

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 *Colorectales Carcinom*

Das colorectale Carcinom ist in den westlichen Industrienationen noch immer das Malignom mit zweithöchster Inzidenz. Nur das Lungencarcinom bei Männern und der Brustkrebs bei Frauen tritt häufiger auf. In der Bundesrepublik Deutschland erkrankten im Jahr 1995 nach Schätzungen 333 000 Menschen neu an Krebs, davon 51 800 (15,5%) an colorectalem Carcinom (Robert Koch Institut, 1998). In den USA präsentieren sich die Daten in ähnlicher Weise: colorectale Carcinome hatten 1998 einen Anteil von 11% (131 600) an allen Krebsneuerkrankungen, 10% aller Krebs-Sterbefälle hatten diesen Malignomtyp zur Ursache (American Cancer Society, 1998).

Divergierend verhalten sich die Zahlen bei Morbidität und Mortalität über die vergangenen 20 Jahre. Die Morbidität hat zugenommen, was auf verbesserte diagnostische Verfahren zurückführbar ist, d.h. die Erstdiagnose wird früher gestellt. Vorteilhaft ist dabei, dass die Therapie somit frühzeitiger beginnen kann. Damit erklärt sich ein Aspekt der Abnahme der Mortalität an colorectalem Carcinom (L.Bonneux, 1995). Die Sensibilisierung der Bevölkerung auf einige bekannte Risikofaktoren wie fettreiche und zugleich faserarme Ernährung sowie körperliche Inaktivität (Slattery, 1990) mögen zusätzlich zu diesem Rückgang beigetragen haben. Gerade in den USA und den westeuropäischen Ländern bleibt aber der Anteil der Darmkrebspatienten höher als beispielsweise in Polen, Ungarn oder Estland (Robert Koch Institut, 1998).

Als auslösende endogene Faktoren werden genetische Prädispositionen diskutiert, die zur Genese colorectaler Carcinome führen:

Die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP), eine autosomal dominant vererbte Krankheit, zeichnet sich durch massive Polypenbildung in Colon und Rectum aus, die eine große Disposition zur Krebsentstehung darstellt. Histologisch typische Adenomformen lassen

sich der Diagnose zuordnen (Bussey, 1975). Mit der Größe der Adenome nehmen auch die Zeichen maligner Entartung wie Transformation der Villi, hochgradige Dysplasie und erworbene genetische Veränderungen, zu (O'Brian, 1990). Werden die anfangs harmlosen Wucherungen nicht rechtzeitig entfernt, ist das Risiko des Patienten, bis zum 45. Lebensjahr an colorectalem Carcinom zu erkranken nahezu 100% (Berliner Arbeitskreis für hereditäre Tumorerkrankungen, 1994).

Gardner's Syndrom führt ähnlich der FAP zur Polypenbildung und später Carcinogenese und ist darüberhinaus ursächlich beteiligt an benignen Tumoren von Haut, Knochen und weichem Bindegewebe.

Hereditary-Nonpolyposis-Colon-Cancer (HNPCC) steht für colorectale Carcinome, die in familiärer Häufung auftreten, aber nicht zwangsläufig aus Polypen entstehen.

Eine besondere Häufung von colorectalen Carcinomen gibt es nach neueren Erkenntnissen bei Juden osteuropäischer Herkunft (Ashkenazy-Juden, 6% der amerikanischen Juden), bei denen, wie schon bei den zuvor genannten Risikofaktoren, ein vererbter Gendefekt in der DNA für die Ausbildung des Carcinoms verantwortlich zu sein scheint. Die Wahrscheinlichkeit einer malignen Erkrankung liegt bei diesen Menschen zwischen 18 und 30% (American Cancer Society, 1998).

Auf der Ebene der Präventionsmaßnahmen finden sich unterschiedliche Studien. So zeigten Patientenkollektive mit regelmäßigen endoskopischen Untersuchungen im Bereich des Colons und des Rectums eine Reduktion des Carcinomrisikos von 50% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Astrid D. Müller, 1995). Regelmäßiger Einnahme von NSAIDs (Nonsteroidal-Antiinflammatory-Drugs), insbesondere Aspirins, wird protektive Wirkung zugesprochen (Amnon Sonnenberg, 1994).

