

**Design neuer bi- und trispezifischer
Antikörperderivate für die zielgerichtete Applikation
haptenylierter toxischer Payloads**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Juliane Adelman
geb. am 23.07.1978 in Würzburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. Hauke Lilie
2. Prof. Dr. Frank Bordusa
3. Dr. Alexander Haas

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.12.2020

„Was wir wissen, ist ein Tropfen,
war wir nicht wissen, ein Ozean.“

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Strategien der zielgerichteten Krebstherapie.....	2
1.1.1	Targeted Drug Delivery	2
1.1.2	Monoklonale Antikörper.....	3
1.1.3	Antikörper-Radionuklid-Konjugate.....	5
1.1.4	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate.....	5
1.1.5	Immuntoxine	6
1.2	Problemstellung und Ziele.....	7
1.2.1	Strategien zur Moleküloptimierung von ADCs oder Immuntoxinen	7
1.2.1.1	Target-Auswahl.....	8
1.2.1.2	Antikörperstruktur und Effektorfunktion	9
1.2.1.3	Zytotoxische Payloads.....	11
1.2.1.4	Konjugation und Linker-Design	13
1.2.1.5	Hapten-bindende Antikörper.....	18
1.2.2	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	25
2.1.3	Puffer und Nährmedien	29
2.1.4	Kits.....	30
2.1.5	Vektoren.....	30
2.1.6	Antikörper und enzymkonjugierte Sekundärantikörper	30
2.1.7	Bakterienstämme und Zelllinien	31
2.1.8	Synthetische Oligonukleotide	32
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	32
2.2.1.1	Restriktion und Ligation	32

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.2.1.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	34
2.2.1.4	RNA-Isolierung	34
2.2.1.5	Reverse Transkription	34
2.2.1.6	RACE PCR	35
2.2.1.7	TOPO Klonierung	36
2.2.1.8	Transformation und Anzucht verwendeter Mikroorganismen.....	36
2.2.1.9	Isolierung von Plasmid DNA.....	37
2.2.1.10	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	37
2.2.2	Design der Expressionsvektoren.....	37
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	38
2.2.3.1	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität eukaryontischer Zellen.....	38
2.2.3.2	Reaktivierung einer Kryokultur	39
2.2.3.3	Kultivierung eukaryontischer adhärenter und Suspensionszellen.....	39
2.2.3.4	Transfektion eukaryontischer Suspensionszellen und Proteinexpression	40
2.2.3.5	Durchflusszytometrie	40
2.2.3.6	Zellviabilitätsassay.....	42
2.2.3.7	Zellbasierter ELISA.....	43
2.2.3.8	Konfokalmikroskopie	44
2.2.4	Biochemische Methoden	44
2.2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittel UV-Spektroskopie	44
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
2.2.4.3	Western-Blot	45
2.2.4.4	Proteinreinigung über Protein A-Affinitätschromatographie	46
2.2.4.5	Proteinreinigung über Kappa-Select-Affinitätschromatographie	46
2.2.4.6	Präparative Größenausschlusschromatographie	47
2.2.4.7	Analytische Größenausschlusschromatographie	48
2.2.4.8	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Biacore)	49
2.2.4.9	Massenspektrometrie	50
2.2.5	Haptenylierung der Payloads	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Toxische Payloads.....	53

3.1.1	Chemotherapeutische Payloads.....	56
3.1.1.1	Analytik der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe mittels SEC.....	56
3.1.1.2	Analytik der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe mittels zellbasiertem ELISA.....	58
3.1.1.3	Analytik der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe mittels Durchflusszytometrie	59
3.1.1.4	Konfokalmikroskopie der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe	60
3.1.1.5	Aktivität der toxischen Payloads vor und nach Haptenylierung	61
3.1.1.6	Targeting der toxischen Payloads auf MCF-7 Zellen	62
3.1.2	Proteintoxine als Payloads	64
3.1.2.1	Massenspektrometrische Analytik.....	64
3.1.2.2	Aktivität vor und nach Haptenylierung	66
3.1.2.3	Targeting auf MCF-7 Zellen.....	66
3.1.3	Zusammenfassung.....	68
3.2	Bispezifische Digoxigenin bindende Antikörperderivate	69
3.2.1	Expression und Reinigung des DIG-trivalenten Triple-Fab	70
3.2.2	Charakterisierung des DIG-trivalenten Triple-Fab	72
3.2.2.1	Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page.....	72
3.2.2.2	Massenspektrometrie	74
3.2.3	Expression und Reinigung des DIG-trivalenten KIH-VD Antikörperkonstrukts	75
3.2.4	Charakterisierung des DIG-trivalenten KIH-VD Antikörperkonstrukts	76
3.2.4.1	Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page.....	76
3.2.4.2	Massenspektrometrie	78
3.2.5	Funktionalitätsnachweis drei aktiver DIG-Bindestellen	79
3.2.5.1	Analytische Größenausschlusschromatographie mit DIG-siRNA-Cy5.....	79
3.2.5.2	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie mit DIG-Doxorubicin.....	81
3.2.6	Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MCF-7 Zellen.....	84
3.2.7	Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MOLM-13 Zellen.....	85
3.2.8	Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur	87
3.2.9	Zusammenfassung.....	90
3.3	Bispezifische Theophyllin bindende Antikörperderivate	91
3.3.1	Generierung eines monoklonalen humanisierten Theo-bindenden IgG	92
3.3.1.1	RACE-PCR und TOPO Klonierung	93

3.3.1.2	CDR-Grafting	94
3.3.2	Bestimmung der Bindungsaffinität	95
3.3.3	Expression und Reinigung des Theo-trivalenten Triple-Fab	96
3.3.4	Charakterisierung des Theo-trivalenten Triple-Fab.....	98
3.3.4.1	Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page.....	98
3.3.4.2	Massenspektrometrie	100
3.3.5	Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MCF-7 Zellen.....	101
3.3.6	Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MOLM-13 Zellen.....	102
3.3.7	Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur	102
3.3.8	Zusammenfassung.....	104
3.4	Trispezifische Digoxigenin und Theophyllin bindende Antikörperderivate...105	
3.4.1	Expression und Reinigung des trispezifischen DIG-Theo-Antikörpers	106
3.4.2	Charakterisierung des trispezifischen DIG-Theo-Antikörpers	107
3.4.2.1	Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page.....	107
3.4.2.2	Massenspektrometrie	109
3.4.3	Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe auf MOLM-13 Zellen.....	110
3.4.4	Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur	112
3.4.5	Zusammenfassung.....	115
4	Diskussion.....	117
4.1	Toxine als Payloads.....	118
4.1.1	Haptenylierung und Targeting	118
4.1.2	Charakterisierung.....	122
4.2	Bispezifische Digoxigenin bindende Antikörperderivate.....	123
4.2.1	Expression und Reinigung	124
4.2.2	Charakterisierung.....	125
4.2.3	Funktionalitätsnachweis drei aktiver DIG-Bindestellen	127
4.2.4	Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur	128
4.3	Bispezifische Theophyllin bindende Antikörperderivate	129
4.4	Trispezifische Digoxigenin und Theophyllin bindende Antikörperderivate...131	
5	Ausblick.....	134

Inhaltsverzeichnis

6	Abstract	135
7	Abkürzungsverzeichnis.....	136
8	Literaturverzeichnis.....	139
9	Anhang.....	152
	Danksagung.....	163

1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich rund 500 000 Menschen neu an Krebs, etwa 45 % der Patienten sterben an den Krankheitsfolgen. Krebs ist somit die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (RKI, 2015)(destatis, 2015). Weltweit erkranken jährlich etwa 14 Millionen Menschen neu an Krebs, etwa 8.2 Millionen sterben daran. Laut der *World Health Organisation* (WHO) wird sich in den nächsten zwei Jahrzehnten die Zahl neuer Krebserkrankungen weltweit um etwa 70 % erhöhen (WHO, 2015). Trotz jahrzehntelanger Forschung ist bei vielen Tumorerkrankungen bis heute eine kurative Therapie nicht möglich. Anhand etlicher Kriterien wie z.B. Krebsform, Tumor-Lage, -Größe und -Stadium wird entschieden, welchen Behandlungsstrategien die Patienten unterzogen werden können. Dabei kann sowohl eine einzelne Therapieform wie auch eine Kombination mehrerer Therapien angewandt werden. Neben den gängigen Möglichkeiten wie der chirurgischen Entfernung des Tumors, der Strahlen- und Chemotherapie kommen auch biologische Therapeutika zum Einsatz. Sowohl die Strahlen- wie auch die Chemotherapie haben den Nachteil, dass es zu Schäden an gesundem Gewebe bzw. gesunden Zellen kommen kann. Bei der Strahlentherapie werden Tumorzellen im Tumorgewebe durch hochenergetische Strahlung geschädigt und zerstört, wodurch das Wachstum des Tumors gebremst werden soll. Trotz präziser Tumorlokalisation und Bestrahlung heutzutage kommt es allerdings immer noch häufig zu Schädigung des gesunden angrenzenden Gewebes, was je nach Tumorlokalisation, zu mehr oder weniger schweren Nebenwirkungen führen kann. Während die Strahlentherapie vor allem der lokalen Tumorbehandlung dient, wirken die in der Chemotherapie eingesetzten Zytostatika systemisch. Zytostatika sind Medikamente, welche entweder direkt auf die Zellteilung einwirken oder den Stoffwechsel der Tumorzelle stören. Da Stoffwechsel- und Zellteilungsvorgänge aber auch in gesunden Zellen stattfinden, werden auch gesunde Zellen geschädigt. Tumorzellen weisen eine hohe Zellteilungsrate auf, wodurch die Chemotherapeutika diese meist mehr schädigen als die übrigen Körperzellen, welche sich zum Zweck des Erhalts und der Regeneration nur langsam teilen. Wenn die Körperzellen allerdings wegen starker mechanischer Beanspruchung und somit notwendiger schneller Regenerationsfähigkeit eine ähnlich Teilungsrate wie Tumorzellen aufweisen, dann kann es zu bekannten Nebenwirkungen wie Schleimhautproblemen, Haarausfall, Nagelschäden, Anämie und Infektanfälligkeit kommen. Chemotherapeutika werden außerdem sowohl intrazellulär und intravasal metabolisiert als auch über die Leber und Niere ausgeschieden, was zur Folge hat, dass dementsprechend hohe Dosen verabreicht werden müssen, um einen therapeutischen Effekt am Tumor zu erzielen. Hierbei ist es häufig schwierig die Balance zwischen ausreichender Aktivität gegen die Tumorzellen und möglichst geringer systemischer Toxizität zu finden. Oft liegt die maximal tolerierte Dosis unter der Dosis, welche für eine

effektive Therapie notwendig wäre. Deshalb wird seit Jahrzehnten an Strategien des sogenannten *Drug Targeting* geforscht, also an Möglichkeiten Krebszellen zielgerichtet mit Chemotherapeutika oder auch anderen zytotoxischen Agenzien zu behandeln.

1.1 Strategien der zielgerichteten Krebstherapie

1.1.1 Targeted Drug Delivery

Eine Möglichkeit für die gezielte Anreicherung der Wirkstoffe an Tumorzellen ist das *Passive Drug Targeting*. Hierbei nutzt man den EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention), also die erhöhte Durchlässigkeit der Endothelzellen von Gefäßen, im Bereich des Tumors. Große Moleküle mit einem Durchmesser von etwa 10 bis 100 nm können extravasieren und sich im interstitiellen Raum des Tumors anreichern (Matsumura *et al.*, 1986)(Greish *et al.*, 2003). Um die sehr kleinen chemotherapeutischen Moleküle in dieser makromolekularen Form verabreichen zu können, werden lösliche partikuläre Träger, wie z.B. Liposomen, Nanopartikel oder polymere Mizellen benötigt. Aufgrund der geringen Anzahl von Lymphgefäßen, welche für den Abtransport der im Gewebe befindlichen Flüssigkeit verantwortlich sind, kann das Chemotherapeutikum, eingebunden in diese Makromoleküle, im Vergleich zur konventionellen Gabe so eine 10- bis 100-fach höhere intratumorale Konzentrationen erreichen (Hamaguchi *et al.*, 2005)(Padera *et al.*, 2002).

Eine weitere Möglichkeit der gezielten Wirkstoffanreicherung ist das *Physikalische Drug Targeting*. Neoplastisches Gewebe zeigt zum Teil einen niedrigeren pH oder eine erhöhte Temperatur im Vergleich zu gesundem Gewebe. Es gibt Wirkstoffträger, welche sich dies zu Nutze machen und durch diesen physikalischen Unterschied dazu angeregt werden ihren Wirkstoff abzugeben (Danhier *et al.*, 2010)(Torchilin *et al.*, 1993). Aber auch andere Stimuli wie z.B. Magnetfelder können dazu genutzt werden, Wirkstoffe über beispielsweise ferromagnetische Träger am Tumor anzureichern und gezielt freizusetzen (Lübbe *et al.*, 1996).

Eine weitere vielversprechende Variante einen Wirkstoff gezielt an Tumorzellen anzureichern ist das *Aktive Drug Targeting*. Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, um die Wirkstoffe an ihre Zielorte zu bringen. Wie beim *Passiven Drug Targeting* sind mit Chemotherapeutika beladene partikuläre Träger wie Liposomen, Nanopartikel oder polymere Mizellen denkbar, die ihrerseits wieder mit einem Targeting Vektor gekoppelt sind, welche für einen gezielten Transport zur Tumorzelle sorgen. Auch können Chemotherapeutika oder Toxine direkt über unterschiedliche Methoden an ein Vektormolekül gebunden und so zum Tumor transportiert werden. Krebszellen exprimieren häufig tumorspezifische Antigene, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren oder bestimmte Zuckerstrukturen auf ihrer Oberfläche, an welche die Vektormoleküle mit einer bestimmten Spezifität binden können. Als Vektormoleküle

eignen sich Antikörper (AK) und deren Fragmente, Proteine, Peptide, Lectine, Hormone, Zytokine, Polysaccharide oder Oligonukleotide.

Der Nutzen all dieser Targeting Methoden liegt v.a. darin die Toxizität für gesunde Zellen zu reduzieren. Bei der Entwicklung eines solchen zielgerichteten Therapeutikums gilt es im Wesentlichen drei Parameter bzw. die Kombination dieser Parameter untereinander zu beachten. Diese drei Parameter sind Target, Wirkstoff und Design des Vektormoleküls. In den letzten 30 Jahren wurde besonders intensiv an antikörperbasierten Therapeutika geforscht. Hinsichtlich des Targets ist es für eine erfolgreiche Anwendung der antikörperbasierten Therapeutika wichtig, dass die tumorassoziierten Antigene in hoher Dichte, möglichst homogen auf der Tumoroberfläche vorliegen, in gesundem Gewebe kaum vorhanden bzw. nicht zugänglich sind und nicht durch Proteasen von der Zelloberfläche abgespalten werden. Auch die Internalisierung und das intrazelluläre *Trafficking* bestimmen maßgeblich die Wirkung des zielgerichteten Therapeutikums (Goldmacher & Kovtun, 2011). Auf detailliertere Kriterien der genannten Parameter in der Entwicklung antikörperbasierter Therapeutika wird in der Zielstellung dieser Arbeit weiter eingegangen (siehe 1.2).

1.1.2 Monoklonale Antikörper

Die Einführung der Technologie zur Produktion monoklonaler Antikörper (*monoclonal Antibodies*, mAbs) von Köhler und Milstein (Köhler & Milstein, 1975) legte den Grundstein für die Entwicklung hoch selektiver Krebstherapeutika. War es in den Anfängen nur möglich murine Antikörper herzustellen, die den Nachteil hoher Immungenität, kurzer Halbwertszeiten und unzureichender Effektorfunktionen aufwiesen, so ist es durch die Fortschritte der Immun- und Molekularbiologie heute möglich chimere (Neuberger *et al.*, 1985), humanisierte (Jones *et al.*, 1986) oder humane (Lonberg, 2008) Antikörper herzustellen (Abb. 1.1-1). Die für die Antigenbindung wichtige Region eines Immunglobulins G (IgG) ist die variable Region der leichten (VL) und schweren Kette (VH). Da Antikörper hochkonservierte Strukturen über die Evolution aufweisen, können chimere Antikörper, über die Fusion der murinen variablen Regionen mit den humanen konstanten Regionen (Fc) der leichten (LC) und schweren Kette (HC), generiert werden. Es entstehen Antikörper, die zu etwa 70 % human sind und einen vollständigen humanen Fc-Teil besitzen, wodurch sie weniger immunogen sind und im Körper besser von den Effektorzellen oder dem Komplementsystem gebunden werden können. Wird der murine Anteil des Antikörpers über CDR-Grafting noch weiter verringert (Jones *et al.*, 1986), so dass nur noch die Komplement bestimmenden Regionen (CDRs) murin sind, so spricht man von humanisierten Antikörpern, die eine noch niedrigere Immunogenität aufweisen. Es gibt über 70 monoklonale, meist chimäre oder humanisierte Antikörper unterschiedlichster Art, die von der *Food and Drug Administration* (FDA) als Medikament zur

Behandlung verschiedener Erkrankungen, wie z.B. Krebs, zugelassen sind (FDA, 2016). Die Mechanismen therapeutischer Antikörper, welche zum Absterben der Tumorzellen führen, sind unterschiedlich. So können z.B. Ligand-Rezeptor-Interaktionen blockiert werden, die für das Wachstum oder Überleben der Tumorzellen notwendig sind. Außerdem kann es durch den Fc-Teil des an der Tumorzelle gebundenen Antikörpers zu einer antikörperabhängigen, zellulären Zytotoxizität (ADCC) durch die Effektorzellen des Immunsystems, zur Komplement vermittelten Zytolyse (CDC) oder zur Komplement vermittelten zellabhängigen Zytotoxizität (CDCC) der Tumorzellen kommen (siehe 1.2.1.2).

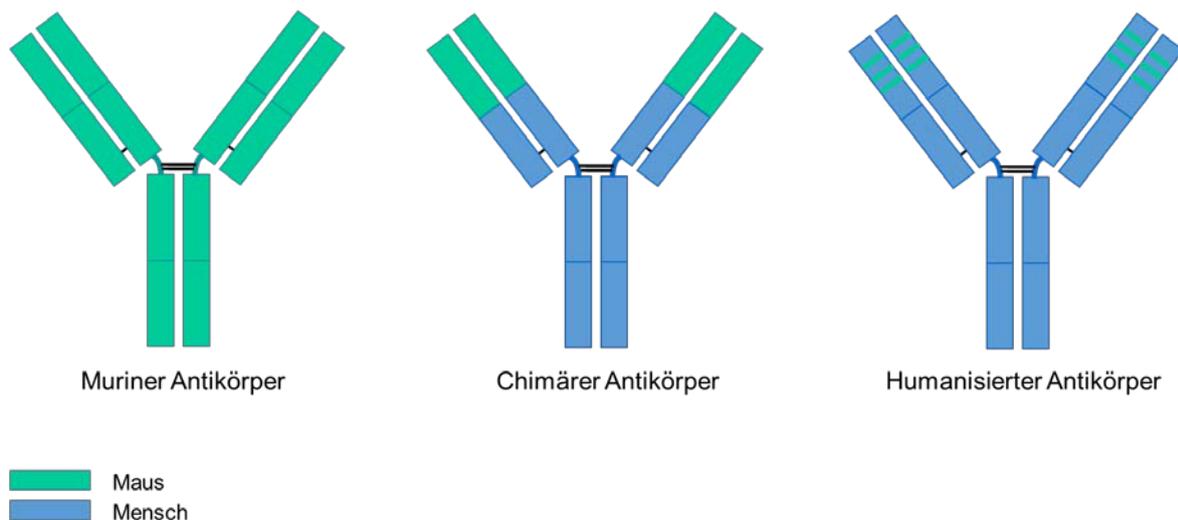


Abb. 1.1-1: Schematische Darstellung modifizierter mAbs für therapeutische Anwendungen

Bei murinen Antikörpern sind die beiden schweren und leichten Ketten zu 100 % murinen Ursprungs. Bei chimären Antikörpern sind nur die variablen Regionen der leichten und schweren Kette murinen Ursprungs. Humanisierte Antikörper tragen nur noch in den hypervariablen Regionen (HVRs) murine Merkmale.

Trotz des therapeutischen Nutzens der monoklonalen Antikörper, ist der Bedarf an wirksameren Molekülen hoch. Denn monoklonale Antikörper zeigen häufig nur einen lebensverlängernden Effekt, aber keine Heilung. Das Beispiel Rituxan[®], der erste für das Non-Hodgkin's Lymphom (NHL) zugelassene chimäre anti-CD20 Antikörper, zeigt zwar eine beachtliche Verminderung der CD20-tragenden Lymphomzellen bei etwa 50 % der behandelten Fälle, allerdings nur eine *Complete Response Rate* (CRR) von etwa 10 % (Eisenbeis *et al.*, 2003). Kombiniert man die Behandlung zusätzlich mit einer Chemotherapie, so verbessert man zwar den Behandlungserfolg im Vergleich zur alleinigen Antikörpertherapie, aber eine wesentlich höhere vollständige Remissionsrate ist nicht zu verzeichnen. Deshalb wurden und werden weitere modifizierte, anti-CD20 Antikörper basierte Moleküle entwickelt. Ein erfolgsversprechender Ansatz zur Verbesserung der Wirksamkeit therapeutischer Antikörper allgemein ist die Konjugation verschiedenster sogenannter Payloads, wie

konventionellen Chemotherapeutika, Radionukliden oder auch Pflanzen- oder Bakterientoxinen an Antikörper oder Antikörperderivate.

1.1.3 Antikörper-Radionuklid-Konjugate

Für die zielgerichtete Therapie von radioaktiven Substanzen wäre ein Antikörper ideal, der sich schnell an der Tumorzelle anreichert und nur kurz im Körper zirkuliert. Als Payload können alpha- oder beta-Strahler zum Einsatz kommen. Im Fall von anti-CD20 mAbs wurden mit Zevalin® und Bexxar® von der FDA zwei Antikörper-beta-Strahler-Konjugate (*Antibody-Radionuclide-Conjugates*, ARC) zur Behandlung des NHL zugelassen. Die mit den ARCs einhergehende Problematik des Handlings von radioaktiven Substanzen und deren Entsorgung, neben z.B. Herstellung und Lagerung dieser Moleküle, stellt allerdings eine logistische und technische Herausforderung dar. Die Schwierigkeit bei der Entwicklung eines solchen Moleküls ist außerdem, die für die jeweilige Tumorart passende und wirksamste Kombination aus Radionuklid und Antikörper zu finden (Koppe *et al.*, 2005)(Steiner *et al.*, 2011). So konnte seit der Zulassung von Zevalin® und Bexxar® 2002 bzw. 2003 kein weiteres ARC in klinischen Studien im Vergleich zu komplementären unkonjugierten Antikörpern überzeugen.

1.1.4 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Wie bereits erwähnt, gehört die Kombination von monoklonalen Antikörpern mit einer Chemotherapie in der Therapie bereits zu gängigen Routine im klinischen Alltag, um eine höhere Wirksamkeit zu erzielen. Dabei tritt allerdings immer der große Nachteil der *Off-Target* Toxizität gegenüber normalen Zellen auf. Um diese zu verringern, wird ein ähnlicher Gedanke, wie bei der Entwicklung der ARCs verfolgt, nämlich die Konjugation einer kleiner zytotoxischen Substanz an einen monoklonalen Antikörper. Das dadurch entstehende Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (*Antibody-Drug-Conjugate*, ADC) sollte durch die spezifische Bindung eines tumorassozierten Antigens einen deutlich besseren therapeutischen Index aufweisen – also eine geringere systemische Toxizität bzw. Toxizität für gesunde Zellen bei therapeutisch wirksamer Dosis zeigen. ADCs der „ersten Generation“ waren monoklonale Antikörper, die mit seit Jahrzehnten bekannten und in der Klinik verwendeten Zytostatika wie Methotrexat (Smyth *et al.*, 1987), Vinblastin (Schrappe *et al.*, 1992) oder Doxorubicin konjugiert wurden (Yang & Reisfeld, 1988)(Firestone *et al.*, 1996). BR96-Dox, ein Doxorubicin-Konjugat mit einem anti-LeY-Antikörper, welcher an dem auf Brustkrebszellen überexprimierten Oberflächenantigen Lewis Y bindet, konnte in Phase II Studien nicht überzeugen. Die Wirksamkeit von Doxorubicin als Payload war zu niedrig, die Instabilität des Linkers und die Bindung an normale Zellen zu

hoch, so dass die Entwicklung dieser ADCs eingestellt wurde (Tolcher *et al.*, 1999). Für die ADCs der zweiten Generation wurden 100 bis 1000fach potentere Zytostatika als bei den vorher entwickelten ADCs getestet. Meist handelt es sich um Substanzen, die als „freie“ Chemotherapeutika, also ohne sie an monoklonale Antikörper zu konjugieren, eine zu hohe systemische Toxizität aufwiesen. So wurde beispielsweise das ADC Kadzycla[®] entwickelt, welches auf dem mAb Trastuzumab basiert und mit dem Maytansinoid N(2')-deacetyl-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin (DM1) konjugiert ist. Kadzycla[®] ist seit 2012 zur Therapie von metastasierendem Brustkrebs (*Metastatic Breast Cancer*, MBC) zugelassen. Ein Jahr zuvor wurde bereits Adcetris[®], ein ADC aus dem monoklonalen anti-CD30-Antikörper und dem Zytostatikum Monomethylauristatin E (MMAE) zur Behandlung des Hodgkin-Lymphoms und des anaplastischen großzelligen Lymphoms (ALCL) zugelassen. Aktuell befinden sich über 30 ADCs in klinischen Phasen, die meisten davon sind Antikörperkonjugate mit den von Kadzycla[®] oder Adcetris[®] bekannten, wirksamen Zytostatika aus der Gruppe der Maytansinoide (Widdison *et al.*, 2006) oder Auristatine (Doronina *et al.*, 2006).

Im Wesentlichen können bei der Behandlung mit ADCs die gleichen Nebenwirkungen wie bei „freien“ Chemotherapeutika auftreten. Denn ist die zytotoxische Payload nicht stabil genug an den Antikörper bzw. das Antikörperderivat gekoppelt, so kann sie sich im Plasma vom ADC lösen. Durch die Plasmastabilität kann es dann zu unerwünschten systemischen Nebenwirkungen kommen. Krebszellen können außerdem durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen resistent gegenüber verschiedensten chemischen Agenzien werden. Diese *Multi Drug Resistance* (MDR) wird beispielsweise durch eine Überexpression des P-Glykoproteins MDR1 oder anderer Transporterproteine, welche den Efflux der Chemotherapeutika aus Krebszellen erhöhen, verursacht. Im Falle der Maytansinoide, welche häufig in der Entwicklung von ADCs eingesetzt werden, ist bekannt, dass die erhöhte Expression von MDR1 für die Resistenz gegen das hochpotente Zytostatikum oder dessen Konjugate verantwortlich ist (Tang *et al.*, 2009). Die MDR ist ein Problem, welches den therapeutischen Nutzen und die Potenz der ADCs deutlich einschränkt.

1.1.5 Immuntoxine

Ebenso wie bei ADCs wird auch bei Immuntoxinen das Prinzip genutzt die toxische Payload, in dem Fall Bakterien- oder Pflanzentoxine, an einen Antikörper zu koppeln, um nach Antigenbindung und Internalisierung das Absterben der Zellen zu induzieren. Die Toxizität ist meist auf die Hemmung der Proteinbiosynthese in der Zelle zurückzuführen. Die Toxine können chemisch mit unterschiedlichen Linkern an einen Antikörper oder ein Antikörperderivat gekoppelt werden. Mit dem seit Jahrzehnten bekannten, hochwirksamen Bakterientoxin *Pseudomonas Exotoxin* (PE) (Iglewski *et al.*, 1977)(Pollack, 1983) wurden aber auch vermehrt

rekombinante Immuntoxine entwickelt. PE hat eine Größe von etwa 66 kDa und inaktiviert, nach Internalisierung und Freisetzung ins Zytosol, den Elongationsfaktor 2 (EF-2), was zur Hemmung der Translation und so zum Absterben der Zelle führt. Die Größe des aus drei Domänen bestehenden PE66 (Allured *et al.*, 1986), konnte durch Weglassen einzelner Teil-Domänen auf ein 40 oder 38 kDa großes Molekül (PE40 oder PE38) verkleinert und die Zytotoxizität durch gezielte Mutation einer Aminosäuresequenz am C-Terminus erhöht werden (Kreitman & Pastan, 1995). PE gehört, mit z.B. Ricin und dem Diphtherie Toxin (DT), zu den Toxinen, die natürlicherweise eine Domäne haben, die die Bindung an die Zelle vermittelt. In dieser natürlichen Form können sie in Zellen eindringen und dort ihre zytotoxische Wirkung entfalten. Immuntoxine der ersten Generation enthielten noch das Toxin der gesamten Länge, wie es in der Natur vorkommt und meist murine Antikörper, an die sie gekoppelt wurden. Später wurde die Zellbindungsdomäne entfernt und durch Antikörper oder Antikörperderivate ersetzt (Bird *et al.*, 1988)(Huston *et al.*, 1988)(Brinkmann *et al.*, 1991). Durch die Kopplung kleinerer Antikörperderivate wie scFvs konnte bei Immuntoxinen die schlechte Tumorpenetration der Immuntoxine, die an vollständige IgGs gekoppelt wurden, verbessert werden. Aktuell befindet sich beispielsweise ein Immuntoxin zur Therapie verschiedener Leukämie-Arten, bestehend aus einem Disulfid verbrücktem variablen Fragment (dsFv) gegen CD22, an welches PE38 konjugiert wurde, in der klinischen Phase I (Kreitman *et al.*, 2012). Für die Therapie solider Tumoren werden ähnliche Immuntoxine gegen LeY in klinischen Studien (Pastan *et al.*, 2007) untersucht. Ein großer Nachteil der Immuntoxine ist, dass die Therapie auf wenige Gaben beschränkt sein kann, da es häufig zu Immunreaktionen gegen das Toxin (*Human Anti-Toxin Antibody*, HATA) oder den murinen Antikörper (*Human Anti-Mouse Antibody*, HAMA) kommt. Das Problem der HAMAs konnte durch die Konjugation an humane bzw. humanisierte Antikörper oder Antikörperderivate angegangen werden. Anders als bei ADCs sind die Toxine keine kleinen chemischen Moleküle, sondern größere Peptide oder Proteine pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs und ihre Domänen sind hoch immunogen. So kann es passieren, dass bereits nach wenigen Infusionen, HATAs gebildet werden. Um dies zu vermeiden, verfolgen neuere Ansätze das Ziel, B- oder T-Zell-Epitope, welche eine solche Immunreaktion auslösen könnten, gentechnisch zu beseitigen (Onda *et al.*, 2008).

1.2 Problemstellung und Ziele

1.2.1 Strategien zur Moleküloptimierung von ADCs oder Immuntoxinen

In der klinischen Entwicklung der beiden bereits aufgeführten ADCs zeigte sich deutlich, dass es keine universelle, für alle ADCs allgemeingültige „Bauweise“ gibt. Die erfolgreiche Entwicklung eines ADCs hängt von mehreren Faktoren ab. So spielen Antikörper bzw. das

Antikörper-Format, die Wirksamkeit der zytotoxischen Payload, die Stabilität des Linkers und der Kopplungsstelle, an welche das Payload-Linker-Molekül konjugiert wird, eine entscheidende Rolle (Goldmacher & Kovtun, 2011).

1.2.1.1 Target-Auswahl

Grundsätzlich bleibt die Auswahl des Targets eine der schwierigsten Aufgaben. Ideal wäre ein tumorspezifisches Antigen, welches ausschließlich auf Tumorzellen oder der Tumervaskulatur (Gerber *et al.*, 2009) und sehr gering auf normalen Zellen exprimiert wird. Da die meisten bisher identifizierten tumorassoziierten Antigene auch auf normalen Zellen vorhanden sein können, ist ein vorheriger Test der Expressionslevel unabdingbar. Ein geeignetes Target für ein ADC oder Immuntoxin wäre eines, das in hoher Dichte selektiv und homogen auf Tumorzellen und in geringer Dichte auf gesunden Zellen vorhanden ist. Dabei muss das Target aber nicht zwangsläufig massiv überexprimiert sein. Bei Mylotarg[®], welches gegen das CD33-Antigen auf AML-Zellen (akute myeloische Leukämie, AML) gerichtet ist, findet man nur etwa 5000 bis 10000 Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Tanimoto *et al.*, 1989). Das sind etwa 300-mal weniger als etwa bei dem Antigen Her2 auf bestimmten Brustkrebszellen. Ist es bei den eingangs erwähnten ARCs nicht zwingend erforderlich, dass sie internalisiert werden, da die Strahlung sogar in benachbartes Gewebe einige Millimeter bis Zentimeter tief eindringen und so Zellen zerstören kann, müssen Immunttoxine und in der Regel auch ADCs, nach Bindung auf Tumorzellen, internalisiert werden. Zytotoxische Payloads müssen üblicherweise ins Zellinnere oder sogar in den Zellkern gelangen, um dort wirken zu können, weshalb Targets ausgewählt werden sollten, die eine effiziente Internalisierung zeigen. Die Tumorzellen auf denen das Target nicht homogen exprimiert sein sollte, können von dem sogenannten *Bystander Effekt* profitieren. Dabei können in der Zelle freigesetzte zytotoxische Payload-Moleküle durch die Zellmembran nach außen diffundieren und von dort in Nachbarzellen aufgenommen werden, welche so ebenfalls abgetötet werden (Kovtun *et al.*, 2006). Neben der Antigendichte und der Internalisierungsrate hat auch die Bindungsaffinität einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit des ADCs oder Immuntoxins. Dabei ist zu beachten, dass eine hohe Bindungsaffinität und schnelle Internalisierung zwar das Nebenwirkungspotenzial verringern, aber bei der Therapie von soliden Tumoren auch von Nachteil sein kann, da das ADC oder Immuntoxin dann weniger weit in das Tumorgewebe eindringt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit LeY (Scott *et al.*, 2000) und CD33 (van der Velden *et al.*, 2001) zwei bekannte Oberflächenantigene genutzt, die durch frühere Forschungsarbeiten hinreichend charakterisiert sind und von denen bekannt ist, dass sie nach Antikörperbindung internalisieren.

1.2.1.2 Antikörperstruktur und Effektorfunktion

Ebenso wie bei unkonjugierten mAbs ist die Aufnahme des ADCs oder Immuntoxins durch den Tumor von der richtigen Balance zwischen Pharmakokinetik, Tumorpenetration und -retention abhängig. Diese werden wiederum im Wesentlichen durch Antikörper- bzw. ADC- oder Immuntoxin-Größe, -Form, -Affinität, -Isotyp, Anzahl der Antigen-Bindungsstellen und Anzahl der pro Antikörper gebundenen toxischen Payload bestimmt. Der Isotyp des Antikörpers spielt v.a. für die Pharmakokinetik eine Rolle. Die meisten der in der klinischen Entwicklung oder auf dem Markt befindlichen ADCs sind vom Isotyp IgG1. Diese liegen mit etwa 150 kDa von der Größe her deutlich über dem Schwellenwert der Nierenfiltration von etwa 70 kDa, was ein Herausfiltern der ADCs durch die Glomeruli der Nieren verhindert. Die CH2-CH3-Domäne im konstanten Teil des IgG kann außerdem an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen, wie z.B. Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen binden. Dies führt zu Antikörper Recycling (Roopenian & Akilesh, 2007), wodurch Antikörper eine deutlich längere Halbwertszeit haben, was meistens von Vorteil ist, da die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert werden (Kuo & Aveson, 2011)(Yip *et al.*, 2014). Bindet die Fc-Domäne an einen Rezeptor der Fcγ-Familie, welcher auf der Oberfläche verschiedener Effektorzellen, wie Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert wird, wird das zelluläre Immunsystem, insbesondere die ADCC durch die natürlichen Killerzellen stimuliert (Nimmerjahn & Ravetch, 2007). Dabei spielt ein niedriger Fucose-Gehalt in der Glykosylierung der CH2-Domäne eine entscheidende Rolle für die Affinität der Fcγ-Rezeptor-Bindung, was zur Entwicklung afucosylierter Antikörper geführt hat (Mori *et al.*, 2007). Der Fc-Teil hat, wie in Abb. 1.2-1 gezeigt, darüber hinaus aber auch noch einen weiteren Einfluss auf die Funktion des Antikörpers. Er kann über die Bindung des Faktors C1q das Komplement aktivieren, wodurch die CDC bzw. CDCC ausgelöst wird und ebenso wie die ADCC zum Absterben der durch den Antikörper gebundenen Zelle führt.

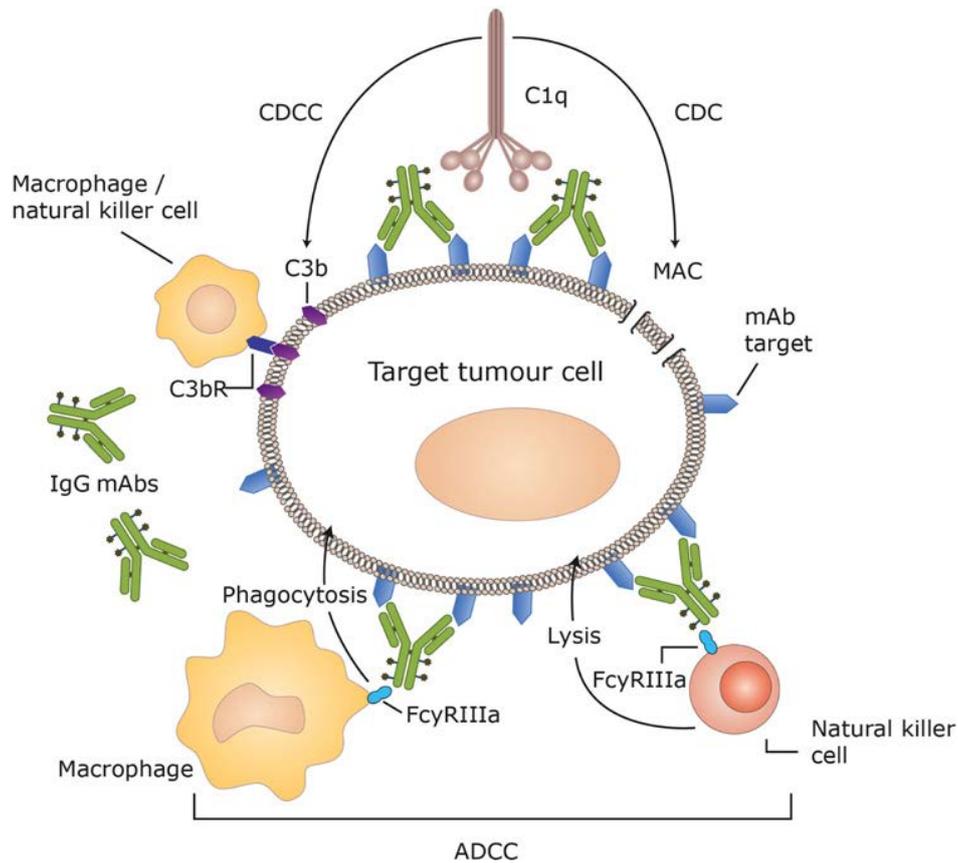


Abb. 1.2-1: Schema der Antikörper vermittelten Immunantwort (angepasst nach Peters & Brown, 2015)

Nach der Bindung eines IgG mAbs an das Oberflächenantigen auf einer Tumorzelle wird über den C1q Komplement Faktor, der an den Fc-Teil des mAbs bindet, die Komplementabhängig Kaskade ausgelöst. Es kommt zu Ausbildung Membran attackierender Komplexe (MAC), welche zur Lyse der Zellen führen (CDC). C3b, welches während der Komplementkaskade gebildet wird, vermittelt die Bindung an C3b-Rezeptoren auf Makrophagen und Killerzellen, die die Phagozytose und Zytolyse induzieren (CDCC). Die Antikörper binden über den Fc-Teil außerdem an Fcγ-Rezeptoren auf der Oberfläche von Makrophagen und natürlichen Killerzellen (ADCC), wodurch ebenfalls Phagozytose und Zytolyse ausgelöst wird.

