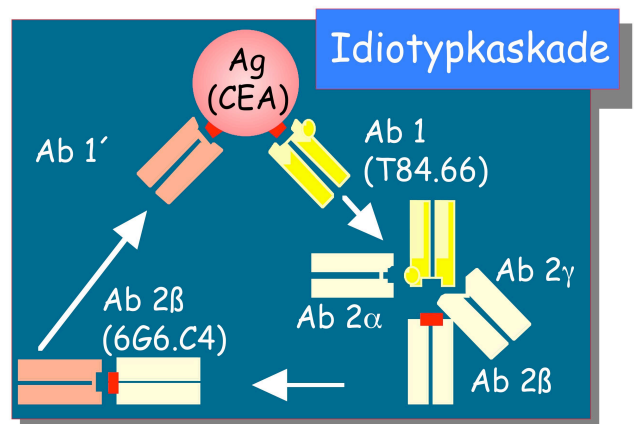


Spezifische immunologische Therapiemodelle für CEA-positive Karzinome im CEA-transgenen immunkompetenten Mausmodell

ALLGEMEINER HINTERGRUND

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ein 180-kD großes gewebespezifisches Differenzierungsantigen der Kolonmukosa. Es wird in mehr als 95% der kolorektalen Karzinome und seiner Metastasen fortgesetzt exprimiert. In Adenokarzinomen anderer Ursprungsgewebe kann CEA im Rahmen einer Neoexpression auftreten (z.B. medulläres Schilddrüsenkarzinom). Im Rahmen der Krebsprogression wird CEA als zirkulierender Tumormarker im Serum von Patienten mit CEA-positiven Tumoren nachweisbar. Eine Immunantwort gegen CEA im Sinne einer Autoimmunantwort wird in der Regel nicht beobachtet. Damit eignet sich CEA grundsätzlich sehr gut für adoptive humoral oder zellulär gestützte immunologische Tumorthérapien besonders beim kolorektalen Karzinom.

Einen besonderen Ansatz stellt die **spezifische, aktive Immuntherapie** dar, welche das Immunsystem des Patienten gegen tumorassoziierte Antigene (TAA) auf den Tumorzellen sensibilisieren und eine Langzeitimmunität erzeugen soll. TAAs stellen jedoch in aller Regel Selbst-Antigene dar, gegenüber denen der Organismus immuntolerant ist. Antigene Determinanten auf TAA können immunologisch durch sogenannte „internal image“ anti-idiotypische (Ab2 β) Antikörper simuliert werden, welche die antigenen Strukturen in Form eines Antikörpers in einem anderen molekularstrukturellen Zusammenhang präsentieren (sog. molekulares Mimickry; Surrogat-Antigene). Ab2 β können dann verwendet werden, um ihrerseits Antikörper zu erzeugen, die sich dann gegen das nominale Antigen richten (Ab3 oder Ab1'; **Abb. 1**)



In klinischen Studien konnte bei einigen Tumortypen nachgewiesen werden, dass eine Ab2 β -Immunisierung zu anti-anti-idiotypischen Immunantworten (Ab3 bzw. Ab1') führen kann. Man muss daher davon ausgehen, dass eine Modulation bzw. Brechung der Immuntoleranz durch anti-Idiotypen grundsätzlich möglich ist. Voraussetzung für die systematische Untersuchung immunologischer Effektoren in einer dem Patienten vergleichbaren immunkompetenten und immuntoleranten *in-vivo* Situation sind geeignete Modelle. In diesen lässt sich die Effizienz einer anti-Tumorantwort untersuchen und z.B. durch die genetische Veränderungen von Antikörpern oder ihre Fusion mit Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Kostimulationsantigenen optimieren.

Vorausgehende Arbeiten unserer Gruppe haben ein Modell für das Carcinoembryonale Antigen geschaffen, welches sich für die Untersuchung nachstehender Fragen umfassend eignet.

FRAGESTELLUNGEN UND ZIELE

Wir beabsichtigen, die Immuntoleranz gegenüber TAAs durch anti-idiotypische Vakzinierungen zu durchbrechen, um eine therapeutisch nutzbare anti-Tumorantwort zu erhalten. Dies setzt ein für das TAA immuntolerantes und immunkompetentes Versuchssystem voraus. Demgegenüber sind die Effekte, die in (den üblich verwendeten) nicht immuntoleranten Systemen beobachtet werden, häufig nicht eindeutig beurteilbar, weil die immunologischen Antworten auch durch die primär xenogene Natur humaner TAA verursacht sind bzw. durch die Zytokin-Wirkung im Sinne einer gesteigerten Immunantwort verstärkt sein können.