Die Prognose einer Erkrankung an colorectalem Carcinom ist mit der Lokalisation und dem histopathologischen Stadium des Tumors bei der Diagnosestellung korreliert. 70% der Carcinome befinden sich im Bereich Sigmoid/Rectum und machen sie damit zu Krankheiten mit schlechter Prognose. Der hier fehlende Serosaüberzug erleichtert dem Tumor die Invasion perirectalen Gewebes, der Blase, Prostata oder der Vagina. Der venöse Abfluss

über die Vena cava inferior begünstigt darüberhinaus eine schnelle Metastasierung in die Lunge (Niederhuber, 1993). Zum histopathologischen Staging wird in Deutschland im Allgemeinen die TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) zur Einteilung von malignen Tumoren verwendet. Außerdem existiert die Klassifikation nach Dukes zur Einteilung speziell des colorectalen Carcinoms. Maßgeblich in dieser Klassifikation sind Infiltrationstiefe in der Darmwand und regionale lymphogene Metastasierung.

DUKES	TNM	STADIUM
A	Tis N0 M0	Frühstadium. Carcinoma in situ. CA nur innerhalb der Mucosa
B1	T1-2 N0 M0	CA innerhalb Darmwand
B2	T3 N0 M0	CA mikroskop. durch Darmwand
B2	T4a N0 M0	CA makroskop. durch Darmwand
B3	T4b N0 M0	Umgebung des CA betroffen
C1	T1-3 N1-3 M0 T3	CA innerhalb Darmwand
C2	N1-3 M0 T4a	CA mikroskop. durch Darmwand
C3	N1-3 M0 T4b	CA makroskop. durch Darmwand
C3	N1-3 M0	Umgebung des CA betroffen
D	jedes T, jedes N, M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Einteilung des colorectalen Carcinoms in Stadien nach Dukes und TNM-Klassifikation

Dukes: Einteilung nach Invasionsstendenz und lymphogener Metastasierung des Tumors

TNM-Klassifikation:

T- Primärtumor, wobei T0-kein Primärtumor, T1,2,3-zunehmende Tumorprogression

N-Regionäre Lymphknoten befallen, wobei N0-keine, N1,2,3- zunehmende Metastasen

M-Metastasen, wobei M0-keine, M1,2,3,4-zunehmender Metastasierungsgrad

Die Therapie der Wahl bei colorectalem Carcinom ist immer noch die offen-chirurgische Resektion des betroffenen Dickdarmabschnitts. Dabei haben Patienten mit einem Tumor im Dukes-Stadium A und B1 eine 90-95% Heilungschance. Im Stadium B2 und B3 leben nur noch 30-70% der Patienten länger als 5 Jahre. Im Dukes-Stadium C liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei 10-50%.

Es zeigt sich also, dass insbesondere eine frühe Diagnosestellung und Intervention für die Prognose eine entscheidende Rolle spielen. Somit haben neue diagnostische Verfahren eine herausragende Stellung bei der Arbeit auf diesem Gebiet.

1.2 Transformierte colorectale Zellen als Carcinominduktoren

Die Carcinogenese im Colon ist ein komplexer Prozess, der durch die Verkettung vieler Einzelschritte zur Ausbildung maligner epithelialer Zellen führt. Dabei kommt es auf den Ebenen von Proliferation, Differenzierung und programmiertem Zelltod (Apoptose) zu einem Kontrollverlust der homöostatischen Verhältnisse. Diese Veränderungen sind Folge einerseits von Ernährung und anderen Umwelteinflüssen, die wahrscheinlich in der Lage sind, die Signaltransduktion der intestinalen Zellen zu modulieren, andererseits von Mutationen in Onkogenen sowie Deletionen und Mutationen in DNA-Reparaturenzymen und Tumorsuppressorgenen (Bertagnolli et al., 1997). Da epidemiologische, pathologische und molekulargenetische Studien gezeigt haben, dass die meisten colorectalen Carcinome aus primär benignen Adenomen entstehen, wird in diesem Zusammenhang auch von der Adenom-Carcinom-Sequenz gesprochen, d.h. also dem Übergang von benigner Colonmukosa in neoplastisches Gewebe (Morson, 1974; O'Brien, Winawer et al., 1990). Innerhalb dieses Übergangs hat sich der Wnt/APC/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg als wichtiges Element bei der Krebsentstehung erwiesen (Pennisi, 1998). Dieser Signalweg wird vom Wachstumsfaktor Wnt-1n initiiert (erstmalig bei Drosophila entdeckt, Rijsewijk et al., 1987). Unter Kontrolle des Tumor-Suppressorgens APC (Adenomatöse Polyposis Coli) bzw. dessen Genproduktes, wird das β -Catenin als Transduktionsfaktor in dieser Kaskade aktiviert, welches dann wiederum im Zellkern Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie

aktiviert. Zielgen ist möglicherweise das Onkogen c-myc, einer essentiellen Determinante bei der Zellproliferation (Jeanteur, 1998). Bei 85% der Colonicarcinome findet sich eine inaktivierende Mutation im APC-Gen. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität der Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef (Kinzler, 1996; Korinek, 1997; Rubinfeld; 1997). Bei über 50% der Colonicarcinome ohne APC-Mutation findet sich eine Mutation im β -Catenin-Gen CTNNB1, dabei besonders häufig in Carcinomen mit sogenannter High-Frequency-Microsatellite-Instability im Genom (Sparks, 1998; Mirabelli-Primdahl, 1999). Aber nicht nur diese Parameter scheinen bei der Entstehung des Colonicarcinoms eine Rolle zu spielen: APC wird mit dem GSK-3 β -Komplex (Glykogen-Synthase-Kinase) in Verbindung gebracht, der die Phosphorylierung des β -Catenins kontrolliert (Rubinfeld, 1996). Ein weiterer Faktor ist die PKC β_{II} , die wahrscheinlich diesen gesamten Signaltransduktionsweg und damit die Proliferation epithelialer Zellen (Murray, 1999) stimulieren kann.

Die Veränderungen im APC-Gen, das auf Chromosom 5q lokalisiert ist, werden als früheste Ereignisse in der Carcinomentwicklung gesehen. Mutationen, die zu einer Dysregulation des Protoonkogens K-ras führen, werden ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt. Ein weiterer kritischer Faktor in der frühen Carcinogenese ist der von vielen Onkoproteinen induzierte Initiationsfaktor der Proteinsynthese eIF-4E, der die Gesamtproteinsyntheseleistung steigern soll (Rosenwald, 1999). Zur späten Phase der Krebsentstehung auf molekularer Ebene gehört der Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 18q, was zur Inaktivierung des Tumor-Suppressorgens DCC führt, sowie die Mutation des Suppressorgens p53 auf Chromosom 17p, dessen Beteiligung bei vielen Carcinomen bekannt ist und vermutlich bewirkt, dass durch genetische Alterationen die Zelle der Ruhephase im Zellzyklus und der Apoptose entkommt (Gryfe, 1997).

Schon jetzt lassen sich also auf molekularbiologischer Ebene eine Vielzahl relevanter Modelle zur Entstehung des Colonicarcinoms erkennen.

1.3 Tumormarker

Tumormarker sind Substanzen (Proteine, insbesondere Enzyme, Hormone), die bei malignen Erkrankungen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten in erhöhten Konzentrationen nachweisbar sind. Tumormarker stammen entweder aus der Tumorzelle selbst (Tumor-Derived-Products) oder ihre Bildung bzw. Freisetzung aus anderen Geweben wird vom Tumor induziert (Tumor-Associated-Products).

Die immunologische Diagnostik stützt sich auf den Nachweis von Tumormarkern mittels monoklonaler Antikörper, weshalb Tumormarker häufig auch als Tumorantigene bezeichnet werden.

Tumormarker können auch von normalen Zellen oder histologisch verschiedenen Zellen exprimiert werden, allerdings meist in sehr geringer Konzentration. Antigene, die sowohl von Tumor- wie auch von Normalgewebe exprimiert werden, werden nicht mehr als tumorspezifische, sondern als Tumor-assoziierte Antigene (TAA) bezeichnet (Ahnen, 1982).

Wichtige Tumormarker in der onkologischen Diagnostik sind z.B. Carcinoembryonales Antigen (CEA) bei vielen Carcinomarten, CA 19-9 bei Pankreas- und Colon-Carcinom, CA 15-3 beim Mamma-Carcinom, sowie Prostataspezifisches Antigen (PSA) beim Prostata-Carcinom. Diese Tumormarker sind als "Leitmarker" zu betrachten, da bei jedem Tumor auch andere Marker nachgewiesen werden können.