Im Falle von ADCs oder Immuntoxinen ist die ADCC bzw. die Fcγ-Rezeptor-Bindung für die therapeutische Wirksamkeit nicht wichtig. Denn das ADC oder Immuntoxin sollte nach Target-Bindung internalisiert werden, damit die zytotoxische Payload intrazellulär freigesetzt werden und wirken kann. Somit ist kein Antikörper mehr auf der Zelloberfläche zugänglich, der die ADCC auslösen könnte. In dieser Hinsicht ist die CH2-Domäne mit entsprechender Fcγ-Rezeptor-Bindung für die Wirkung von ADCs und Immuntoxinen nicht ausschlaggebend. Neben Antikörpern vom Typ IgG wurden in unkonventionelleren Ansätzen auch vermehrt kleinere Formate entwickelt (Bird *et al.*, 1988)(Holliger & Hudson, 2005), die aufgrund ihrer geringen Größe den Vorteil haben, dass sie sich schneller und gleichmäßiger in soliden Tumoren verteilen. Dieser Ansatz ist auch für ADCs oder Immuntoxine sinnvoll, allerdings

besteht durch den fehlenden Fc-Teil der Nachteil, dass kein Antikörper Recycling stattfindet, was eine geringe Zirkulationsdauer der Antikörperderivate im Körper bewirkt. Wird eine Größe von etwa 70 kDa unterschritten, werden die Antikörperderivate außerdem sehr schnell über die Niere ausgeschieden, was häufige Infusionen für eine ausreichende Wirksamkeit notwendig macht. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf größeren Antikörperkonstrukten, da basierend auf dem Prinzip der bispezifischen Hapten-bindenden Antikörper, die Anzahl gebundener haptenylierter Payloads erhöht werden sollte, was nur mit einem größeren Antikörperkonstrukt erreicht werden konnte. Für analytische Fragestellungen wurden allerdings auch kleinere Antikörperderivate hergestellt, die nur eine haptenylierte Payload binden konnten.

1.2.1.3 Zytotoxische Payloads

Die gängige Annahme für den Wirkmechanismus eines Immuntoxins ist, dass es nach Antigenbindung über endozytische Prozesse internalisiert wird, anschließend das Toxin im Zellinnern aus den Endosomen freisetzt und es durch dessen Wirkung zum Absterben der Zelle kommt. Bei ADCs hingegen ist grundsätzlich nicht auszuschließen, dass sie nicht internalisiert werden müssen, sondern das Chemotherapeutikum nach Antigenbindung des gesamten ADCs extrazellulär abgespalten werden kann und anschließend durch Diffusion oder andere Transportmechanismen in die Krebszelle gelangt, um dann dort zelltötend zu wirken. Da die Expressionslevel mancher Target-Antigene auf Tumorzellen häufig nicht sehr hoch sind, muss die Payload eine ausreichend zytotoxische Wirkung haben – auch bei niedrigen Konzentrationen. Die meisten der zytotoxischen Payloads der derzeit in der Entwicklung befindlichen ADCs binden an die DNA und verhindern eine erfolgreiche Replikation oder sie binden an Tubulin, wodurch die für die Mitose wichtige Funktion der Mikrotubuli gestört wird. In beiden Fällen führt dies zur Induktion der Apoptose. In dieser Arbeit wurden mit Mitomycin C und Doxorubicin zwei anti-Tumor Antibiotika getestet, die aufgrund ihrer hohen unspezifischen Toxizität nicht für die Behandlung bakterieller Infektionen geeignet sind und so ihren Weg in die Tumorthherapie gefunden haben. Mitomycin C interkaliert nach enzymatischer Aktivierung zwischen zwei DNA-Stränge und verhindert so die Transkription und Replikation der DNA, wodurch sowohl das Wachstum als auch die Vermehrung der Zellen zum Erliegen kommt. Doxorubicin interkaliert in die DNA und hemmt die Topoisomerase II, ein für die Entspiralisierung der DNA wichtiges Enzym, wodurch sowohl die Zellteilung als auch die Transkription und somit die Proteinsynthese behindert wird. Doxorubicin wie auch Mitomycin C zeigen eine höhere Aktivität in proliferierenden Zellen und müssen in relativ hoher molarer Konzentration, etwa im mikromolaren Bereich, angewandt werden, um einen ausreichenden zytotoxischen Effekt zu erzielen (An *et al.*, 2015)(Chen *et al.*, 2013). Deshalb

wird Mitomycin C und Doxorubicin häufig in chemotherapeutischer Kombinationstherapie eingesetzt (Cocconi *et al.*, 1994)(Pujade-Lauraine *et al.*, 2010). Die Wirksamkeit von Doxorubicin wird nicht nur durch die Kombination mit weiteren Zytostatika versucht zu erhöhen, sondern auch durch die Kombination mit anderen Arzneien, wie z.B. dem Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen (Panasci *et al.*, 1996). Häufig wird Doxorubicin dabei nicht „frei“, sondern in Form von Doxorubicin beladenen Mizellen oder Liposomen bestimmter Größe verabreicht, um ein passives Targeting zu erreichen und so die Nebenwirkungen von Doxorubicin zu reduzieren (Huang *et al.*, 2010)(Oudard *et al.*, 1991) .

Die Bakterien- oder Pflanzentoxine zeigen häufig ein sehr hohes zytotoxisches Potential, welches sogar teilweise so hoch ist, dass ein einziges Molekül pro Zelle für den Zelltod ausreichend ist (Yamaizumi *et al.*, 1978). Zahlreiche der hoch potenten Pflanzentoxine gehören zu den Ribosomen inaktivierenden Proteinen (RIPs). Diese entfernen Adenin aus der ribosomalen 28S-rRNA, wodurch es zum Erliegen der Proteinbiosynthese und so zum Absterben der Zelle kommt. Man unterscheidet Typ-I-RIPs, etwa 30 kDa große monomere Proteine, die nur Enzymaktivität besitzen und Typ-II-RIPs, welche zusätzlich eine Lectin bindende Domäne oder eine andere Rezeptorbindungsdomäne in Form einer etwa 35 kDa großen zellbindenden Kette enthalten (Lord *et al.*, 1994). Ricin und Abrin sind die zwei Typ-II-RIPs und Saporin und Gelonin die zwei Typ-I-RIPs, welche bis heute am besten charakterisiert und klinisch erforscht sind. Saporin hat sich in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Tumorzelllinien und Target-Antigenen als vielversprechende zytotoxische Payload erwiesen (Pistillo *et al.*, 2003)(Kato *et al.*, 2012), weshalb dieses Typ-I-RIP im Rahmen der Doktorarbeit untersucht werden sollte. Saporin ist ein pflanzliches Toxin, welches aus dem gewöhnlichen Seifenkraut *Saponaria officinalis* isoliert werden kann. Für die Testung innerhalb dieser Doktorarbeit wurde das Extrakt aus den Samen des Seifenkrauts verwendet, welches aus einem Gemisch mehrerer Isoformen besteht, die alle die für die zytotoxische Wirkung notwendigen, katalytisch aktiven Domänen aufweisen (Ferrerias *et al.*, 1993).

Bei den Bakterientoxinen, wie dem *Pseudomonas* Toxin und dem Diphtherie Toxin, handelt es sich um Proteine mit nur einer Kette, die allerdings sowohl katalytische Domänen als auch Zellbindungsdomänen besitzt. Sowohl Bakterien- als auch Pflanzentoxine können also, sofern eine Zellbindungsdomäne vorhanden ist, an die Zelloberfläche binden und internalisieren. Sie sollten proteolytische Abbauprozesse und den sauren pH, wie er z.B. in Endosomen vorherrscht, unbeschadet überstehen, um nach Abspaltung von der Bindungsdomäne, durch die katalytische Inhibition der Ribosomen, Apoptose induzieren zu können. Kommen diese Toxine als zytotoxische Payloads für Immuntoxine zum Einsatz, wird die Domäne bzw. Kette, die für die Zellbindung verantwortlich ist, durch einen Antikörper oder ein Antikörperderivat ersetzt. In dieser Doktorarbeit wurde das *Pseudomonas* Exotoxin als „Goldstandard“ mitgeführt, da es eines der am genauesten untersuchten Toxine für die Herstellung von

Immuntoxinen ist (Collier *et al.*, 1979)(Saelinger & Morris, 1987)(Wolf & Elsässer-Beile, 2009). Das native *Pseudomonas* Exotoxin besteht aus drei Domänen. Domäne I ist dafür verantwortlich, dass das Toxin an Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden kann. Domäne II ist die Translokationsdomäne, welche wichtig ist, damit das PE aus dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in das Zytosol gelangen kann und Domäne III ist für die eigentliche zytotoxische Wirkung verantwortlich. Das in dieser Arbeit verwendete PE38 ist eine verkürzte Form des PE66, dem die Rezeptorbindungsdomäne Ia vollständig (aa 1 - 252) und die Domäne Ib, teilweise (aa 365 – 380) fehlt (Roscoe, Pai & Pastan, 1997). Die Furin Schnittstelle, die benötigt wird, damit das Toxin katalytisch und so letztlich zytotoxisch wirken kann, wurde bei dieser verkürzten Form PE38 erhalten. Ebenfalls enthält PE38, wie das native lange PE66 auch, das C-terminale REDL Motiv, durch welches es an KDEL-Rezeptoren des Trans-Golgi Netzwerks binden kann. Es wird vermutet, dass dieses REDL Motiv dafür verantwortlich ist, dass das Toxin zum ER transportiert wird (Ogata *et al.*, 1990), von wo es durch Teile der Domäne II ins Zytosol transloziert. Domäne III katalysiert dort dann die ADP-Ribolysierung des Elongationsfaktor EF-2, wodurch es in Folge zum Erliegen der Proteinsynthese und somit zum Absterben der Zelle kommt.

1.2.1.4 Konjugation und Linker-Design

Sowohl bei ADCs als auch bei Immuntoxinen spielt der Linker und die Konjugation eine entscheidende Rolle, da dadurch die Pharmakokinetik, die Löslichkeit, die Stabilität, der therapeutische Index und die Wirksamkeit nachhaltig beeinflusst wird (Boylan *et al.*, 2013).

Ein idealer Linker sollte im Blutkreislauf stabil sein, so dass die zytotoxische Payload erst am Tumor freigesetzt wird und so die *Off-Target* Toxizität minimiert wird. Gleichzeitig sollte die zytotoxische Payload nach Internalisierung effizient und in intakter Form von dem Antikörper oder Antikörperderivat abgespalten werden (Teicher & Chari, 2011). Bei den meisten ADCs in der klinischen Entwicklung wird die zytotoxische Payload unspezifisch an bestimmte, auf der Antikörperoberfläche zugängliche Aminosäuren, meist Lysine, oder an Sulfhydryl-Gruppen in der Hinge-Region Antikörpers bzw. in der CH1- und Ckappa (Cκ) Region der HC und LC konjugiert (Abb. 1.2-2 und Abb. 1.2-2B). Dies resultiert in einem Mix von ADC-Spezies mit variablen *Drug-Antibody-Ratios* (DAR) und Konjugationsstellen (Sochaj *et al.*, 2015). Es können somit für gewöhnlich ADC Moleküle mit keiner, nur einer oder bis zu 8 toxischen Payloads entstehen (Junutula *et al.*, 2010), die sich auch noch hinsichtlich der Konjugationsposition unterscheiden. Die Schwierigkeit im Produktionsprozess ist diese Unterschiede zu kontrollieren, monitoren und das heterogene Material robust aufzureinigen. Ein Weg diese Heterogenität zu minimieren, ist die *Site-specific Conjugation*, also die stöchiometrisch und lokal definierte, homogene Konjugation der zytotoxischen Payload an den

Antikörper bzw. das Antikörperderivat. Grundsätzlich lässt sich das durch drei Strategien realisieren (Abb. 1.2-2C): i) das Einfügen von Cysteinen, die auf der Oberfläche der Antikörper zugänglich sind (Lyons *et al.*, 1990)(Stimmel *et al.*, 2000) ii) das Einfügen unnatürlicher Aminosäuren mit anschließender Konjugation des Toxins an diese Aminosäuren (Young & Schultz, 2010) iii) die enzymatische Konjugation an bestimmte Aminosäuremotive (Jeger *et al.*, 2010). Bei der Kopplung an Thiole eingeführter bzw. mutierter Cysteine auf der Oberfläche müssen milde Reduktions- und Reoxidationsbedingungen angewandt werden, damit keine *interchain*- und *intrachain*-Cysteine, sondern nur eingeführte bzw. mutierte Cysteine konjugiert werden und wenig heterogene Produkte entstehen (Junutula *et al.*, 2008). Neben der Konjugation an Cysteine, ist auch die Konjugation an eine unnatürliche Aminosäure wie p-acetylphenylalanin denkbar, die zuvor in die konstante Region des rekombinant hergestellten Antikörpers eingefügt worden ist. An diese mutierten Antikörper werden beispielsweise Alkoxyamin-Wirkstoffderivate unter Ausbildung einer stabilen Oximbindung gekoppelt (Axup *et al.*, 2012). Auch chemoenzymatische Konjugationen werden getestet. Die aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* stammende Sortase A katalysiert die Hydrolyse der Bindung zwischen Threonin und Glycin in Proteinen, die das Motiv $^N\text{LPXTG}^C$ enthalten, um dann eine neue Peptidbindung zwischen dem C-Terminus des Threonin und dem freien N-Terminus einer Polyglycin-Akzeptormoleküls einzugehen (Madej *et al.*, 2012). Bringt man dieses Motiv an geeigneter Stelle in einen Antikörper oder dessen Derivat ein, kann man es dazu nutzen eine zytotoxische Payload, die einen Poly-Glycin-Tag enthält, daran spezifisch und definiert zu koppeln.

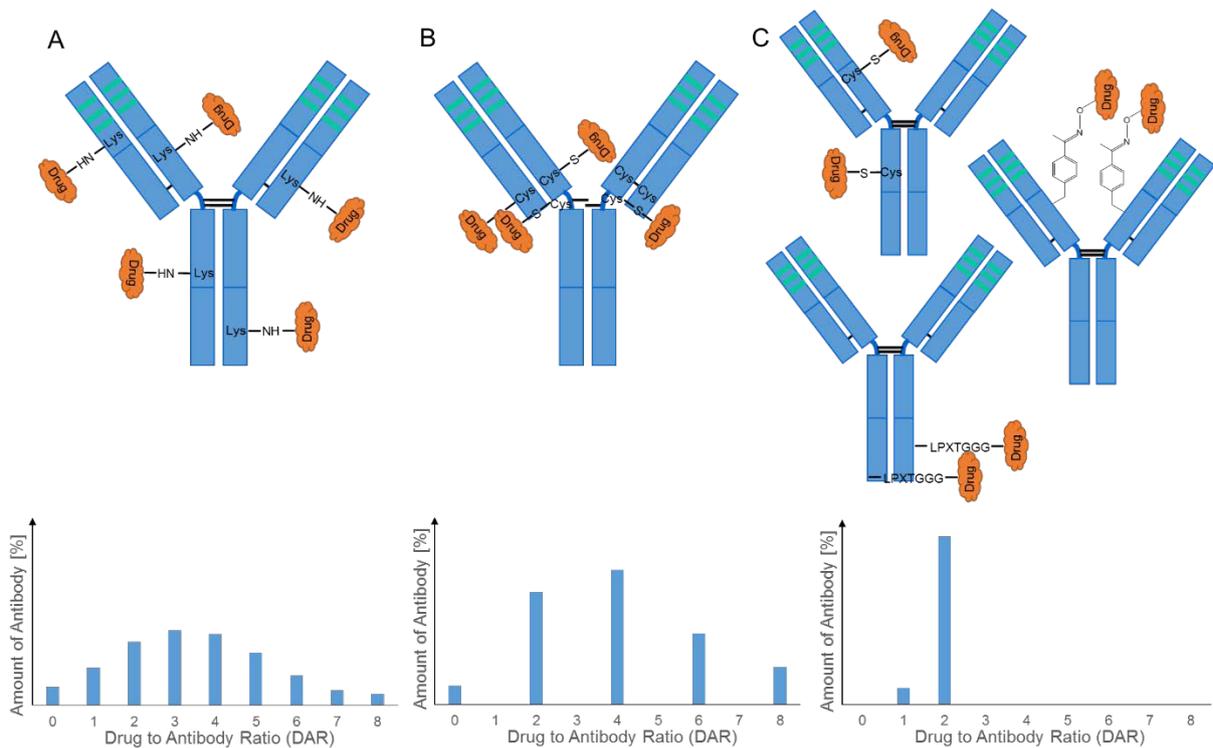


Abb. 1.2-2: Schema zur Konjugation zytotoxischer Payloads an Antikörper

A Konjugation an Lysine führt zu großer Heterogenität des ADCs hinsichtlich Position und Anzahl der modifizierten Lysine. **B** Konjugation über die Reduzierung von *interchain*-Disulfidbrücken zeigt zwar reduzierte, aber immer noch große Heterogenität der ADCs hinsichtlich ihrer DAR. **C** Die *Site-specific Conjugation* bietet über das gezielte Einführen von Cysteinen, unnatürlichen Aminosäuren oder bestimmten Aminosäuremotiven für die enzymatische Kopplung, die Möglichkeit die Anzahl und die Position gebundener zytotoxischer Payloads zu regulieren. Die Anzahl der Konjugationssites kann auch erhöht werden (DAR Daten entstammen Panowski *et al.*, 2014).

Der ideale Linker sollte im Blutkreislauf stabil sein, damit die pharmakokinetischen Eigenschaften des ADCs ähnlich wie die des unkonjugierten Antikörpers sind, die Wirkung der Payload in der Tumorzelle aber nicht behindert wird. Bei den bisher entwickelten ADCs werden sowohl spaltbare als auch nicht spaltbare Linker eingesetzt. Bei den spaltbaren Linkern wird die Payload vom Trägermolekül unter unterschiedlichen Bedingungen freigesetzt. Bei Mylotarg[®] wurde beispielsweise ein säurelabiler Hydrazonlinker eingesetzt, der Calicheamicin erst im sauren Milieu der Endosomen (pH = 5-6) und Lysosomen (pH = 4.8) vom Antikörper abspaltet (van der Velden, 2001). Ein weiteres Prinzip nutzen Protease spaltbare Linker, bei denen lysosomale Proteasen die Peptidbindung eines kurzen Linker-Peptids spalten, und so die Freisetzung der zytotoxischen Payload ermöglichen. Die Protease Cathepsin B zum Beispiel wird in Tumorzellen überexprimiert (Podgorski & Sloane, 2003). Bei Adcetris[®] wurde deshalb ein Valin-Citrullin-Linker, also ein Dipeptid Linker, eingeführt, der nach Spaltung durch Cathepsin B letztlich die zytostatische Payload Monomethylauristatin E (MMAE) freisetzt (Senter & Sievers, 2012). Bei nicht spaltbaren Linkern wird die Payload nicht durch solch einen

„kontrollierten“ Mechanismus, sondern durch die Degradation des ADCs in den Lysosomen abgespalten. Wie Untersuchungen zeigten, bleibt die Payload dabei allerdings kovalent am Linker und an Aminosäureresten des Antikörpers gebunden (Erickson *et al.*, 2006)(Doronina *et al.*, 2003), was die Wirksamkeit der Payload aber nicht behindern muss. Häufig werden Maleimidocaproyl oder Thioether Linker, wie bei Kadcycla[®] eingesetzt (Junttila *et al.*, 2011). Nicht spaltbare Linker können die Verträglichkeit und Stabilität verbessern und so die *Off-Target* Toxizität im Vergleich zu spaltbaren Linkern minimieren (Polson *et al.*, 2009). Eine erhöhte Wirksamkeit durch den *Bystander* Effekt ist allerdings aufgrund der Undurchlässigkeit der Zellmembran für hydrophile Moleküle, zu denen die abgespaltenen Payload-Linker-Moleküle eher zählen, nicht zu erwarten. Unterschiedliche Studien zeigen, dass es Vor- und Nachteile bei beiden Linkern gibt und alle anderen Parameter der ADCs, wie z.B. das Target, die Antikörperstruktur oder die Payload ebenfalls bei der Wahl des Linkers berücksichtigt werden müssen (Lewis Phillips *et al.*, 2008)(Anthony W Tolcher *et al.*, 2003).

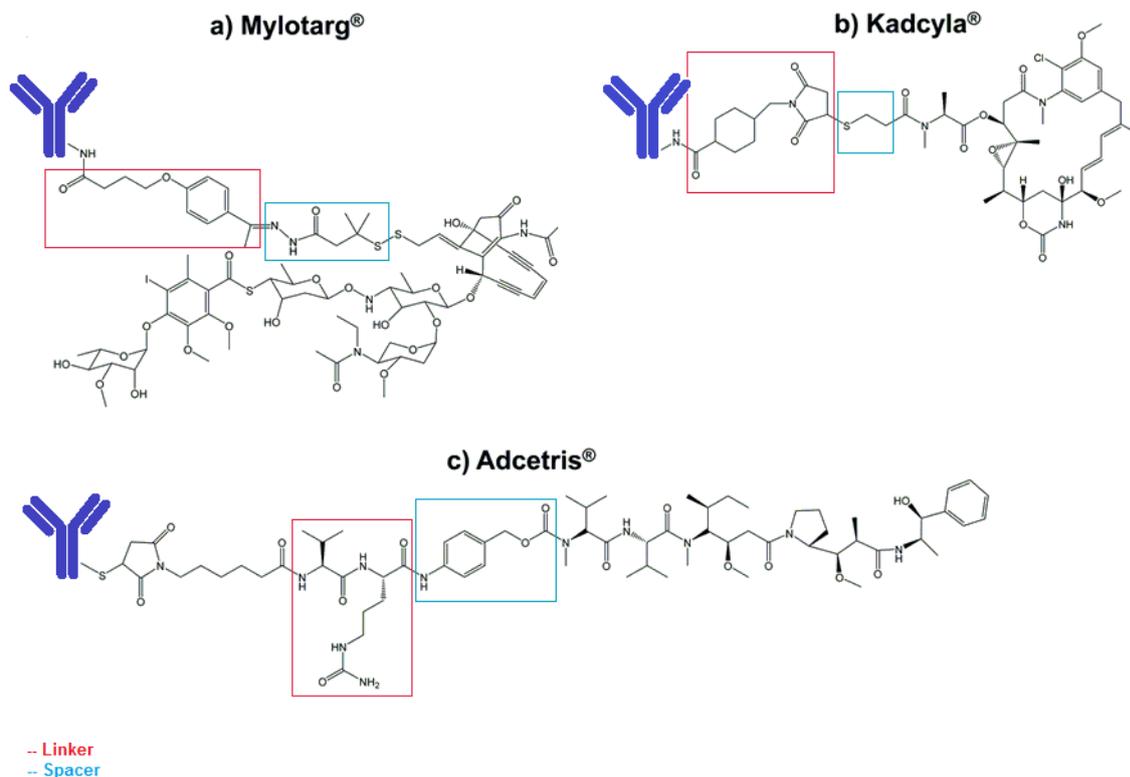


Abb. 1.2-3 Schematische Darstellung der zugelassenen ADCs (angepasst nach Hess *et al.*, 2014)

a) Mylotarg[®] ist ein anti-CD33-Antikörper, welcher mit dem Zytotoxin Calicheamycin konjugiert ist. An Lysine des Antikörpers ist der säurelabile Hydrazonlinker gekoppelt und daran ein Spacer, der wiederum die Bindung von Calicheamycin über eine Disulfidbrücke erlaubt. b) Kadcycla[®] ist ein anti-Her2-Antikörper, welcher mit dem Maytansin Derivat DM-1 konjugiert ist. An Lysine des Antikörpers ist ein SMCC-Linker (Succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexan-1-carboxylat) gekoppelt und daran ein Sulfhydryl-Spacer, der die nicht spaltbare Thioether Kopplung von DM-1 erlaubt. c) Adcetris[®] ist ein anti-CD30-Antikörper, welcher mit dem Zytostatikum Monomethylauristatin E (MMAE) konjugiert

ist. An Cysteine des Antikörpers ist ein Maleimidocaproyl Rest über einen Thioether gebunden. Der für die Funktion wichtige Cathepsin B spaltbare Dipeptid Linker ist über einen p-Aminobenzyl Carbamate Spacer an MMAE gebunden.

Grundsätzlich gelten für die Linker bei Immuntoxinen dieselben Anforderungen wie bei ADCs. Da es sich bei Immuntoxinen aber um toxische Proteine handelt, die an einen Antikörper gekoppelt sind, werden diese in der Regel rekombinant hergestellt, wodurch ein Linker überflüssig wird und die, durch die Instabilität des Linkers bedingte, *Off-Target* Toxizität selten die Ursache für Nebenwirkungen ist. Dafür werden aber häufig, wie unter 1.1.5 beschrieben, anti-Toxin-Antikörper gebildet. Erste Immuntoxine wurden hergestellt, indem man die vollständigen Toxine oder deren katalytische Untereinheiten über eine reduzierbare Disulfid- oder nicht reduzierbare Thioether-Bindung an den Antikörper koppelte (FitzGerald *et al.*, 1990). Dabei entstanden allerdings nicht selten instabil gekoppelte oder sehr heterogen gekoppelte Immuntoxine (FitzGerald *et al.*, 2004), weshalb sich rekombinant hergestellte Immuntoxine durchsetzten. Dies hat den Vorteil, dass ausschließlich nur Domänen des Toxins verwendet werden, die für die Wirkung wichtig sind und außerdem gezielt Mutationen in den Bereichen eingebracht werden können, die für HATAs verantwortlich sind. Sollen Immuntoxine kleiner Größe hergestellt werden, die durch ihre geringe Größe eine verbesserte Tumorpenetration haben, besitzt die rekombinante Produktion außerdem den Vorteil, dass relativ große Mengen über eine bakterielle Expression hergestellt werden können. Typische Toxine wie *Pseudomonas* Exotoxin oder das Diphtherie Toxin (Gu *et al.*, 1996)(Tsuneoka *et al.*, 1993) enthalten von Natur aus eine Furin Spaltstelle, die für die toxische Wirkung unerlässlich ist, da erst nach Spaltung die eigentlich toxische Domäne katalytisch aktiv wird (Chiron *et al.*, 1994). Furin ist ein Enzym, welches zur Familie der Proprotein Konvertasen gehört, d.h. es aktiviert andere Proteine indem es Aminosäureketten, welche die Aktivität blocken, entfernt. Es kommt in Endosomen bzw. dem Trans-Golgi-Netzwerk vor. Wird PE oder DT über die Rezeptorbindungsdomäne von einer Zelle gebunden, wird es internalisiert und löst sich im sauren Milieu der Endosomen wieder vom Rezeptor. Furin spaltet dann die Rezeptorbindungsdomäne von den toxischen Domänen, die somit durch Hemmung der Proteinsynthese den Zelltod auslösen können. Die Rezeptorbindungsdomäne wird in einem Immuntoxin durch einen Antikörper bzw. ein Antikörperderivat ersetzt. Die weiteren Domänen und die Furin Spaltstelle bleiben allerdings unverändert, da diese für das intrazelluläre Routing und die Aktivität des Toxins benötigt werden. Eine Verkürzung einzelner Domänen ist ggf. möglich, wenn man die entscheidenden Sequenzen beibehält (siehe 3.1). In jedem Fall ist bei der Konjugation und dem Linkerdesign darauf zu achten, dass die Wirkung des Toxins nicht signifikant eingeschränkt wird.

1.2.1.5 Hapten-bindende Antikörper

Für die „Kopplung“ eines Toxins an einen Antikörper kann, neben den unter 1.2.1.4 genannten Strategien, noch das Prinzip der Hapten-bindenden Antikörper eingesetzt werden. Hapten-bindende Antikörper sind schon sehr lange v.a. aus diagnostischen Anwendungen mittels ELISA bekannt, in denen sie für die Detektion endogener und exogener Substanzen, wie z.B. Glykolipiden oder Pestiziden eingesetzt werden (Duk *et al.*, 2003)(Vasylieva *et al.*, 2015). Haptene können Arzneimittelwirkstoffe, Hormone, Steroide, Vitamine, Herbizide und viele andere Substanzen sein. Einen Überblick über Haptene und Hapten-bindende Antikörper liefert eine eigene Datenbank, die umfassende Informationen über chemische, physikalische und strukturelle Eigenschaften dieser Moleküle gibt (M. K. Singh *et al.*, 2006). Allgemein versteht man unter einem Hapten ein kleines chemisches, stabiles Molekül, welches normalerweise eine Größe < 1000 Da besitzt und nicht immunogen ist. Erst wenn das Hapten an ein Trägerprotein, wie z.B. BSA gekoppelt ist, kann eine vollständige Immunreaktion und somit die Bildung von anti-Hapten Antikörpern ausgelöst werden. So wurden auch die ersten anti-DIG Antikörper vor Jahrzehnten generiert, die in dieser Arbeit als Basis für die bispezifischen DIG-bindenden Antikörper dienen (Kessler, 1991). Da es sich bei anti-Hapten Antikörpern um hochspezifische und hochaffine Antikörper handelt, wird dieses Prinzip seit einiger Zeit auch für therapeutische Anwendungen getestet (Schneider *et al.*, 2012)(Metz *et al.*, 2011).

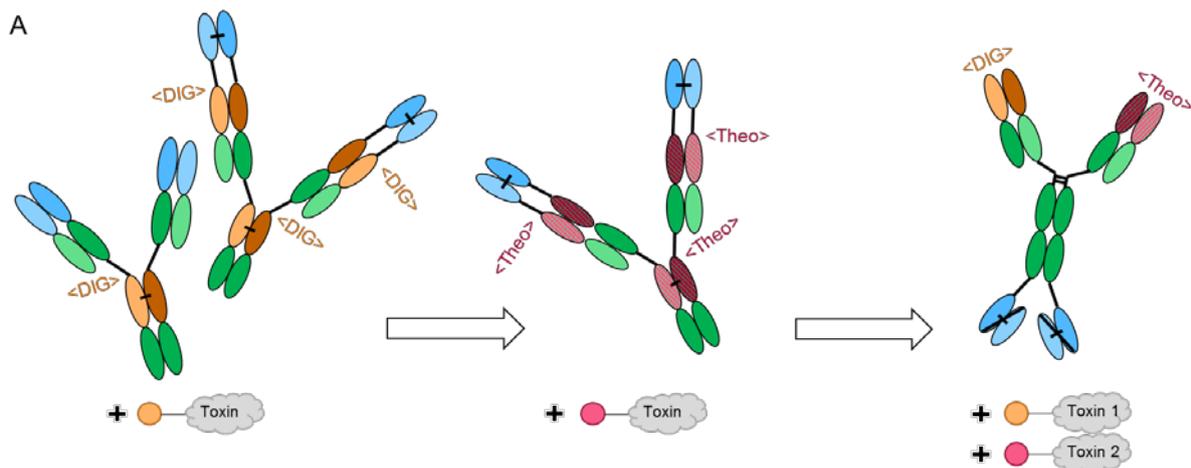
1.2.2 Zielsetzung der Arbeit

Die Entwicklung therapeutisch wirksamer ADCs und Immuntoxine hängt von vielen, in den vorherigen Kapiteln, beschriebenen Einflussfaktoren ab, die die Produktion sehr aufwendig werden lassen. Deshalb beschäftigt sich diese Arbeit damit, über haptenylierte Payloads und anti-Hapten Antikörper die Möglichkeit zu schaffen, Antikörper gegen verschiedenste Targets mit unterschiedlichsten toxischen Payloads, ähnlich einem „Baukastensystem“, zu kombinieren und so die Entwicklung therapeutischer exakt definierter Antikörper-Payload-Komplexe zu erleichtern. In dieser Arbeit sollten auf Basis des bereits durch S. Metz und Kollegen entwickelten bispezifischen bivalenten Digoxigenin bindenden Antikörpers zur zielgerichteten Payload-Applikation (Metz *et al.*, 2011)(Schneider *et al.*, 2012) weitere trivalente bispezifische Hapten-bindende Antikörper-Formate entwickelt werden. Es sollte dadurch ermöglicht werden nicht nur zwei, sondern drei toxische Wirkstoffmoleküle pro Antikörper in die Zelle einzuschleusen und so die zytotoxische Potenz der Antikörper zu verbessern. Neben dem Nachweis, dass alle Valenzen des bispezifischen Antikörpers für die Haptenbindung intakt sind und eine haptenylierte Payload binden, sollte der Nachweis

erbracht werden, dass der bispezifische Antikörper gleichzeitig spezifisch an das Oberflächentarget auf Tumorzellen binden kann.

Da Digoxigenin ein Derivat des herzaktiven Glykosids Digoxin ist (Terra *et al.*, 1999) und eine Wirkung auf das Herz, in der für die zielgerichtete Antikörper-Payload-Applikation benötigten Konzentration, zum jetzigen Zeitpunkt durch *in vivo* Versuche nicht auszuschließen ist, sollte mit Theophyllin ein alternatives Hapten zu Digoxigenin identifiziert werden. Bei Theophyllin handelt es sich um Purinalkaloid ähnlich wie Koffein oder Theobromin, welches für die Therapie von Bronchialerkrankungen eingesetzt wird. Die therapeutische Dosis liegt mit 5 – 10 µmol/L 5000 bis 10000 Mal höher als die von Digoxin (Markham & Faulds, 1998). Im Anschluss sollten die neu entwickelten Digoxigenin bindenden Antikörper-Formate auf Theophyllin übertragen werden (siehe Abb. 1.2-4). Zuletzt sollte außerdem die Bindung zweier unterschiedlicher Payloads über die beiden unterschiedlichen Haptene Digoxigenin und Theophyllin im Rahmen der Entwicklung trispezifischer Antikörper getestet werden, da diese Anwendung die Möglichkeit eröffnen würde synergistische Effekte von zwei unterschiedlichen Payloads auszutesten.

Weiterhin sollten aus der Literatur bekannte Toxine im Hinblick auf Haptenylierbarkeit und Toxizität untersucht werden. In einem Vorversuch sollte getestet werden, ob sich die Toxine Mitomycin C, Saporin, Doxorubicin und *Pseudomonas* Exotoxin hinsichtlich ihrer Toxizität und Haptenylierbarkeit als toxische Payloads eignen. Danach sollten die haptenylierten Toxine *in vitro* auf deren Zytotoxizität untersucht werden und verglichen werden, ob sich diese nach Haptenylierung verändert. Das Targeting und die Wirksamkeit der haptenylierten Payloads mit den neuen bi- oder trivalenten bispezifischen Antikörpern sollte in Zellkulturexperimenten getestet werden.