Unsere Projekte untersuchen die Wirksamkeit geeigneter rekombinanter Fusionsproteine auf den Tumorprogress in einer eigenen CEA-transgenen und immuntoleranten Maus durch Untersuchung immunologischer Effektorfunktionen.

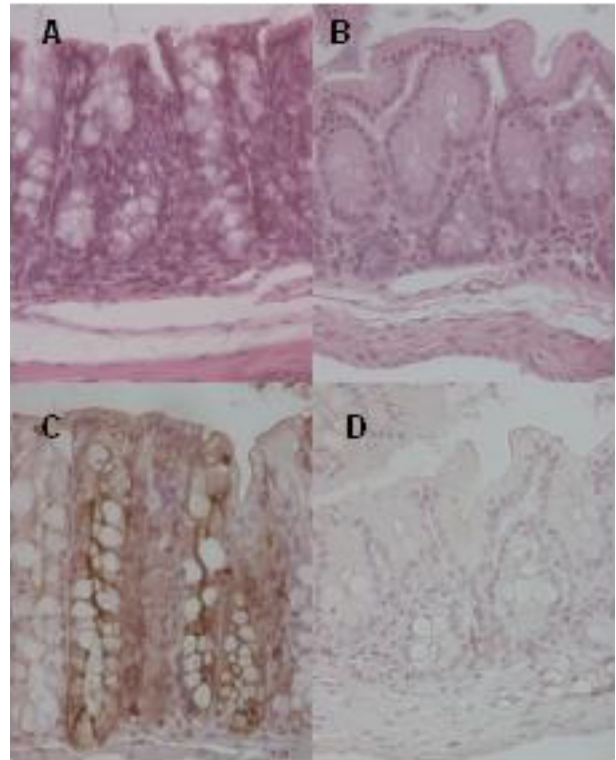
Die immunologische Nähe zur humanen Situation ist hierbei Programm, um immunologische Ansatzpunkte für die Behandlung des humanen Kolonkarzinoms zu entwickeln, wobei aufgrund der Expressionscharakteristik von CEA besonders die Behandlung von Mikrometastasen interessiert.

EIGENE VORARBEITEN

Es wurde der anti-Idiotypantikörper 6G6.C4 erzeugt, welcher ein CEA-spezifisches Epitop simuliert. In nicht CEA-toleranten Versuchstieren bewirkt 6G6.C4 eine hochspezifische anti-CEA Antwort. Dies belegt, dass die molekulare Struktur von 6G6.C4 grundsätzlich für das molekulare Mimickry geeignet ist. Im CEA-Transgen wird CEA gewebespezifisch in einer dem Menschen sehr ähnlichen Weise exprimiert (**Abb. 2**).

Abb. 2: Beispiel immunhistochemischer Färbung bei CEA-transgenen Mäusen

- A: HE-Färbung Kolon
- B: HE-Färbung Leber
- C: anti-CEA Färbung
- D: negative Färbekontrolle Leber



Die Transgene sind gesund, CEA-tolerant und immunkompetent; es besteht wie beim Menschen eine immunologische Toleranz gegenüber CEA. Diese kann mit 6G6.C4 oder seinem entsprechenden gentechnisch hergestellten Molekül (scFv6G6.C4) alleine nicht gebrochen werden. Wir haben daher Fusionsproteine konstruiert, die scFv6G6.C4 enthalten.

Verwendet man ein Fusionsprotein aus scFv6G6.C4 und dem Wachstumsfaktor GM-CSF (scFv6G6.C4/GM-CSF. **Abb. 2**), läßt sich gegenüber den einzelnen Komponenten zeigen, dass eine Immunantwort gegen CEA erzeugt werden kann. Damit wurde erstmals gezeigt, dass die Brechung einer Immuntoleranz mit einem anti-Idiotypen spezifisch gegen ein Epitop eines humanen TAA gelingt. Die durch die aktive Immunisierung erzeugten Antikörper binden spezifisch CEA-positive Tumorzellen in Lösung, wie durch FACS-Analyse demonstrierbar ist (**Abb. 3**).