Auf Tumormarker, die bei der Diagnostik des colorektalen Carcinoms eine Rolle spielen, wird in Kapitel 1.6 näher eingegangen.

1.4 Immunglobuline

Immunglobuline (Antikörper, γ -Globuline) sind körpereigene Proteine, die der Mensch als Antwort auf die Konfrontation mit körperfremden Substanzen bildet. Bei einer solchen Antigenexposition kommt es zu charakteristischen Veränderungen im System der humoralen

Immunantwort: Die stimulierte B-Zelle transformiert sich zur Plasmazelle und ist dann in der Lage, spezifische Antikörper gegen die eingedrungene Fremdsubstanz zu bilden.

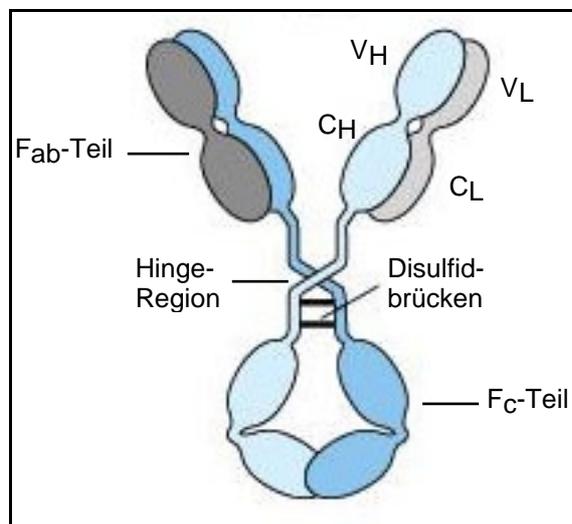


Abbildung 1

Schematische Darstellung eines Immunglobulin-Moleküls

Das Molekül ist aus zwei leichten L-Ketten (mit einem variablen V-Teil und einem konstanten C-Teil) aufgebaut, die über Disulfidbrücken am Ende eines C-Teils mit den schweren H-Ketten verknüpft sind. Durch die variablen Abschnitte findet die Antigen-Antikörper-Bindung statt.

1.5 Polyklonale und monoklonale Antikörper

Werden verschiedene B-Lymphozyten zu Plasmazellen und damit zur Produktion von Antikörpern stimuliert, sind die sezernierten Immunglobuline polyklonal (polyklonale Antikörperantwort). Sie besitzen zwar dieselbe Spezifität hinsichtlich des von ihnen erkannten Antigens; da sie aber alle von unterschiedlichen Plasmazellen stammen, sind sie polyklonal und erkennen daher verschiedene Epitope am antigenen Protein.

Köhler und Milstein machten sich 1975 das Plasmozytom bei der Überwindung des Problems der Heterogenität bei der Erforschung biologischer Prozesse zunutze. Bei dieser Krebsform, die von einer entarteten Zelle ausgeht, teilen sich die Zellen B-Zell-Reihe unkontrolliert. Köhler und Milstein fusionierten nun *in vitro* Plasmazellen der Milz einer vorher hyperimmunisierten Maus mit Myelomzellen. Die erhaltenen Hybridomzellen produzierten homogene Antikörper in unbeschränkter Menge, die in ihrer Spezifität

durchgemustert werden konnten. Die Hybridome teilten sich aufgrund ihrer veränderten genetischen Information unbegrenzt *in vitro* und ließen sich infolgedessen leicht kultivieren. Monoklonale Antikörper haben neue Perspektiven eröffnet, da sie sich als analytische und präparative Reagentien einsetzen lassen. Nicht nur im Bereich biochemischer Forschung, sondern ganz besonders im Feld der Routinetests klinischer Laboratorien sind sie heute unerlässlich.

1.6 Diagnostische Verfahren zur Tumordetektion

Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern in der Krebsdiagnostik nimmt seinen Ausgang in der Arbeit von Pressman und Korngold (1953), die erstmals radioaktiv markierte Antikörper einsetzten, um osteogenes Sarkom *in vivo* nachzuweisen.