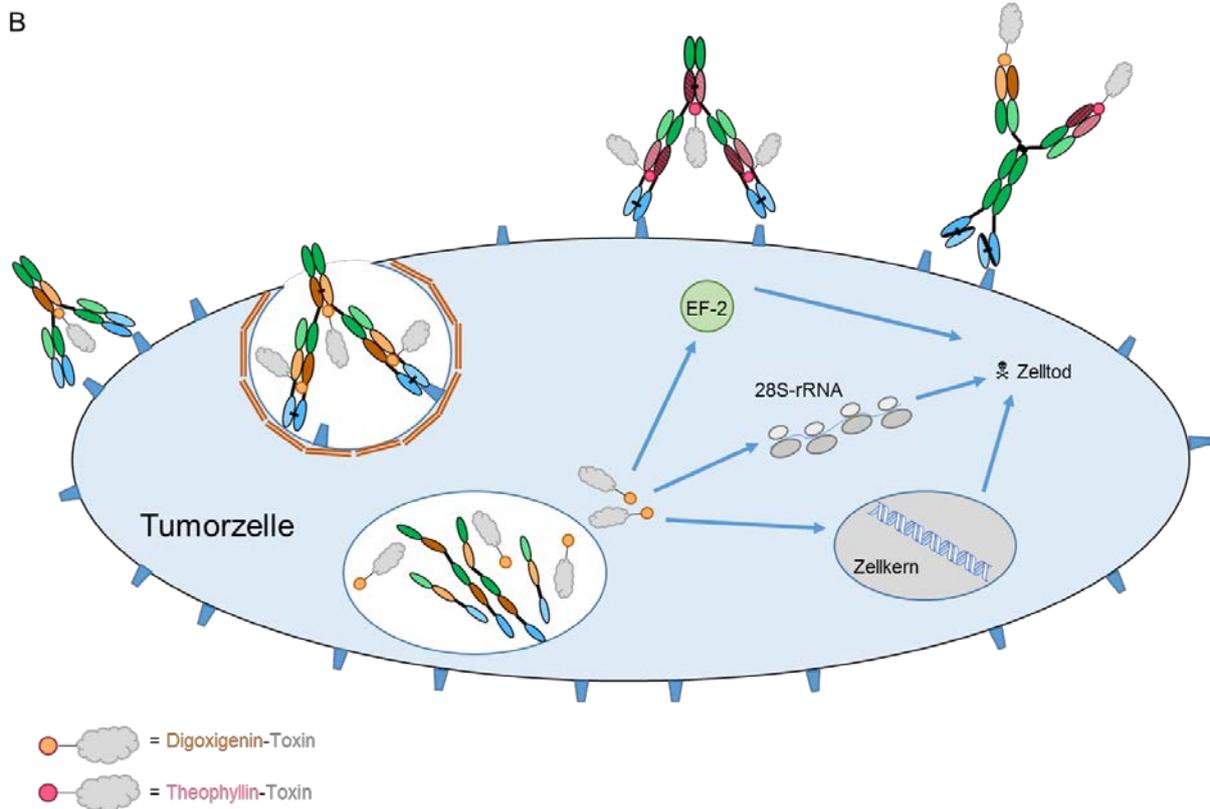


Abb. 1.2-4: Schema zur Strategie der Entwicklung bispezifischer Hapten-bindender Antikörper

A Auf Basis des bekannten Digoxigenin bindenden Antikörpers für die targetspezifische Payload-Applikation sollten neue Antikörper-Formate mit unterschiedlichen Valenzen für die Haptenbindung entwickelt werden. Ebenso sollten verschiedene Toxine haptenyliert werden, welche alleine und in Kombination mit den Digoxigenin bindenden Antikörpern *in vitro* auf Zytotoxizität zu testen waren. Die neuen Antikörper-Formate sollten auf das alternative Hapten Theophyllin übertragen werden, um das „Baukastensystem“ zu erweitern. Ebenso sollten trispezifische Antikörper zur Applikation zweier unterschiedlicher Payloads hergestellt werden. **B** Basierend auf der Theorie der Internalisierung von ADCs über Clathrin vermittelte Endozytose und anschließender proteolytischer Degradation (Senter, 2009)(Kovtun & Goldmacher, 2007)(Kalim *et al.*, 2017), sollten die bispezifischen Antikörper mit den toxischen Hapten-Payloads an ein tumorspezifisches Target binden und internalisiert werden. Im sauren pH der Endosomen sollte das Hapten-Toxin freigesetzt werden und so am jeweiligen intrazellulären Target durch seinen Wirkmechanismus zum Zelltod führen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
ÄKTAexplorer™ 100 Air mit Frac-950	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
ÄKTApurifier™ mit Frac-950	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Amicon® Ultra Centrifugal Filters 3000 MWCO, 15 mL	Millipore, Billerica (USA)
Amicon® Ultra Centrifugal Filters 30000 MWCO, 50 mL	Millipore, Billerica (USA)
Amicon® Ultra Centrifugal Filters 100000 MWCO, 50 mL	Millipore, Billerica (USA)
Biacore T100	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Biacore T200	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Biophotometer®	Eppendorf, Hamburg
Blottingpapier	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
Brutschrank BBD6220	Heraeus, Hanau
Brutschrank RUMED	Rubarth Apparate, Laatzen
Dokumentationsanlage (UV, Fluoreszenz) Lumi-Imager™ F1	Roche, Mannheim
Durchflusszytometer BD FACSCanto™	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

Bezeichnung	Hersteller
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen, Isernhagen
ELISA-Reader SpectraMax	Molecular Devices, München
Geldokumentationsanlage (UV) FluorChem FC2	Alpha Innotec, Kasendorf
Gelkammer für Agarose-Gelelektrophorese	PEQLAB, Erlangen
Gelkammer für SDS-PAGE Xcell SureLock™	Invitrogen, Carlsbad (USA)
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200, 318 mL	GE Healthcare, Buckinghamshire (USA)
HiTrap™ Kappa-Select™, 5 mL	GE Healthcare, Buckinghamshire (USA)
HiTrap™ MabSelect SuRe™, 5 mL	GE Healthcare, Buckinghamshire (USA)
HPLC-Anlage für analytische SEC Dionex Summit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Immobilon® PVFD Transfer Membrane	Millipore, Billerica (USA)
Konfokalmikroskop SP8	Leica, Wetzlar
Kunststoff-Drigalski Spatel	VWR, Darmstadt
Kunststoff-Erlenmeyerkolben, 0.25 - 3 L	Corning, Corning (USA)
Kunststoff-Impfösen	VWR, Darmstadt
MabPac™ SEC-1, 30 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Massenspektrometer MaXis (qTOF)	Bruker, Bremen
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenleser Tecan Infinite® F200	Tecan, Männedorf (CH)
Mikrozentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Multikanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Bezeichnung	Hersteller
ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington (USA)
Netzgerät für Agarose-Gelelektrophorese	Consort, Turnhout (B)
Netzgerät für SDS-PAGE PowerEase® 500	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Netzgerät für Western Blotting VLP 2403	Voltcraft (Conrad Electronic), Hirschau
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Objektträger mit 8-Well Kammer	Ibidi, Planegg
Omnifix, 10 mL	Braun, Melsungen
PD10 Desalting Columns	GE Healthcare, Buckinghamshire (USA)
pH-Meter Orion 3-Star	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikküvetten (Schichtdicke 1 cm)	Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach
Polypropylen-Röhrchen, 14 mL	Greiner, Kremsmünster (A)
Quarzglas-Küvetten	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße, 0.2 – 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Rollenmischer	A. Hartenstein, Würzburg
Schüttelinkubator Climo-Shaker ISF1-X	Kühner, Birsfelden (CH)
Schüttelinkubator Minitron	Infors, Bottmingen/Basel (CH)
Sensorchip C1	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)

Bezeichnung	Hersteller
Sensorchip CM5	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Sepahdex G-25	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Serologische Pipetten, 5 – 50 mL	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Sterilfilter Minisart 0.20 µm	Sartorius, Göttingen
Spritzenvorsatzfilter 0.22 µm	Millipore, Billerica (USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA)
TSKgel G3000SWXL, 30 mm	Tosoh Bioscience, Shunan (Japan)
Ultraschallgerät Sonifier® Cell Disrupter	Branson, Danbury (USA)
Ultrazentrifuge Sorvall® Evolution RC	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Umkehrmikroskop	Leica, Wetzlar
Uvikon UV Spektrometer	Goebel Analytik, Au
UV-Schirm Safe Imager	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Vakuumanlage Vacusafe comfort	INTEGRA Biosciences, Fernwald
Vortexer IKA MS3 basic	IKA, Staufen
Wasserbad precitherm PFV	ehem. Boehringer-Mannheim
96 Well-Mikrotiterplatte, transparent, U-Boden	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
96 Well-Mikrotiterplatte, weiß, transparenter Flachboden	Greiner, Kremsmünster (A)
Zeba™ Spin Desalting Columns, 2 und 5 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturflaschen, 75 und 175 cm ²	Greiner, Kremsmünster (A)
Zellzähler Casy [®] TTC	Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifugenbecher, 250 und 500 mL	Corning, Corning (USA)
Zentrifugen Centrifuge 5417R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3SR+	Heraeus, Hanau

Tabelle 2.1.1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
ABTS-Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Accutase	PAA, Pasching (A)
Acetonitril	Baker, Center Valley
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Alexa Fluor 488-Streptavidin-Konjugat	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammonium-Fe(II)-Citrat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto Agar	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
BamHI	New England Biolabs, Ipswich (GB)
BCIP [®] /NBT-Blue Liquid Substrate	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
bovines Serumalbumin (BSA)	Roche, Mannheim
Cy5 gelabelte Digoxigenin-siRNA	Roche, Penzberg & Kulmbach

Bezeichnung	Hersteller
Cy5-Polyglycerol-Nanopartikel	AG Haag, FU Berlin
D-Glukose	Merck, Darmstadt
Digoxigenin-Biotin	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Carboxymethyl-N-Hydroxysuccinimide Ester	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Cy5	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Cy5-Polyglycerol-Nanopartikel	AG Haag, FU Berlin
Digoxigenin-Doxorubicin	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Doxorubicin-Polyglycerol-Nanopartikel	AG Haag, FU Berlin
Digoxigenin-Methylcarbonyl- ϵ -Aminocaproicacid- N-hydroxysuccinimide Ester	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Mitomycin	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Methyl-Amid-Maleimid	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin- <i>Pseudomonas</i> Exotoxin PE38	Roche, Mannheim & Penzberg
Digoxigenin-Saporin	Roche, Mannheim & Penzberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Doxorubicin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Doxorubicin-Polyglycerol-Nanopartikel	AG Haag, FU Berlin
ESI-L MS low concentration tuning mix	Agilent, Santa Clara
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin, reinst	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (0.5 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
fötales Rinderserum (FBS)	PAA, Pasching (A)
Gelfiltrationsstandard Nr. 151-1901	Bio-Rad, Hercules (USA)

Bezeichnung	Hersteller
Glycin-HCl (pH 1.5)	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Guanidin Hydrochlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Hind III	New England Biolabs, Ipswich (GB)
Imidazol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Kpn I	New England Biolabs, Ipswich (GB)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
L-Asparagin	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Gibco, Carlsbad (USA)
L-Histidin	Merck, Darmstadt
Lysozym	Roth, Karlsruhe
MEM Non-Essential Amino Acids (100x)	Gibco, Carlsbad (USA)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid-Lösung (1 M)	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Natriumchlorid-Lösung (5 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung (4 mol/L)	VWR, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung (50 mM)	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)

Bezeichnung	Hersteller
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
N-Glycosidase F	Prozyme, Hayward
Penicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<i>Pseudomonas</i> Exotoxin PE38	Roche, Penzberg
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad, Hercules (USA)
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Saporin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Sacl	New England Biolabs, Ipswich (GB)
SDS-PAGE Laufpuffer NuPAGE® MES (20x)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
SimplyBlue™ Safe Stain	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Sojapepton HyPep 1510	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Spurenelementelösung	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Roche, Mannheim
Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Theophyllin-BSA	Roche, Mannheim & Penzberg
Theophyllin-Carboxypropyl-N-Hydroxysuccinimide ester	Roche, Mannheim & Penzberg
Theophyllin-Cy5	Roche, Mannheim & Penzberg
TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Transfektionsreagenz 293-Free™	Novagen (Merck), Darmstadt
Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tris-HCl (1 M), pH 8.0	Lonza, Basel (CH)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tween® 20-Lösung (10 %)	Bio-Rad, Hercules (USA)

Bezeichnung	Hersteller
Water, PCR Grade	Roche, Mannheim
Xba I	New England Biolabs, Ipswich (GB)
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

Tabelle 2.1.2: Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

2.1.3 Puffer und Nährmedien

Bezeichnung	Hersteller
FreeStyle293	Gibco, Carlsbad (USA)
Hepesgepufferte Saline (HBS-P)	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Hepesgepufferte Saline mit EDTA (HBS-EP)	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
LDS-Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
LB-Medium	Gibco, Carlsbad (USA)
LB Broth	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
OPTI-MEM Reduced Serum Medium	Gibco, Carlsbad (USA)
Phosphatgepufferte Saline (PBS) (10x)	Roche, Mannheim
phosphatgepufferte Saline Dulbecco's PBS (1 M)	PAA, Pasching (A)
RPMI 1640	Gibco, Carlsbad (USA)
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Carlsbad (USA)
SuRE/Cut Buffer A, B	Roche, Mannheim
TBE-Gelladepuffer (10x)	Invitrogen, Carlsbad (USA)
TBE-Puffer (10x)	Roche, Mannheim
Transferpuffer Tris/Glycin (10x)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Trisgepufferte Saline (TBS) (10x)	Bio-Rad, Hercules (USA)

Tabelle 2.1.3: Puffer und Nährmedien

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amine Coupling Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire (GB)
Cell Titer-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega, Madison (USA)
FirstChoice [®] RLM-RACE Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)
HiSpeed [®] Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO [®] TA Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Tabelle 2.1.4: Kits

2.1.5 Vektoren

Als Basis für die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren wurden zwei bereits vorhandene, auf pUC18-Vektoren basierende Vektoren verwendet, welche von Dr. Silke Metz (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) für die Expression der schweren und leichten Kette des bispezifischen Digoxigenin bindenden Antikörpers kloniert wurde (Metz *et al.*, 2011).

2.1.6 Antikörper und enzymkonjugierte Sekundärantikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Goat anti-human IgG (Fc specific)-Alkaline Phosphatase	Western Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Goat anti-human-kappa-light-chain (Bound and Free)-FITC	Durchflusszytometrie	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Goat anti-human-kappa-light-chain-Alkaline Phosphatase	Western Blot	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Chicken polyclonal anti-DIG-HRP	Zellbasierter ELISA	Abcam, Cambridge (UK)

Tabelle 2.1.5: Antikörper und Sekundärantikörper

2.1.7 Bakterienstämme und Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium + Zusätze
MAX Efficiency [®] DH5 α -T1	<i>Escherichia Coli</i> , Kompetente Zellen	LB-Medium
OneShot [®] Top10	<i>Escherichia Coli</i> , Kompetente Zellen	LB-Medium
XL10-Gold [®]	<i>Escherichia Coli</i> , Kompetente Zellen	LB-Medium
HEK293-F	Suspensionszelllinie aus humanem embryonalen Nierengewebe	Freestyle293
MCF-7	Adhärente Zelllinie aus humanem Adenokarzinom der Brust	RPMI 1640 10 % FBS 2 mM L-Glutamin
MOLM-13	Suspensionszelllinie humaner akuter myeloischer Leukämie	RPMI 1640 20 % FBS 2 mM L-Glutamin

Tabelle 2.1.6: Bakterienstämme, Zelllinien und Kulturmedien

2.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
Ckappa Primer	5'-GCGCAAGCTTCCTAACACTCATTCTGTTGAA GCTC-3'	MWG Biotech AG, Ebersberg
CH1 Primer	5'-GCGCGGTACCCTCGACAGCTGGCAGGGTTAA CTGG-3'	MWG Biotech AG, Ebersberg
Stabilisierte Cy5 gelabelte Digoxigenin Duplex siRNA	5' Cy5-CUG AAG ACC UGA AGA CAA UUU-DIG 3' 3' AUU GAC UUC UGG ACU UCU GUU 5'	Roche, Penzberg & Kulmbach
5' RACE Adapter	5'-GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUG CUGGCUUUGAUGAAA-3'	Invitrogen, Carlsbad (USA)
5' RACE Inner Primer	5'-CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTT GATG-3'	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Tabelle 2.1.7: Synthetische Oligonukleotide

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Für die Klonierung wurden entweder OneShot® Top10 oder XL10-Gold® verwendet.

2.2.1.1 Restriktion und Ligation

Für das sequenzspezifische Ausschneiden von DNA-Fragmenten aus längeren DNA-Abschnitten benötigt man Restriktionsendonukleasen, die es erlauben DNA-Stücke mit definierten Schnittenden zu generieren. Hierzu wurden etwa 3-4 µg DNA mit bis zu drei Restriktionsenzymen 1 h bei 37 °C inkubiert. Ein typischer Ansatz mit den dazugehörigen Volumina ist in Tabelle 2.2.1 aufgeführt.

Komponente	Volumen [µL]
DNA	2-5
Restriktionsenzym 1	1
Restriktionsenzym 2	1

SuRE/Cut B Puffer (10x)	2
H ₂ O	ad 20

Tabelle 2.2.1: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau

Zur Kontrolle des Verdau wurden die Reaktionsansätze nach Inkubation auf ein 0.8 %iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.2). Zeigten die Fragmente aus dem Verdau die korrekte Länge, wurden die entsprechenden Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem Herstellerprotokoll mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit extrahiert.

Für die Ligation der linearisierten DNA-Fragmente wurden dann Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent über die kompatiblen Enden miteinander verbunden. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur 15 min durchgeführt. Je nach Konzentration des Inserts wurden 2 bis 4 µL davon verwendet (Tabelle 2.2.2). Das erforderliche Verhältnis der benötigten DNA-Mengen errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Menge Vektor [ng]} * \text{Größe Insert [bp]}}{\text{Größe Vektor [bp]}} * \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = \text{Menge Insert [ng]}$$

Formel 2.2-1 Berechnung DNA-Menge für Ligation

Komponente	Volumen [µL]
Vektor DNA	1
Insert DNA	2 - 4
T4-DNA-Ligase	1
DNA-Dilution Puffer	4
T4-Ligase Puffer	10
H ₂ O	ad 20

Tabelle 2.2.2: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden auf ein 0.8 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur Herstellung des Gels wurden 0.8 g Agarose in 100 mL TBE-Puffer und 10 µL Ethidiumbromid-Lösung gelöst. Die DNA-Proben wurden 1:10 mit TBE-Gelladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurde der Größenstandard TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder mitgeführt. Durch Anlegen einer Spannung (125 V, 50 min) wurden die

DNA-Fragmente aufgetrennt und im UV-Licht durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2.2.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Banden definierter Größe wurden mit Hilfe eines Skalpell oder Bandenausstecher aus Plastik aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde dann mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit nach dem Herstellerprotokoll extrahiert und mit 30 µL Elutionspuffer eluiert.

2.2.1.4 RNA-Isolierung

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde das neue Hapten Theophyllin eingesetzt, welches an die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Payloads gekoppelt wurde. Dieses Hapten sollte von einem monoklonalen Hapten-bindenden Antikörper spezifisch gebunden werden. Um die DNA Sequenz, die zur gezielten Herstellung dieser Antikörper benötigt wird, herauszufinden, muss die RNA aus den murinen Hybridomzellen zunächst isoliert werden und im Anschluss in cDNA umgeschrieben und mittels PCR vervielfältigt werden. Für die RNA-Isolierung wurde der RNeasy-Kit® gemäß des Herstellerprotokolls genutzt. Ein Zellpellet mit 1×10^6 murinen Hybridomzellen wurde mit 350 µL RLTM-Puffer mit 1 % Mercaptoethanol gemischt. Nachdem die Probe sorgfältig homogenisiert wurde, wurde sie in ein QIAshredder Tube überführt und 2 min zentrifugiert. Die so gewonnene RNA wurde mit 350 µL 70 % Ethanol gewaschen, auf eine RNeasy Spin Column aufgetragen und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Danach wurde die RNA mit 700 µL RW1-Puffer gewaschen und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchlaufs, wurden 500 µL RPE-Puffer auf die RNeasy Spin Column aufgetragen und 15 s bei 8000 x g abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt. Allerdings wurde die RNeasy Spin Column 2 min bei 8000 x g zentrifugiert, um alle Reste von Ethanol zu entfernen. Die gereinigte RNA wurde von der Säule mit 30 µL RNase freiem Wasser 1 min bei 8000 x g eluiert. Die Konzentration der RNA wurde spektroskopisch bestimmt und betrug 0.83 µg/µL, was einer Gesamtmenge von etwa 32 µg entsprach. Die RNA wurde danach bei -80 °C gelagert.

2.2.1.5 Reverse Transkription

Die cDNA, welche für die weitere RACE-PCR benötigt wurde, ist mittels des FirstChoice® RLM-RACE Kits gewonnen worden. Dafür wurden 10 µg der isolierten RNA eingesetzt, um wie im Herstellerprotokoll beschrieben, über reverse Transkription eine cDNA zu erzeugen. Die

Gesamt-RNA wurde mit intestinaler Kälberphosphatase (CIP) behandelt, um die RNA mit freien Phosphatresten am 5'-Ende, wie z.B. rRNA, tRNA und fragmentierte mRNA zu entfernen und so die intakte Gesamt-mRNA weiter einsetzen zu können. Diese wurde im Anschluss mittels Chloroform-Phenol-Extraktion gereinigt und mit Tabaksäure-Pyrophosphatase (TAP) behandelt, um die CAP-Struktur zu entfernen. An dem verbleibenden Monophosphat des 5'-Ende erfolgte die Ligation des 5'RACE Adapters aus dem FirstChoice® RLM-RACE Kit. Für die reverse Transkription wurden dann 0.16 µg RNA aus der Ligrationsreaktion verwendet. Nach 1 h Inkubation bei 42 °C wurde der Ansatz bei -20 °C bis zur PCR aufbewahrt.

2.2.1.6 RACE PCR

Für die PCR wurde die KOD Hot Start Polymerase verwendet, da sie im Vergleich zur im Kit enthaltenen Taq Polymerase eine erhöhte *proof-reading*-Aktivität aufweist und erste Versuche mit der Taq Polymerase keine erfolgreiche PCR ermöglichten. Nachdem der 5'RACE Adapter eingefügt wurde, konnte direkt mittels der „Inner PCR“ fortgefahren werden. Dafür wurden Primer-Paare verwendet, die aus dem im Kit enthaltenen 5'RACE Inner Primer und entweder einem C κ oder IgA-CH1 spezifischem Primer bestanden. Die Sequenz für den C κ Primer, um die VL Region des Theophyllin IgA zu amplifizieren war 5'-GCGC AAGCTT CCTAACAATCATTCTGTTGAAGCTC-3'. Die Sequenz für den CH1 Primer, um die VH Region des Theophyllin IgA zu amplifizieren war 5'-GCGC GGTACC CTCGACAGCTGGCAGGGTTAACTGG-3'. Für diese Primer Kombinationen wurde eine Annealing Temperatur von 60 °C verwendet, wobei nach einem 3-minütigen initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C, 35 Zyklen zur Amplifizierung (30 s 94 °C/ 30 s 60 °C/ 30 s 72 °C) und ein abschließender Verlängerungszyklus 7 min bei 72 °C durchgeführt wurden.

Komponente	Volumen [µL]
10x PCR reaction buffer	5
dNTP Mix	4
MgSO ₄ (25 mM)	4
Gene Specific Primer (10 µM)	2
5'RACE Inner Primer	2
DNA Template	2
KOD Hot Start Polymerase (5U/µL)	0.25
H ₂ O	ad 50

Tabelle 2.2.3: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

2.2.1.7 TOPO Klonierung

Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, wie unter 2.2.1.3 beschrieben aus dem Agarosegel extrahiert und in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor des TOPO[®] TA Cloning Kits für PCR-Produkte mit „*blunt ends*“ nach dem Herstellerprotokoll eingefügt. Die Reaktionsansätze der TOPO Klonierung wurden in kompetente MAX Efficiency[®] *Escherichia coli* DH5 α -T1 Zellen transformiert. Im Anschluss wurden *E.coli* Klone, welche die VL bzw. VH kodierenden Sequenzen trugen, auf LB-Kanamycin und auch auf LB-Ampicillin Agar-Platten kultiviert. Aufgrund des im Vektor enthaltenen *LacZ α* Gens konnten Kolonien der *E.coli* Klone, in welche der pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor erfolgreich transformiert wurde, über *blue/ white Screening* identifiziert werden. Es wurden je 6 positive Klone pro Platte selektiert und in 3 mL LB-Medium mit Kanamycin oder Ampicillin (100 μ g/mL) über Nacht weiter propagiert. Im Anschluss daran wurde die DNA dieser Kulturen isoliert und der Einbau der Vektoren über den Restriktionsverdau mit SacI und XbaI kontrolliert. Da das Vektor Backbone SacI und XbaI Schnittstellen besaß, welche die Inserts an beiden Seiten flankierten, konnte aus Insert tragenden Plasmiden mittels dieser Restriktionsenzyme Inserts mit einer Größe von etwa 750 bp (für VH und VL) bestimmt werden. Die DNA Sequenz der VH und VL des Theophyllin bindenden Antikörpers und die davon abgeleitete Proteinsequenz wurde aus der automatisierten Sequenzierung zahlreicher Klone identifiziert. Diese wurde bei der SequiServe GmbH in Auftrag gegeben und durchgeführt.

2.2.1.8 Transformation und Anzucht verwendeter Mikroorganismen

Für die Transformation wurden 18 μ L OneShot[®] Top10 oder XL10-Gold[®] chemokompetente *Escherichia coli* Zellen verwendet. Diese wurden bei -80 °C gelagert und für die Transformation auf Eis aufgetaut. Es wurden 2 μ L des Ligationsansatzes wie in Tabelle 2.2.2 beschrieben mit den kompetenten Zellen vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 s bei XL10-Gold[®] Zellen bzw. 45 s bei OneShot[®] TOP10 Zellen auf 42 °C erhitzt. Anschließend wurden die Zellen schnell auf Eis überführt und für 2 min stehen gelassen. Danach wurde 250 μ L SOC-Medium zugegeben und die transformierten Zellen wurden für mindestens 60 min auf dem Drehrad bei 37 °C inkubiert. 200 μ L dieses Ansatzes wurden auf Ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die weitere Vermehrung gewachsener Klone wurden diese mit einer sterilen Pipettenspitze oder Einweg-Impföse gepickt und in LB-Ampicillin-Medium weiter propagiert. Pro Konstrukt wurden 4 Röhrchen mit je 3 mL LB-Ampicillin-Medium (50 μ g/mL Ampicillin) mit je einem Positiv Klon inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert. Bei einer Re-Transformation erfolgte keine Ausplattierung, sondern eine Inokulation von 250 mL LB-

Ampicillin-Medium (100 µg/mL Ampicillin) mit 250 µL der Vorkultur. Aus diesem größeren Ansatz konnte dann eine DNA Maxipräparation vorgenommen werden.

2.2.1.9 Isolierung von Plasmid DNA

Um den Erfolg der Klonierung kontrollieren und einen Kontrollverdau durchführen zu können, muss die Plasmid-DNA aus den propagierten Zellen aufgereinigt werden. Auch wenn für die Antikörper Expression die Vektoren für eine Transfektion von HEK293 Freestyle Zellen isoliert werden sollten, musste die Bakterienkultur aufgereinigt werden. Dies geschah in kleinem Maßstab mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit, mit dem 3 mL Bakteriensuspension vollautomatisiert im QIAcube aufgereinigt werden können oder in großem Maßstab mit dem HiSpeed® Plasmid Maxi Kit, mit dem 250 mL Bakteriensuspension aufgereinigt werden können. Das benötigte Zellpellet wurde bei einem Volumen von 3 mL Bakteriensuspension durch 2 min Zentrifugation bei 10000 rpm und bei einem Volumen von 250 mL durch 15 min Zentrifugation bei 6000 rpm erhalten. Die Kits wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers angewandt.

2.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA zu bestimmen, wurde ein UV-Photometer benutzt. Hierfür wurde die DNA-Probe 1:20 in Elutionspuffer verdünnt und als „dsDNA“ dreifach bestimmt. Als Blank diente der unverdünnte Elutionspuffer. Zusätzlich zur Konzentration wurde der Quotient aus A260 und A280 gebildet, welcher eine Aussage über die Verschmutzung der DNA (Absorptionsmaximum bei 260 nm) mit Proteinen (Absorptionsmaximum bei 280 nm) erlaubt. So weist ein A260/A280-Wert von $1,9 \pm 1$ auf nicht durch Proteine kontaminierte DNA hin.

2.2.2 Design der Expressionsvektoren

In der Arbeitsgruppe von Dr. Ulrich Brinkmann waren zwei auf pUC18-Vektoren basierende Vektoren vorhanden, welche von Dr. Silke Metz (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) für die Expression der schweren und leichten Kette des bispezifischen Digoxigenin bindenden Antikörpers verwendet wurden (Metz *et al.*, 2011) und für die Konstrukte in dieser Arbeit weiter modifiziert wurden. Diese Vektoren enthielten neben der Kassette zur Antikörper-Expression, auch den Replikationsursprung des EBV oriP, den für die Replikation des Plasmids in *E.coli* wichtigen Replikationsursprung des Vektors pUC18, ein beta-Lactamase Gen für die Ampicillin

Resistenz in *E.coli*, eine Poly-A-Sequenz und den Promotor des humanen CMV, welcher für die transiente Expression in eukaryontischen Zellen wichtig ist. Die Restriktionsschnittstellen BamHI und XbaI flankieren den Bereich, der für die Domäne der jeweiligen Antikörper-Kette kodiert. N-Terminal kann über die Restriktionsschnittstellen BamHI und KpnI die variable Region der schweren oder leichten Kette ausgetauscht werden. C-terminal kann über HindIII und XbaI das dsscFv-Fragment entfernt oder ausgetauscht werden. Durch Kombination der genannten Möglichkeiten eines Restriktionsverdau konnten die Vektoren für die in dieser Arbeit verwendeten Antikörperkonstrukte kloniert werden. Das Design der Expressionsvektoren wurde mit Hilfe des Programms Vector NTI gemacht. Die für die jeweiligen Konstrukte benötigten Genabschnitte wurden mittels automatischer Gensynthese durch die Geneart AG hergestellt. Die so synthetisierte DNA wurde in den beschriebenen Expressions-Vektor über die genannten Restriktionsschnittstellen subkloniert und dieser in *E.coli* XL10-Gold® vermehrt. Von den subklonierten *E.coli* Kulturen wurde ein Restriktionsenzym Kontrollverdau durchgeführt. Die korrekte Sequenz ausgewählter Klone wurde durch Doppelstrang Sequenzierung, durchgeführt von der Sequiserve GmbH, überprüft. Bei allen Gensequenzen, welche die leichten und schweren Ketten der Antikörper kodierten, wurden mit einer am 5'-Ende angehängten Leader-Sequenz gewährleistet, dass der exprimierte Antikörper in eukaryontischen Zellen in den Überstand sezerniert wird.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

Die zellbiologischen Arbeiten wurden in einem abgeschlossenen Zellkultur-Labor an einer Sicherheitswerkbank (Klasse 2) unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung der HEK293-F Zellen erfolgte in 1000 mL bis 3000 mL Erlenmeyerkolben in einem Schüttelinkubator (37 °C, 8 % CO₂, 75 % relativer Luftfeuchte, 125 rpm). Die adhärenenten Zellen (MCF-7) wurden wie die Suspensionszellen (MOLM-13) in Zellkulturflaschen (75 cm² oder 175 cm²) in einem Inkubator (37 °C, 8 % CO₂, 75 % relativer Luftfeuchte) kultiviert.

2.2.3.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität eukaryontischer Zellen

Für die Durchführung zellbasierter Assays musste die genaue Zellkonzentration, also die Anzahl der Zellen pro mL Suspension, bestimmt werden. Diese wurde mit dem Zellzähler Casy® Model TTC bestimmt. Hierfür wurden 10 µL der Suspension in 10 mL Casy Ton-Lösung verdünnt und in dreifacher Zählung analysiert. Die Zellzählung dieses Geräts basiert auf dem Prinzip des elektrischen Ausschlusses (*electrical current exclusion* (ECE)), wodurch die Anzahl lebender Zellen ohne Verwendung von Farbstoffen ermittelt werden kann. Lebende

Zellen besitzen eine intakte Plasmamembran, die im elektrischen Feld als Nichtleiter fungiert. Hingegen ist die Plasmamembran von toten Zellen für den elektrischen Strom durchlässig, wodurch bei den toten Zellen als Nichtleiter die Kernmembran detektiert wird. Aufgrund der Größe der Isolatoren kann dann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden.

2.2.3.2 Reaktivierung einer Kryokultur

Zelllinien werden für die Langzeit-Kryokonservierung in ein geeignetes Medium überführt, um beim Einfrieren die Kristallbildung in den Zellsuspensionen, die die Zellen schädigen kann, zu minimieren. Dieses Einfriermedium besteht im Fall der MCF-7 aus 5 % DMSO + 95 % Kulturmedium und bei MOLM-13 aus 10 % DMSO + 90 % Kulturmedium. Eine Konzentration von 5 bzw. 10 % DMSO ist im aufgetauten Zustand für die Zellen toxisch. Deshalb wurden eingefrorene Zellen zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen mit 10 mL Zellkulturmedium überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 200 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurden die sedimentierten Zellen in 5 mL Nährmedium aufgenommen und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden über Nacht inkubiert (37 °C, 8 % CO₂, 75 % relativer Luftfeuchte). Um ein Entfernen des toxischen DMSO sicherzustellen wurde nach 24 h nochmal das Zellkulturmedium getauscht.

2.2.3.3 Kultivierung eukaryontischer adhärenter und Suspensionszellen

Die Zellen wurden in 175 cm²-Zellkulturflaschen mit 10 bis 15 mL des jeweiligen Zellkulturmediums im Brutschrank (37 °C, 8 % CO₂, 75 % relativer Luftfeuchte) kultiviert. Sie wurden jeden zweiten Tag im Lichtmikroskop inspiziert. Dabei wurde bei den MCF-7 Zellen vor allem darauf geachtet wie gut die Adhärenz ist und wie dicht die Zellen gewachsen sind. Bei den adhärenenten Zellen wurde das Medium alle 48 bis 72 h gewechselt bis die Zellen eine optische Konfluenz von etwa 80-90 % erreicht hatten. Dann konnten sie für die einzelnen Zellkulturversuche als Aussaat verwendet oder im Verhältnis 1:10 für die weitere Passagierung gesplittet werden. Hierfür wurden die Zellen vom Medium befreit, mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Accutase, nach 10 bis 15 min im Inkubator, abgelöst und mit frischem Medium im Verhältnis 1:10 in eine neue Zellkulturflasche überführt. Durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer Pipette sollte erreicht werden, dass die Zellen gut vereinzelt werden. Die Suspensionszellen wurden drei- bis viermal pro Woche im Verhältnis 1:6 - 1:8 gesplittet oder nach Bedarf für Zellkulturversuche verwendet.

2.2.3.4 Transfektion eukaryontischer Suspensionszellen und Proteinexpression

Die Antikörper wurden in HEK293 Freestyle Zellen exprimiert. HEK293 Zellen sind Säugerzellen, die den exprimierten Antikörper in den Überstand sezernieren, wodurch kein Zellaufschluss für die Produktisolierung notwendig ist. Solange die HEK293-F Zellen nicht für die Proteinexpression benötigt wurden, wurden diese passagiert. Das Passagieren der HEK293-F Zellen erfolgte erfahrungsgemäß montags und mittwochs durch Splitten im Verhältnis 1:3 und freitags im Verhältnis 1:4 - 1:5.

Die Antikörper wurden entweder im 1 L oder 2 L Massstab exprimiert. Dafür mussten 750 mL oder 2 x 750 mL mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro mL in einen Schüttelkolben ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 8 % CO₂, 75 % relativer Luftfeuchte bei 125 rpm inkubiert werden. Pro 750 mL Zellsuspension wurden insgesamt 375 µg DNA (Plasmid der schweren und Plasmid der leichten Kette) und 499 µL Transfektionsreagenz Novagen 293-free (1.3 µL Transfektionsreagenz pro 1 µg DNA) in 10 mL 1x PBS verdünnt und nach 10-minütiger Inkubation unter Rühren der Suspension zugegeben. Am ersten Tag nach Transfektion wurden 750 mL Suspension mit 180 mL Nährmedium und am fünften Tag nach Transfektion wurden je 750 mL Suspension mit 90 mL Nährmedium versetzt. Die Zellen wurden nach der Transfektion für eine Woche im Inkubator (37 °C, 8 % CO₂, 75 % relativer Luftfeuchte, 125 rpm) geschüttelt und danach geerntet (erste Zentrifugation: 20 min 3000 rpm, zweite Zentrifugation: 50 min 8400 rpm) und die dadurch erhaltenen Überstände über einen 0.22 µm Filter sterilfiltriert. Bis zur Reinigung der Antikörper wurden die Überstände eingefroren und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.5 Durchflusszytometrie

Die in dieser Arbeit generierten Antikörper wurden mittels Durchflusszytometrie auf Funktionalität und Targeting untersucht. Bei der Durchflußzytometrie werden Einzelzellen in Suspension an einem Laser vorbeigeführt. Die Zellen streuen einen Teil des Lichtes vorwärts und seitwärts. Die Größe und Granularität der Zellen bestimmen hier im Wesentlichen die Streulichtanteile, durch die man bereits ohne Fluoreszenzfarbstoffe z.B. die einzelnen Zellarten des Blutes unterscheiden kann. In dieser Arbeit sollte allerdings die Bindung der Antikörper an die Zelle der ausgewählten Zelllinien und die Bindung der Haptene an die Antikörper nachgewiesen werden. Dafür benötigt man eine besondere Form der Durchflusszytometrie – die Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung (FACS). Hierbei wird nach Passage des Lasers, sobald ein Lichtstreusignal gemessen wird, der Fluoreszenzkanal aktiviert, wodurch die von den Zellen ausgehende charakteristische Fluoreszenz mittels geeigneter Detektoren erfasst werden kann. Durch Zugabe eines Fluoreszenz-markierten anti-

human-kappa-light-chain Antikörpers konnte untersucht werden, ob die Antikörper an die Zielzellen gebunden haben. Denn nur, wenn der fluoreszierende Sekundärantikörper an den zellgebundenen Antikörper bindet, gibt es ein zellassoziertes Fluoreszenzsignal. Durch Zugabe von Fluoreszenz-markierten Haptenen wie z.B. DIG-Cy5, DIG-Cy5-Nanopartikel oder Theo-Cy5 konnte die Haptenbindung nachgewiesen werden. Denn nur, wenn das fluoreszierende Hapten vom Antikörper gebunden wird, gibt es ein zellassoziertes Fluoreszenzsignal. Es wurde je ein Ansatz mitgeführt, bei dem der Sekundärantikörper bzw. die fluoreszierende Hapten-Payload ohne weiteren Antikörper zu den MCF-7 Zellen gegeben wurde, um zu überprüfen, dass diese nicht unspezifisch an die Zellen binden und so ein Hintergrundsignal verursachen. Auf eine Sortierung der Zellen, wie sie beim FACS noch gemacht werden kann, wurde hier verzichtet.

Die Versuche hierfür wurden am BD FACSCanto™ (BD Biosciences) unter Verwendung eines Argon-Lasers durchgeführt. Die Messung erfolgte in transparenten 96-Well Mikrotiterplatten (V-Boden), wobei eine Zellzahl von 300000 Zellen pro Well eingesetzt wurde.

Für die Testung der Antikörperderivate wurden die Zellen mit einer finalen Konzentration der Antikörperkonstrukte von 10 nM inkubiert. Der FITC gelabelte Sekundärantikörper wurde mit 1.5 µL auf 200 µL Antikörperlösung für 300000 Zellen eingesetzt. Die fluoreszierenden Haptene wurden in einer finalen Konzentration von 20 nM eingesetzt. Für die Herstellung des Alexa Fluor 488-Streptavidin-Bi-DIG, welches gleichzeitig mit Theo-Cy5 als fluoreszierendes Hapten zum Nachweis der Funktionalität beider Haptenbindungsstellen in dem trispezifischen Antikörper eingesetzt wurde, wurde das Alexa Fluor-Streptavidin in äquimolarem Verhältnis mit Bi-DIG für 30 min bei RT vorinkubiert. Die Antikörperkonstrukte wurden dann mit dem fluoreszierenden Hapten oder dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT im Dunkeln vorinkubiert. Danach wurden die Zellen mit den vorinkubierten fluoreszenzmarkierten Antikörpern im Dunkeln 30 min auf Eis inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen 2x mit 200 µL 1x PBS gewaschen und für die Messung in 100 µL 1x PBS resuspendiert. Fluorescein und Alexa Fluor 488 haben ein Emissionsmaximum von 525 nm und konnten im Fluorescein-Kanal detektiert werden. Cy5 hat ein Emissionsmaximum von 670 nm und konnte im Cy5-Kanal detektiert werden.

Für die Testung der Nanopartikel (NPs) wurden für die Durchflusszytometrie Cy5-markierte NPs bzw. Cy5-markierte DIG-NPs verwendet. LeY-monospezifische, LeY-DIG-bispezifische oder CD33-DIG-bispezifische Antikörper wurden mit den Cy5-NPs und DIG-Cy5-NPs in einem molaren Verhältnis von 1:2 gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit einer finalen Antikörperkonzentration von 6.86 nM 1 h auf Eis inkubiert, anschließend 2x mit 200 µL 1x PBS gewaschen und für die Messung in 100 µL 1x PBS resuspendiert. Die Emission von Cy5 wurde bei 670 nm im Cy5-Kanal detektiert.

