auf 0 Aminosäuren hat die Bildung von multimeren scFv-Komplexen (Dimere, Trimere und Tetramere) in Lösung zur Folge, was mit einer ansteigenden funktionellen Aktivität korreliert und darauf hindeutet, daß auch auf den Phagenpartikeln Multimere vorliegen.

Der vielversprechendste Klon zeigte eine außergewöhnliche TF-Spezifität und eine Affinität von ca. 20 nM, was für ein Kohlenhydrat-spezifisches Antikörperfragment sehr hoch ist. Interessanterweise war die Sequenzvariabilität der gewonnenen Klone sehr niedrig und die Affinität konnte nicht durch Affinitätsreifung verbessert werden, was nahelegt, daß es nur ein schmales Fenster für eine optimale Sequenz TF-spezifischer Antikörper gibt.

Einen weiteren Durchbruch stellte die erfolgreiche Herstellung eines stabilen Multimers, dessen Aufreinigung, der Konjugation des Multimers mit dem Chelator DTPA, dessen ¹¹¹In-Markierung und *in vitro* Charakterisierung dar. Es wurden zwei verschiedene Maustumormodelle (Xenograft) verwendet und es konnte zum ersten Mal erfolgreich eine Markierung des TF-Antigens *in vivo* gezeigt werden mit einer relativ guten Aufnahme des Multimers in den Tumor. Die Nierenbelastung war verglichen mit anderen in der Literatur beschriebenen rekombinanten Antikörperfragmenten niedrig, insbesondere für das tetramere scFv(0aa)-Konstrukt. Dies zeigt, daß diese multimeren scFv eine sehr hohe Tumorspezifität besitzen und für die Entwicklung einer Radioimmuntherapie geeignet sind.

Zusammengefaßt wurde das erste stabile multivalente TF-spezifische Antikörperfragment als Grundlage für die Entwicklung einer hochspezifischen Tumor-Radioimmuntherapie hergestellt. Es wurde eine neue multimere Phagendisplay-Methode etabliert, die voraussichtlich für die Herstellung von Kohlenhydrat-spezifischen Antikörpern und anderen Antikörpern mit geringer intrinsischer Affinität für die einzelne Bindungsdomäne angewendet werden kann.