Auch gegen coloncarcinom-assoziierte Antigene wurden diverse monoklonale Antikörper etabliert (Bleday et al., 1986; Tsavaris et al., 1993), allerdings meist mit geringer Spezifität (Kuusela et al., 1991).

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und das Cancer-Antigen CA 19-9 haben derzeit die größte klinische Relevanz als Tumormarker für colorektale Carcinome (Ward et al., 1993; Vogel et al., 1995).

CEA gehört zusammen mit dem Biliary Glycoprotein (BGP), dem Nonspecific-Cross-reacting-Antigen (NCA), dem Zelladhäsionsmolekül C-CAM und anderen Vertretern zur Carcinoembryonic-Gene-Familie, die in der Nomenklatur des Cluster of Differentiation das Kürzel CD66 besitzt (Hammarström et al., 1993; Thompson et al., 1991).

CEA ist ein Glykoprotein mit M_r 180k, welches sezerniert, aber auch an der apikalen Membran von Epithelzellen exprimiert wird.

Anfänglich wurde angenommen, dass CEA nur von entodermalen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und normalem fetalen Darmgewebe während der ersten Schwangerschaftstrimester exprimiert wird (Gold et al., 1965). Weiterführende Untersuchungen haben gezeigt, dass CEA auch von nicht gastrointestinalen Tumoren sowie von Normalgewebe des Colon exprimiert wird (Robbins et al., 1993; Baranov et al., 1994).

Zudem lassen sich erhöhte Serumspiegel bei Rauchern und Patienten mit gutartigen gastrointestinalen Erkrankungen nachweisen (Schouw, 1992).

Die Aussagekraft von CEA als Tumormarker wird weiter dadurch eingeschränkt, dass nur 40-70% aller Patienten präoperativ einen erhöhten CEA-Spiegel aufweisen, wobei die Differenzierung des Tumors eine große Rolle spielt. Hochdifferenzierte Tumoren führen fast immer zu einer CEA-Erhöhung im Serum, während dies nur bei ca. 30% der niedrig differenzierten Tumoren der Fall ist (Northover, 1986).

Die klinische CEA-Bestimmung wird für folgende Bereiche vorgeschlagen:

1. Als prätherapeutischer Indikator für die Prognose eines Patienten (Sena et al., 1989)
2. Als posttherapeutischer Indikator für das Auftreten von Rezidiven (Steele et al., 1982)
3. Als Parameter für krankheitsfreies Überleben nach adjuvanter Behandlung (Umehara et al., 1993; Brunivels et al., 1994)

Der Wert dieser Untersuchungen wird jedoch von verschiedenen Autoren unterschiedlich beurteilt. Während Gebauer (1997) in einer follow-up-Studie den Tumormarkerbestimmungen in Biopsaten gesunder Colon-Schleimhaut eine prognostische Relevanz in der Rezidivprophylaxe zuschreibt, bestreitet Rockall (1999) auf der Basis einer retrospektiven Studie anhand der Beobachtung von 193 Patienten über einen Zeitraum von 2 Jahren den Nutzen von CEA als prognostischem und rezidivprophylaktischem Parameter im Serum. Der hohe Kostenaufwand und die häufigen falsch-positiven Ergebnisse, so schließt er, rechtfertigen kein Routine-Monitoring von Patienten mit behandeltem colorektalem Carcinom. Ähnliche Schlüsse zieht auch Nicolini (1995) aus einer Studie. Lindmark (1995) hat zudem Zweifel an der Aussagekraft von CEA-Bestimmungen für eine Therapieplanung. Das Nonspecific-Cross-Reacting-Antigen (NCA) konnte im Colocarzinom, im Mammacarcinom, im normalen Lungengewebe und in fast allen Lungentumoren (Allard et al., 1994) nachgewiesen werden. Bei diesen beiden Vertretern der CEA-Familie handelt es sich somit nicht um tumorspezifische, sondern um tumorassoziierte Antigene (TAA).