2.2.3.6 Zellviabilitätsassay

Bei diesem Assay wird der relative Anteil an lebenden Zellen bestimmt, wodurch auf die Toxizität des zugegebenen Moleküls geschlossen werden kann. Werden unterschiedliche Konzentrationen der toxischen Moleküle zugegeben, kann auch die IC₅₀ (Konzentration, bei der das Wachstum der Zellen zu 50 % inhibiert wird) bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zellviabilität mit dem Cell Titer-Glo[®] Assay (Promega) bestimmt. Dies ist ein Lumineszenz Assay, der auf einer Luciferase Reaktion beruht. Wenn Adenosintriphosphat (ATP) vorhanden ist, entsteht durch die Luciferase Oxyluciferin unter Aussendung eines Lumineszenzsignals, welches gemessen werden kann. ATP ist nur in metabolisch aktiven Zellen vorhanden, weshalb das gemessene Signal direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen ist. Es wurden etwa 5000 bis 10000 Zellen pro Well in 96-Well Mikrotiterplatten (weiß, transparent, flacher Boden) ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen mit vorinkubierten Antikörper-Payload-Komplexen bzw. mit den einzelnen Payloads alleine für eine definierte Zeit von 48 bis 96 h inkubiert. Einzig bei den Doxo- bzw. DIG-Doxo-NPs und PE- bzw. DIG-PE38 wurden die vorinkubierten Mischungen mit den bispezifischen Antikörpern nach 2 h bzw. 0.5 h Inkubation durch Waschen von den Zellen entfernt, um eine unspezifische Bindung und Internalisierung der Toxine zu vermeiden. Für den Rest der Inkubationszeit wurden die Zellen mit bloßem Zellkulturmedium inkubiert. Neben diesen Proben wurden zusätzlich Medium-, Staurosporin- (Apoptose-Induktor) und Lysis-Kontrollen mitgeführt. Für die Lysis-Kontrolle wurde den Wells 10 µL eines Lysis-Reagenz (Cytotoxicity Detection Kit Lysis Solution) ca. 15 Minuten vor Zugabe des Cell Titer-Glo[®] Reagenz zugegeben und für etw 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde im Mikroskop überprüft. Anschließend wurde in alle Wells 100 µL des Cell Titer-Glo[®] Reagenz pipettiert, 30 Minuten auf dem Plattformschüttler geschüttelt (750 rpm) und schließlich die Lumineszenz mit einem Lesegerät für Mikrotiterplatten (Tecan Infinite) detektiert. Alle Ansätze erfolgten dabei in Triplikaten.

Bei allen Toxinkonzentrationen wurde der Anteil lebender Zellen ermittelt und anhand der Mediumkontrolle, welche keine inhibierende Wirkung zeigt, auf eine Skala von 0 – 100 % normiert. Für die Ermittlung der IC₅₀ wurde dieser prozentuale Anteil lebender Zellen gegen die Antikörper-Toxinkonzentration in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Die Berechnung erfolgt nach einer logistischen Funktion mit 4 Parametern:

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{\text{Hillfaktor}}}$$

Formel 2.2-2: Berechnung der IC₅₀

Die Auswertung der Daten erfolgt in Sigma Plot Version 6.1, wobei y_{\min} und y_{\max} die untere (hohe Antikörper-Toxin-Konzentration) und obere (niedrige Antikörper-Toxin-Konzentration) Asymptote der Kurve ist und IC_{50} , die Antikörper-Toxin-Konzentration, bei der noch 50 % der Zellen leben. Diese 3 Parameter wurden dabei von dem Programm berechnet. Der Hillfaktor, der die Steigung der Kurven im Mittelpunkt beschreibt, entfällt mit Annahme eines abfallenden Standardverlaufs und einem dementsprechenden Hillfaktor von -1.

2.2.3.7 Zellbasierter ELISA

Um nachzuweisen, dass der LeY-DIG-bispezifische Antikörper das Oberflächenantigen LeY und den DIG-Doxo-NP gleichzeitig binden kann, wurde ein zellbasierter ELISA durchgeführt (siehe Abb. 2.2.1). Hierfür wurden MCF-7 Zellen in OPTI-MEM I Reduced Serum Medium in einer 96-Well Mikrotiterplatte mit flachem Boden in einer Dichte von 15000 Zellen pro Well eingesäht. Nach Adhärenz über Nacht wurden den Zellen unkomplexierte bispezifische Antikörper oder mit NPs vorinkubierte bispezifische Antikörper in verschiedenen Konzentrationen bis 500 nM zugefügt. Jede Konzentration wurde in Triplikaten gemessen. Für die Vorinkubation der bispezifischen Antikörper wurden diese in einem molaren Antikörper:Nanopartikel-Verhältnis von 1:2 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit den bispezifischen Antikörpern bzw. Antikörper-NP-Komplexen 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit kaltem 1x PBS gewaschen und mit 100 μ L anti-DIG Antikörper (1:1000 verdünnt), welcher mit Meerrettichperoxidase konjugiert war (*Horseradish Peroxidase*; HRP), 1 h auf Eis inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen 2x mit kaltem 1x PBS gewaschen und 15 min mit 100 μ L ABTS-Substrat (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) 15 min bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler bei 600 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Absorption an einem Mikrotiterplattenleser bei 405 nm ausgelesen. Die Absorptionswerte wurden auf den höchsten Absorptionswert normiert, so dass die Absorption des höchsten positiven Signals 100 % betrug.

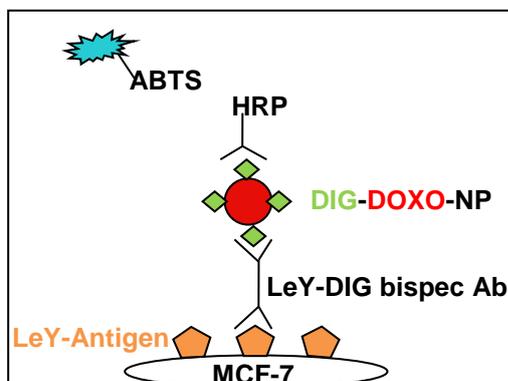


Abb. 2.2.1: Design des zellbasierten ELISA

2.2.3.8 Konfokalmikroskopie

Um die Aufnahme von Doxorubicin aus Doxo- bzw. DIG-Doxo-NPs in Zellen zu visualisieren, wurde die Konfokalmikroskopie angewandt, die sehr gut dafür geeignet ist, definierte Ebenen eines fluoreszenten Präparates mit hoher Auflösung darzustellen. Hierfür wurden 300 μL MCF-7 Zellen pro Well mit einer Dichte von 187500 Zellen/ mL in einer 8-Well Kammer auf Objektträger mit optischem Boden ausgesät. Die Doxo- und DIG-Doxo-NPs wurden in RPMI 1640 Medium ohne FBS in einer Doxo-äquivalenten Dosis von 5 μM in einem molaren 1:1 Verhältnis mit dem LeY-DIG-bispezifischen und CD33-DIG-bispezifischen Antikörper 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen über Nacht adhärerten, wurde das Medium gegen die Antikörper-NP-Mischungen bzw. freies Doxorubicin ausgetauscht und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 70 min wurde die Fluoreszenz von Doxorubicin bei 561 nm angeregt und die Emission im Bereich 579 - 691 nm aufgenommen. Außerdem wurde auch in Transmission gemessen. Diese Messungen wurden mit Unterstützung von Heike Seul und Dr. Olaf Mundigl bei Roche Diagnostics durchgeführt.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittel UV-Spektroskopie

Über das Lambert-Beersche Gesetz kann die Proteinkonzentration in Abhängigkeit der Absorption, der Schichtdicke der Küvette und des Extinktionskoeffizienten berechnet werden. Die Extinktionskoeffizienten konnten durch die Anzahl der aromatischen Aminosäuren kalkuliert werden. Es wurde entweder ein UV-Spektrometer mit 100 μL Küvetten oder ein NanoDrop® Spektrophotometer verwendet. Bei der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm gemessen.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Größenauffrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Sie ermöglicht es, die Reinheit einer Probe zu prüfen und das Molekulargewicht der Proteine abzuschätzen. Dazu wird das zu untersuchende Proteingemisch mit denaturierendem SDS-haltigem Puffer gemischt und auf 95 °C erhitzt. Das SDS lagert sich um die Probe, so dass die Proteine nur noch die durch SDS verursachte Ladung besitzen. Zur Untersuchung der einzelnen leichten und schweren Ketten von Antikörpern werden diese mit 2-Mercaptoethanol reduziert, so dass die Cysteine keine Disulfidbrücken zur Verbindung der einzelnen Ketten mehr ausbilden. Die Proteine werden entlang eines Spannungsfeldes durch den Siebeffekt des Geles aufgetrennt. Für die

Durchführung der SDS-PAGE wurde das Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System von Invitrogen mit NuPAGE® 4 - 12 % Bis-Tris Gelen (zehn oder 15 Taschen, 1.00 mm Dicke) verwendet und die Elektrophorese bei 185 V, 250 mA für 45 min durchgeführt. Als Laufpuffer diente 2-(N-Morpholino)ethan-sulfonsäure-Puffer (MES-Puffer). Die Probenvorbereitung erfolgte bei nicht reduzierenden Bedingungen durch Zugabe des entsprechenden Volumens an NuPAGE® LDS-Sample Buffer (4x). Bei reduzierenden Bedingungen wurde den Proben neben dem Probenpuffer zusätzlich noch 2-Mercaptoethanol im Verhältnis 1:10 zugegeben und für acht Minuten bei 95 °C inkubiert. Neben den Proben wurden 10 µL Precision Plus Protein™ Dual Color Standards als Größenstandard mitgeführt. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurden eine Coomassie Färbung mit Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen) durchgeführt. Der Triphenylmethanfarbstoff lagert sich an basische Seitengruppen der Proteine an, wodurch diese sichtbar werden. Hierfür wurden die Gele 3x5 min mit 100 mL deionisiertem Wasser gewaschen und danach 60 bis 180 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Taumelschüttler in der Coomassie-Färbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte in deionisiertem Wasser.

2.2.4.3 Western-Blot

Für den Western-Blot wird das SDS-Gel über Anlegen einer Spannung senkrecht zur Elektrophorese Richtung auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Aufgrund ihrer Ladung laufen die Proteine aus dem Gel auf die Membran und können dort z.B. mit Peroxidasegekoppelten Antikörpern nachgewiesen werden. Für einen Western Blot wurden fünf Filterpapiere, das Gel und die Nitrozellulose-Membran kurz in Transferpuffer eingeweicht und anschließend nach dem semi-dry-Prinzip für 60 min bei 18 V im Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) geblottet. Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulose-Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 5 % Magermilch in TBS-T-Puffer (1x TBS-Puffer mit 0.05 % Tween 20 Lösung) auf dem Taumelschüttler 30 min inkubiert. Nach Zugabe des Detektionsantikörpers (anti-human-kappa-light-chain) oder anti-human IgG (Fc specific), 1:1000 in Magermilch verdünnt), welcher mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert war, und Inkubation für 1 h auf dem Taumelschüttler wurde die Membran 3x für 10 min in TBS-T-Puffer gewaschen, um den ungebundenen Detektionsantikörper zu entfernen. Zuletzt wurde die Entwicklersubstanz BCIP®/NBT-Blue Liquid Substrate zugegeben und solange inkubiert bis Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde durch kurzes Spülen mit Wasser gestoppt.

2.2.4.4 Proteinreinigung über Protein A-Affinitätschromatographie

Die in dieser Arbeit generierten Antikörper befinden sich nach Expression in einem heterogenen Zellüberstand. Um die Antikörper in einem ersten Reinigungsschritt von den übrigen Zellüberstand Bestandteilen zu trennen, wurde als erster Reinigungsschritt die Protein A-Affinitätschromatographie eingesetzt. Sie beruht auf der hohen Affinität des Protein A-Liganden (aus *Staphylococcus aureus*) mit dem Fc-Teil von Immunglobulinen, insbesondere IgG, aus Säugetieren. Es wurden 5 mL HiTrap™ MabSelect SuRe™ Säulen eingesetzt, die nach den Angaben des Herstellers eine dynamische Bindekapazität von 30 bis 35 mg humanem IgG pro mL Säulenmedium besitzen. Die Bindung des Antikörpers an die Säule erfolgte bei neutralem pH in 1x PBS, bei pH 7.4, und die Elution bei saurem pH in 50 mM Citratpuffer, bei pH 3.0. Die Chromatographie wurde automatisiert an einer ÄKTA Explorer 100 Anlage unter Verwendung eines geeigneten Programmes ausgeführt. Alle für die Reinigung verwendeten Puffer und Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0.22 µm). Außerdem wurde das Anlagensystem, wie auch Säule und Fraktionssammler, vor dem Lauf manuell zunächst mit Wasser, dann mit 0.5 M Natronlauge gespült und zuletzt mit 1x PBS äquilibriert. Der Aufzug des Kulturüberstandes erfolgte mit einem Fluss von 5 mL/min. Der Durchlauf wurde separat gesammelt und direkt im Anschluss an den Probenaufzug bei 5 °C gelagert, um bei Nichtbinden des Antikörpers auf den Durchlauf zurückgreifen zu können. Anschließend an den Aufzug wurde mit 5 Säulenvolumen 1x PBS gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Mit 7 Säulenvolumen 50 mM Citratpuffer wurde die Probe in Fraktionen zu 1.8 mL eluiert. Der niedrige pH der Fraktionen wurde durch Zugabe von 1 M Tris-Puffer pH 9.0 neutralisiert, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Anschließend wurden die Fraktionen mit entsprechendem Absorptionssignal bei 280 nm vereinigt. Sofern eine präparative SEC benötigt wurde, wurden die gepoolten Fraktionen auf ein geeignetes Volumen konzentriert. Hierfür wurden Amicon® Ultra Membranfilter mit einer Ausschlussgröße von 30000 Dalton verwendet.

2.2.4.5 Proteinreinigung über Kappa-Select-Affinitätschromatographie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Antikörperderivate generiert, die keinen IgG Fc-Teil bzw. nur eine CH1-Domäne enthielten. Da aber bei der Protein A-Affinitätschromatographie der Ligand mit der CH2- und CH3-Domäne interagiert, konnte diese bei den genannten Antikörperderivaten nicht eingesetzt werden. Als alternative Reinigungsstrategie wurde dann die Kappa-Select-Affinitätschromatographie gewählt. Der Ligand für diese Chromatographie, ein rekombinantes Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*, besitzt eine hohe Affinität zu der konstanten Region einer Kappa LC. Es wurden 5 mL Atoll Säulen mit Kappa-Select-Medium eingesetzt. Der Antikörper wurde unter neutralen Bedingungen mit 1x PBS bei pH 7.4 an die

Säule gebunden und bei pH 3.0 mit 25 mM Citratpuffer eluiert. Die Chromatographie wurde automatisiert an einer ÄKTA Explorer 100 Anlage ausgeführt. Alle für die Reinigung verwendeten Puffer und Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0.22 µm). Außerdem wurde das Anlagensystem, wie auch Säule und Fraktionssammler, vor dem Lauf manuell zunächst mit Wasser, dann mit 0.5 M Natronlauge gespült und zuletzt mit 1x PBS äquilibriert. Der Kulturüberstand wurde mit einem Fluss von 5 mL/min aufgezogen, der Durchlauf separat gesammelt und bei 5 °C gelagert, um bei Nichtbinden des Antikörpers auf den Durchlauf zurückgreifen zu können. Es wurde dann mit 5 Säulenvolumen 1x PBS gewaschen, um das ungebundene Material zu entfernen. Mit 7 Säulenvolumen 50 mM Citratpuffer wurde die Probe in Fraktionen zu 1.8 mL eluiert, deren niedriger pH-Wert durch Zugabe von 1 M Tris-Puffer pH 9.0 neutralisiert wurde, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Anschließend wurden die Fraktionen mit entsprechendem Absorptionssignal bei 280 nm vereinigt. Ebenso wie die Antikörperkonstrukte, die im ersten Reinigungsschritt über Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt wurden, konnten die so aufgereinigten Antikörperderivate, falls nötig und möglich, einer präparativen SEC unterzogen werden. Dafür mussten die gepoolten Fraktionen mit Amicon® Ultra Membranfiltern mit einer Ausschlussgröße von 30000 Dalton auf ein geeignetes Volumen eingeeengt werden.

2.2.4.6 Präparative Größenausschlusschromatographie

Bei der Herstellung rekombinanter Antikörper können neben dem gewünschten Antikörper zusätzlich Nebenprodukte, wie Antikörperfragmente, halbe Antikörper oder Aggregate auftreten. Diese können durch Protein A- oder Kappa-Select-Affinitätschromatographie meist nicht abgetrennt werden, weshalb im Anschluss eine präparative SEC empfehlenswert ist. Die Größenausschlusschromatographie trennt nach Molekülgröße. In der Säulenmatrix befinden sich Poren, in welche die unterschiedlichen Probenbestandteile unterschiedlich weit hinein diffundieren können. Große Moleküle, wie z.B. Oligomere oder Aggregate können kaum in die Poren eindringen und eluieren somit zu früheren Retentionszeiten. Niedriger molekulare Substanzen können tiefer in die Poren diffundieren und eluieren somit zu späteren Retentionszeiten. Für die präparative SEC wurde eine HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 Säule benutzt. Das ist eine Agarose basierte Säule, welche kovalent gekoppeltes Dextran enthält. Mit dieser Säule ist eine Trennung im Bereich von 10 kDa bis 600 kDa möglich. Für die automatisierte Aufreinigung wurde eine ÄKTA Purifier Anlage mit geeignetem Laufprogramm genutzt. Erst wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer (20 mM L-Histidin, 140 mM NaCl, pH 6.0) äquilibriert. Dann wurde die Probe mit einem Fluss von 2.5 mL/min aufgezogen und mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer nachgewaschen. Die Elution erfolgte in 0.6 Säulenvolumen in Fraktionen zu je 4 mL. Nach Vereinigung der entsprechenden Fraktionen

und Konzentrieren auf 1 - 4 mg/mL (mit Amicon® Ultra Membranfilter) wurde die Endanalytik mittels SDS-PAGE durchgeführt. Das Endprodukt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Anlage und Säule wurden zur Lagerung nach dem Lauf in 20 %-iger Ethanol-Lösung umgespült.

2.2.4.7 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die analytische SEC dient der Größenaufftrennung von Proteinen unter nativen Bedingungen. Sie ermöglicht es die relativen Anteile an Nebenprodukten, wie Antikörperfragmenten, halben Antikörpern oder Aggregaten bestimmen zu können. Dazu wird das gereinigte und aufkonzentrierte Endprodukt auf eine geeignete SEC Säule aufgetragen und mit geeignetem Laufpuffer aufgetrennt. Ebenso wie bei der präparativen Größenausschlusschromatographie wird hier nach Molekülgröße aufgetrennt. In den Partikeln der Säulenmatrix befinden sich Poren, in welche die unterschiedlichen Probenbestandteile unterschiedlich weit hinein diffundieren können. Große Moleküle eluieren vor kleineren Molekülen, da sie weniger tief als die kleinen Moleküle in die Poren eindringen können. Für die analytische SEC wurde entweder eine MabPac SEC-1 Säule (Thermo Fisher, 4 mm x 30 cm) oder eine TSKgel G3000SWXL (Tosoh Bioscience, 7.8 mm x 30 cm) verwendet. Beides sind Kieselgel basierte Säulen, bei denen durch eine kovalent gekoppelte hydrophile Diolphase die Silikaoberfläche abgeschirmt wird, so dass sie keine Interaktionen mit Proteinen mehr eingehen soll. Beide Säulen haben eine Partikelgröße von 5 µm und laut Herstellerangaben einen Trennbereich von 10 kDa bis 500 kDa (TSKgel G3000SWXL) bzw. 1000 kDa (MabPac SEC-1). Für die automatisierte Analytik wurde eine Dionex Ultimate 3000 HPLC mit geeignetem Laufprogramm genutzt. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer äquilibriert. Für die Säule TSKgel G3000SWXL wurde der Laufpuffer 1x PBS, pH 6.8 und für die MabPac SEC-1 wurde der Laufpuffer 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 6.8 verwendet. Die Injektionsmenge für die Analytik der Antikörperderivate betrug zwischen 10 und 100 µg und für die Analytik der Antikörper-DIG-Doxo-Nanopartikel 160 µg. Die Flussrate betrug zwischen 0.2 und 1 mL/min. Zur Erstellung der Kalibrationsgeraden wurde immer ein Gelfiltrationsstandard von Bio-Rad mitgeführt. Trägt man den Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Retentionszeit auf, so kann das Molekulargewicht anhand der Retentionszeit aus der Kalibrationsgeraden abgeleitet werden.

Um die Stöchiometrie der Antikörper-Payload Bindung für ein DIG-trivalentes Antikörper-Format zu untersuchen, wurde ebenfalls die analytische Größenausschlusschromatographie verwendet. Dafür wurde der Antikörper in unterschiedlichen molekularen Verhältnissen mit DIG-siRNA-Cy5, welche gegen Abbau durch Endo- und Exonukleasen stabilisiert war, für etwa 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend mit einer Superdex 200 10/300 Säule

analysiert, um nicht komplexierte DIG-siRNA-Cy5 von Antikörper komplexierter DIG-siRNA-Cy5 zu trennen. Die Auftragsmenge entsprach einer Proteinkonzentration von etwa 20 µg. Als Laufmittel diente 1x PBS, pH 7.4. Um das Fluoreszenzsignal von Cy5 detektieren zu können, wurde eine Dionex Ultimate 3000 HPLC mit Fluoreszenzdetektor verwendet. Der Verstärkungsfaktor am Detektor war 1 und die Sensitivität medium. Die Fluoreszenz wurde bei 650 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 667 nm aufgenommen.

2.2.4.8 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Biacore)

Um das Bindungsverhalten von Biomolekülen in Echtzeit und ohne, dass es einer Markierung und somit Veränderung des Moleküls bedarf, beobachten zu können, ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ein geeignetes Mittel. Sie wurde hier dafür eingesetzt, um die Bindungsaffinität des bispezifischen Antikörpers an das Hapten zu bestimmen und um die Stöchiometrie der Antikörper-Payload Bindung zu verifizieren. Die Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) tritt auf, wenn polarisiertes Licht durch ein Prisma auf einen mit Gold beschichteten SPR-Sensor fällt und es an der Grenzschicht zwischen Goldoberfläche und Probenlösung zur Totalreflexion kommt (Kretschmann & Raether, 1968). Unter bestimmten Bedingungen von Wellenlänge, Polarisation und Einfallswinkel, regen die Photonen des einfallenden Lichts die freien Elektronen des Goldes zu longitudinalen Schwingungen parallel zur Metalloberfläche an, den sogenannten Oberflächenplasmonen. Durch diese Resonanzkopplung, kommt es zu einem definierten Energieverlust des reflektierten Lichtes. Ändern sich nun die Bedingungen auf der Sensoroberfläche z.B. durch Wechselwirkung zwischen auf dem Chip immobilisierten Antikörpern und den eingefangenen Payloads, führt das zu veränderten Resonanzbedingungen, wodurch sich der Energieverlust ändert. Diese Änderung kann mit der Beladung der Oberfläche bis zu einem bestimmten Wert in ng/mm² korreliert werden, was eine Aussage über Adsorptions- und Desorptionsprozesse ermöglicht. Die Versuche für diese Arbeit wurden an einem Biacore T100 oder T200 System durchgeführt. Das Biacore System besteht aus einem Sensor Chip, einem kontinuierlichen Flusssystem und einer optischen Detektionseinheit.

Für die Evaluierung, ob alle Hapten-Bindestellen des Antikörpers intakt sind, wurde ein CM5 Chip mit einem 1:1 Mix aus 0.1 M N-hydroxysuccinimid und 0.1 M 3-(N,N-dimethylamino)propyl-N-ethylcarbodiimid bei einer Flussrate von 5 µL/min aktiviert und danach mit dem Fangreagenz anti-human Fab in 10 mM Na-Acetat, pH 5.0 mit einer Konzentration von 10 µg/mL beschichtet bis eine Dichte von etwa 10000 RU erreicht war. 1 RU entspricht einer Masse von 1 pg/mm². Nach der Immobilisierung wurde die Oberfläche mit 1 M Ethanolamin/HCl, pH 8.5 geblockt. Im Anschluss wurde der zu analysierende Antikörper in

HBS-EP+ Laufpuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005 % PS 20, pH 7.4) mit einer Konzentration von 20 µg/mL 120 s bei einer Flussrate von 20 µL/min aufgegeben. Zuletzt wurde DIG-Doxorubicin in HBS-EP+ Laufpuffer mit einer Konzentration von 900 nM bei einem Fluss von 50 µL/min aufgegeben. Die Kontaktzeit (Assoziationsphase) betrug 3 min und die Waschzeit mit Laufpuffer ohne Antikörper (Dissoziationsphase) betrug 5 min. Eine Referenz-Flusszelle wurde auf gleiche Weise mit allen verwendeten Puffern und dem analysierten Antikörper, aber ohne Fangreagenz behandelt, damit das Bruttosignal von der unspezifischen Bindung bereinigt werden konnte. Der Chip wurde 2 x 60 s mit 60 mM Glycin, pH 1.5 und 30 s mit 50 mM NaOH, 1 M NaCl bei einem Fluss von 30 µL/min regeneriert, um nicht kovalent gebundenes Protein nach jedem Bindezyklus zu entfernen. Für die Bestimmung der Bindungsaffinität des anti-Theophyllin Antikörpers wurde ein C1 Chip verwendet, auf den über Aminkopplung das Fangreagenz Theo-BSA immobilisiert wurde. Die Assoziationsphase, in der der anti-Theo-Antikörper an das Theo-BSA bindet, betrug 3 min und die Dissoziationsphase 10 min. Der Theo-Antikörper wurde in verschiedenen definierten Konzentrationen in HBS-EP+ Laufpuffer bei einem Fluss von 50 µL/min aufgegeben. Die übrigen Versuchsbedingungen waren vergleichbar zu denen des CM5 Chips. Alle Versuche wurden bei 25 °C durchgeführt und mittels der Biacore T200 Evaluation Software Version 1.0 ausgewertet.

2.2.4.9 Massenspektrometrie

Um die Integrität und Identität der Moleküle zu bestätigen, wurde die Massenspektrometrie eingesetzt. Im Falle der Antikörperkonstrukte konnte so v.a. die Sequenzintegrität bestimmt werden. Für die haptenylierten Toxine wurde die Massenspektrometrie hauptsächlich eingesetzt, um den Haptenylierungsgrad, also die Anzahl gebundener Haptene pro Toxinmolekül, herauszufinden. Da Proteine aus Stabilitätszwecken normalerweise in Puffern vorliegen und die meisten Puffersalze in der Massenspektrometrie stören, müssen diese vorher entsalzt werden. Außerdem wurden die Antikörperkonstrukte, die eine CH₂-Domäne enthielten, deglykosiliert und für die Analytik der einzelnen Antikörperketten auch reduziert. Für die Deglykosylierung der Antikörper wurden etwa 100 µg mit 1 µL N-Glycosidase F versetzt und mit 100 mM NaH₂PO₄ Verdünnungspuffer (pH 7.1) auf ein Endvolumen von 230 µL aufgefüllt. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurden davon 115 µL entnommen und mit 50 µL 8 M Guanidin Hydrochlorid-Lösung und 60 µL 0.5 M Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP) in 4 M Guanidin Hydrochlorid-Lösung 30 min bei 37 °C inkubiert und so reduziert. So wurde ein Teil des Antikörper Aliquots nicht reduziert und deglykosiliert und ein anderer denaturiert und reduziert. Die Hapten-trivalenten Antikörperkonstrukte und die haptenylierten Toxine wurden nicht deglykosiliert, sondern nur auf eine Konzentration von

etwa 0.5 mg/mL mit 100 mM NaH₂PO₄ Verdünnungspuffer, pH 7.1, verdünnt. Im Anschluss wurden die so vorbereiteten Proben über eine G25-Sephadex Säule mit 40 % Acetonitril, 2 % Ameisensäure 8 min bei 1 mL/min an einer HPLC entsalzt. Der Elutionspeak wird bei 280 nm detektiert und im Peakanstieg ab einer Extinktion von etwa 30 mAU bis zu einem Peakabfall auf etwa 20 mAU gesammelt. Die Massenspektrometrie wurde mit einem MaXis qTOF-Massenspektrometer (Bruker) durchgeführt. Die Aufzeichnung und Auswertung erfolgte unter der Compass Software 1.3 mit micrOTOFcontrol V 3.0-SR2 und DataAnalysis V 4.0-SP4 von Bruker.

2.2.5 Haptenylierung der Payloads

Die chemische Kopplung der Haptene wurde entweder intern bei der Roche Diagnostics GmbH durch die Abteilung DXRE von Hr. Dr. Josel und Hr. Hermann durchgeführt oder, wie bei den DIG-Doxo-Nanopartikeln durch den kooperierenden Partner, die AG Prof. Haag der FU Berlin. Es wurden drei unterschiedliche DIG-Reagenzien mit unterschiedlichen Linker-Längen für die Digoxigenylierung der Toxine genutzt – Digoxigenin-3-Carboxymethyl-Osu für Mitomycin, Digoxigenin-Methylcarbonyl-Amcap-Osu für Saporin und *Pseudomonas* Exotoxin und Digoxigenin-Maleimid für die Polyglycerol Doxorubicin-Nanopartikel. Die Linker-Länge wurde auf das jeweilige Toxin abgestimmt, so dass in jedem Fall die Antikörperbindung an das Hapten durch das gekoppelte Toxin nicht behindert werden sollte (siehe Abb. 3.1-1). Für die Herstellung von Theo-Saporin wurde ausschließlich Theophyllin-Carboxypropyl-Osu benutzt. Bei der Osu-Chemie wird an einem im Toxin vorhandenen primären Amin das Hapten Digoxigenin, unter Ausbildung einer Amidbindung, gekoppelt. Bei der Maleimid-Chemie wird das Hapten Digoxigenin an eine im Toxin vorhandene Sulfhydryl-Gruppe, unter Ausbildung einer Thioetherbindung, gekoppelt. DIG-Mitomycin wurde gemäß eines bereits publizierten Mitomycin C Derivats mit einem Glutarsäurelinker hergestellt (Macky *et al.*, 2002)(siehe Abb. 3.1-1-B). Dabei wurde Digoxigenin über diesen Linker an das sekundäre Amin des Aziridinrings in Mitomycin C gekoppelt. Die Polyglycerol Doxorubicin-Nanopartikel wurden von der AG Haag der freien Universität Berlin synthetisiert (Calderón *et al.*, 2011)(Hussain *et al.*, 2013). Ebenso wie für die Kopplung des (6-maleimidocaproyl) Hydrazon Derivates von Doxorubicin (DOXO-EMCH) wurde dann eine Thiol-Zwischenstufe des Polyglycerol-Konjugates über 2-Iminothiolane hergestellt, welches im Weiteren mit DIG-Maleimid in einem theoretischen molekularen Verhältnis von 4 DIG pro Nanopartikel umgesetzt wurden. Pro Nanopartikel wurden sowohl 4 Doxorubicin- als auch 4 DIG-Moleküle stabil über eine Thioetherbindung gekoppelt (Mehrabadi & Adelman *et al.*, 2016) (siehe Abb. 3.1-1-A). Doxorubicin kann durch den Einbau eine säurelabilen Hydrazonlinkers im sauren pH der Endosomen abgespalten werden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden zum einen toxische Substanzen getestet, welche sich nach Haptenylierung als Payload für tumorspezifische Antikörper eignen und zum anderen wurden unterschiedliche bi- bzw. trispezifische Antikörper-Formate rekombinant hergestellt und gereinigt, welche für den tumorspezifischen Transport der toxischen Payloads geeignet sind. Ausgangspunkt für die Entwicklung der bispezifischen Antikörper war ein IgG, welches spezifisch das Kohlenhydratantigen LeY oder das myeloide Oberflächenantigen CD33 bindet. Ein DIG-bindender, disulfid-stabilisierter scFv (dsscFv) am C-Terminus der CH3-Domäne ermöglichte die Bindung einer DIG-haptenylierten Payload. Auch eine ausreichende Serumstabilität dieser DIG-bispezifischen Antikörper konnte bereits mit Payloads wie DIG-Cy5 oder DIG-Doxorubicin gezeigt werden (Metz *et al.*, 2011). Basierend auf diesem Format, welches zwei DIG-Payloads binden kann, wurden Formate mit drei DIG-Bindestellen entwickelt und evaluiert. In früheren Untersuchungen konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Anzahl der pro Antikörper gebundenen toxischen Payload direkt mit der anti-Tumor Aktivität korreliert (Hamblett *et al.*, 2004)(King *et al.*, 1999). Die Herstellung der ADCs erfolgt standardmäßig durch Reaktion des Chemotherapeutikums zugänglichen reaktiven Aminosäuren wie Lysin oder Cystein der Antikörper, mit oder ohne Zuhilfenahme chemischer *Crosslinking* Reagenzien. Dies hat eine sehr heterogene Mischung von ADCs zur Folge, welche sich pharmakokinetisch sehr unterschiedlich verhalten (Wu & Senter, 2005)(Junutula *et al.*, 2010)(Hamblett *et al.*, 2004). Für die Entwicklung eines Immunkonjugates und die Beurteilung dessen Wirksamkeit ist es allerdings essentiell ein Konjugat, welches eine stöchiometrisch definierte Anzahl toxischer Payload bindet, zu verwenden. Vor allem für toxische Payloads mit steiler Dosis-Wirkungskurve, welche also nicht schon in sehr geringer Dosierung zytotoxisch wirken, wie z.B. das *Pseudomonas* Exotoxin, bei dem theoretisch 1 Molekül pro Zelle ausreichend ist, um die Zelle zu töten (Pastan *et al.*, 1992), kann die erhöhte Antikörper-Payload-Ratio von Nutzen sein (Firestone *et al.*, 1996). Weiter wurde als alternatives Hapten zu Digoxigenin das Purinalkaloid Theophyllin verwendet. Aus Hybridoma wurde ein Theophyllin bindender Antikörper isoliert und auf Basis der getesteten DIG-bispezifischen Formate ein humanisierter monoklonaler Theophyllin-bispezifischer Antikörper generiert. Außerdem wurde ein trispezifischer Antikörper entwickelt und getestet, der neben dem Zielantigen sowohl eine DIG-Payload als auch eine Theo-Payload binden kann. Ein additiver oder synergistischer Effekt zweier Payloads konnte in Studien bereits mehrfach gezeigt werden – allerdings nur in kombinatorischer Applikation der freien, nicht am Antikörper gebundenen Therapeutika (Lee *et al.*, 2013)(Miskimins *et al.*, 2014)(Tyagi, Agarwal, Chan, & Agarwal, 2004). Die trispezifische Anwendung kann zur Austestung additiver oder synergistischer Effekte von Payloads verwendet werden – und zwar in Form definierter zielgerichteter Immunkonjugate, was *in vivo* deutliche Vorteile gegenüber der systemischen

Behandlung aufweist. Denn ebenso wie bei der Behandlung mit einem einzelnen Chemotherapeutikum, kann durch Kopplung zweier zytotoxischer Substanzen an einen tumorspezifischen Antikörper, die Wirkung auf „normale“, körpereigene Zellen reduziert und die tumorspezifische Wirkung verbessert werden, wodurch ein breiteres therapeutisches Fenster erreicht werden kann (Firestone *et al.*, 1996). Bakterien- bzw. Pflanzentoxine oder Zytostatika dienten in dieser Arbeit nach Haptenylierung als toxische Payload, welche mit den verschiedenen Antikörper-Formaten kombiniert werden konnten. Bis heute sind zahlreiche neue Antikörper-Formate, die weit von einem Standard IgG entfernt sind, entwickelt worden (Cuesta *et al.*, 2010). Die Entwicklung neuartiger Antikörper-Formate ist komplex und in erster Instanz vor allem hinsichtlich Exprimierbarkeit, Integrität und Funktion zu untersuchen (Chames *et al.*, 2009)(C. Wu *et al.*, 2007). Die Antikörper, die haptenylierten Payloads und die daraus entstehenden modularen Antikörper-Payload-Komplexe wurden biochemisch analysiert und zellbiologisch auf Ihre Wirksamkeit untersucht.

3.1 Toxische Payloads

Es wurden unterschiedliche zytotoxische Substanzen in dieser Arbeit untersucht (siehe Tabelle 3.1.1). Bei der Auswahl der Substanzen wurde im Wesentlichen darauf geachtet, dass sie z.B. -NH₂ oder -SH enthielten, um gängige Kopplungsmechanismen (siehe 2.2.5), wie beispielsweise die O-Succinimid- oder Maleimid-Chemie für die Haptenylierung der Toxine nutzen zu können. Es wurden die anti-Tumor Antibiotika Mitomycin C und Doxorubicin getestet, welche in die DNA interkalieren und so die Replikation und auch Transkription stören (siehe 1.2.1.3). Beide Interkalantien sind bereits seit Jahrzehnten bekannt (Wakaki *et al.*, 1958)(Arcamone *et al.*, 1969) und werden heutzutage häufig in Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt, wobei Doxorubicin dabei meist in Form von polymeren oder liposomalen Nanopartikeln verwendet wird (Wagenaar *et al.*, 2001)(Grenader *et al.*, 2012). Weiterhin wurde das Pflanzentoxin Saporin getestet, das im Vergleich zu Mitomycin C und Doxorubicin, eher zu den neueren Substanzen für die Tumorthherapie zählt (Stirpe *et al.*, 1983). Es gehört zu den Typ-I-RIPs, welches aus der ribosomalen 28S-rRNA Adenin entfernt, wodurch die Proteinbiosynthese gehemmt wird und es zum Absterben der Zellen kommt. Typ-I-RIPs werden aktuell hauptsächlich an Antikörper oder deren Fragmente gekoppelt, um ihnen eine tumorspezifische Zytotoxizität zu verleihen (Polito *et al.*, 2013). Als Kontrollsubstanz wurde das Bakterientoxin PE38, eine verkürzte Variante des nativen PE66 (Allured *et al.*, 1986), mitgeführt, das die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor EF-2 katalysiert, wodurch es in Folge zum Erliegen der Proteinbiosynthese und somit zum Absterben der Zelle kommt. Von allen Toxinen, die für Immuntoxine genutzt werden, ist *Pseudomonas* Exotoxin das am besten aufgeklärte, weshalb es häufig für die Entwicklung von

Immuntoxinen verwendet wird (Becker & Benhar, 2012) und in dieser Doktorarbeit als Referenzsubstanz dient. Da alle Domänen des *Pseudomonas* Exotoxins und deren einzelne kodierende Gene bekannt sind (Pastan *et al.*, 2007), wurden bis heute zahlreiche PE-basierte Immuntoxine, die sich in klinischer Entwicklung befinden oder befanden (Kreitman *et al.*, 2012)(Hassan *et al.*, 2007), hergestellt.