Abb. 2: Klonierungsstrategie für die Konstruktion von Genen für rekombinantes scFv6G6.C4 (A) und Fusionsprotein scFv6G6.C4/GM-CSF (B).

A: Die VH-Region und die VL-Region wurden durch PCR aus klonierten Domänen hergestellt. Durch Ligation der Produkte wurden die BamHI und BglII Schnittstellen unter Entstehung des scFv-Fragmentes mit der diagnostisch nutzbaren BstYI-Restriktionsstelle eliminiert. B: Das scFv6G6.C4 und GM-CSF wurden als Genkassetten mittels einer in den Primern 5 and 7 eingebauten SfiI-Stelle zusammengeführt.

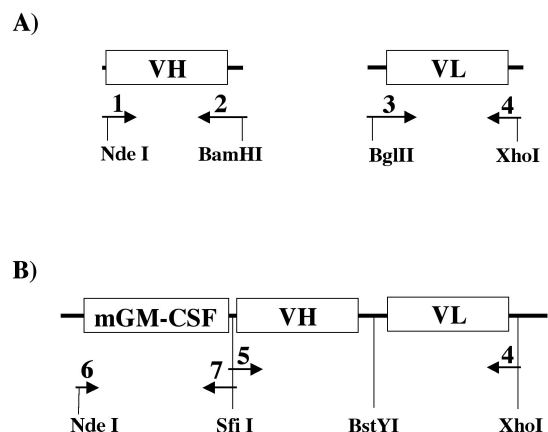
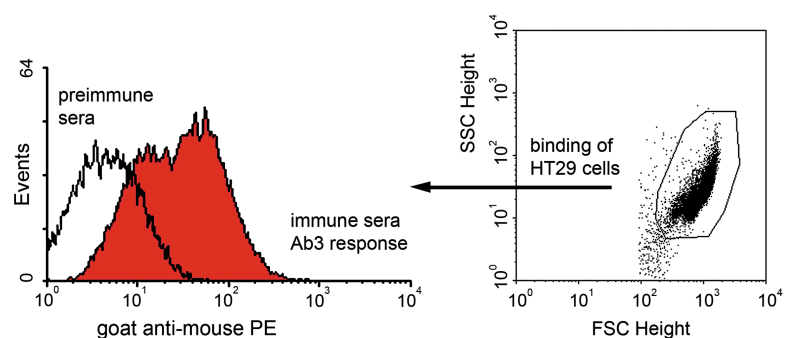


Abb. 3: Bindung von CEA-positiven Kolonkarzinomzellen durch Ab3

HT29-Zellen wurden über ihre Streulichteigenschaften gated. Spezifische Bindung von HT29-Zellen durch Antikörper der Ab3-Immunantwort mittels Durchflusszytometrie (rot). Präimmunsere (keine Färbung) zeigen keine Bindung an HT29-Tumorzellen.



Es ist entsprechend dieser Ergebnisse möglich, dass zirkulierende Tumorzellen im Blut aufgrund der aktiven Immunisierung dauerhaft zerstörbar werden. Ob sich hierdurch eine signifikant niedrigere Organmetastasierungsrate von Kolonkarzinomzellen in einem auf dem Transgen beruhenden Modellsystem erzielen lässt, ist von erheblichem medizinischem Interesse und Gegenstand aktueller Untersuchungen der Gruppe.

(zu den einzelnen Teilprojekten werden experimentelle Promotionsarbeiten vergeben)

- Molekulare Charakterisierung metastatischer und nicht-metastatischer Tumorzelllinien durch functional genomics und Proteomanalysen
- Etablierung von Verfahren zum Nachweis zirkulierender mikrometastatischer Tumorzellen in einem experimentellen Therapiemodell
- Charakterisierung immunologischer Eigenschaften von Antiseren und zellulären Effektoren gegen anti-Idiotyp Vakzine
- Untersuchung der Autoimmunität nach anti-Idiotyp-Vakzinierung
- Adoptive Immuntherapie durch anti-Idiotyp Vakzinierung von dendritischen Zellen im CEA-Transgen
- Herstellung, Reinigung und molekulare Charakterisierung anti-idiotypischer Vakzine