CA 19-9 wurde erstmals durch einen monoklonalen Antikörper gegen eine Colocarzinom-Zelllinie identifiziert (DeVillano 1983) und wird heute klinisch-diagnostisch eingesetzt. Bei

dem vom Antikörper CA 19-9 erkannten Epitop handelt es sich um ein Hapten der menschlichen Sialyl-Lewis^a-Blutgruppenderminante (Magnani et al., 1982). CA 19-9 zeigt eine gute Sensitivität (53%) in der Verlaufskontrolle von gastrointestinalen, insbesondere von Pankreasneoplasien (82%) (Schmiegel et al., 1985; Steinberg et al., 1986). Aber auch auf normaler Mukosa und in Körperflüssigkeiten (Speichel, Fruchtwasser) ist eine hohe bis sehr hohe CA 19-9-Konzentration nachweisbar (Villano, 1983; Quentmeier, 1987). Gegen dieses Epitop gerichtete Antikörper werden daher vor allem nach erfolgter Operation als posttherapeutische Indikatoren für Residualtumoren gemessen (Ward et al., 1993).

Außer zur Serodiagnostik und zum Nachweis im histologischen Schnitt wurde schon früh nach einer Möglichkeit des *in vivo*-Nachweises mittels Immunszintigraphie gesucht. Für die Untersuchungen waren Patienten mit colorektalem Carcinom immer von besonderem Interesse (Goldenberg, 1991).

1978 berichtete Goldenberg über die erste erfolgreiche immunszintigraphische Studie mit anti-CEA-Antikörpern an Patienten mit verschiedenen Tumoren. Primärherde und Metastasen wurden mit einer Sensitivität von 85% nachgewiesen. Mach (1980) relativierte diesen Erfolg wenig später mit einer Studie, bei der die Sensitivität des Nachweises von zumeist colorektalen Carcinomen lediglich 40% betrug. Er selbst führte 1981 erste Versuche zur Detektion mit monoklonalen Antikörpern am Menschen durch.

Trotz technischer Weiterentwicklung wie der Etablierung des SPECT-Verfahrens blieb die Frage, inwieweit die Immunszintigraphie konventioneller Diagnostik wie dem CT, überlegen ist, bzw. inwiefern sie eine sinnvolle Ergänzung darstellt. Ryan (1993) resümiert, dass CT und Szintigraphie eine ähnliche Sensitivität aufweisen, so können beide Verfahren Metastasen unter 2cm Größe nicht sicher nachweisen, ebensowenig lassen sich Daten über Ausbreitung und Infiltration des Primärherdes gewinnen. Unterschiede bestehen lediglich im Tumornachweis an verschiedenen Lokalisationen. Ryan sieht die Immunszintigraphie in der Zukunft nicht als Routineuntersuchung, sondern lediglich als Ergänzung in unsicheren Fällen oder in der Therapieplanung bei kritischen Patienten mit besonders aggressiven Tumoren.

1.7 Immuntherapie beim colorectalen Carcinom

Trotz Fortschritten auf molekularbiologischer Ebene, sowie bei adjuvanten Chemotherapien bleibt das colorectale Carcinom eine schwere Erkrankung mit immer noch relativ schlechter Prognose. Konventionelle Therapien setzen auf chirurgische Sanierung, lokale Bestrahlung sowie Chemotherapie mit 5-Fluoruracil (5-FU) und Folinsäure. Die eingeschränkte Wirksamkeit und teilweise hohe Toxizität für den Patienten macht die Suche nach Alternativen erforderlich.

Immuntherapien zeichnen sich durch ihre höhere Spezifität und geringe Toxizität aus. Anders als die adjuvante Chemotherapie greifen sie auch bei Zellen, die sich in der G_0 -Phase des Zellzyklus befinden (Pantel 1993). Bislang wurden sowohl aktive Therapien (Active-Specific-Immunotherapy) wie Tumor-Vakzine als auch passive Therapien wie die Gabe monoklonaler Antikörper getestet. Unspezifische, immunstimulierende Substanzen haben sich bislang nicht durchsetzen können, werden jedoch häufig in Verbindung mit konventionellen Therapien angewandt, wie z.B. die Kombination aus 5-FU und Levamisol oder Interferon.