Substanz	Quelle	Größe [g/mol]	Wirkmechanismus	Literatur
Mitomycin C	Actinobakterien	~ 330	Interkalation in die DNA	Wakaki <i>et al.</i> , 1958; Wagenaar <i>et al.</i> , 2001;
Doxorubicin	Actinobakterien	~ 540	Interkalation in die DNA	Arcamone <i>et al.</i> , 1969; Grenader <i>et al.</i> , 2012;
<i>Pseudomonas</i> Exotoxin	<i>Pseudomonas</i> Bakterien	~ 66000 (nativ) ~ 38000	ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktor EF-2	Allured <i>et al.</i> , 1986; Pastan <i>et al.</i> , 2007;
Saporin	Seifenkraut	~ 29000	Adeninabspaltung aus ribosomaler RNA	Stirpe <i>et al.</i> , 1983; Polito <i>et al.</i> , 2013;

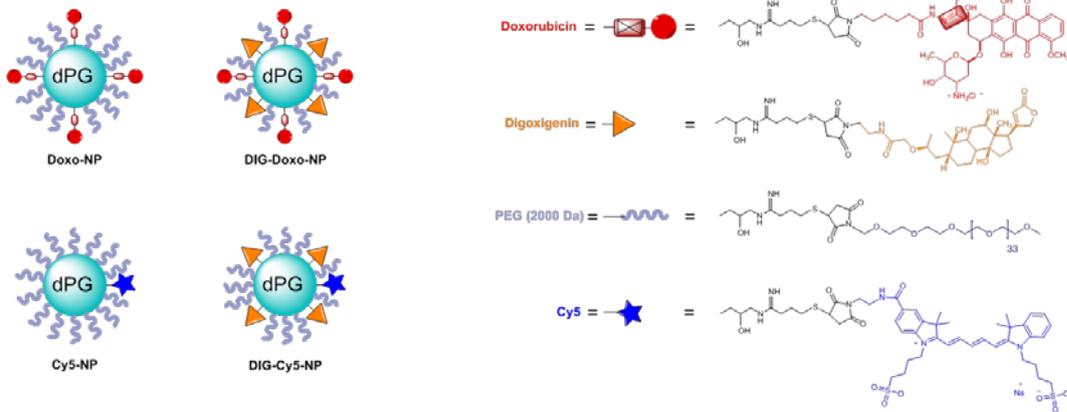
Tabelle 3.1.1: Übersicht über toxische Payloads

Es wurden vier unterschiedliche toxische Payloads verwendet, deren Herkunft, Größe und Wirkmechanismus in der Tabelle aufgeführt ist. Die Literaturhinweise sind im Text wiederzufinden (3.1).

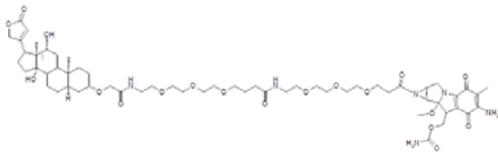
Doxorubicin wurde in dieser Arbeit in Form eines Prodrug-Konjugates bzw. Nanopartikels verwendet, welches theoretisch 4 Doxo- und 4 DIG-Moleküle pro Konjugat enthält. Die Synthese dieser Partikel und der Referenzpartikel, wie z.B. ohne Digoxigenin wurde von der AG Prof. Haag der FU Berlin durchgeführt. Die 4 DIG-Moleküle wurden stabil über eine Thioetherbindung gekoppelt, wobei durch Einfügen eines säurelabilen Hydrazonlinkers das Abspalten der 4 Doxorubicin-Moleküle im sauren pH der Endosomen ermöglicht werden sollte (Mehrabadi & Adelman *et al.*, 2016)(siehe Abb. 3.1-1-A). Freie nicht zur Kopplung von DIG oder Doxorubicin Thiol-aktivierte Aminogruppen der dendritischen Polyglycerol Nanopartikel (dPG-NPs) wurden mit PEG 2000 konjugiert. Dadurch sollten v.a. die Stabilität und Wasserlöslichkeit der NPs erhöht werden. NPs mit Cy5 wurden für die fluoreszenzbasierte Analytik, wie die Durchflusszytometrie, hergestellt. Dabei wurde Cy5 ebenfalls stabil über Maleimid-Chemie an den NP gekoppelt. DIG-Mitomycin wurde bei der Roche Diagnostics GmbH von Hr. Dr. Josel und Hr. Hermann gemäß eines bereits publizierten Mitomycin C Derivats mit einem Glutarsäurelinker hergestellt (Macky *et al.*, 2002)(siehe Abb. 3.1-1-B). Für die Herstellung des DIG-Saporins wurde das Extrakt aus den Samen des Seifenkrautes (Sigma-Aldrich) verwendet, welches bei der Roche Diagnostics GmbH in der Abteilung DXRE von Hr. Dr. Josel und Hr. Hermann digoxigenyliert wurde. PE38 wurde von Dr. B. Schneider bei der Roche Diagnostics GmbH produziert. Die Digoxigenylierung wurde ebenfalls bei der

Roche Diagnostics GmbH in der Abteilung DXRE von Hr. Dr. Josel und Hr. Hermann durchgeführt (siehe Abb. 3.1-1-C).

A



B



C

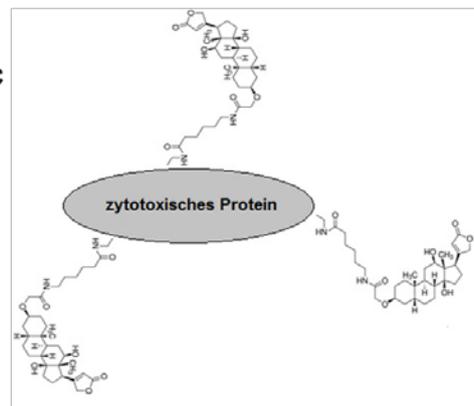


Abb. 3.1-1: Übersicht digoxigenylierter Payloads

Als toxische Payloads wurden unterschiedlichste Toxine verwendet: **A** DIG-Doxo-Nanopartikel, welche auf etwa 10 kDa großen Polyglycerol-Nanopartikeln basieren, die mit je 4 Doxorubicin- und je 4 Digoxigenin-Molekülen funktionalisiert sind. Die toxische Payload kann durch den säurelabilen Hydrazonlinker im Zellinnern freigesetzt werden. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden 2 kDa große PEG Seitenketten eingebracht. Für fluoreszenzbasierte Analytik wie die Durchflusszytometrie wurden Cy5-NPs hergestellt. **B** DIG-Mitomycin, bei welchem Mitomycin-C über einen langen Spacer und Amidbindung an das Hapten Digoxigenin gekoppelt wurde. **C** Zytotoxische DIG-Proteine wie DIG-Saporin und DIG-PE38, welche über die im Protein enthaltenen Lysine über eine Amidbindung an das Hapten Digoxigenin über einen Spacer gekoppelt wurden.

Die biologische Wirksamkeit vor und nach Haptenylierung und das Targeting haptenylierter Toxine wurden mittels Zellviabilitätsassays untersucht.

3.1.1 Chemotherapeutische Payloads

Als niedermolekulare toxische Payloads wurden Mitomycin C und Doxorubicin getestet. Zwei ursprünglich aus Actinobakterien isolierte Zytostatika, die durch Interkalation in die DNA die Replikation und auch Transkription hemmen, wodurch es zum Zelltod kommt. Eines der ersten entwickelten und publizierten ADCs war BR96-Doxorubicin – ein chimärer anti-LeY-Antikörper, an den über einen Hydrazonlinker Doxorubicin gekoppelt war. Aus dieser Forschung ging hervor, dass vermutlich deutlich toxischere Substanzen als Doxorubicin für ein erfolgreiches ADC benötigt würden (Chari *et al.*, 1995)(C. Liu *et al.*, 1996) oder eine deutlich höhere Anzahl Doxorubicin-Moleküle pro Antikörper nötig ist. Der alternative Ansatz für Doxorubicin war deshalb in dieser Doktorarbeit, dieses Chemotherapeutikum in definierter Beladung über einen säurelabilen Hydrazonlinker an dendritische Polyglycerol-Nanopartikel zu koppeln, an welchen zusätzlich Digoxigenin über eine stabile Bindung gekoppelt war. Die Funktionalität des Hydrazonlinkers und somit erfolgreiche Freisetzung von Doxorubicin unter sauren Bedingungen ($\text{pH} < 6$) konnte in pH-abhängigen Studien mit den dPG-NPs von der AG Haag gezeigt werden (Mehrabadi & Adelman *et al.*, 2016). Über den stabil gebundenen Digoxigenin Rest sollten diese NPs wiederum von LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern gebunden werden, um so eine zielgerichtete Payload-Applikation und Toxizität auf MCF-7 Zellen zu erreichen.

3.1.1.1 Analytik der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe mittels SEC

Um eine erfolgreiche spezifische Bindung der bispezifischen Antikörper an DIG-Doxo-NPs nachzuweisen, wurden sowohl LeY-DIG-bispezifische als auch LeY-monospezifische Antikörper mit den Nanopartikeln im Verhältnis 1:2 Mol gemischt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mittels analytischer Größenausschlusschromatographie mit UV-Detektion bei 280 nm untersucht. Die DIG-Doxo-NPs und die Doxo-NPs alleine zeigen kein UV-Signal bei 280 nm, da die Konjugate keine UV-absorbierenden Gruppen bei dieser Wellenlänge enthalten. Die Doxo-NPs zeigten weder mit dem LeY-DIG-bispezifischen noch mit dem LeY-monospezifischen Antikörper eine stabile Komplexbildung. Die DIG-Doxo-NPs hingegen zeigten mit dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper einen Shift zu kürzeren Retentionszeiten, verglichen mit dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper alleine, was auf eine stabile Komplexbildung schließen lässt (siehe Abb. 3.1-2). Da bei beiden NPs kein Retentionszeitshift mit dem LeY-monospezifischen Antikörper detektiert werden konnte, kann eine stabile Komplexbildung, bedingt durch eine unspezifische Bindung an die LeY Bindungsstelle, ausgeschlossen werden.

Ergebnisse

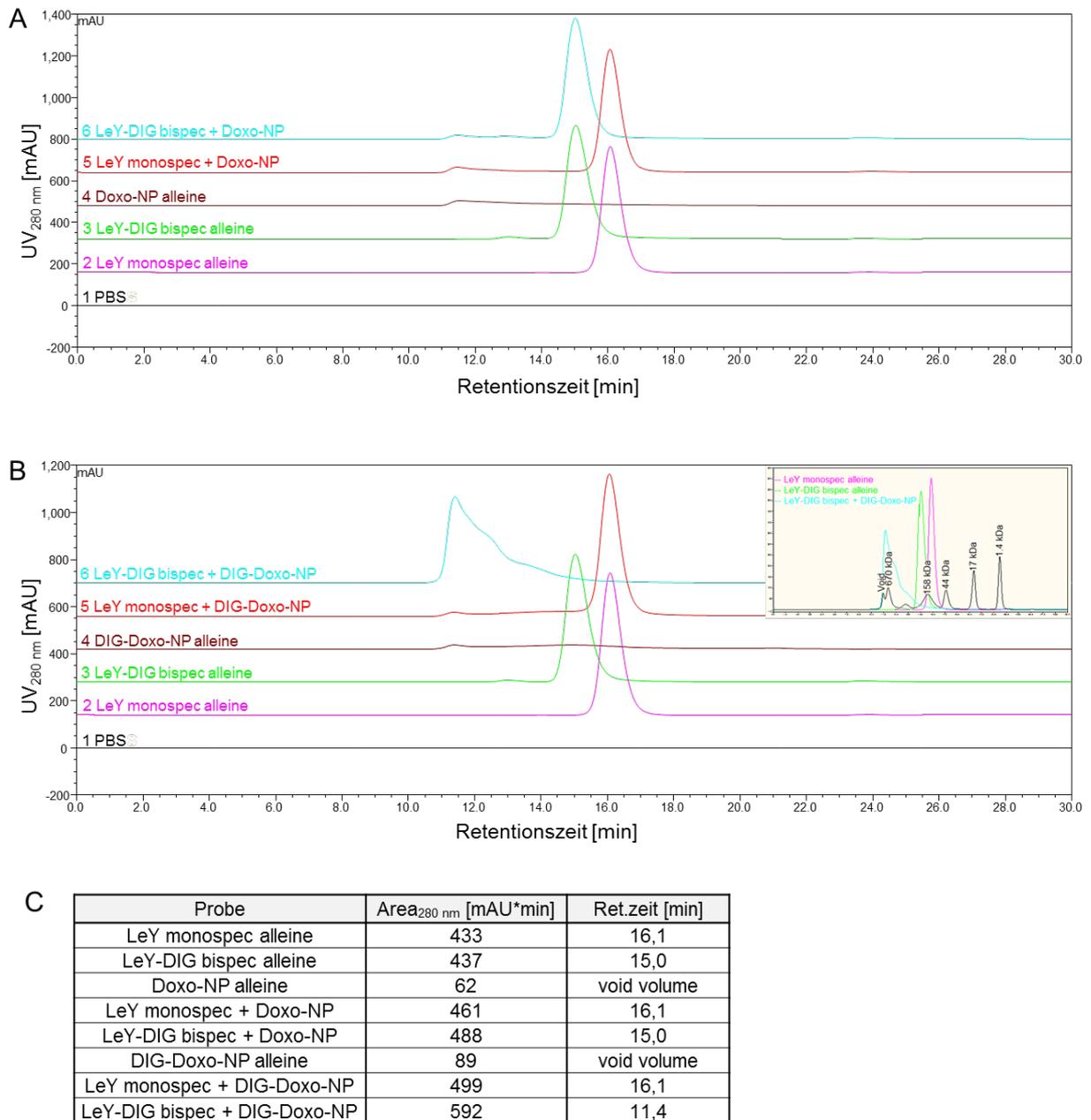


Abb. 3.1-2: Analytische SEC der der bsAb-NP-Komplexe

A Doxo-NPs wurden in einem molaren Verhältnis von 2:1 mit dem LeY-DIG-bispezifischen und dem LeY-monospezifischen Antikörper gemischt. **B** DIG-Doxo-NPs wurden in einem molaren Verhältnis von 2:1 mit dem LeY-DIG-bispezifischem und dem LeY-monospezifischen Antikörper gemischt. Die Mischungen wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und danach mittels SEC auf einer TSKgel3000SWxl Säule analysiert und mittels Gelfiltrationsstandard ausgewertet. **C** Die Proben wurde alle ohne Unterbrechung von 10.5 bis 19.5 min integriert. Nur die DIG-Doxo-NPs mit LeY-DIG-bispezifischem Antikörper zeigten einen ausgeprägten Shift zu kürzeren Retentionszeiten, was auf eine DIG-spezifische Bindung der DIG-Doxo-NPs schließen lässt.

3.1.1.2 Analytik der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe mittels zellbasiertem ELISA

Um die simultane Bindung der LeY-DIG-bispezifischen Antikörper an das Antigen LeY auf der Oberfläche von MCF-7 Zellen und an die DIG-Doxo-NPs zu zeigen, wurde ein zellbasierter ELISA, wie unter 2.2.3.7 beschrieben, designt. Bindet dabei der LeY-DIG-bispezifische Antikörper an das hoch exprimierte LeY-Oberflächenantigen und an das DIG des DIG-Doxo-NPs, so kann über einen weiteren DIG-Rest des gebundenen NPs der Sekundärantikörper gebunden werden. Dieser Sekundärantikörper ist HRP-konjugiert, wodurch die Umsetzung des Substrats ABTS katalysiert und das Reaktionsprodukt dann photometrisch nachgewiesen werden kann. Der DIG-Doxo-NP, welcher mit dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper vorinkubiert wurde, zeigt ein deutliches konzentrationsabhängiges Signal bei 405 nm (Abb. 3.1-3). Der CD33-DIG-bispezifische Antikörper, welcher in gleicher Weise mit dem DIG-Doxo-NP vorinkubiert wurde, zeigt nur einen marginalen Anstieg des Signals. Außerdem war weder bei dem LeY-DIG-bispezifischen noch bei dem DIG-Doxo-NP alleine ein Signalanstieg erkennbar.

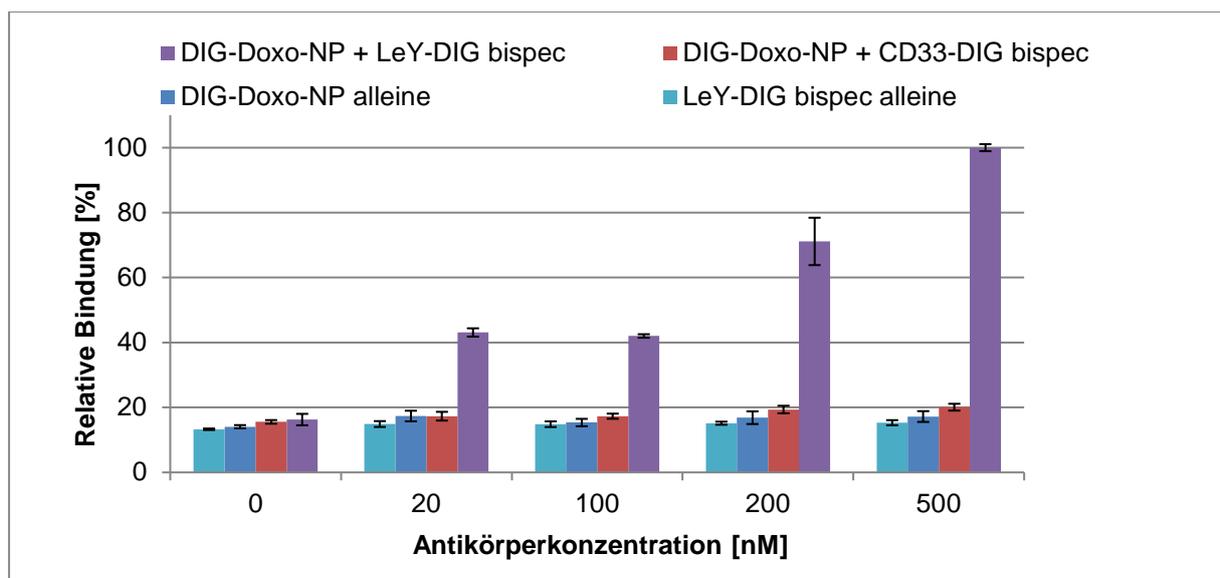


Abb. 3.1-3: Zellbasierter ELISA der bsAb-NP-Komplexe

DIG-Doxo-NPs wurden mit LeY- oder CD33-DIG-bispezifischen Antikörpern vorinkubiert und in steigenden Konzentrationen auf MCF-7 Zellen aufgetragen. Werden die DIG-Doxo-NPs von den LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern gebunden, so können diese im Komplex über den Antikörper an das Oberflächenantigen LeY an die MCF-7 Zellen binden. Über einen weiteren DIG-Rest des gebundenen Antikörper-Nanopartikel-Komplexes kann die Bindung über einen HRP-markierten anti-DIG Sekundärantikörper und ABTS nachgewiesen werden.

3.1.1.3 Analytik der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe mittels Durchflusszytometrie

Mit Durchflusszytometrie sollte die simultane Bindung der LeY-DIG-bispezifischen Antikörper an das Oberflächenantigen LeY auf MCF-7 Zellen und an die DIG-Doxo-NPs bestätigt werden. Dafür wurden Cy5 markierte NPs und DIG-NPs verwendet, da die Fluoreszenz des Doxorubicin für die Detektion zu schwach war. Die Cy5-markierten Nanopartikel unterschieden sich von den Doxorubicin haltigen Nanopartikeln einzig dadurch, dass statt 4 Doxorubicin-Molekülen pro NP 1 Cy5-Molekül pro NP gebunden war (siehe Abb. 3.1-1).

Die Cy5-NPs und DIG-Cy5-NPs wurden mit den LeY-DIG-bispezifischen und LeY-monospezifischen Antikörpern in einem molaren 2:1 Verhältnis gemischt, mit den MCF-7 Zellen inkubiert und danach die zellassoziierte Fluoreszenz aufgenommen. Weder die Cy5-NPs noch die DIG-Cy5-NPs zeigten mit dem LeY-monospezifischen Antikörper einen targetpezifischen Anstieg der Cy5-Fluoreszenz. Auch die Inkubation mit den Cy5-NPs und DIG-Cy5-NPs alleine zeigte keine signifikante Cy5-Fluoreszenz. Cy5-NPs und DIG-Cy5-NPs, welche mit CD33-DIG-bispezifischen Antikörpern inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine zellassoziierte Cy5-Fluoreszenz, genauso wie der LeY-DIG-bispezifische Antikörper alleine (Metz *et al.*, 2011). Einzig der LeY-DIG-bispezifische Antikörper, der mit DIG-Cy5-NPs inkubiert wurde, zeigte ein deutliches zellassoziiertes Cy5-Fluoreszenz-Signal, was auf eine targetspezifische Bindung der Antikörper-DIG-NPs schließen lässt.

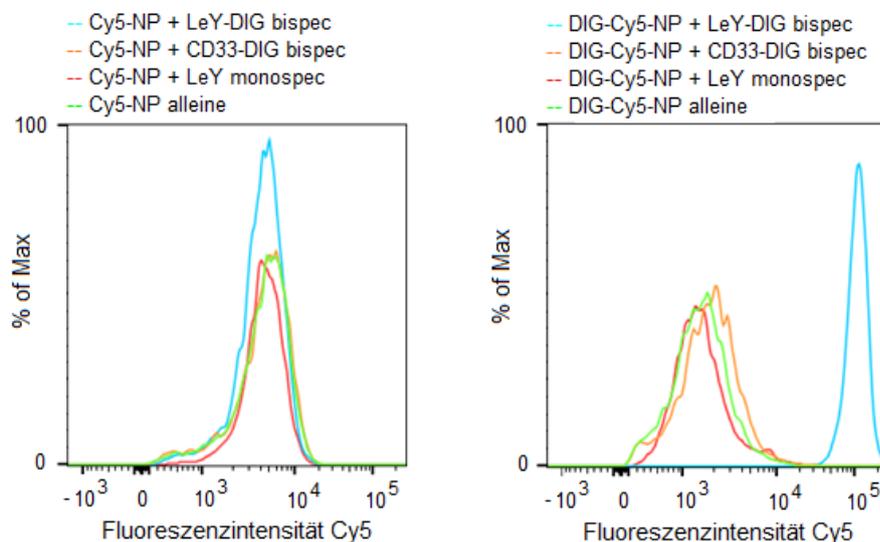


Abb. 3.1-4: Durchflusszytometrie der bsAb-NP-Komplexe

A MCF-7 Zellen wurden mit Cy5-NPs alleine oder in Kombination mit LeY-monospezifischen, LeY- oder CD33-DIG-bispezifischen Antikörpern inkubiert. **B** MCF-7 Zellen wurden mit DIG-Cy5-NPs alleine oder in Kombination mit LeY-monospezifischen, LeY- oder CD33-DIG-bispezifischen Antikörpern inkubiert.

3.1.1.4 Konfokalmikroskopie der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe

Mittels SEC, zellbasiertem ELISA und Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass DIG-NPs spezifisch durch LeY-DIG-bispezifische Antikörper komplexiert werden und diese Komplexe zielgerichtet an das Oberflächenantigen LeY auf MCF-7 Zellen binden. Mittels Konfokalmikroskopie wurde untersucht wie sich die Doxo- und DIG-Doxo-NPs mit und ohne bispezifischen Antikörpern auf MCF-7 Zellen verhalten. In früheren Studien konnten Calderon und Kollegen (Calderón *et al.*, 2011) zeigen, dass dPG-basierte NPs, bei denen Doxorubicin über einen säurelabilen Linker an das dendritische Gerüst gekoppelt war, erfolgreich für tumortherapeutische Zwecke eingesetzt werden konnten. Da Doxorubicin seine zytotoxische Wirkung durch Interkalation in die DNA bewirkt, muss es in den Zellkern vordringen können. Die Ergebnisse der Konfokalmikroskopie (siehe Abb. 3.1-5) zeigten, dass Doxorubicin sowohl von Doxo-NPs als auch von DIG-Doxo-NPs abgespalten werden kann, da bei beiden NPs im Zellkern der MCF-7 Zellen ein deutliches Fluoreszenzsignal von Doxorubicin zu beobachten war. Verglichen mit der Intensität des freien Doxorubicin, war die Intensität des Doxorubicin bei beiden NPs etwas niedriger. Werden die Doxo- und DIG-Doxo-NPs nun mit LeY- oder CD33-DIG-bispezifischen Antikörpern vorinkubiert und auf die Zellen aufgetragen, so sind bei allen Mischungen ähnliche Doxorubicin-Signale erkennbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl Doxo- als auch DIG-Doxo-NPs unabhängig von DIG-bispezifischen Antikörpern von den Zellen aufgenommen werden können und die Bindung eines bispezifischen Antikörpers weder die Aufnahme in die Zellen, noch die Abspaltung des Doxorubicin in den Zellen und dessen Vermögen in den Zellkern zu gelangen beeinflusst.

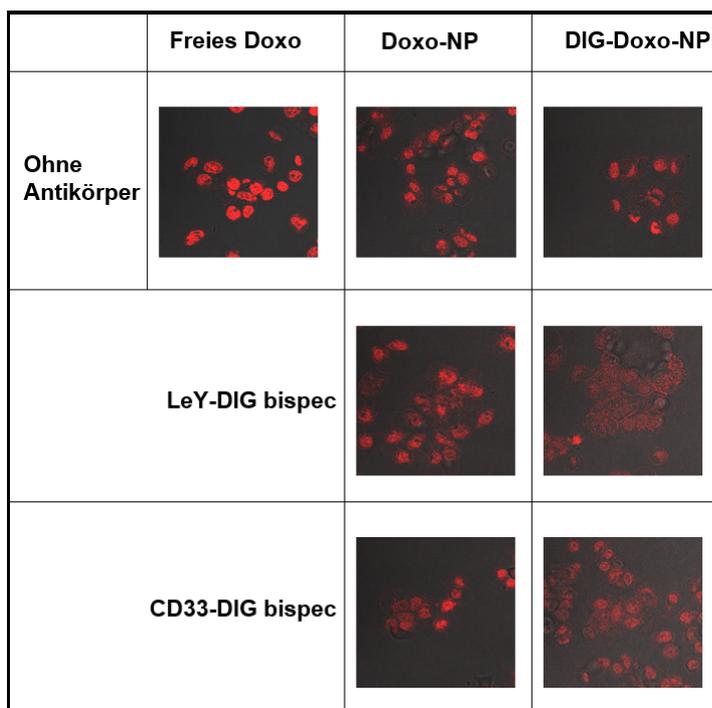


Abb. 3.1-5: Konfokalmikroskopie der bsAb-NP-Komplexe

MCF-7 Zellen wurden mit freiem Doxorubicin, Doxo-NPs und DIG-Doxo-NPs alleine (oberste Reihe) oder in Kombination mit LeY- oder CD33-DIG-bispezifischen Antikörpern inkubiert und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Für die Darstellung wurden die Bilder aus Transmission und Fluoreszenz übereinander gelegt.

3.1.1.5 Aktivität der toxischen Payloads vor und nach Haptenylierung

Mitomycin C wurde bei der Roche Diagnostics GmbH von Hr. Dr. Josel und Hr. Hermann haptenyliert. Am sekundären Amin des Aziridinrings wurde über einen Glutarsäurelinker Digoxigenin gekoppelt. Dadurch wurde Mitomycin C sowohl chemisch modifiziert als auch in seiner Größe durch den angehängten DIG-Rest verändert, weshalb in einem Zellviabilitätassay verglichen wurde, ob die Zytotoxizität des DIG-Mitomycin mit der Ausgangssubstanz Mitomycin C vergleichbar ist.

Doxorubicin wurde in Form eines Doxorubicin Prodrug-Konjugats getestet, von welchem Calderón und Kollegen bereits zeigen konnten, dass es durch Endozytose in Zellen aufgenommen wird, das Doxorubicin im sauren pH der Endosomen vom Konjugat abgespalten wird und nach 6 h Inkubation im Zellkern detektierbar ist (Calderón *et al.*, 2011). In diesem Konjugat sind 4 Doxorubicin-Moleküle über einen säurelabilen Linker an ein dendritisches Polyglycerol Polymer gebunden. Dieser Hydrazonlinker wurde bereits in vorherigen Studien der AG Haag dazu genutzt die Beladung der NPs mit Doxorubicin bzw. die Freisetzung von Doxorubicin besser kontrollieren zu können. Etwa 3 bis 4 DIG-Moleküle wurden ebenso wie Doxorubicin über Maleimid-Chemie an die mit 2-Iminothiolane aktivierten Aminogruppen des dPG-Gerüsts der NPs gekoppelt. Übrige nicht durch DIG oder Doxorubicin belegte Sulfhydryl-Gruppen wurden mit 2 kDa PEG funktionalisiert, um v.a. die Löslichkeit und Stabilität der Konjugate zu erhöhen. Neben einem Doxorubicin-Nanopartikel mit DIG (DIG-Doxo-NP bzw. dPG-DigMal₄-DOX₄-PEG), bei dem das Hapten stabil an das Dendrimer gekoppelt war, wurden Doxorubicin-Nanopartikel ohne DIG (Doxo-NP bzw. dPG-DOX₄-PEG) hergestellt, um zu testen, ob die Haptenylierung das Bindungsverhalten der NPs bzw. die Abspaltung des Doxorubicin vom NP und somit die Zytotoxizität beeinflusst. Strukturell vergleichbare dPG-NPs ohne Doxorubicin wurden im Vorfeld getestet, um einen zytotoxischen Effekt durch dPG-NPs alleine auszuschließen (Daten nicht gezeigt).

Die Zytotoxizität der DIG-Payloads und der Ausgangs- bzw. Vergleichssubstanzen wurde mittels CellTiter-Glo[®]-Zellviabilitätsassay gemessen. Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen Toxin und DIG-Toxin 48 h (Doxorubicin-Nanopartikel) oder 72 h (Mitomycin C) inkubiert. Anschließend wurde gemäß 2.2.3.6 100 µL des CellTiter-Glo[®]-Reagenz pro Well dazugegeben und das Lumineszenz-Signal ausgelesen. Die Lumineszenz ist ein Maß für den ATP-Gehalt, welcher

proportional zur Anzahl lebender Zellen ist und wurde hier auf eine Skala normiert, bei der 1 einer Zellviabilität von 100 % entspricht. Mitomycin wurde in einer Konzentration von 0,5 bis 5 μM aufgetragen. Mitomycin zeigt nach Digoxigenylierung und 72 h Stunden Inkubation auf MCF-7 Zellen einen Verlust der Zytotoxizität von etwa 10 – 30 % im Vergleich zum nicht digoxigenylierten Mitomycin C (Abb. 3.1-6-A). Doxorubicin und die Doxorubicin-Nanopartikel wurden in einer für Doxorubicin-Nanopartikel üblichen Konzentration von 0,1 bis 5 μM aufgetragen (Shi *et al.*, 2009)(Ren *et al.*, 2011). Die Toxizität der Doxo-NPs und DIG-Doxo-NPs sieht vergleichbar aus (Abb. 3.1-6-B). Im Vergleich zu freiem Doxorubicin in äquivalenten Dosen, zeigen die Nanopartikel allerdings eine etwas reduzierte Toxizität.

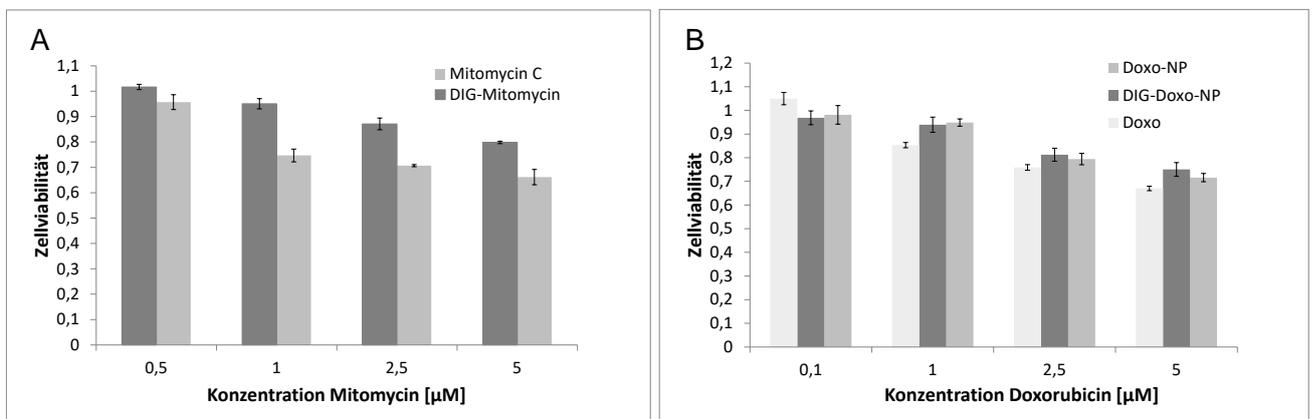


Abb. 3.1-6: Zytotoxizität chemotherapeutischer Payloads vor und nach Haptenylierung

Die toxischen Payloads wurden einfach oder mehrfach mit Digoxigenin gekoppelt. Im Anschluss daran wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay untersucht, ob die Kopplung einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Die Zytotoxizität wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay ausgelesen. Die Zellviabilität wurde hier auf eine Skala normiert, bei der eine Zellviabilität von 1 einer Anzahl von 100 % lebender Zellen entspricht. Diese Zellviabilität wurde gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen.

A (■) Mitomycin C (■) DIG-Mitomycin **B** (■) Doxorubicin-Nanopartikel (■) DIG-Doxorubicin-Nanopartikel (□) Doxorubicin

3.1.1.6 Targeting der toxischen Payloads auf MCF-7 Zellen

Das Targeting des Toxins über den bispezifischen Hapten-bindenden und tumorspezifischen Antikörper ist von essentieller Bedeutung, um unerwünschte Nebenwirkungen auf körpereigene Zellen zu reduzieren und die zielgerichtete Wirkung des Toxins zu gewährleisten. Deshalb wurde untersucht, ob die digoxigenylierten Toxine nach Vorinkubation mit LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern auf MCF-7 Zellen einen Targeting-Effekt zeigten. Für diesen Versuch wurde das bereits publizierte LeY-DIG-bispezifische Antikörper-Format (Metz *et al.*, 2011) mit DIG-Toxin im molaren Verhältnis von 1:2 verwendet. Als Isotypkontrolle wurde

der CD33-DIG-bispezifische Antikörper, der nicht an MCF-7 Zellen bindet, im gleichen Format verwendet. Die DIG-Toxine wurden mit den Antikörpern 24 h bei 4 °C vorinkubiert und auf die Zellen aufgebracht. Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen der DIG-Toxin-Antikörper-Komplexe 48 h (DIG-Doxorubicin-Nanopartikel) oder 72 h (DIG-Mitomycin) inkubiert. Von den verwendeten Doxorubicin-Nanopartikeln war zu erwarten, dass sie aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Optimierung (Calderón *et al.*, 2011) auch passiv aufgenommen werden. Um diese passive Aufnahme und somit unspezifische Zytotoxizität zu vermeiden, mussten geeignete Analysebedingungen gefunden werden. Daher wurden die DIG-Doxorubicin-Nanopartikel-Antikörper-Komplexe nach 2 h Inkubation durch Waschen mit Medium von den Zellen entfernt. Die Zellen mit DIG-Mitomycin wurden nicht gewaschen. Anschließend wurde die Zellviabilität bestimmt. DIG-Mitomycin zeigt bis 5 µM keinen Targeting-Effekt mit dem bispezifischen LeY-DIG-Antikörper (Abb. 3.1-7-A). Um den Targeting-Effekt der Doxorubicin-Nanopartikel zu testen, wurde nicht nur der DIG-Doxorubicin-Nanopartikel mit je beiden Antikörpern vorinkubiert und aufgetragen, sondern auch der nicht digoxigenylierte Doxorubicin-Nanopartikel. Die DIG-Doxo-NPs mit LeY-DIG-bispezifischem Antikörper zeigten im Vergleich zu den Komplexen mit dem CD33-DIG-Antikörper oder den entsprechenden Antikörper-Komplexen mit den Doxo-NPs ohne DIG eine leicht erhöhte Toxizität. Dies konnte in Wiederholungsmessungen bestätigt werden (Daten nicht explizit gezeigt). Für die DIG-Doxorubicin-Nanopartikel zeigte sich also ein schwacher, aber reproduzierbarer Targeting-Effekt. Allerdings zeigt auch der nicht digoxigenylierte Doxorubicin-Nanopartikel eine dosisabhängige erhöhte Zytotoxizität mit beiden bispezifischen Antikörpern (Abb. 3.1-7-B).

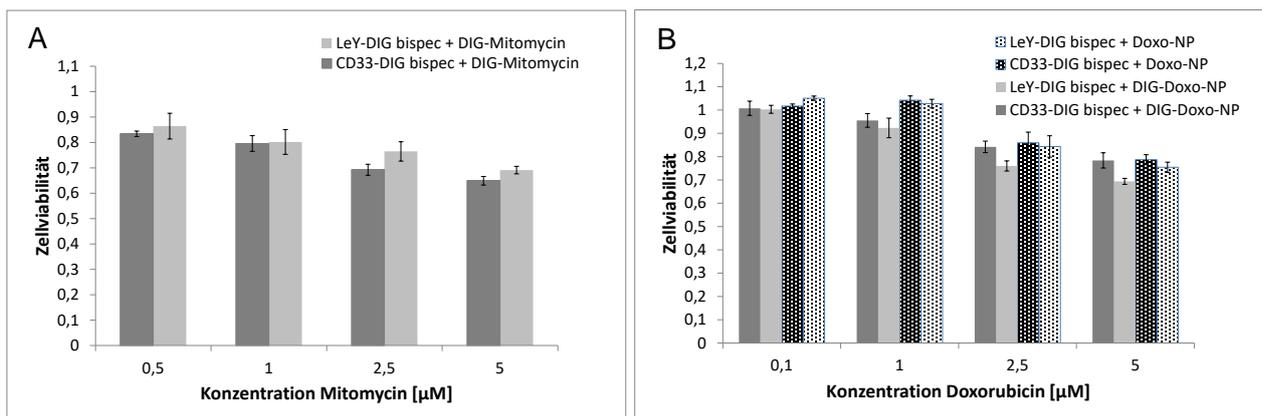


Abb. 3.1-7: Targeting digoxigenylierter toxischer Payloads mit LeY-DIG- und CD33-DIG- bispezifischen Antikörpern auf MCF-7 Zellen

Digoxigenylierte Toxine wurden mit bispezifischen LeY-DIG- oder CD33-DIG-bindenden Antikörpern im molaren Verhältnis 2:1 (DIG-Toxin:Ak) 24 h inkubiert und dann auf die LeY-positiven MCF-7 Zellen aufgebracht. Die Zytotoxizität wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay ausgelesen. Im Diagramm wurde die

normierte Zellviabilität gegen die jeweilige antikörpergebundene Toxinkonzentration aufgetragen. Eine Zellviabilität von 1 entspricht einer Anzahl von 100 % lebenden Zellen.

A (■) LeY-DIG bispec + DIG-Mitomycin (■) CD33-DIG bispec + DIG-Mitomycin **B** (▨) LeY-DIG bispec + Doxo-Nanopartikel (▩) CD33-DIG bispec + Doxo-Nanopartikel (■) LeY-DIG bispec + DIG-Doxo-Nanopartikel (■) CD33-DIG bispec + DIG-Doxo-Nanopartikel

3.1.2 Proteintoxine als Payloads

Als höhermolekulare Proteintoxine wurden das aus dem Seifenkraut stammende Pflanzentoxin Saporin und das aus *Pseudomonas* Bakterien stammende Toxin PE38 untersucht.