EXPERIMENTELLE METHODEN FÜR DIE BEARBEITUNG DER FRAGESTELLUNGEN

- Pro- und eukaryontische Klonierungs- und Expressionstechniken
- PCR, rtPCR
- DNA-Sequenzierung
- Elektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren
- Western blot
- Chromatographische Methoden
- Flow-Zytometrie
- Protein profiling (MALDI-TOF Mass spectrometry)
- ELISA
- Zellkulturtechniken
- Tierexperimentelle Techniken
- Immunhistochemie, Immunzytochemie

MITGLIEDER DER ARBEITSGRUPPE

Institut für Klinische Chemie (IKC) Mannheim

Prof. Dr. med. Michael Neumaier
Dr. med. Alexandra Dorn-Beineke
Frau Zoi Edinger (MTLA, IKC)
Frau Cornelia Keup (MTLA, IKC)
N.N.

Chirurgische Universitätsklinik Mannheim

Dr. med. Roderich Bönninghoff
Dr. med. Karoline Horisberger

EXTERNE KOOPERATIONSPARTNER

Prof. Holger Kalthoff, Molekulare Onkologie der chirurgischen Klinik, Universität Kiel
Prof. John Shively, Dept. Of Immunology, City of Hope, Duarte, Kalifornien
Prof. Dr. Hinrich Abken, Labor für Tumorzellgenetik der Medizinischen Klinik, Universität Köln
Prof. Carole Stocking, Heinrich-Pette-Institut für Virologie der Universität Hamburg, Hamburg

KONTAKT

Dr. Alexandra Dorn-Beineke
Institut für Klinische Chemie (Haus 22, Ebene 4)
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg
Theodor-Kutzer-Ufer 1-3
68167 Mannheim

Tel: +49 (0)621/383-3561
Fax: +49 (0)621/383-3819
E-mail: alexandra.dorn-beineke@ikc.ma.uni-heidelberg.de

AUSGEWÄHLTE EIGENE PUBLIKATIONEN ZUM THEMA

Schwegler C, Dorn-Beineke A, Nittka S, Stocking C, Neumaier M. Monoclonal anti-idiotypic antibody fused to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is capable to break tolerance to carcinoembryonic antigen in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. *Cancer Res* 2005; 65(5) in press.

Hoffmann P, Mueller N, Shively JE, Fleischer B, Neumaier M. Fusion proteins of B7.1 and a carcinoembryonic antigen (CEA)-specific antibody fragment opsonize CEA-expressing tumor cells and coactivate T-cell immunity. *Int J Cancer* 2001;92(5):725-32.

Neumaier M, Gaida FJ, Lewis MR, Hefta LJ, Shively LE, Raubitschek A, et al. A chimeric anti-CEA antibody with heavy interchain disulfide bonds deleted: molecular characterization and biodistributions in normal and tumor bearing mice. *Anticancer Res* 1999;19(1A):13-21.

Hefta LJ, Neumaier M, Shively JE. Kinetic and affinity constants of epitope specific anti- carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies for CEA and engineered CEA domain constructs. *Immunotechnology* 1998;4(1):49-57.

Wu AM, Chen W, Raubitschek A, Williams LE, Neumaier M, Fischer R, et al. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 1996;2(1):21-36.

Eades-Perner AM, van der Putten H, Hirth A, Thompson J, Neumaier M, von Kleist S, et al. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 1994;54(15):4169-76.

Gaida F-J, Pieper D, Roder UW, Shively JE, Wagener C, Neumaier M. Molecular characterization of a cloned idiotypic cascade containing a network antigenic determinant specific for the human carcinoembryonic antigen. *J.Biol.Chem.* 1993;268(19):14138-45.

Gaida F-J, Fenger U, Wagener C, Neumaier M. A monoclonal anti-idiotypic antibody bearing the image of an epitope specific to the human carcinoembryonic antigen. *Int.J.Cancer* 1992;51:459-65.

Neumaier M, Shively L, Chen FS, Gaida FJ, Ilgen C, Paxton RJ, et al. Cloning of the genes for T84.66, an antibody that has a high specificity and affinity for carcinoembryonic antigen, and expression of chimeric human/mouse T84.66 genes in myeloma and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1990;50:2128-34.