Bei gegebener hoher Spezifität versprechen vor allem monoklonale Antikörper Fortschritte bei der Behandlung des colorectalen Carcinoms. Ziel ist es, durch Antikörper, die gegen colorectale Tumorantigene gerichtet sind, eine komplement-, zell- oder pharmakavermittelte Zytolyse zu erreichen. Als geeignetes Ziel werden vor allem einzelne, disseminierte Tumorzellen gesehen (Illiger 1997). Vor einem effektiven Einsatz müssen jedoch noch zahlreiche technische, wie konzeptionelle Probleme gelöst werden. So muss zunächst die Spezifität eines Tumorantigens ausreichend geklärt sein, Antigenvariabilität ausgeschlossen werden. Die Antikörper müssen hohe Affinität zeigen und der Mechanismus der antikörpervermittelten Zytolyse genauer identifiziert werden. Zuletzt bleibt das Problem der Immunreaktion des Wirts gegen den meist murinen oder semimurinen Antikörper.

Der bislang am besten untersuchte Antikörper, der bereits klinisch eingesetzt wird, ist der murine MoAb 17-1A (Panorex[®]), ein IgG_{2a}-Molekül, welches ein colorectales TAA erkennt,

ein Membranglykoprotein mit M_r 37k. Co 17-1A wird von der Zelle nicht sezerniert und konnte auch auf fast allen anderen epithelialen Tumoren, sowie nicht entarteten Epithelien nachgewiesen werden (Göttlinger, 1986).

Die Toxizität war in bisherigen Phase I- und Phase II-Studien gering, jedoch war auch die response-rate des Tumors unter strengen Kriterien im allgemeinen gering, d.h. unter 5%. Erst der Einsatz in der adjuvanten Therapie beim Colocarzinom nach Resektion führte zum Erfolg. Nach Riethmüller et al. (1994) lag die Fünfjahres-Überlebensrate nach Resektion eines Dukes' C-Colocarzinoms in der Panorex[®]-Gruppe einer randomisierten Studie bei 64% gegenüber 49% in der Kontrollgruppe. Besonders deutlich zeigte sich der Unterschied beim Auftreten von Fernmetastasen, während beim Lokalrezidiv keine Unterschiede zu beobachten waren.

Der Vergleich zwischen der Panorex[®]-Therapie und konventionellen Chemotherapien bzw. ihr Synergismus wird derzeit weltweit in groß angelegten Studien untersucht.

Bei anderen Neoplasien existieren bereits monoklonale Antikörper, die Patienten mit Chemotherapieresistenz zu partiellen oder sogar kompletten Remissionen verhelfen, z.B. Rituximab[®], ein Antikörper, der sich gegen das CD20-Epitop auf B-Zellen richtet (Anderson et al. 1997).

Dies zeigt, dass auf dem Gebiet der Erforschung monoklonaler Antikörper gegen colorectales Carcinom noch viel zu tun ist.

1.8 Zielsetzung und Strategie

Die Qualität immundiagnostischer und -therapeutischer Verfahren zur Behandlung von Tumorerkrankungen hängt entscheidend von Spezifität und Sensitivität der verwendeten Antikörper ab. Ziel war die Gewinnung neuer monoklonaler Antikörper gegen antigene Proteine aus Membranen von Colocarzinomzellen. Die Antigene sollten im Gewebe lokalisiert, chromatographisch angereichert und proteinbiochemisch charakterisiert werden.

Zwei Strategien sind grundsätzlich möglich:

1. Ein Tumorprotein wird ausgewählt, isoliert und monoklonale Antikörper nach Immunisierung mit diesem Protein produziert.
2. Nach Immunisierung mit Colonicarcinomgewebe werden monoklonale Antikörper produziert, mit nachfolgender Isolation und Identifizierung des Antigens.

Die **erste Strategie** basiert auf der Auswahl eines Antigens zur Immunisierung. Hierzu wird ein bereits isoliertes, tumorassoziiertes Protein benötigt, dessen Antigenität ausreicht, um eine Immunantwort hervorzurufen.

Im folgenden beschränkt man sich dann auf die Klonierung und Charakterisierung des Antikörpers gegen dieses Protein. Anschließend lassen sich tumorbiologische Untersuchungen an Nativmaterial hinsichtlich Expression und Verteilung durchführen.