3.1.2.1 Massenspektrometrische Analytik

Für DIG-Saporin und DIG-PE38 wurde die Bestimmung des Digoxigenylierungsgrades, also wieviel DIG-Reste pro Toxin-Molekül gebunden sind, mit Massenspektrometrie durchgeführt. Als alternatives Hapten wurde außerdem Theophyllin im Rahmen dieser Doktorarbeit getestet, weshalb für weiterführende Anwendungen mit bispezifischen Theophyllin bindenden Antikörpern auch Theo-Saporin hergestellt (2.2.5) und in der Massenspektrometrie getestet wurde. Für DIG-Saporin waren unterschiedliche Haptenylierungszustände zwischen 0 und 6 DIG pro Toxinmolekül erkennbar (Abb. 3.1-8-A). Auch für Theophyllin waren unterschiedliche Haptenylierungszustände zwischen 0 und 5 Theo pro Toxinmolekül nachweisbar (Abb. 3.1-8-B). Sowohl bei DIG-Saporin als auch bei Theo-Saporin waren die dominanten Spezies 2-fach und 3-fach haptenyliertes Toxin. Die Massenspektren sahen sehr heterogen aus, da das verwendete Saporin eine Mischung mehrerer Isotypen und Glycosylierungszustände war. Eine Deglykosilierung wurde versucht, blieb aber erfolglos. Für die Auswertung wurde der jeweils intensivste Peak als Referenz herangezogen, auf dessen Basis der relative Gehalt an unterschiedlichen Haptenylierungszuständen berechnet wurde. Unter der Annahme, dass alle enthaltenen Spezies keine Sequenzunterschiede an den für die Haptenylierungsreaktion wichtigen Stellen aufweisen (Lysine), kann davon ausgegangen werden, dass alle Isoformen ähnliche Haptenylierungszustände zeigen. Ebenso wie Saporin zeigte PE38 unterschiedliche Digoxigenylierungszustände zwischen 0 und 4 DIG pro Toxinmolekül. Die dominante Spezies war hier mit nahezu 50 % PE38 + 2 DIG (Abb. 3.1-8-C). PE38 wurde rekombinant in *E.coli* produziert, was dazu führt, dass es nicht glykosiliert ist und somit Probleme mit der Deglykosilierung und ein entsprechendes heterogenes Spektrum hier nicht auftraten.

Ergebnisse

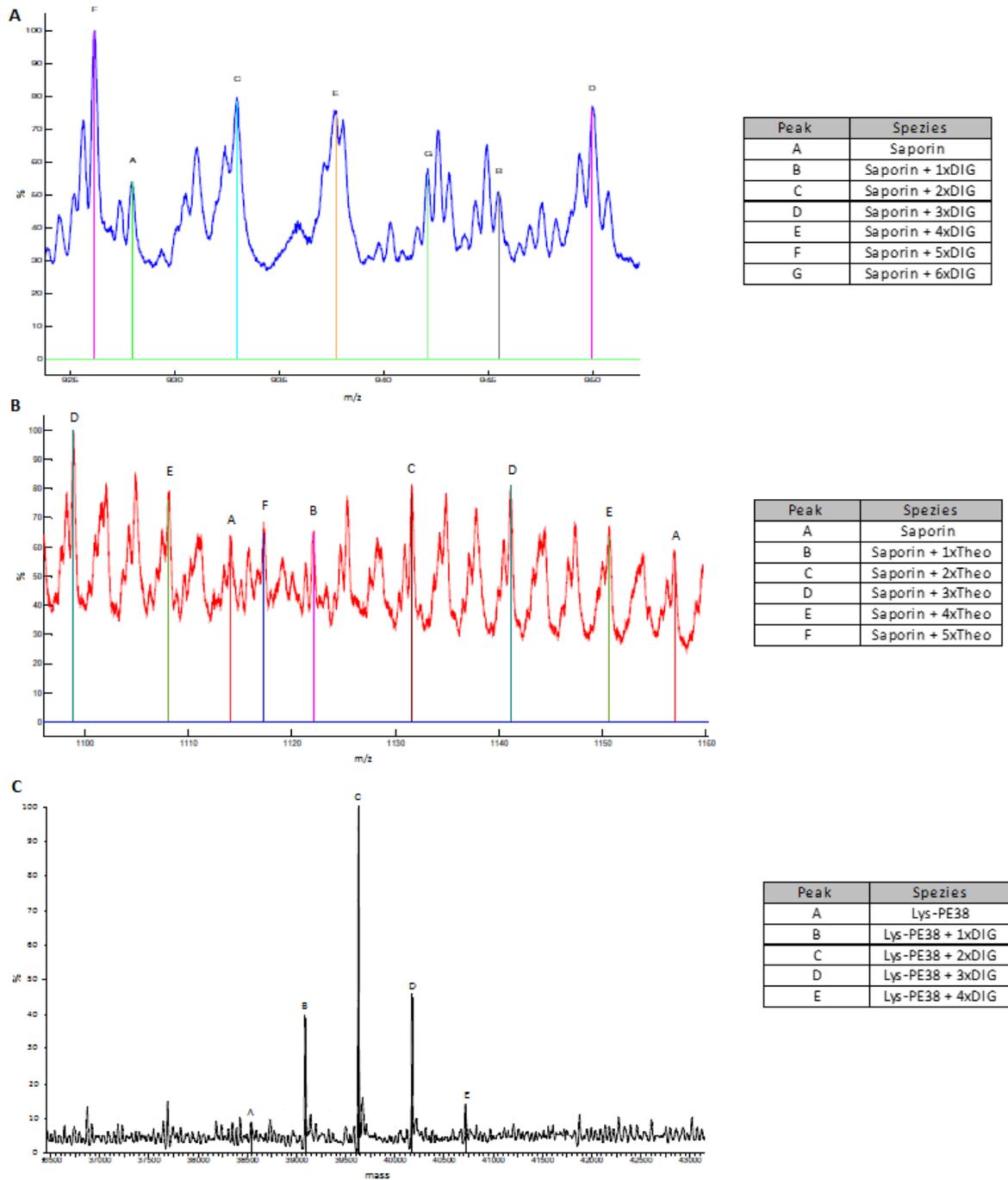


Abb. 3.1-8: Massenspektrometrische Analyse der Haptenylierung von Saporin und PE38

Die Toxine wurden mit DIG-NHS oder Theo-NHS wie unter 2.2.5 beschrieben haptenyliert. Mit MS sollte analysiert werden, wieviel DIG bzw. Theo pro Toxin-Molekül gebunden wurde. **A** zeigt die Verteilung des konjugierten DIG-Saporin; auf der x-Achse ist das m/z-Verhältnis aufgetragen und auf der y-Achse die rel. Signalintensität. **B** zeigt die Verteilung des konjugierten Theo-Saporin; auf der x-Achse ist das m/z-Verhältnis aufgetragen und auf der y-Achse die rel. Signalintensität. **C** zeigt die Verteilung des konjugierten DIG-PE38; auf der x-Achse ist die Masse aufgetragen und auf der y-Achse die rel. Signalintensität.

3.1.2.2 Aktivität vor und nach Haptenylierung

Die Proteintoxine wurden innerhalb der Roche Diagnostics GmbH haptenyliert. Um zu testen, ob die Payload durch die Haptenylierung ganz oder teilweise an Wirksamkeit verliert, wurde die Zytotoxizität der DIG-Payload mit der Zytotoxizität der Ausgangssubstanz anhand des CellTiter-Glo®-Zellviabilitätsassays verglichen (2.2.3.6). Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen von Toxin und DIG-Toxin 48 h (PE38) oder 72 h (Saporin) inkubiert. Anschließend wurde CellTiter-Glo®-Reagenz dazugegeben und das Lumineszenz-Signal an einem Mikrotiterplatten-Reader ausgelesen. Saporin wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.01 bis 1 μM aufgebracht. DIG-Saporin zeigt nach 72 h Inkubation auf MCF-7 Zellen eine etwa 20 – 50 % geringere Zytotoxizität als das unmodifizierte Saporin (Abb. 3.1-9-A). PE38 wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 0.003 nM aufgebracht. Bei dem digoxigenylierten *Pseudomonas* Exotoxin PE38 zeigte sich nach 48 h Inkubation auf MCF-7 Zellen keine verminderte zytotoxische Wirksamkeit im Vergleich zum unmodifizierten PE38 (Abb. 3.1-9-B).

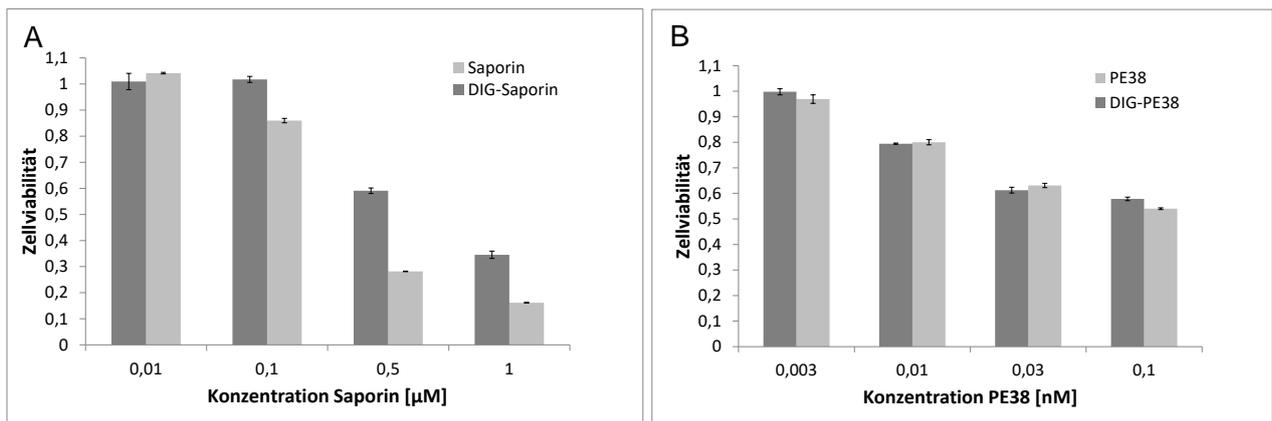


Abb. 3.1-9: Zytotoxizität proteintoxischer Payloads vor und nach Haptenylierung

Die toxischen Payloads wurden mehrfach mit Digoxigenin gekoppelt. Im Anschluss daran wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay untersucht, ob die Kopplung einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Die Zytotoxizität wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay ausgelesen. Die Zellviabilität von 1 entspricht einer Anzahl von 100% lebenden Zellen. Diese Zellviabilität wurde gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen.

A (■) Saporin, (■) DIG-Saporin **B** (■) PE38 (■) DIG-PE38

3.1.2.3 Targeting auf MCF-7 Zellen

Das Targeting des Toxins über den bispezifischen Hapten-bindenden und tumorspezifischen Antikörper ist von essentieller Bedeutung, um unerwünschte Nebenwirkungen auf

körpereigene Zellen zu reduzieren und die zielgerichtete Wirkung des Toxins zu gewährleisten. Deshalb wurde untersucht, ob die digoxigenylierten Toxine nach Vorinkubation mit LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern auf MCF-7 Zellen einen Targeting-Effekt zeigten. Für diesen Versuch wurde das LeY-DIG-bispezifische Antikörper-Format (Metz *et al.*, 2011) mit DIG-Toxin im molaren Verhältnis von 1:2 verwendet. Als Isotypkontrolle wurde der CD33-DIG-bispezifische Antikörper, der nicht an MCF-7 Zellen bindet, im gleichen Format verwendet. Die DIG-Toxine wurden mit den Antikörpern 24 h bei 4 °C vorinkubiert und auf die Zellen aufgebracht. Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen der DIG-Toxin-Antikörper-Komplexe 48 h (PE38) oder 72 h (Saporin) inkubiert. Um unspezifische Zytotoxizität zu vermeiden, wurden das mit den bispezifischen Antikörpern vorinkubierte DIG-PE38 nach 0.5 h Inkubation auf MCF-7 Zellen durch Waschen mit Medium entfernt. Die Zellen mit bispezifischen Antikörpern und DIG-Saporin wurden nicht gewaschen. Anschließend wurde die Zellviabilität bestimmt. DIG-Saporin hatte mit dem bispezifischen LeY-DIG-Antikörper einen bis zu mehr als doppelt so hohen zytotoxischen Effekt im Vergleich zu Isotypkontrolle (Abb. 3.1-10-A). DIG-PE38 weist ebenfalls einen deutlichen konzentrationsabhängigen Targeting-Effekt auf MCF-7 Zellen auf (Abb. 3.1-10-B).

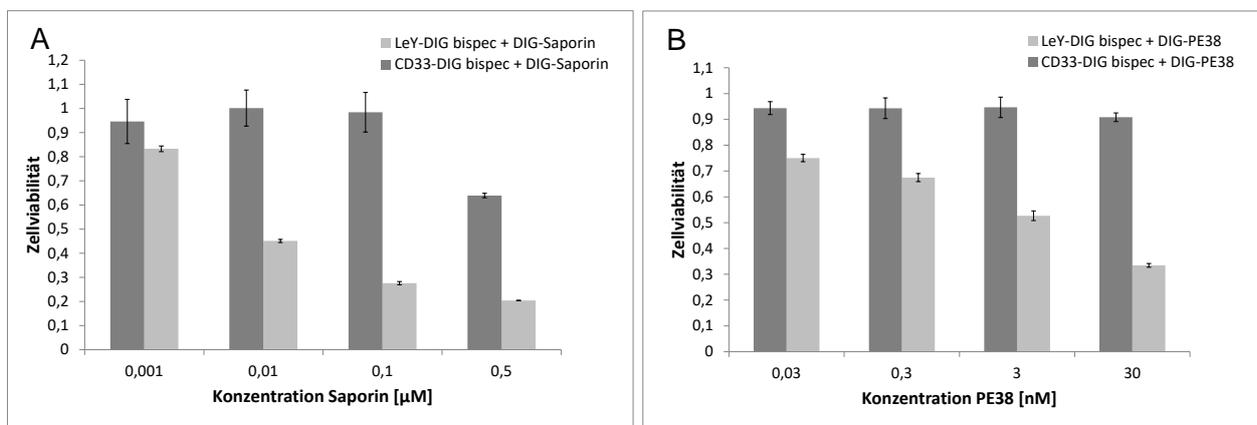


Abb. 3.1-10: Targeting digoxigenylierter toxischer Payloads mit bispezifischen LeY- und CD33-Antikörpern auf MCF-7 Zellen Digoxigenylierte Toxine wurden mit bispezifischen LeY- oder CD33-bindenden Antikörpern im Verhältnis 2:1 (DIG-Toxin:Ak) 24 h inkubiert und dann auf die LeY-positiven MCF-7 Zellen aufgebracht. Die Zytotoxizität wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay ausgelesen. Eine Zellviabilität von 1 entspricht einer Anzahl von 100 % lebenden Zellen.

A (■) LeY-DIG bispec + DIG-Saporin (■) CD33-DIG bispec + DIG-Saporin **B** (■) LeY-DIG bispec + DIG-PE38 (■) CD33-DIG bispec + DIG-PE38

3.1.3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden als potentielle Payloads toxische Substanzen ausgewählt, die hauptsächlich über bekannte oder etablierte Kopplungsmechanismen, wie die O-Succinimid- oder Maleimid-Chemie mit dem Hapten Digoxigenin gekoppelt werden konnten. In der Substanzklasse der antibiotischen Tumortherapeutika wurden die Interkalantien Mitomycin C und Doxorubicin, welches an Nanopartikel konjugiert wurde, getestet. Daneben wurden außerdem das Typ-I-RIP Saporin und der EF-2 Hemmer PE38 untersucht. Durch das Hapten und durch die Kopplungsreaktion selbst werden die Toxine modifiziert. In einem ersten Zellviabilitätassay auf MCF-7 Zellen, in dem die haptenylierten Toxine ohne bispezifische Antikörper aufgetragen wurden, wurde deshalb deren Wirksamkeit vor und nach Haptenylierung verglichen. Toxine, welche nach Haptenylierung keinen oder nur einen geringen Verlust Ihrer Toxizität aufwiesen, waren grundsätzlich als Payload für tumorspezifische Antikörper geeignet. In einem zweiten Zellviabilitätsassay wurde danach untersucht, ob ein Targeting-Effekt der DIG-Toxine mit LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern auf MCF-7-Zellen beobachtet werden kann.

Die Doxo- bzw. DIG-Doxo-NPs enthielten einen säurelabilen Hydrazonlinker, der als Strategie diente zum einen die Beladung der NPs mit Doxorubicin und zum anderen die Freisetzung des Doxorubicin in den Zellen zu kontrollieren (Calderón *et al.*, 2011)(Calderón *at al.*, 2009). In der Analytik mittels SEC, zellbasiertem ELISA und Durchflusszytometrie zeigten die DIG-Doxorubicin-NPs sowohl eine erfolgreiche spezifische und stabile Bindung der LeY-DIG-bispezifischen Antikörper als auch eine targetspezifische Bindung der Antikörper-Nanopartikel-Komplexe auf MCF-7-Zellen. In einem ersten Zellviabilitätsassay lag die Zytotoxizität der Doxo- und DIG-Doxo-NPs nur wenig unter der des freien Doxorubicin in äquimolarer Dosis. Im Komplex mit LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern war auf MCF-7-Zellen allerdings nur ein schwacher Targeting-Effekt erkennbar. In der Konfokalmikroskopie war sowohl für Doxo-NPs als auch für DIG-Doxo-NPs, unabhängig davon ob sie alleine oder in Kombination mit bispezifischen Antikörpern mit MCF-7 Zellen inkubiert wurden, ein deutliches, mit dem Zellkern assoziiertes Fluoreszenzsignal sichtbar. Verglichen mit der Intensität des freien Doxorubicin, war die Intensität des Doxorubicin bei beiden NPs etwas niedriger.

DIG-Mitomycin zeigte nach Inkubation auf MCF-7 Zellen einen Zytotoxizitätsverlust von etwa 10 – 30 % im Vergleich zum nicht digoxigenylierten Mitomycin C. Mit LeY-DIG-bispezifischem Antikörper war für DIG-Mitomycin keine Targeting-Effekt auf MCF-7 Zellen erkennbar.

Mittels Massenspektrometrie wurde festgestellt, dass DIG-Saporin, Theo-Saporin und DIG-PE38 bis 6 Haptene pro Toxinmolekül enthielten. Bei DIG-Saporin ist in dem ersten Zellviabilitätstest eine etwas geringere Wirksamkeit als bei dem nicht haptenylierten Toxin, bei DIG-PE38 eine vergleichbare Wirksamkeit zu erkennen. Auf Basis der Zellviabilitätsdaten mit

den zielgerichteten Antikörper-Payload-Komplexen wurde die Auswahl der Toxine getroffen, die für die weitere Entwicklung der bispezifischen Hapten-bindenden Antikörperderivate verwendet werden sollten.

DIG-Mitomycin zeigte mit LeY-DIG-bispezifischen Antikörpern auf MCF-7 Zellen keinen Targeting-Effekt und war somit für die weitere Entwicklung nicht geeignet. Für die DIG-Doxorubicin-Nanopartikel zeigte sich zwar ein schwacher Targeting-Effekt, aber auch die nicht digoxigenylierten Doxorubicin-Nanopartikel zeigten eine dosisabhängige erhöhte Zytotoxizität mit beiden bispezifischen Antikörpern, weshalb auch diese nicht für die Entwicklung weiterer Antikörper-Formate herangezogen wurden. DIG-Saporin und DIG-PE38 zeigten einen deutlichen Targeting-Effekt und wurden deshalb für die weitere Testung der zielgerichteten Antikörper-Payload-Komplexe ausgewählt. Als alternatives Hapten wurde Theophyllin eingesetzt, welches dementsprechend in dieser Arbeit mit zumindest einem dieser Toxine gekoppelt werden sollte. Deshalb wurde auch Theo-Saporin getestet.

3.2 Bispezifische Digoxigenin bindende Antikörperderivate

Ein Ziel dieser Arbeit war es Antikörpermoleküle zu entwickeln, die es ermöglichen eine definierte Anzahl > 2 Payloads pro Antikörper zu binden und zur Zielzelle zu transportieren. Basierend auf dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper wurden folgende bispezifischen Formate mit 3 Haptenbindungsstellen und 2 Antigen-Bindungsstellen entwickelt (Abb. 3.2-1). Die Antikörper besaßen sowohl eine Spezifität für das Antigen LeY oder CD33 als auch für das Hapten Digoxigenin.

DIG-trivalenter LeY/CD33 Triple-Fab

DIG-trivalenter LeY/CD33 *Knob-into-Hole-Variable-Domain* (KIH-VD) Antikörper

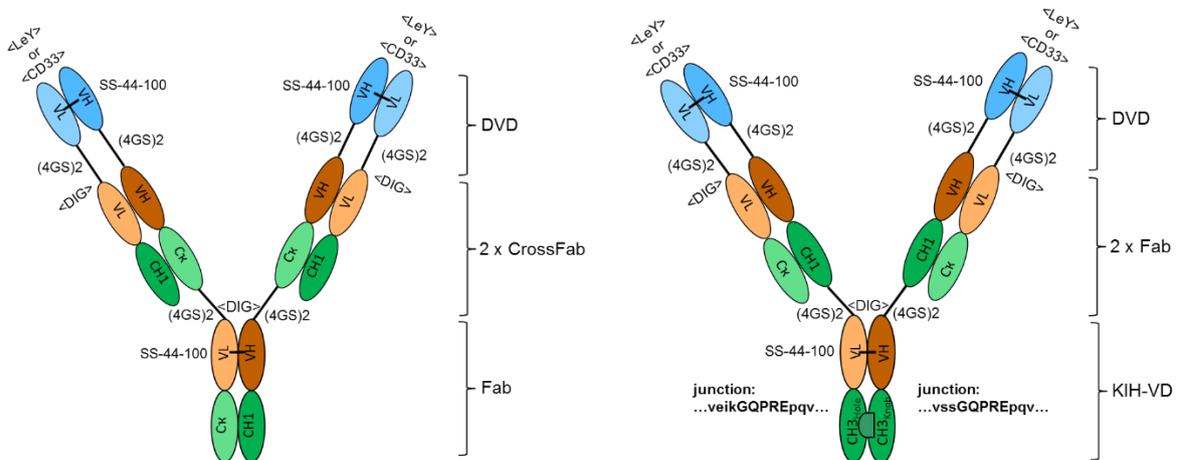


Abb. 3.2-1: Schema der hergestellten bispezifischen DIG-trivalenten Antikörperkonstrukte

3.2.1 Expression und Reinigung des DIG-trivalenten Triple-Fab

Basierend auf dem bivalenten LeY/CD33-DIG bispezifischen Antikörper (Metz *et al.*, 2011), wurde ein trivalentes Antikörperderivat hergestellt, welches drei statt zwei DIG-Payloads binden sollte. Allerdings wurde die zweite Spezifität nicht über einen disulfidstabilisierten scFv (dsscFv) am C-Terminus, sondern über eine zweite variable Domäne (VD) am N-Terminus angefügt. Dieses Prinzip der *Dual-Variable-Domain* (DVD)(C. Wu *et al.*, 2007) wurde bereits erfolgreich für die Herstellung tetravalenter bispezifischer Antikörper-Formate angewendet. Besonders die Bindung der Spezifität, an welche N-terminal die zweite Spezifität angehängt wurde, ist vom Abstand bzw. der Linker-Länge abhängig (Metz *et al.*, 2012). Vorarbeiten ehemaliger Kollegen (Daten nicht abgebildet) und Ergebnisse vorheriger Studien (C. Wu *et al.*, 2007) zeigten, dass ein 8 Aminosäuren langer Linker für Antikörper im DVD-Format ausreichend sein sollte, um die Bindung beider Spezifitäten zu gewährleisten. Deshalb wurde in dieser Arbeit für das Design der neuen Antikörper-Formate ein $(G_4S)_2$ -Linker, also ein Linker bestehend aus 2 mal 4 Glycin plus 1 Serin, zwischen den variablen Domänen der zwei unterschiedlichen Spezifitäten verwendet. Das erste in dieser Doktorarbeit entwickelte DIG-trivalente bispezifische Antikörper-Format ist ein Antikörper, der aus zwei DIG-bindenden Fabs entsteht, an den C-terminal ein weitere DIG-bindender Fab über einen $(G_4S)_2$ -Linker fusioniert wurde. Da dieser Antikörper somit keine Hinge-Region enthält, wurde zur Stabilisierung am zentralen anti-DIG-Fab eine VH44-VL100 Disulfidbrücke eingeführt (Jung *et al.*, 1994)(Reiter *et al.*, 1996). Die Antigenbindung wird durch die DVD am N-Terminus der beiden DIG-Fabs realisiert. Die VH-Sequenz von anti-LeY oder anti-CD33 wurde über einen $(G_4S)_2$ -Linker N-terminal an die VH-Sequenz von anti-DIG fusioniert. Ebenso wurde die VL-Sequenz von anti-LeY oder anti-CD33 über einen $(G_4S)_2$ -Linker N-terminal an die VL-Sequenz von anti-DIG fusioniert. Auch hier wurde eine Stabilisierung der VH- und VL-Domäne von anti-LeY oder anti-CD33 durch eine VH44-VL100 Disulfidbrücke realisiert. Darin liegt auch der Grund, warum die Spezifitäten nicht andersherum angeordnet wurden. Bei LeY und CD33 war bekannt, dass eine VH44-VL100 Disulfidbrücke keine Probleme in der Antigenbindung verursacht. Dies gilt für DIG zwar genauso, da aber in Vorversuchen mit anderen Antigenen bzw. Haptenen Probleme bei der Expression oder Antigen- bzw. Haptenbindung auftraten, wurde das beschriebene Design gewählt, um das Format auf Theophyllin übertragen zu können. Die Anordnung der Antigenbindung in der DVD sollte außerdem gewährleisten, dass es nicht zu sterischen Problemen bei der Antigenbindung kommt. Um eine korrekte Heterodimerisierung der leichten und schweren Ketten zu gewährleisten, wurde die oberen beiden Fabs des Antikörpers nach der *CrossMab*-Strategie entwickelt (Schaefer *et al.*, 2011). Dafür wurden die CH1 und die C κ -Domäne getauscht. Die dreifache DIG-Bindung wurde also durch 2 DIG-bindende *CrossFabs* und 1 weiteren c-terminal fusionierten DIG-bindenden Fab realisiert. Der Antikörper wurde in HEK293-F Zellen transient exprimiert. Der Überstand wurde

nach 7 Tagen von den Zellen getrennt und mittels Western-Blot auf erfolgreiche Expression der Antikörper-Formate untersucht. Die schweren Ketten haben ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 65 kDa und die leichten Ketten haben ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 35 kDa. Zur Detektion wurde ein AP-konjugierter anti-human-kappa-light-chain Antikörper eingesetzt. Sowohl bei dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper JA0011 als auch bei dem CD33-DIG-bispezifischen Antikörper JA0024 sind 2 Banden in Höhe der theoretisch erwarteten Molekulargewichte erkennbar (Abb. 3.2-2). Außerdem sind zwei Banden in Höhe von etwa 35 kDa erkennbar. Die LCs enthalten allerdings keine C κ -Domäne, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass möglicherweise auch Bruchstücke der HC im Überstand enthalten sind, die mit dem anti-human-kappa-light-chain Antikörper detektiert werden können.

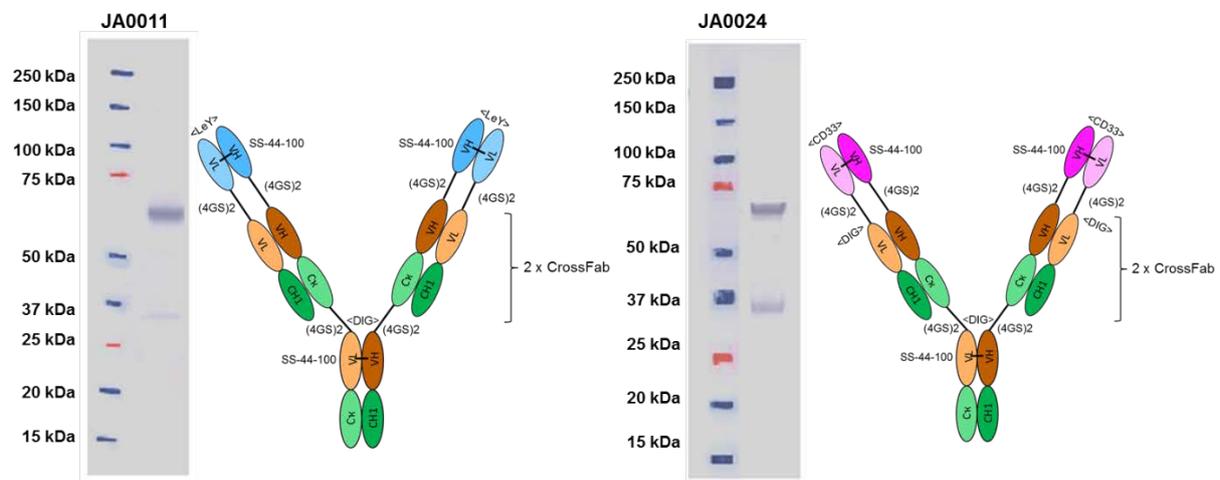


Abb. 3.2-2: Western Blot der Kulturüberstände und schematische Darstellung von JA0011 und JA0024

Um zu testen, ob die Antikörperketten exprimiert wurden und die erwartete Größe aufwiesen, wurde ein Western Blot der Kulturüberstände nach Antikörper-Expression und Zellernte durchgeführt. Die Detektion erfolgte über einen AP-konjugierten Sekundärantikörper, der gegen die humane LC gerichtet war. Der Größenstandard wurde für die Darstellung mit Farbstift nachgezeichnet, da dieser nach Trocknung der Membran sonst kaum mehr sichtbar gewesen wäre.

Anschließend wurde der Überstand über Kappa-Select-Affinitätschromatographie und präparative Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Aus 1 L des JA0011 Überstandes konnte 3.4 mg Antikörper gereinigt werden. Aus 1 L des JA0024 Überstandes konnte 4.2 mg Antikörper gereinigt werden.

3.2.2 Charakterisierung des DIG-trivalenten Triple-Fab

3.2.2.1 Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page

Die gereinigten Antikörper wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie analysiert. Für JA0011 wurde 10 µg gereinigtes Protein auf eine Dionex MabPac SEC-1 Säule und von JA0024 100 µg gereinigtes Protein auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Bei der MabPac SEC-1 Säule wurde eine Flussrate von 0.2 mL/min und bei der TSK3000 SWXL Säule eine Flussrate von 0.5 mL/min benutzt.

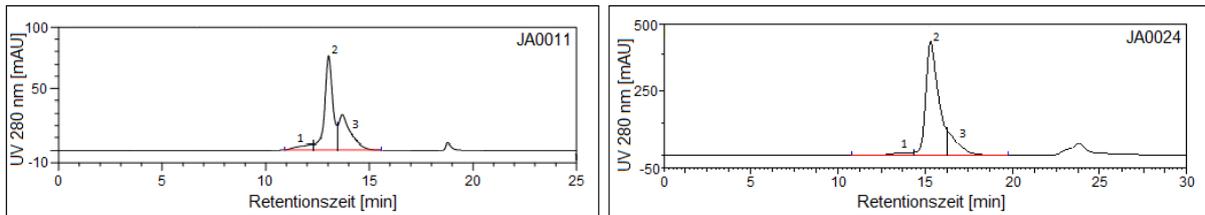


Abb. 3.2-3: Analytische Gelpermeationschromatographie der DIG-trivalenten LeY/CD33 Triple-Fabs

Die Überstände der Proben JA0011 und JA0024 wurden mittels Kappa-Select-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie gereinigt, in 20 mM His/ 140 mM NaCl pH 6.0 umgepuffert und konzentriert. Anschließend wurden die Endprodukte mittels analytischer Gelpermeationschromatographie analysiert. Dafür wurden von JA0011 10 µg gereinigtes Protein auf eine Dionex MabPac SEC-1 Säule und von JA0024 100 µg gereinigtes Protein auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert. Eine Übersicht der Fraktionen ist in Tabelle 3.2.1 dargestellt.

Peak-Nr.	Fraktion	JA0011 [area %]	JA0024 [area%]
1	HMW	5,8	3,2
2	Monomer	60,3	81,2
3	LMW	33,9	15,6

Tabelle 3.2.1: Fraktionen der analytischen SEC von JA0011 und JA0024

Die SEC wurde wie in Abb. 3.2-3 beschrieben durchgeführt. Für die Auswertung der Chromatogramme wurde eine Kalibrierkurve aus dem Ergebnis des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad erstellt, anhand derer die Fraktionen der Proben identifiziert wurden. Peak 1 (HMW) ist die Fraktion, welche Oligomere oder Aggregate des Antikörpers enthält. Peak 2 ist die Hauptfraktion, welche das Monomer des Antikörpers enthält und die letzte Fraktion unter Peak 3 (LMW) enthält Antikörperbruchstücke bzw. Antikörper, welchem LC und/oder HC fehlt.

Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert. Es zeigte sich, dass der Hauptpeak dem gewünschten Antikörper mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa entspricht. Daneben finden sich allerdings auch höhermolekulare Spezies (HMW), wie Antikörper Di- oder Oligomere, und niedrigmolekulare Spezies (LMW), wie beispielsweise Antikörper, denen eine LC, eine HC o.ä. fehlt. Bei JA0011 ist neben einem relativen Antikörper-

Monomeranteil von 60.3 %, ein HMW-Anteil von 5.8 % und LMW-Anteil von 33.9 % detektierbar. Bei JA0024 ist der relative Antikörper-Monomeranteil mit 81.2 % etwa 20 % höher als bei JA0011. Demenstprechend geringer sind die übrigen Spezies enthalten – ein HMW-Anteil von 3.2 % und LMW-Anteil von 15.6 %. Zusätzlich zur analytischen SEC wurde noch eine SDS-Page gemacht. Dafür wurde je 8 µg gereinigtes Protein, welches für die denaturierende reduzierte und nicht reduzierte SDS-Page vorbereitet wurde, auf ein NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt.

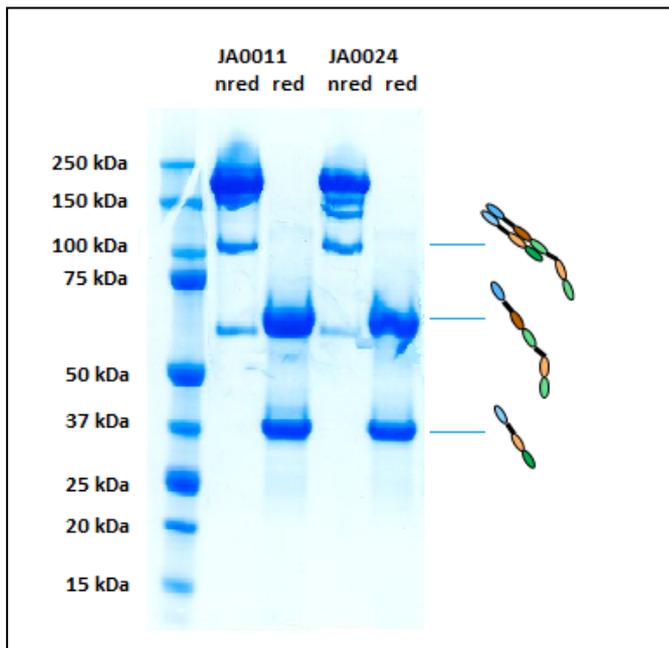


Abb. 3.2-4: SDS-Page der DIG-trivalenten LeY/CD33 Triple-Fabs

Die über Kappa-Select-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie gereinigten, umgepufferten und konzentrierten Produkte der Antikörper-Formate JA0011 und JA0024 wurden mittels SDS-Page in reduziertem und nicht reduziertem Zustand analysiert. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Neben den Proben wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad) als Größenstandard mitgeführt.

Bei beiden Antikörpern ist im nicht reduzierten Zustand eine Hauptbande bei etwa 200 kDa erkennbar. Daneben ist bei beiden eine deutliche Bande um 100 kDa erkennbar, was etwa dem Molekulargewicht des halben Antikörpers entspricht. Darüber hinaus ist sowohl bei JA0011, wobei bei diesem Konstrukt etwas ausgeprägter, als auch bei JA0024 eine Bande in Höhe einer freien schweren Kette erkennbar. Bei JA0024 sind außerdem zwei Zusatzbanden zwischen etwa 160 und 130 kDa erkennbar, was möglicherweise einem Antikörper ohne eine oder zwei LC entsprechen könnte. Eine Identifikation der Banden bei JA0011 ist leider nicht eindeutig möglich, da die Hauptbande im Gel sehr breit war. Im reduzierten Zustand sind bei

beiden Antikörpern ausschließlich die Banden in Höhe der leichten und schweren Ketten erkennbar.

3.2.2.2 Massenspektrometrie

Um die Integrität der Molekularmasse der einzelnen leichten und schweren Ketten sowie der Gesamtmasse der Antikörper nachzuweisen, wurden die Antikörper mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Für die Bestimmung der molekularen Massen von leichter und schwerer Kette wurden die Antikörper standardmäßig mit TCEP reduziert. Am Ende der Probenvorbereitung wurden die Proben entsalzt und mittels ESI-qTOF-MS untersucht.

		Theoretisches Mw [Da]	Experimentelles Mw [Da]
JA0011	Gesamt	197821	197827
	LC	35253	35250
	HC-1	64119	64115
	HC-2	63241	63237
JA0024	Gesamt	196622	196628
	LC	35025	35024
	HC-1	63747	nicht detektierbar
	HC-2	62869	62867

Tabelle 3.2.2: Massenspektrometrische Ergebnisse der Antikörperkonstrukte JA0011 und JA0024

Die aufgereinigten Proben der Antikörper-Formate JA0011 und JA0024 wurden mittels ESI-MS analysiert und ausgewertet. Für die Bestimmung der molekularen Massen von leichter und schwerer Kette wurden die Proben mit TCEP reduziert. In der Tabelle ist auf der linken Seite das aus der Aminosäuren Abfolge berechnete theoretische Molekulargewicht aufgeführt. Auf der rechten Seite ist das mittels MS experimentell ermittelte Molekulargewicht dargestellt.

Sowohl bei JA0011 als auch bei JA0024 konnten sowohl die Molekulargewichte der einzelnen leichten und schweren Ketten als auch die Gesamtmassen der Antikörper experimentell bestätigt werden. Nur bei JA0024 konnte eine HC (HC-1) nicht detektiert werden. Allerdings war der Gesamtantikörper mit korrekter Masse nachweisbar, weshalb davon auszugehen ist, dass die HC-1 unter den angewandten Bedingungen schlecht ionisierbar war und deshalb im reduzierten Zustand nicht nachgewiesen werden konnte. Bei beiden Antikörpern wurden deutliche Mengen an halbem Antikörper oder nicht richtig verbrücktem Material, z.B. 2xHC-2 + 1xLC, festgestellt. Außerdem wurden bei JA0024 noch zwei unbekannte Massen von 133141 Da und 160989 Da detektiert.