Die Vorteile dieser Vorgehensweise liegen darin, dass nach Bildung der Hybridomzellklone ein umfassender Selektionsprozess entfällt und man Antikörper erhält, die gegen eine Vielzahl von Epitopen gerichtet sind. Unter diesen sind auch besonders stabile Zellklone zu erwarten. Die Beschränkung dieser Strategie liegt in der Verfügbarkeit isolierter Tumorantigene. Neue tumorspezifische Proteine können zwar durch analytische Verfahren wie z.B. zweidimensionale Gelelektrophorese oder kombinierte hochauflösende Chromatographien (HPLC) erkannt und angereichert werden; diese Verfahren sind jedoch äußerst aufwändig, insbesondere für große membranassoziierte Proteine. Es ist hierbei kaum vorherzusehen, inwieweit es sich hierbei um neu exprimierte, überexprimierte oder nur geringfügig modifizierte Proteine handelt und inwieweit diese tumorimmunologisch relevant sind.

Die **zweite Strategie** geht von der Immunisierung von Mäusen mit komplexen Gemischen aus Antigenen, z.B. Plasmamembranen oder ganzen Zellen, aus, um monoklonale Antikörper auch gegen vorher nicht isolierte bzw. bekannte Antigene etablieren zu können.

In erster Linie wird dabei die Differenzierung zwischen Tumor- und Normalgewebe durch die neuen Antikörper angestrebt. Erst im zweiten Schritt wird das Antigen mit Hilfe des Antikörpers charakterisiert und isoliert. Bei diesem Vorgehen ist die Induzierung von

Antikörpern aufgrund der Speziesunterschiede zwischen Maus und Mensch gesichert, und ihre Tumorspezifität kann durch die Wahl des Selektionsverfahrens gelenkt werden. Andererseits steht die Identität des Antigens erst am Ende eines aufwändigen Selektions- und Charakterisierungsprozesses fest, wodurch das Auffinden bereits bekannter Tumorantigene nicht ausgeschlossen werden kann.

Für diese Arbeit wurde die zweite Strategie gewählt.

Häufig werden monoklonale Antikörper durch Immunisierungen mit Zellen einer definierten Zelllinie etabliert (Moldenhauer et al., 1987; Bleday et al. 1986). Tumorgewebe besteht jedoch aus einem Mosaik von Zellpopulationen, die teilweise unterschiedliche Antigene auf der Zelloberfläche exprimieren. Britain et al (1981) gelang es, aus einem primären Colocarzinom 3 Subpopulationen mit unterschiedlicher Immunogenität, einer unterschiedlichen Wachstumsfraktion und unterschiedlichem histologischen Muster zu isolieren.

Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit mit einer Antigenfraktion immunisiert, die aus einem Pool von Colocarzinombiopsaten isoliert wurde und somit in ihrer Zusammensetzung der Heterogenität solider Tumoren entspricht. Nur so bot sich die Möglichkeit, bisher unbekannte Tumorantigene zu entdecken, bzw. bekannte Proteine, deren Bedeutung oder Überexpression im Tumorgewebe unbekannt sind, zu detektieren.

Da sehr viele Membranproteine glycosyliert sind und Tumorzellen sich häufig im Glycosylierungsmuster ihrer Membrankomponenten unterscheiden (Kim, 1992; Hanski et al., 1993), sind Glykanepitope wichtige potenzielle Tumorantigene. Sialinsäuren in N-terminaler Position können sterisch Glykane aber auch Peptidepitope maskieren (Schauer, 1982, 1984, 1991). Die Freilegung dieser Antigene durch enzymatische Abspaltung der Sialinsäuren kann so die Immunogenität des Antigens erhöhen. Deshalb wurden in dieser Arbeit ausschließlich desialylierte Antigene als Immunogene eingesetzt.

Die Immunisierung bewirkte schon nach der ersten Applikation einen deutlichen Titeranstieg im Serum der Maus. Es ist bekannt, dass spezie fremde Proteine aufgrund ihrer Größe und Heterogenität ein besonders hohes immunogenes Potenzial besitzen. Mit den

durch Hyperimmunisierung stimulierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) dieser Maus wurden nach der von Köhler und Milstein (1975) etablierten Methode Zellfusionen durchgeführt.

Da hier mit einer Membranpräparation aus nativem Colonicarcinommateriale immunisiert wurde, ist eine große Anzahl auch im Normalgewebe vorhandener Proteine sowie eventuelle Splicevarianten und Mutationen im Immunogenmaterial mit eingeschlossen. Die zur Gewinnung tumorspezifischer Antikörper notwendige Differenzierung erfolgte in der anschließenden Selektionsphase.