3.2.3 Expression und Reinigung des DIG-trivalenten KIH-VD Antikörperkonstrukts

Ausgehend von dem DIG-trivalenten Ley/CD33 Triple-Fab wurde ein weiteres DIG-trivalentes Konstrukt entwickelt, da der Triple-Fab mit etwa 60 % (LeY) bzw. 80 % (CD33) einen relativ geringen Monomeranteil aufwies. Die Massenanalytik zeigte, dass ein deutlicher Anteil von nicht korrekt verbrücktem Material in der gereinigten Probe der Triple-Fabs enthalten war. Deshalb wurde für das folgende Konstrukt die *Knob-into-Hole*-Strategie verwendet, welche bereits seit mehreren Jahren erfolgreich angewendet wird, um die inkorrekte Paarung, das sogenannte *Mispairing*, von Antikörperketten zu vermeiden (Ridgway *et al.*, 1996)(Merchant *et al.*, 1998). In diesem Format (Abb. 3.2-1) ist das zentrale Fab des Triple-Fab durch eine variable DIG-bindende Domäne, an welche direkt die CH3-Domäne mit *Knob-into-Hole*-Sequenz fusioniert wurde, ersetzt. Bei diesem *Knob-into-Hole-Variable-Domain* Antikörper (KIH-VD) wurde deshalb im oberen Teil auf den *CrossMab* des Antikörpers verzichtet. Die korrekte Heterodimerisierung sollte durch die *Knob-into-Hole*-Mutation gewährleistet werden. Dieses Format besteht also aus zwei DIG-bindenden Fabs, an die C-terminal eine weitere DIG-bindende variable Domäne über einen (G₄S)₂-Linker fusioniert wurde. Da dieser Antikörper keine Hinge-Region enthält, wurde ebenso wie beim Triple-Fab zur Stabilisierung an der zentralen variablen anti-DIG Domäne eine VH44-VL100 Disulfidbrücke eingeführt (Jung *et al.*, 1994)(Reiter *et al.*, 1996). Die Antigenbindung wird durch die *Dual-Variable-Domain* am N-Terminus der beiden DIG-Fabs realisiert. Die VH-Sequenz von anti-LeY oder anti-CD33 wurde über einen (G₄S)₂-Linker N-terminal an die VH-Sequenz von anti-DIG fusioniert. Ebenso wurde die VL-Sequenz von anti-LeY oder anti-CD33 über einen (G₄S)₂-Linker N-terminal an die VL-Sequenz von anti-DIG fusioniert. Auch hier wurde eine Stabilisierung der VH- und VL-Domäne von anti-LeY oder anti-CD33 durch eine VH44-VL100 Disulfidbrücke realisiert. Die „*Knob*“-Mutation (T366W) wurde in die CH3-Domäne der einen HC eingefügt und drei „*Hole*“-Mutationen (T366S, L368A, und Y407V) wurden in die CH3-Domäne der anderen HC eingefügt (Atwell *et al.*, 1997). Außerdem wurde mit der S354C Mutation auf der „*Knob*“-Seite und der Y349C Mutation auf der „*Hole*“-Seite eine zusätzliche Disulfidbrücke zur Stabilisierung eingefügt (Carter, 2001). Der Antikörper wurde in HEK293-F Zellen transient exprimiert. Der Überstand wurde nach 7 Tagen von den Zellen getrennt und mittels Western-Blot auf erfolgreiche Expression der Antikörper-Formate untersucht. Zur Detektion wurden ein AP-konjugierter anti-human-Fc Antikörper und ein AP-konjugierter anti-human-kappa-light-chain Antikörper eingesetzt. Die schweren Ketten haben ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 65 kDa und die leichte Kette hat ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 35 kDa.

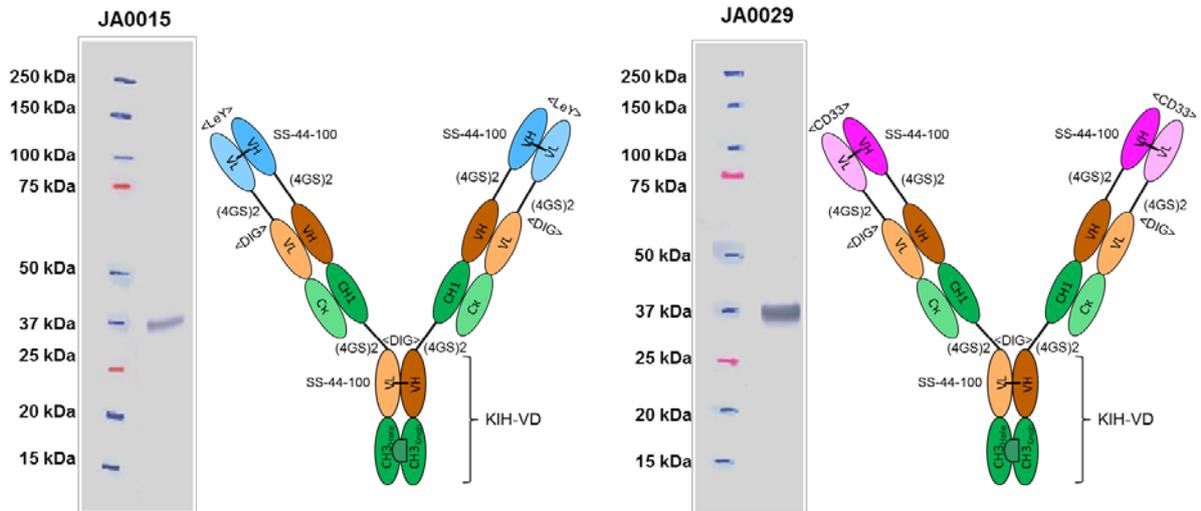


Abb. 3.2-5: Western Blot der Kulturüberstände und schematische Darstellung von JA0015 und JA0029

Um zu testen, ob die Antikörperketten exprimiert wurden und die erwartete Größe aufwiesen, wurde ein Western Blot der Kulturüberstände nach Antikörper-Expression und Zellernte durchgeführt. Die Detektion erfolgte über AP-konjugierte Sekundärantikörper, die gegen den humanen Fc-Teil und die humane kappa-light-chain gerichtet waren. Der Größenstandard wurde für die Darstellung mit Farbstift nachgezeichnet, da dieser nach Trocknung der Membran sonst kaum mehr sichtbar gewesen wäre.

Aus 1 L des JA0015 Überstandes konnte 1.6 mg Antikörper gereinigt werden. Aus 1 L des JA0029 Überstandes konnte 3.8 mg Antikörper gereinigt werden.

3.2.4 Charakterisierung des DIG-trivalenten KIH-VD Antikörperkonstrukts

3.2.4.1 Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page

Die gereinigten Antikörper wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie analysiert. Für JA0015 wurde 10 µg gereinigtes Protein auf eine Dionex MabPac SEC-1 Säule und von JA0029 20 µg gereinigtes Protein auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Bei der MabPac SEC-1 Säule wurde eine Flussrate von 0.2 mL/min und bei der TSK3000 SWXL Säule eine Flussrate von 1.0 mL/min benutzt.

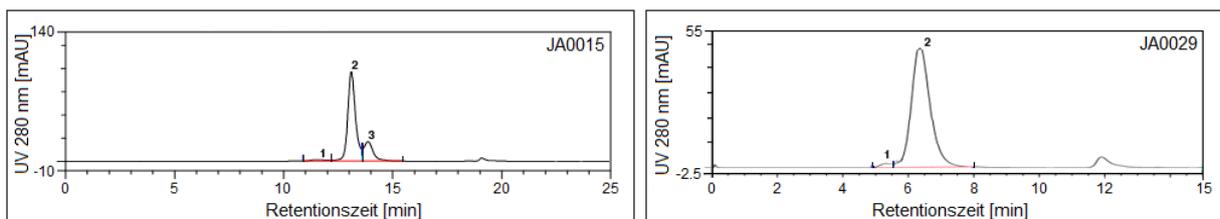


Abb. 3.2-6: Analytische Gelpermeationschromatographie der DIG-trivalenten LeY/CD33 KIH-VD Antikörperkonstrukte

Die Überstände der Proben JA0015 und JA0029 wurden mittels Kappa-Select-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie gereinigt, in 20 mM His/ 140 mM NaCl pH 6.0 umgepuffert und konzentriert. Anschließend wurden die Endprodukte mittels analytischer Gelpermeationschromatographie analysiert. Dafür wurden von JA0015 10 µg gereinigtes Protein auf eine Dionex MabPac SEC-1 Säule und von JA0029 20 µg gereinigtes Protein auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert und aufgeteilt. Eine Übersicht der Fraktionen ist in Tabelle 3.2.3 dargestellt.

Peak-Nr.	Fraktion	JA0015 [area %]	JA0029 [area%]
1	HMW	2,3	2,2
2	Monomer	77,0	97,8
3	LMW	20,7	—

Tabelle 3.2.3: Fraktionen der analytischen SEC von JA0015 und JA0029

Für die Auswertung der Chromatogramme (Abb. 3.2-6) wurde eine Kalibrierkurve aus dem Ergebnis des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad erstellt, anhand derer die Fraktionen der Proben identifiziert wurden. Peak 1 (HMW) ist die Fraktion, welche Oligomere oder Aggregate des Antikörpers enthält. Peak 2 ist die Hauptfraktion, welche das Monomer des Antikörpers enthält und unter Peak 3 (LMW) sind Antikörperbruchstücke bzw. Antikörper, welchem LC und/oder HC fehlt, enthalten.

Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert. Es zeigte sich, dass der Hauptpeak dem gewünschten Antikörper mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa entspricht. Daneben finden sich allerdings auch höhermolekulare Spezies, wie Antikörper Di- oder Oligomere, und niedrigmolekulare Spezies, wie beispielsweise Antikörper, denen eine LC, eine HC o.ä. fehlt. Bei JA0015 ist neben einem relativen Antikörper-Monomeranteil von 77.0 %, ein HMW-Anteil von 2.3 % und LMW-Anteil von 20.7 % detektierbar. Bei JA0029 ist der relative Antikörper-Monomeranteil mit 97.8 % etwa 20 % höher als bei JA0015. Außerdem ist nur ein geringer HMW-Anteil von 2.2 % erkennbar. Neben der analytischen SEC wurde noch eine SDS-Page gemacht. Dafür wurde je 8 µg gereinigtes Protein für die denaturierende reduzierte und nicht reduzierte SDS-Page vorbereitet und auf ein NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt.

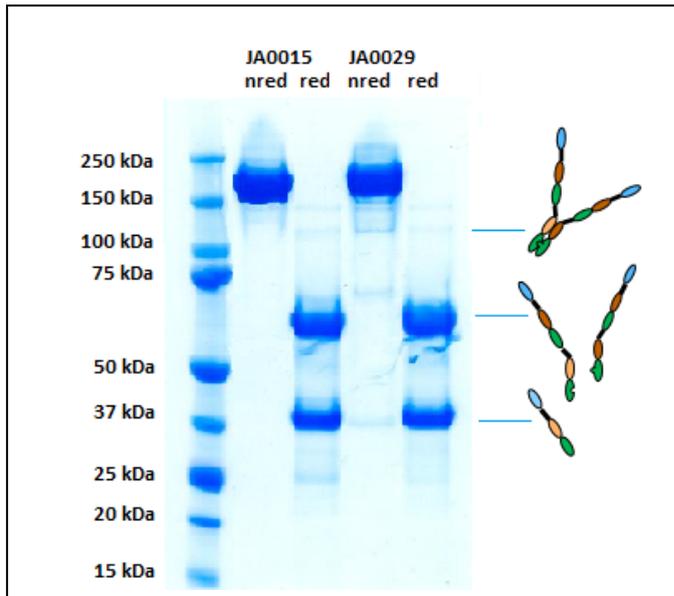


Abb. 3.2-7: SDS-Page der DIG-trivalenten LeY/CD33 KIH-VD Antikörperkonstrukte

Die über Kappa-Select-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie gereinigten, umgepufferten und konzentrierten Produkte der Antikörper-Formate JA0015 und JA0029 wurden mittels SDS-Page im reduzierten und nicht reduzierten Zustand analysiert. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Neben den Proben wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) als Größenstandard mitgeführt.

Bei beiden Antikörpern ist im nicht reduzierten Zustand eine Hauptbande bei etwa 200 kDa erkennbar. Daneben sind bei JA0029 im Wesentlichen drei sehr schwache Banden erkennbar – eine etwa in Höhe von 130 kDa, was einem HC-Dimer entsprechen könnte, eine etwa in Höhe von 70 kDa, was einem LC-Dimer entsprechen könnte, und eine etwa in Höhe von 35 kDa, was wahrscheinlich einer freien LC entspricht. Im reduzierten Zustand sind bei beiden Antikörper Hauptbanden in Höhe der leichten und schweren Ketten erkennbar. Daneben sind auch sehr schwache Banden in Höhe von etwa 150 kDa, 130 kDa und 25 kDa im reduzierten Zustand vorhanden. Die Bande bei 130 kDa könnte, wie im nicht reduzierten Zustand, einem HC-Dimer zugeordnet werden. Bei 150 kDa und 25 kDa handelt es sich vermutlich um Antikörper-Bruchstücke, welche auf fehlerhafte schwere oder leichte Ketten zurückzuführen sind.

3.2.4.2 Massenspektrometrie

Die Molekularmasse der einzelnen leichten und schweren Ketten sowie des Gesamtantikörpers wurde mittels ESI-MS bestimmt. Der Antikörper wurde mit TCEP reduziert, wenn die molekularen Massen von leichter und schwerer Kette bestimmt werden sollten. Die Proben wurden entsalzt und mittels ESI-qTOF-MS untersucht.

		Theoretisches Mw [Da]	Experimentelles Mw [Da]
JA0015	Gesamt	199462	199469
	LC	36424	36422
	HC-1	64503	64503
	HC-2	62155	62153
JA0029	Gesamt	197835	197844
	LC	35982	35981
	HC-1	64132	64130
	HC-2	61783	61782

Tabelle 3.2.4: Massenspektrometrische Ergebnisse der Antikörperkonstrukte JA0015 und JA0029

Die aufgereinigten Proben von JA0015 und JA0029 wurden mittels ESI-MS analysiert und ausgewertet. Für die Bestimmung der molekularen Massen von leichter und schwerer Kette wurden die Proben mit TCEP reduziert. In der Tabelle ist auf der linken Seite das aus der Aminosäuren Abfolge berechnete theoretische Molekulargewicht aufgeführt. Auf der rechten Seite ist das mittels MS experimentell ermittelte Molekulargewicht dargestellt.

Sowohl bei JA0015 als auch bei JA0029 konnten sowohl die Molekulargewichte der einzelnen leichten und schweren Ketten als auch die Gesamtmassen der Antikörper experimentell bestätigt werden. Bei beiden Antikörpern wurden nur sehr geringe Mengen an nicht richtig verbrücktem Material, z.B. nicht sicher zuordenbare Masse von 175151 Da bei JA0015 (< 5%) oder 2xLC bei JA0029 (< 10%), festgestellt.

3.2.5 Funktionalitätsnachweis drei aktiver DIG-Bindestellen

3.2.5.1 Analytische Größenausschlusschromatographie mit DIG-siRNA-Cy5

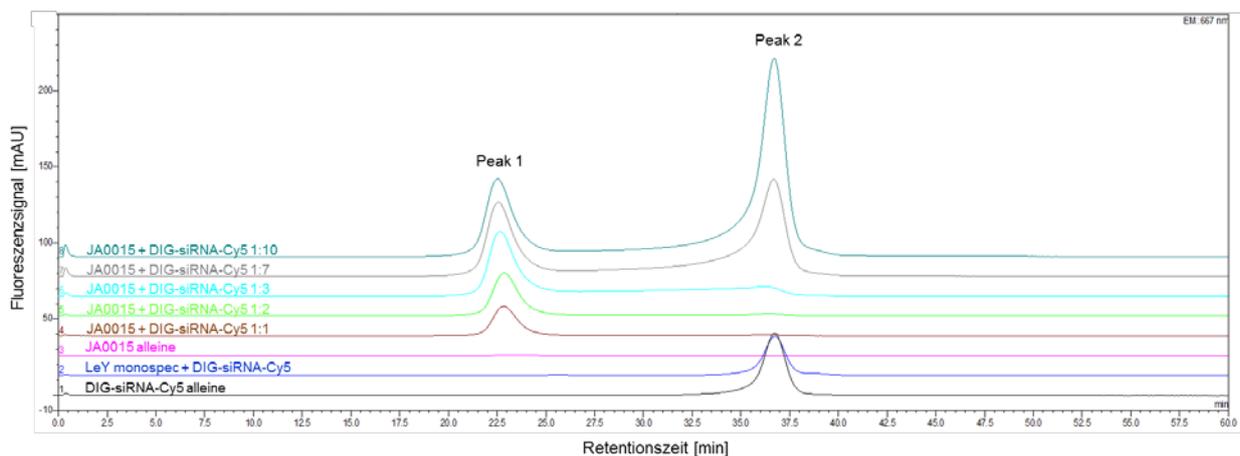
Die beschriebenen bispezifischen DIG-bindenden Antikörperkonstrukte sollten 3 DIG-Payloads pro Antikörpermolekül binden. Zum Nachweis, dass alle drei DIG-Bindestellen aktiv sind, wurde eine Titration des Antikörpers mit DIG-siRNA-Cy5 – einer ca. 15 kDa großen gegen den Abbau durch Endo- und Exonukleasen stabilisierten Duplex-siRNA, welche am 5'-Ende Cy5 und am 3'-Ende DIG gelabelt war – durchgeführt. Es wurde eine 15 kDa Cy5 gelabelte DIG-siRNA und nicht DIG-Cy5 verwendet, um die Bindung größerer Payload-Moleküle zu simulieren, da auch die verwendeten DIG-Toxine zwischen etwa 1 und 40 kDa groß waren. Da sich die trivalenten Konstrukte, also der Triple-Fab oder das KIH-VD Konstrukt in ihrer Konformation bezüglich der DIG-bindenden Domänen räumlich nicht unterscheiden, wurde aus Gründen der Materiallimitation nur das Antikörperkonstrukt JA0015 analysiert.

Der Antikörper JA0015 wurde in unterschiedlichen molekularen Verhältnissen mit DIG-siRNA-Cy5 für etwa 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde diese Ansätze mittels Größenausschlusschromatographie über eine Superdex 200 10/300

analysiert, um nicht komplexierte DIG-siRNA-Cy5 von Antikörper komplexierter DIG-siRNA-Cy5 zu trennen. Die Auftragsmenge entsprach einer Proteinkonzentration von etwa 20 µg. Als Laufmittel diente 1xPBS, pH 7.4. Die Fluoreszenz von Cy5 wurde bei 650 nm angeregt und bei einer Emissionswellenlänge von 667 nm mit einem Fluoreszenzdetektor aufgenommen.

Bei Beladungsverhältnissen bis 3 DIG-siRNA-Cy5 Payloads pro Antikörper konnte ein linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals in Höhe der Antikörper-Fraktion beobachtet werden (Abb. 3.2-8). Bei höheren Beladungsverhältnissen konnte kein weiterer linearer Anstieg des Antikörper-gebundenen Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Als Kontrolle wurde ein monospezifischer LeY-Antikörper, welcher keine DIG-Bindestelle hat, mitgeführt. Die Inkubation dieses monospezifischen Antikörpers mit DIG-siRNA-Cy5 führte zu keiner Komplexierung der DIG-siRNA-Cy5. Dieses Ergebnis belegt, dass drei Valenzen funktionell sind und die gebildeten Komplexe stabil sind.

A



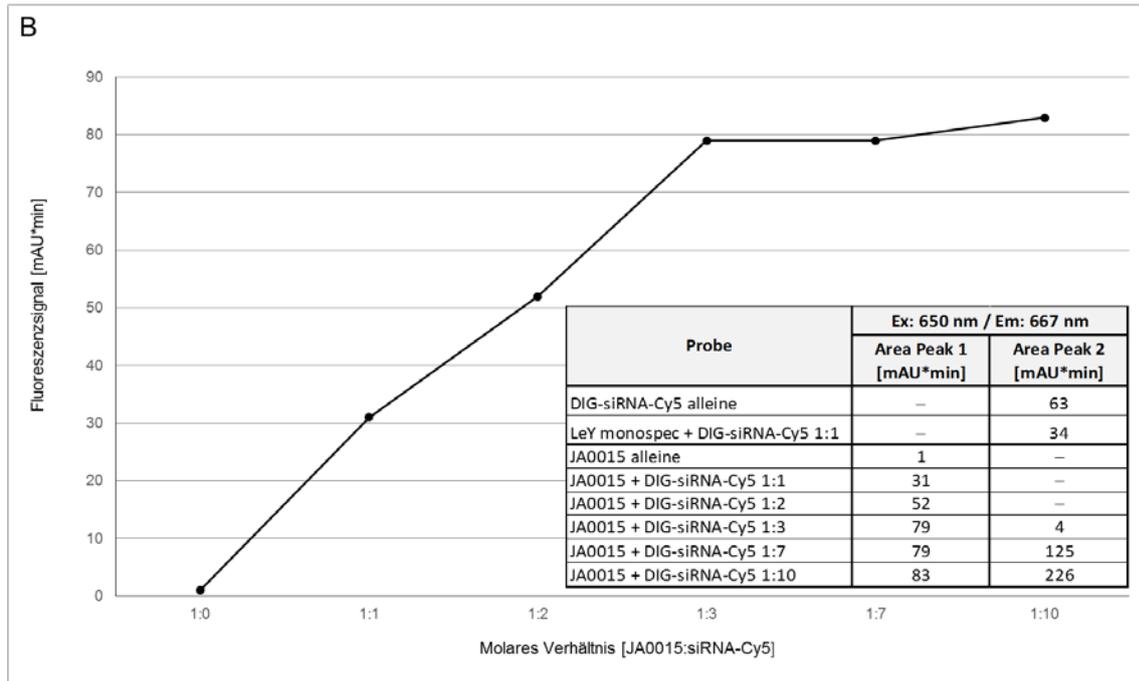


Abb. 3.2-8: SEC-Analytik (mit Fluoreszenzsignal) zum Nachweis intakter DIG-Bindestellen des JA0015

Das entwickelte Antikörperkonstrukt hat 3 DIG-Bindestellen. Um die vollständige Beladung der 3 DIG-Bindestellen mit digoxigenylierter Payload und anschließende Stabilität der Komplexe zu verifizieren, wurde der Triple-Fab in unterschiedlichen Verhältnissen mit DIG-siRNA-Cy5 für 30 min bei RT inkubiert und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. **A** Es wurden etwa 20 µg Antikörper auf eine Superdex 200 10/300 Säule aufgetragen. Aufgenommen wurde das UV280 Signal und die Fluoreszenz bei Ex650/ Em667. Für die Auswertung wurde die Fluoreszenzspur benutzt, um die Stöchiometrie bestimmen zu können. Über die SEC ist es möglich nicht gebundene DIG-siRNA-Cy5 von Antikörper gebundener DIG-siRNA-Cy5 zu trennen. LeY monospec besitzt keine DIG-Bindestelle, bindet keine DIG-siRNA-Cy5 und zeigt deshalb nur ein Signal mit der Retentionszeit ungebundener DIG-siRNA-Cy5 (Peak 2). **B** Der DIG-trivalente LeY-KIH-VD Antikörper zeigt eine proportionale Zunahme des Fluoreszenzsignals bei der Retentionszeit der Antikörper gebundenen DIG-siRNA-Cy5 (Peak 1) bis zu einem Verhältnis von 1:3. Wird DIG-siRNA-Cy5 in einem höheren Verhältnis zugegeben, steigt das Antikörper assoziierte Fluoreszenzsignal nur noch marginal.

3.2.5.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie mit DIG-Doxorubicin

Ergänzend zu dem Titrationsversuch wurde ein Sättigungsexperiment mit Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie durchgeführt, welches die maximale Beladung des gekoppelten DIG-trivalenten Antikörperkonstruktes bestimmen sollte. Dafür wurde auf die Oberfläche eines CM5-Chips ein anti-human Fab als Fangantikörper immobilisiert. Danach wurde der zu analysierende Antikörper an diesen Fangantikörper gekoppelt. Im Anschluss wurde die einfach digoxigenylierte Payload DIG-Doxorubicin, welche eine Größe von 1087 Da hat (Metz *et al.*, 2011), zugegeben. Da sich in Vorversuchen mit unterschiedlichen

Analytkonzentrationen zwischen 33 und 900 nM zeigte, dass ab 100 nM Sättigung eintritt (Abb. 3.2-9-A), wurde der Versuch mit DIG-Doxorubicin bei einer Analytkonzentration von 900 nM durchgeführt. Eine Referenz-Flusszelle wurde auf gleiche Weise mit allen verwendeten Puffern und dem analysierten Antikörper, aber ohne Fangantikörper, behandelt.

Die Anzahl der gebundenen DIG-Payloads konnte aus folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{M_W \text{ Analyt}}{M_W \text{ Capture Antibody}} = \frac{RU_{\text{theor}} \text{ Analyt}}{RU \text{ Capture Antibody}}$$

$$\frac{M_W \text{ Analyt}}{M_W \text{ Capture Antibody}} * RU \text{ Capture Antibody} = RU_{\text{theor}} \text{ Analyt}$$

$$\frac{M_W \text{ DIG-Doxorubicin}}{M_W \text{ DIG-trivalenter AK}} * RU \text{ DIG-trivalenter AK} = RU_{\text{theor}} \text{ DIG-Doxorubicin}$$

↓

$$\frac{RU_{\text{exp}} \text{ DIG-Doxorubicin}}{RU_{\text{theor}} \text{ DIG-Doxorubicin}} = \text{Valenzen}$$

Formel 3.2-1: Berechnung der DIG-Valenzen

Das theoretische Signal RU_{theor} DIG-Doxorubicin kann aus dem Molekulargewicht des Analyten und des Antikörpers und aus dem Level, mit welchem der Antikörper gebunden wurde, errechnet werden. Dieser RU_{theor} DIG-Doxorubicin ergibt sich für einen Antikörper, der theoretisch eine DIG-Payload binden könnte. Wird von dem Antikörper eine höhere Anzahl des Analyten gebunden, so kann experimentell ein höheres RU Signal bestimmt werden. Wichtig für eine derartige Auswertung ist, dass die Oberfläche gesättigt ist, das heißt, dass alle möglichen DIG-Bindestellen des Antikörpers mit Analyt belegt sind. Dies konnte in einem Vorversuch bei allen Analytkonzentrationen über 100 nM beobachtet werden (Abb. 3.2-9-A). Es zeigt sich, dass ein stöchiometrisches Bindeverhältnis von 3.2 DIG-Toxin Molekülen pro Antikörpermolekül vorlag (Tabelle 3.2.5).

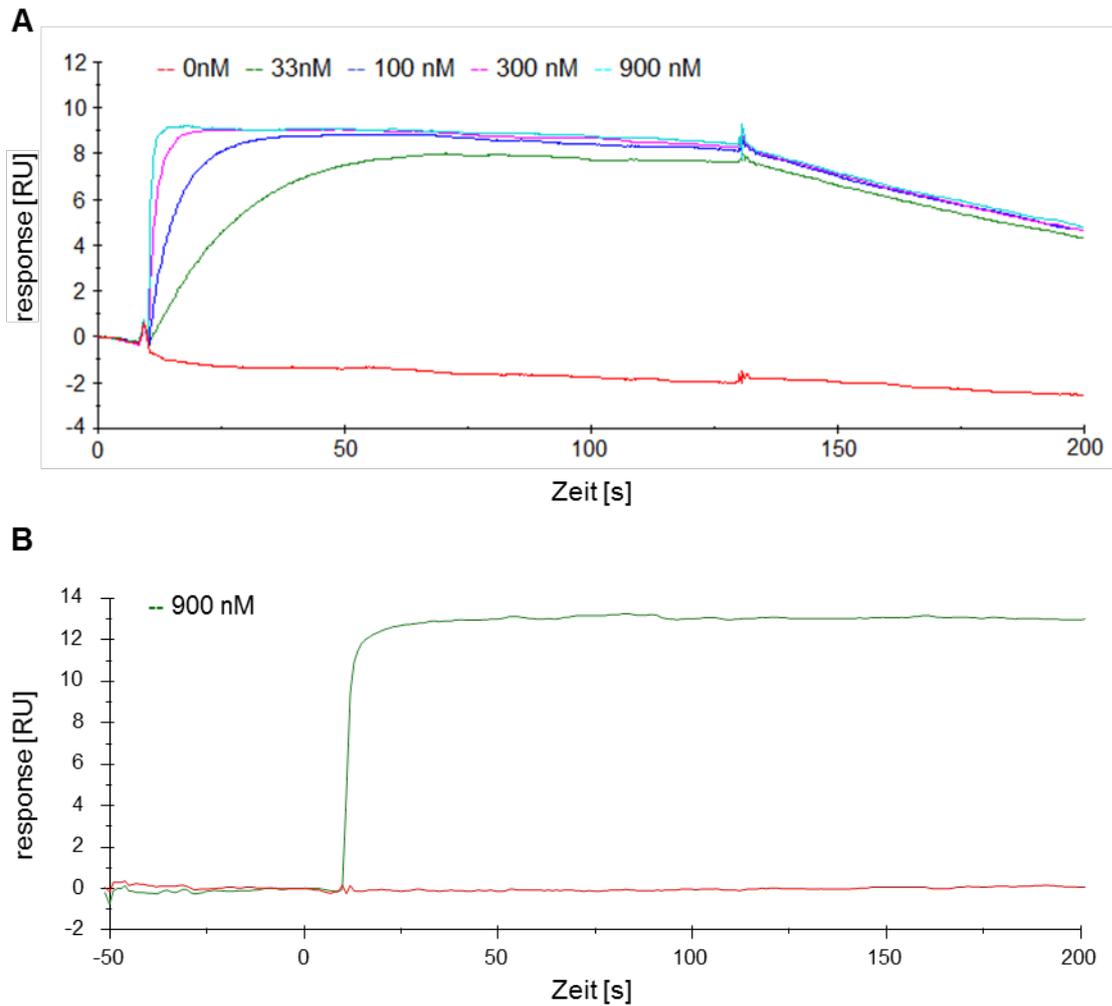


Abb. 3.2-9: Biacore Sensorgramme zur Ermittlung intakter DIG-Bindestellen von JA0015

Zusätzlich zur SEC wurde mittels SPR-Spektroskopie die Anzahl intakter DIG-Valenzen geprüft. Dafür wurde das DIG-trivalente Antikörperkonstrukt über einen huFab (κ/λ LC) an die Oberfläche eines CM5 Chips gekoppelt und mit DIG-Doxorubicin als Payload analysiert. Der Versuch wurde mit einer Biacore T200 durchgeführt. **A** Ein Vorversuch mit unterschiedlichen Analytkonzentrationen zeigte, dass alle Konzentrationen über 100 nM ein Plateau in der „response“ aufweisen, d.h. alle DIG-Bindestellen mit Analyt gesättigt sind, was die Voraussetzung für diesen Versuch darstellt. **B** Der KIH-VD wurde mit DIG-Doxorubicin in einer Analytkonzentration von 900 nM analysiert. Über die Formel 3.2-1 kann die Anzahl der funktionalen DIG-Valenzen berechnet werden. Für den KIH-VD JA0015 kann ein stöchiometrisches Verhältnis von 3 gebundenen DIG-Payloads pro Antikörper berechnet werden (Tabelle 3.2.5).

Ligand	MW Ligand [kDa]	Capture Level Ligand [RU]	Analyt	MW Analyt [kDa]	c Analyt [nM]	$R_{\max \text{ theor}} [RU] (n=1)$	$R_{\max \text{ exp}} [RU]$	Berechnete Stöchiometrie
JA0015	198	726	DIG-Doxorubicin	1,1	900	4,0	12,9	3,2

Tabelle 3.2.5: Stöchiometrie der Beladung der DIG-trivalenten Antikörper mit DIG-Doxorubicin (ermittelt über SPR-Spektroskopie)

Mittels Biacore wurde, wie unter Abb. 3.2-9 beschrieben, die maximale Beladung des DIG-trivalenten KIH-VD JA0015 mit DIG-Doxorubicin getestet. Daraus konnte bei hohen Analytkonzentrationen berechnet werden wieviel DIG-Payload-Moleküle pro Antikörpermolekül binden. Geht man davon aus, dass ein Antikörpermolekül nur 1 DIG-Payload-Molekül binden kann, so ergibt sich unter Berücksichtigung der molekularen Massen des Liganden (DIG-trivalenter AK) und des Analyten (DIG-Payload) und des Capture Levels des Liganden das theoretische maximale Signal RU_{theor} des Analyten. Das tatsächlich ermittelte Signal RU_{exp} wird dann zu RU_{theor} ins Verhältnis gesetzt und so die Anzahl der DIG-Valenzen berechnet. Es wird ein stöchiometrisches Verhältnis von 3.2 für JA0015 bestimmt.

3.2.6 Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MCF-7 Zellen

Der Nachweis der targetspezifischen Bindung der Antikörperkonstrukte erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper für 1 h bei RT im Dunkeln mit einem FITC-konjugierten anti-human-kappa-LC Sekundärantikörper oder mit DIG-Cy5 als fluoreszierende Payload vorinkubiert. Die bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper wurden mit dem Sekundärantikörper in äquimolarem Verhältnis und mit DIG-Cy5 in einem Antikörper-Payload-Verhältnis von 1:3 vorinkubiert. MCF-7 Zellen wurden in einer 96-well Rundbodenplatte ausgesät. Zu diesen wurde für 45 min auf Eis der vorbereitete Antikörper-Sekundärantikörper- oder Antikörper-DIG-Cy5-Mix in einer finalen Konzentration des bispezifischen DIG-trivalenten Antikörpers von 3.43 nM gegeben. Die Inkubation erfolgte auf Eis um eine Internalisierung der Antikörper zu verhindern. Für die Bestimmung des Hintergrundsignals wurde je ein Ansatz mitgeführt, bei dem der Sekundärantikörper bzw. die fluoreszierende Payload DIG-Cy5 ohne weiteren Antikörper zu den MCF-7 Zellen gegeben wurde. Der FITC-konjugierte anti-human-kappa-LC-Sekundärantikörper wurde verwendet, um die Bindung der bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper an das LeY-Target auf MCF-Zellen nachzuweisen und konnte im FITC-Kanal analysiert werden. Um zu überprüfen, dass bei gleichzeitiger Bindung der DIG-Payload auch weiterhin die LeY-Target-Bindung möglich ist, wurde DIG-Cy5 als Payload verwendet, welche im Cy5-Kanal detektiert werden konnte. Die Inkubation der MCF-7 Zellen nur mit Sekundärantikörper oder mit unkomplexierter Payload zeigt kein erhöhtes Fluoreszenzsignal. Auch die Inkubation mit dem bispezifischen DIG-trivalenten CD33 mAb auf MCF-Zellen zeigt bei beiden Konstrukten weder mit Sekundärantikörper noch mit DIG-Cy5 ein erhöhtes Fluoreszenzsignal. Die beiden LeY-bindenden DIG-trivalenten Antikörper zeigen erhöhte zellassozierte Fluoreszenzsignale. Der Triple-Fab JA0011 zeigt sowohl mit dem Sekundärantikörper (Abb. 3.2-10-A) als auch mit DIG-Cy5 (Abb. 3.2-10-B) ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den beschriebenen Kontrollen. Auch das DIG-trivalente KIH-VD Konstrukt zeigt mit dem Sekundärantikörper (Abb. 3.2-10-C) wie auch mit DIG-Cy5 (Abb. 3.2-10-D) ein deutlich

erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den beschriebenen Kontrollen. Das belegt, dass bei beiden Konstrukten sowohl die Target-Bindung als auch die DIG-Bindung funktionell ist.

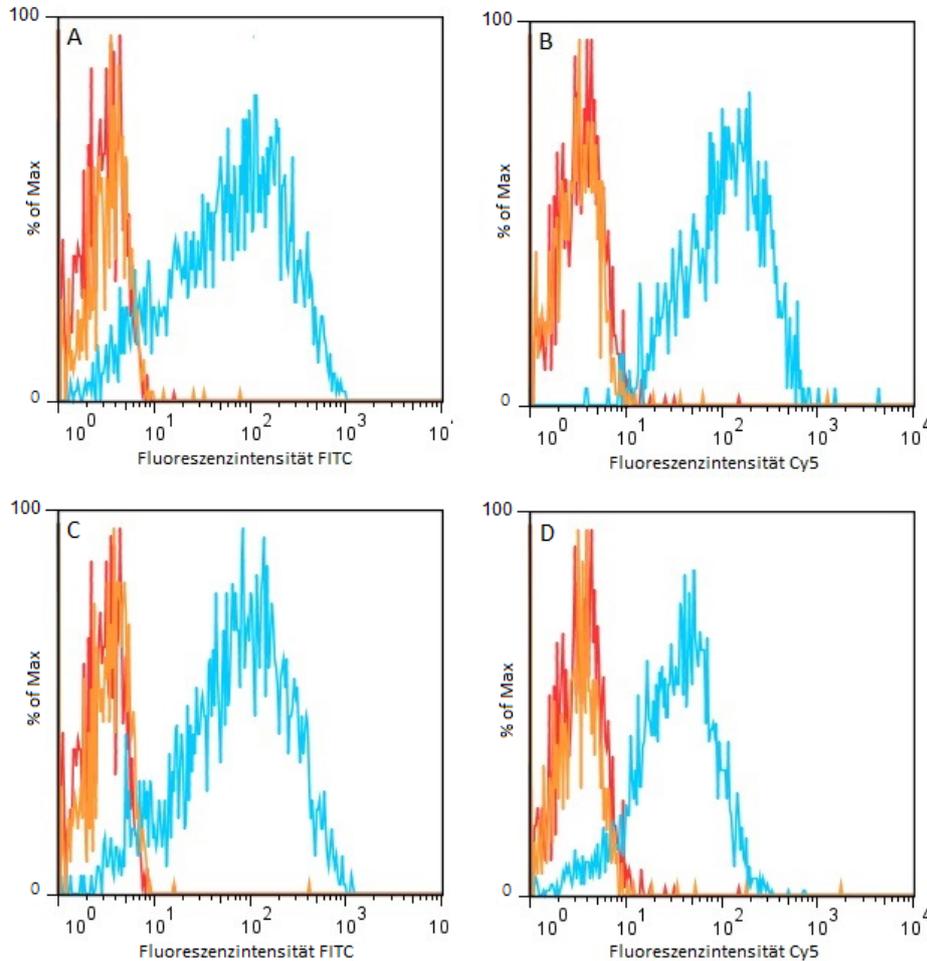


Abb. 3.2-10: FACS der bispezifischen DIG-bindenden Antikörperkonstrukte auf MCF-7 Zellen

A und B: MCF-7 Zellen wurden ohne Antikörper (-- **alleine**) oder mit LeY-bindendem DIG-Triple-Fab (-- **JA0011**) oder CD33-bindendem DIG-Triple-Fab (-- **JA0024**) inkubiert und mittels FACS analysiert **A** Detektion mittels Sekundärantikörper, welcher an die hu-kappa-LC bindet **B** Detektion mittels DIG-Cy5

C und D: MCF-7-Zellen wurden ohne Antikörper (-- **alleine**) oder mit dem trivalenten LeY-bindendem KIH-Konstrukt (-- **JA0015**) oder CD33-bindendem KIH-Konstrukt (-- **JA0029**) inkubiert und mittels FACS analysiert **C** Detektion mittels Sekundärantikörper, welcher an die hu-kappa-LC bindet **D** Detektion mittels DIG-Cy5

3.2.7 Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MOLM-13 Zellen

Um zu belegen, dass die bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper auch auf anderer Zelllinie mit einem anderen Target funktionell sind, wurde der gleiche Versuch wie unter 3.2.6 auf MOLM-13 Zellen gemacht. Diese Zelllinie exprimiert signifikante Level des myeloiden

Oberflächenantigens CD33, weshalb die beiden CD33-bindenden DIG-trivalenten Antikörper JA0024 und JA0029 deutliche zellassoziierte Fluoreszenzsignale mit Sekundärantikörper oder DIG-Cy5 zeigen sollten. Der Triple-Fab JA0024 zeigt sowohl mit dem Sekundärantikörper (Abb. 3.2-11-A) als auch mit DIG-Cy5 (Abb. 3.2-11-B) ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den beschriebenen Kontrollen. Auch das DIG-trivalente KIH-VD Konstrukt zeigt mit dem Sekundärantikörper (Abb. 3.2-11-C) wie auch mit DIG-Cy5 (Abb. 3.2-11-D) ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den beschriebenen Kontrollen. Das belegt, dass das Recruiting der Payload DIG-Cy5 durch die entwickelten bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper auch auf andere Antikörper bzw. Antigene und Zellen angewendet werden kann.

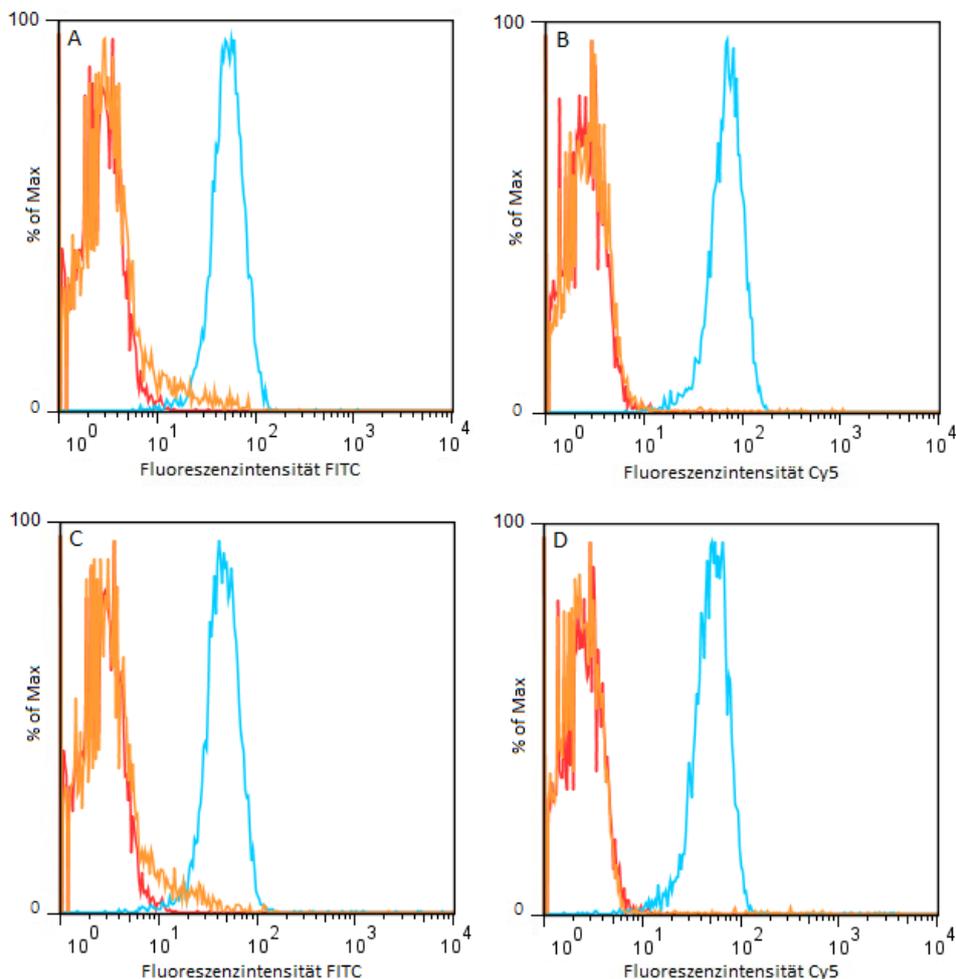


Abb. 3.2-11: FACS der bispezifischen DIG-bindenden Antikörperkonstrukte auf MOLM-13 Zellen

A und **B**: MOLM-13 Zellen wurden ohne Antikörper (-- **alleine**) oder mit CD33-bindendem DIG-Triple-Fab (-- **JA0024**) oder LeY-bindendem DIG-Triple-Fab (-- **JA0011**) inkubiert und mittels FACS analysiert
A Detektion mittels Sekundärantikörper, welcher an die hu-kappa-LC bindet **B** Detektion mittels DIG-Cy5

C und **D**: MOLM-13 Zellen wurden ohne Antikörper (-- **alleine**) oder mit dem trivalenten CD33-bindendem KIH-VD Konstrukt (-- **JA0029**) oder LeY-bindendem KIH-VD Konstrukt (-- **JA0015**) inkubiert

und mittels FACS analysiert **C** Detektion mittels Sekundärantikörper, welcher an die hu-kappa-LC bindet
D Detektion mittels DIG-Cy5

3.2.8 Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur

Die Fähigkeit der bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper LeY-positive Brustkrebszellen töten zu können, sollte mit mehreren toxischen Payloads, welche durch Vorversuche ausgewählt worden sind (3.1.2.2 und 3.1.2.3), in Zellkultur untersucht werden. Außerdem sollte durch den Vergleich mit DIG-monovalenten und DIG-bivalenten LeY-bindenden Antikörpern untersucht werden, ob eine Erhöhung der Anzahl gebundener DIG-Toxine pro Antikörper mit einer höheren Toxizität *in vitro* einhergeht und dies in diesem Assay aufgelöst werden kann. Dafür wurde die bereits zur FACS-Analyse verwendeten MCF-7 Zelllinie verwendet. Die bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper wurden in einem DIG-Toxin-Antikörper-Verhältnis von 3:1 für 24 h bei 4 °C inkubiert und anschließend auf die Zellen aufgebracht. Als Kontrollen wurden die auch bereits im FACS verwendeten CD33-bindenden DIG-trivalenten Antikörper JA0024 und JA0029 verwendet, welche in gleicher Weise mit den DIG-Toxinen vorinkubiert wurden. Ebenso wurden auch der DIG-monovalente und DIG-bivalente LeY-bindende Antikörper mit den DIG-Toxinen inkubiert und auf die Zellen aufgebracht.

Als DIG-bivalenter LeY-bindender Antikörper wurde ein 2:2 bispezifischer Antikörper benutzt (Metz *et al.*, 2011)(Abb. 3.2-12). Um zu zeigen, dass ein Unterschied in der Toxizität, welcher durch eine zusätzliches DIG-Toxin pro Antikörper verursacht wird, mittels dieses Zellviabilitätassays überhaupt aufgelöst werden kann, wurde außerdem ein DIG-monovalenter LeY-bindender Antikörper generiert. Dieser sollte, damit keine Unterschiede in der Internalisierung aufgrund der Antigenbindung auftreten, ebenso wie die anderen Formate 2 LeY-Bindestellen besitzen. Dafür wurde ein Antikörper generiert, welcher aus 2 anti-LeY Fabs besteht, an die C-terminal über einen (G₄S)₂-Linker die disulfidstabilisierte anti-DIG VH- und VL-Domäne mit anschließender KIH-CH3 gekoppelt war (Abb. 3.2-12). Die Expression, Reinigung und Analytik wurde wie bei den übrigen bisher beschriebenen Antikörpern durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Integrität des aufgereinigten monovalenten Antikörpers konnte durch SDS-Page, SEC und Massenspektrometrie belegt werden. Ebenso wie bei dem DIG-bivalenten LeY-bindenden Antikörper lag auch beim DIG-monovalenten LeY-bindenden Antikörper der Monomergehalt über 99 %.

DIG-monovalenter LeY-bindender AK

DIG-bivalenter LeY-bindender AK

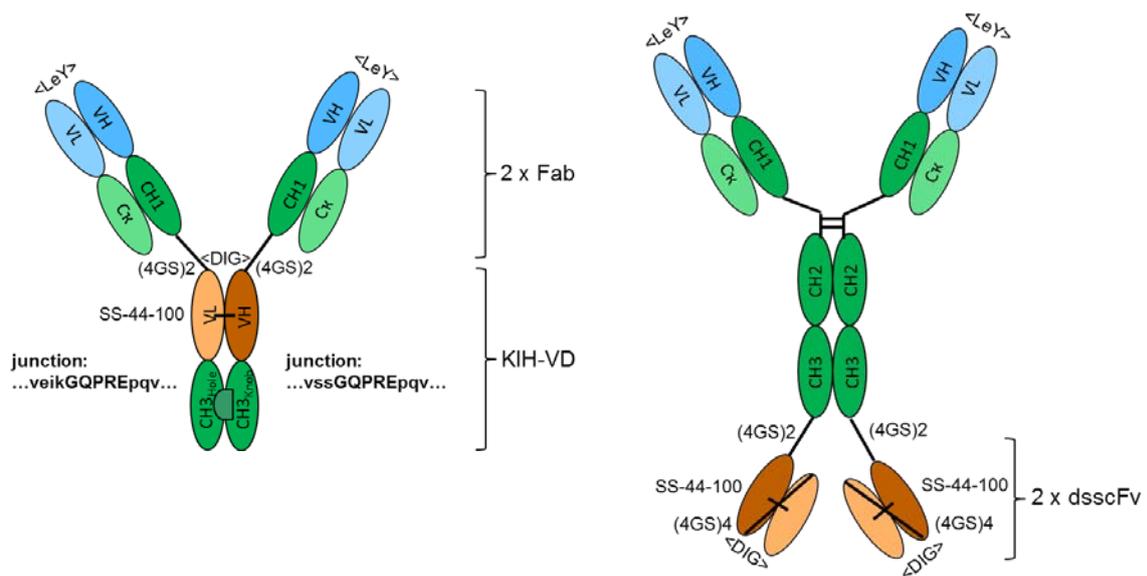
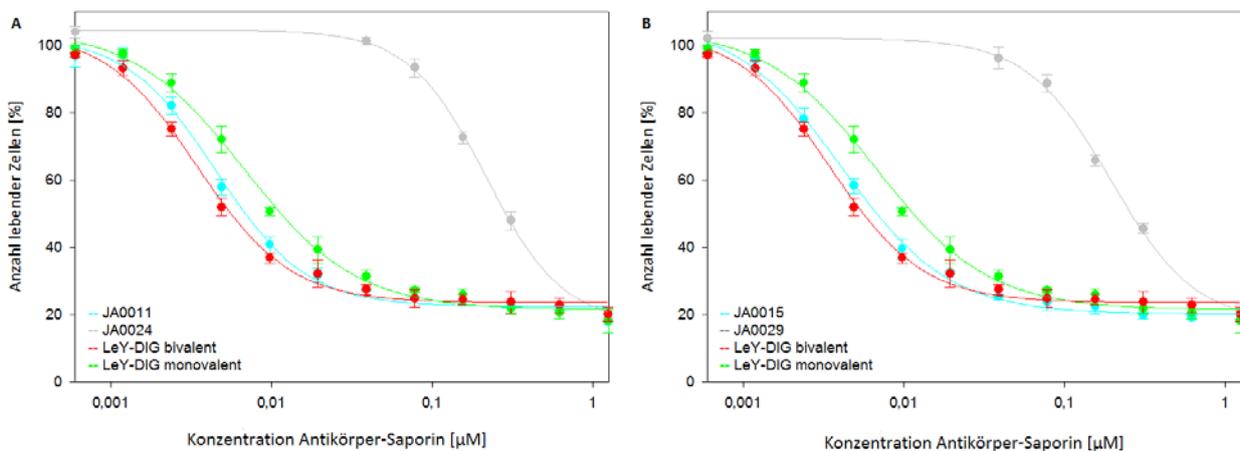


Abb. 3.2-12: Schema der bispezifischen DIG-monovalenten und –bivalenten Antikörperkonstrukte

Die MCF-7 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der DIG-Toxin-Antikörper-Komplexe 72 h (DIG-PE38) oder 96 h (DIG-Saporin) inkubiert. Um unspezifische Zytotoxizität zu vermeiden wurden bei PE38, wie in den Vorversuchen, die DIG-PE38-Antikörper-Komplexe nach 0.5 h Inkubation durch Waschen mit Medium entfernt. Danach wurden die Zellen für den Rest der Inkubationszeit in Medium inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität bestimmt.

Aus den gewonnenen Daten wurde der IC₅₀-Wert gemäß Formel 2.2-2 für das jeweilige Toxin mit dem LeY-bindenden DIG-monovalenten, bivalenten und den trivalenten Antikörper JA0011 und JA0015 bestimmt (Tabelle 3.2.6).



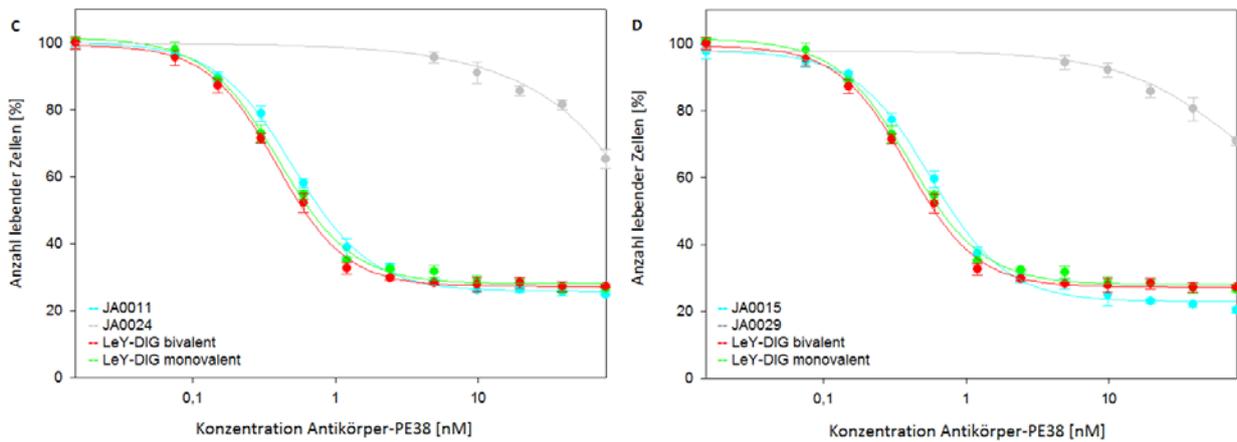


Abb. 3.2-13: Zytotoxizität der bispezifischen DIG-bindenden Antikörperkonstrukte auf MCF-7 Zellen

Um die Spezifität und biologische Wirksamkeit der DIG-Toxin-Antikörper-Komplexe zu untersuchen, wurden diese auf der LeY-positiven Zelllinie MCF-7 getestet. Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen der DIG-Toxin-Antikörper-Komplexe 72 h (DIG-PE38) oder 96 h (DIG-Saporin) inkubiert. Um unspezifische Zytotoxizität zu vermeiden, wurden die DIG-PE38-Antikörper-Komplexe nach 0.5 h Inkubation durch Waschen mit Medium entfernt. Bei Saporin wurde dieser Waschschritt nicht gemacht. Nach 72 bzw. 96 h wurden 100 μ L des CellTiter-Glo®-Reagenz pro Well dazugegeben und das Lumineszenz-Signal an einem Mikrotiterplatten-Reader ausgelesen. Die Lumineszenz ist ein Maß für den ATP-Gehalt, welcher proportional zur Anzahl lebender Zellen ist und wurde hier auf eine prozentuale Skala normiert, die gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen ist. Alle Messpunkte wurden in dreifacher Ausführung bestimmt. Die Linien beschreiben die Anpassung an die experimentellen Daten, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Messwerte dar. Die IC50-Werte sind in Tabelle 3.2.6 zusammengefasst.

A Triple-Fab JA0011 (anti-LeY) und JA0024 (anti-CD33) mit DIG-Saporin **B** Trivalentes KIH-VD Konstrukt JA0015 (anti-LeY) und JA0029 (anti-CD33) mit DIG-Saporin **C** Triple-Fab JA0011 (anti-LeY) und JA0024 (anti-CD33) mit DIG-PE38 **D** Trivalentes KIH-VD Konstrukt JA0015 (anti-LeY) und JA0029 (anti-CD33) mit DIG-PE38

DIG-Saporin wurde mit den jeweiligen Antikörpern in einer Toxinkonzentration von 1.25 bis 0.0006 μ M aufgetragen. Es zeigt sich zwischen monovalentem und bivalentem LeY-bindendem Kontrollantikörper ein deutlicher Unterschied in der Zytotoxizität. Beide Kontrollantikörper lagen in sehr hoher Reinheit (SEC Monomergehalt > 99 %; Daten nicht gezeigt) vor, weshalb der Unterschied in der Zytotoxizität höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass mit dem bivalenten Antikörper mehr Toxin zielgerichtet internalisiert wird als mit dem monovalenten Antikörper. Der DIG-trivalente Triple-Fab JA0011 (Abb. 3.2-13-A) zeigte keine höhere Zytotoxizität im Vergleich zu dem bivalenten Kontrollantikörper. Auch das DIG-trivalente KIH-VD Konstrukt JA0015 (Abb. 3.2-13-B) zeigte keine höhere Zytotoxizität im Vergleich zu dem bivalenten Kontrollantikörper, obwohl die Integrität der drei DIG-

Bindestellen mittels SEC (3.2.5.1) und SPR (3.2.5.2) nachgewiesen werden konnte. DIG-PE38 wurde mit den jeweiligen Antikörpern in einer Toxinkonzentration von 78 nM bis 0.015 nM aufgetragen. Hier zeigt sich zwischen monovalentem und bivalentem LeY-bindenden Kontrollantikörper, im Gegensatz zu DIG-Saporin, kein Unterschied in der Zytotoxizität. Mit diesem Toxin kann in diesem Assay also nicht aufgelöst werden, ob mit dem bivalenten Antikörper mehr Toxin zielgerichtet internalisiert wird als mit dem monovalenten Antikörper und dies eine erhöhte Zytotoxizität bewirkt. Eine höhere Toxizität des DIG-trivalenten Triple-Fabs JA0011 (Abb. 3.2-13-C) wie auch des DIG-trivalenten KIH-VD Konstrukts JA0015 (Abb. 3.2-13-D) mit DIG-PE38 konnte im Vergleich zu dem bivalenten und monovalenten Kontrollantikörper nicht beobachtet werden.

	LeY-DIG- monovalent	LeY-DIG- bivalent	JA0011 (Triple- Fab)	JA0015 (trivalenter KIH-VD)
DIG- Saporin	6,77 nM	3,46 nM	4,53 nM	4,11 nM
DIG-PE38	0,40 nM	0,39 nM	0,51 nM	0,56 nM

Tabelle 3.2.6: IC50-Werte der DIG-Toxin-Antikörper-Komplexe

Die IC50-Werte wurden mit der Formel 2.2-2 aus der Auftragung des prozentualen Anteils lebender Zellen gegen die Toxinkonzentration berechnet. Die Werte wurden mittels CellTiter-Glo®-Assay ermittelt.

3.2.9 Zusammenfassung

Basierend auf dem bekannten LeY-DIG-bispezifischem Antikörper, wurden Antikörper-Formate entwickelt, welche es ermöglichen mehr als 2 Payloads zu binden und zur Zielzelle zu transportieren. Es wurden zwei neue bispezifische Formate mit 3 Haptenbindungsstellen und 2 Antigen-Bindungsstellen entwickelt (Abb. 3.2-1). Die Antikörper besaßen sowohl eine Spezifität für das Antigen (LeY oder CD33) als auch für das Hapten Digoxigenin. Mit dem DIG-trivalenten LeY/CD33 Triple-Fab wurde ein Antikörperkonstrukt generiert, bei welchem die DIG-Bindung über 2 *CrossFabs* mit einem C-terminal angehängten Fab realisiert wird und die Antigenbindung über 2 DVDs, welche N-terminal an die *CrossFabs* fusioniert wurden. Mit dem DIG-trivalenten LeY/CD33 KIH-VD wurde ein Antikörperderivat generiert, bei welchem die DIG-Bindung über 2 Fabs mit einem C-terminal angehängten KIH-VD realisiert wird und die Antigenbindung über 2 N-terminal angehängte DVDs. Der DIG-trivalente Triple-Fab wies für LeY eine etwa doppelt so hohe Ausbeute, für CD33 eine etwa 10 % höhere Ausbeute im Vergleich zu dem DIG-trivalenten KIH-VD auf. Der mit der SEC bestimmte Monomeranteil lag

bei dem KIH-VD über 15 % höher als bei dem DIG-trivalenten Triple-Fab. Diese Beobachtung wurde durch die SDS-Page bestätigt. Mittels ESI-MS konnte die Identität der Gesamtantikörper und der einzelnen schweren und leichten Ketten bestätigt werden. Der Nachweis drei intakter DIG-Bindestellen wurde über analytische Größenausschlusschromatographie erbracht, bei dem der DIG-trivalente LeY-KIH-VD Antikörper, mit der etwa 15 kDa großen DIG-siRNA-Cy5 titriert wurde. Bis zu einem 1:3 Verhältnis (Antikörper:DIG-siRNA-Cy5) konnte ein linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals, bei höheren DIG-siRNA-Cy5 Konzentrationen konnte nur noch ein marginaler Anstieg des antikörpergebundenen Fluoreszenzsignals beobachtet werden. Außerdem konnte mittels SPR-Spektroskopie gezeigt werden, dass rechnerisch 3.2 Payloads pro Antikörper gebunden werden, was zusammen mit dem Ergebnis des DIG-siRNA-Cy5 Titrationsversuch annehmen lässt, dass alle drei DIG-Bindestellen intakt sind. Die targetspezifische Bindung konnte bei allen DIG-trivalenten Antikörperkonstrukten mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass alle DIG-trivalenten Antikörperkonstrukte nicht nur an das Target, sondern auch gleichzeitig an die fluoreszierende Payload DIG-Cy5 binden können. Mittels Zellviabilitätsassays sollte festgestellt werden, ob mit der Erhöhung der Anzahl gebundener DIG-Toxine pro Antikörper ebenso eine Erhöhung der Toxizität einhergeht. Bei DIG-Saporin konnte eine deutlich niedrigere IC₅₀ beim Vergleich von DIG-bivalentem zu DIG-monovalentem LeY-bindendem Antikörper bestimmt werden. Aufgrund der Integrität und Funktionalität beider Antikörper und des hohen Monomeranteils über 99 % konnte davon ausgegangen werden, dass für die gesteigerte Toxizität des DIG-bivalenten im Vergleich zum DIG-monovalenten Antikörper die zweite DIG-Bindung verantwortlich ist, die zur zielgerichteten Internalisierung von mehr Toxinmolekülen pro Antikörper führt. Bei DIG-Saporin eignet sich dieser Zellviabilitätassay also, um zu bestimmen, ob mit einem DIG-bivalenten Antikörper mehr Toxinmoleküle zielgerichtet internalisiert werden als mit einem DIG-monovalentem. Sowohl der DIG-trivalente Triple-Fab JA0011 als auch der DIG-trivalente KIH-VD Antikörper JA0015 zeigte bei DIG-Saporin aber keine gesteigerte Toxizität im Vergleich zu dem DIG-bivalenten LeY-bindenden Antikörper. Die Spezifität der DIG-trivalenten LeY-bindenden konnte durch die Isotypkontrollen JA0024 und JA0029 belegt werden.

3.3 Bispezifische Theophyllin bindende Antikörperderivate

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es mit Theophyllin ein alternatives Hapten zu Digoxigenin zu finden, die Proteinsequenz für die leichte und schwere Kette des Theophyllin bindenden Antikörpers zu isolieren und die neuen Antikörper-Formate auf das alternative Hapten zu übertragen. Analog der DIG-spezifischen Antikörperderivate wurden Formate mit

3 Theophyllin-Bindungsstellen und 2 Antigen-Bindungsstellen entwickelt (Abb. 3.3-1). Die Antikörper besaßen sowohl eine Spezifität für das Antigen LeY oder CD33 als auch für das Hapten Theophyllin. Für die Affinitätsbestimmung der Theophyllin-Bindung wurde außerdem ein Theo-monovalentes Antikörperderivat generiert.

Theo-LeY bispezifischer Fab dsscFv

Theo-trivalenter LeY/CD33 Triple-Fab

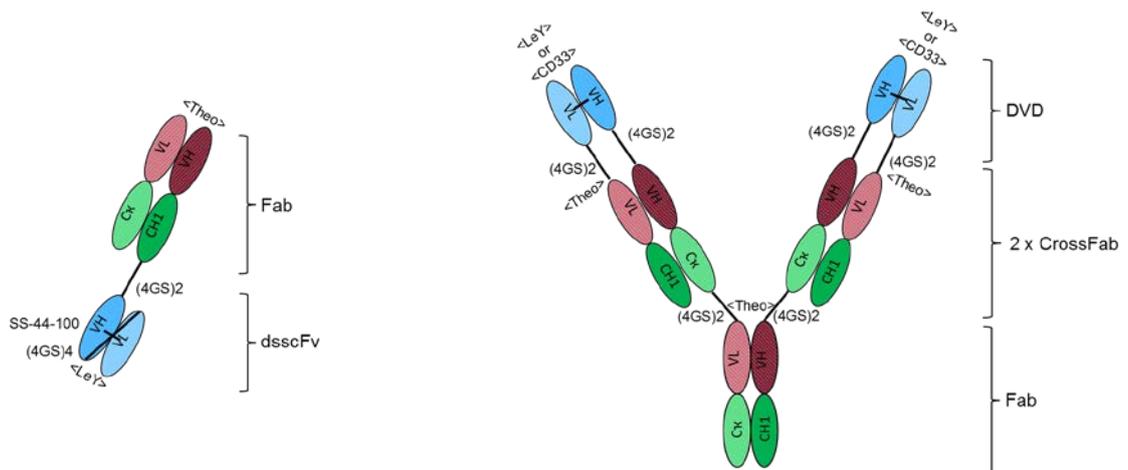


Abb. 3.3-1: Schema der hergestellten bispezifischen Theo-bindenden Antikörperderivate

3.3.1 Generierung eines monoklonalen humanisierten Theo-bindenden IgG

Die bisher beschriebenen bispezifischen Antikörper basierten darauf, dass neben der Bindung eines Targets auf der Zelloberfläche auch die Bindung einer digoxigenylierten Payload realisiert wird. Dafür wurden die Toxine mit Digoxigenin gekoppelt, einem Aglykon des „Herzglykosids“ Digoxin. Die Bezeichnung „Herzglykosid“ rührt daher, dass Digoxin wie auch andere Digitalisglykoside eine Wirkung auf die Herzfunktion haben (Sloan, 1983) kann. Ein weiterer Nachteil bei dem Einsatz digoxigenylierter bzw. hapentylierter Toxine besteht darin, dass sowohl das Toxin (W. Liu *et al.*, 2012) als auch das Toxin gekoppelte Hapten (Singh *et al.*, 2010) körperfremde Stoffe darstellen, die immunogen wirken und so die Produktion neutralisierender Antikörper bewirken können. Im Fall des Haptens, welches an das Toxin gekoppelt ist, würde ein Austausch hilfreich sein, falls Hapten abhängige anti-Payload-Antikörper auftreten. Ein alternatives Hapten würde also die Möglichkeit bieten bei Immunogenität des DIG-Toxins auf das alternative Hapten-Toxin auszuweichen und so weitere Behandlungszyklen zu ermöglichen. Deshalb sollte innerhalb dieser Arbeit ein bispezifischer Antikörper generiert werden, der gegen ein alternatives Hapten gerichtet ist. Das alternative Hapten sollte sich in seiner Struktur dadurch auszeichnen, dass es natürlicherweise nicht im menschlichen Körper vorhanden ist, keine Toxizität *in vivo* aufweist

und leicht in Haptenylierungsreagenzien wie Hapten-Succinimidylester oder Hapten-Maleimid überführbar ist. Als alternatives Hapten wurde Theophyllin verwendet, da es sich hierbei um einen Naturstoff aus Teeblättern handelt, der erst bei sehr hohen Dosierungen, die theoretisch weit außerhalb der therapeutisch notwendigen Dosierungen liegen, deutliche Nebenwirkungen wie Herzrhythmusstörungen und Krampfanfälle zeigen würde. Hybridomzellen, welche einen monoklonalen Theophyllin bindenden IgA/ kappa produzierten, wurden von der Firma Roche zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde dann aus der mRNA dieser Hybridomzellen mittels RACE-PCR und TOPO Klonierung die VH- und VL-kodierenden Sequenzen isoliert und diese im Anschluss mittels CDR-Grafting humanisiert.

3.3.1.1 RACE-PCR und TOPO Klonierung

Die RNA muriner Theophyllin bindender Antikörper wurde aus 1×10^6 muriner Hybridomzellen mittels Rneasy-Kit[®] isoliert. Die cDNA, welche für die weitere RACE-PCR benötigt wurde, ist mittels des FirstChoice[®] RLM-RACE Kits gewonnen worden. Dafür wurde 10 µg der isolierten RNA eingesetzt, um über reverse Transkription eine cDNA zu erzeugen. Die Gesamt-RNA wurde mit intestinaler Kälberphosphatase (CIP) behandelt, um die RNA mit freien Phosphatresten am 5'-Ende, wie z.B. rRNA, tRNA und fragmentierte mRNA zu entfernen und so die intakte Gesamt-mRNA weiter einsetzen zu können. Diese wurde im Anschluss mit Tabaksäure-Pyrophosphatase (TAP) behandelt, um die CAP-Struktur zu entfernen. An dem verbleibenden Monophosphat des 5'-Ende erfolgte die Ligation des 5'RACE Adapters aus dem FirstChoice[®] RLM-RACE Kit. Für die PCR wurde die KOD Hot Start Polymerase verwendet, da sie im Vergleich zur im Kit enthaltenen Taq Polymerase eine erhöhte *proof-reading*-Aktivität aufweist und erste Versuche mit der Taq Polymerase keine erfolgreiche PCR ermöglichten. Nachdem der 5'RACE Adapter eingefügt wurde, konnte direkt mittels der „Inner PCR“ fortgefahren werden. Dafür wurden Primer-Paare verwendet, die aus dem im Kit enthaltenen 5'RACE Inner Primer (Sense Primer) und entweder einem C κ oder IgA-CH1 spezifischen Primer (Antisense Primer), der mittels des Programms VNTI speziell für diese Arbeit designed wurde, bestanden. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die VH und VL kodierenden Sequenzen daraus extrahiert. Die PCR-Produkte wurden gereinigt und in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor des TOPO[®] TA Cloning Kits für PCR-Produkte mit „blunt ends“, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, eingefügt. Die Reaktionsansätze der TOPO Klonierung wurden in kompetente MAX Efficiency[®] *Escherichia coli* DH5 α -T1 Zellen transformiert. Es wurden je 6 positive Klone pro Platte selektiert und in 3 mL LB-Medium mit Kanamycin oder Ampicillin (100 µg/mL) über Nacht weiter propagiert. Im Anschluss daran wurde die DNA dieser Kulturen isoliert und die DNA Sequenz der VH und VL des Theophyllin bindenden Antikörpers und die

davon abgeleitete Proteinsequenz aus der automatisierten Sequenzierung zahlreicher Klone identifiziert.

3.3.1.2 CDR-Grafting

Die Theophyllin spezifischen VH und VL Sequenzen wurden nach einem etablierten Prozedere mittels CDR-Grafting (Lo, 2004) humanisiert (Abb. 3.3-2). Als Basis für das CDR-Grafting wurden aus der IMGT Datenbank (Lefranc, 2005) ausgewählte humane Keimbahnsequenzen für die variablen Bereiche der leichten und schweren Kette verwendet. Die Benennung der CDRs wurde gemäß der Definition nach Kabat (Kabat *et al.*, 1991) vorgenommen. Die hypervariablen Abschnitte HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 und HVR-H3 sind in den Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Kette grün gekennzeichnet (Abb. 3.3-2). Rückmutationen wurden nur an den Stellen vorgenommen, von denen man aufgrund des 3D-Modells annehmen kann, dass Wechselwirkungen bzw. räumlich stabilisierende Aminosäuren der CDR-Loops (J. H. Kim & Hong, 2012) und auch die Antigenbindungsstellen nicht betroffen sind.

murine VH:

DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCAVTGYSIT SDYAWN^{WIRQ} FPGNRLEW^{MG} YIRYSGHTGY
 NPSLKS^{RISI} TRDTFKNQFF LQFNSVTTED TATYYCAR^{WV} DYFDY^{WGQGT} TLTVSS

humanisierte VH:

QVQLQESGPG LVKPSQTL^{SL} TCTVSGYSIT SDYAWN^{WIRQ} HPGKGLEW^{IG} YIRYSGHTGY
 NPSLKS^{RVTI} SRDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCAR^{WV} DYFDY^{WGQGT} LVTVSS

murine VL:

DVVM^{TQ}SPLS LPVSLGDQAS ISCR^{SSQSIV} YNNRYTYLE^W FVQKPGQSLK LLIY^{GVS}NR^F
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDMGV YYCYQ^{GTHAP} YTFGGG^{TKLE} IK

humanisierte VL:

DVVM^{TQ}SPLS LPVTLGQPAS ISCR^{SSQSIV} YNNRYTYLE^W FQQRPGQSPR LLIY^{GVS}NR^F
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCYQ^{GTHAP} YTFGQ^{GTKLE} IK

Abb. 3.3-2: Humanisierung der murinen Theophyllin-Sequenzen

Zur Herstellung Theophyllin bindender Antikörper wurden murine Hybridoma-Kulturen verwendet. Daraus wurde die mRNA isoliert und mittels RT-PCR die VL und VH kodierenden Sequenzen isoliert. Die murine anti-Theophyllin-Sequenz wurde mittels CDR-Grafting mit Rückmutation humanisiert. Die aufgrund des CDR-Grafting geänderten Aminosäuren sind weiß hinterlegt. Die hypervariablen Regionen sind grün hinterlegt.

3.3.2 Bestimmung der Bindungsaffinität

Um die Bindungsaffinität der anti-Theo-Antikörper untersuchen und mit der Bindungsaffinität der anti-DIG-Antikörper vergleichen zu können, wurde eine Konzentrationsreihe des Antikörpers aufgesetzt und mittels SPR analysiert. Dafür wurde ein monovalenter bispezifischer Fab dsscFv generiert (Abb. 3.3-3), der aus einem anti-Theo-Fab bestand, an den C-terminal die LeY-bindende variable Domäne über einen $(G_4S)_2$ -Linker fusioniert wurde. Die VH- und VL-Domäne des scFv, welche über einen $(G_4S)_4$ -Linker verbunden war, wurde über eine VH44-VL100 Disulfidbrücke stabilisiert (Jung *et al.*, 1994)(Reiter *et al.*, 1996). Die Expression, Reinigung und Analytik wurde wie bei den übrigen bisher beschriebenen Antikörpern durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Integrität des aufgereinigten dsscFv konnte durch SDS-Page, SEC und Massenspektrometrie belegt werden.

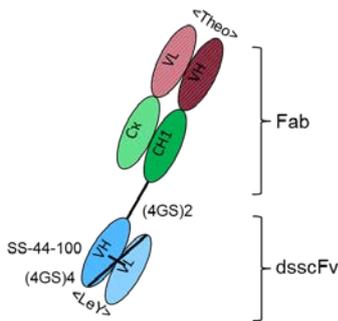


Abb. 3.3-3: Bispezifisches Antikörperderivat für die Affinitätsbestimmung der Theophyllin-Bindung

Um die Affinität der Theophyllin-Bindung untersuchen zu können, wurde ein bispezifischer Theomonovalenter dsscFv generiert. Die Theophyllin bindende Domäne befindet sich am N-terminalen Teil des Fabs. Der Disulfid-stabilisierte LeY-bindende scFv wurde über einen $(G_4S)_2$ -Linker an den C-Terminus des Fabs fusioniert. Durch die Monovalenz bekommt man nach Auswertung mit einem 1:1 Hapten:Antikörper Bindungsmodell eine Aussage über die Bindungsaffinität.

Durch die Monovalenz für Theophyllin können Aviditätseffekte ausgeschlossen werden. Um die Affinität der Theophyllin-Bindung untersuchen und diese mit der bekannten, ebenfalls über Biacore bestimmten, DIG-Affinität vergleichen zu können, wurde Theophyllin-BSA (GenWay Biotech) auf der Oberfläche eines C1 Biosensor Chips mittels Aminkopplung immobilisiert. Der anti-Theo dsscFv wurde in steigenden Konzentrationen injiziert. Der dsscFv wurde in HBS-EP+ verdünnt und mit einer Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Die Kontaktzeit für den Antikörper war 3 min bei Konzentrationen zwischen 1.9 und 900 nM, die Dissoziationsphase war 10 min für jedes Molekül bei einer Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Alle Versuche wurden auf einer Biacore T100 bei RT durchgeführt und mittels der Biacore T200 Evaluation Software Version 1.0 ausgewertet. Die erhaltenen experimentellen Sensorgramme wurden mit einem Langmuir 1:1 Modell gefittet. Wie Abb. 3.3-4 zeigt ist der Fit in der Assoziationsphase etwas schlecht, was vermutlich daran liegt, dass das Theophyllin im Theo-BSA, welches auf der Chipoberfläche

immobilisiert wurde, teilweise für den Antikörper schlecht zugänglich ist bzw. durch das BSA abgeschirmt wird. Um die sterische Hinderung durch zu viel BSA zu minimieren, wurden die Beladungsdichte der Chipoberfläche mit Theo-BSA und die Oberfläche des Chips in einigen Versuchen optimiert (Daten nicht gezeigt). Da der „Sprung“ im Fit der Assoziationsphase bei 900 nM außerdem auf eine unspezifische Bindung hindeuten könnte, wurde die KD einmal mit und einmal ohne diese Konzentration bestimmt. Die KD des anti-Theo dsscFv ergab eine KD von 1.5 nM unter Einbezug der 900 nM Konzentration und eine KD von 1.1 nM unter Weglassen der 900 nM Konzentration. Die Dissoziationsphase zeigt bei der Auswertung mit der 900 nM Konzentration bereits einen sehr guten Fit mit einer sehr langsamen Dissoziation, weshalb beide Ergebnisse vergleichbar sind. Der anti-Theo-Antikörper zeigt damit eine etwa 10fach höhere Affinität als der anti-DIG-Antikörper (Metz *et al.*, 2011).

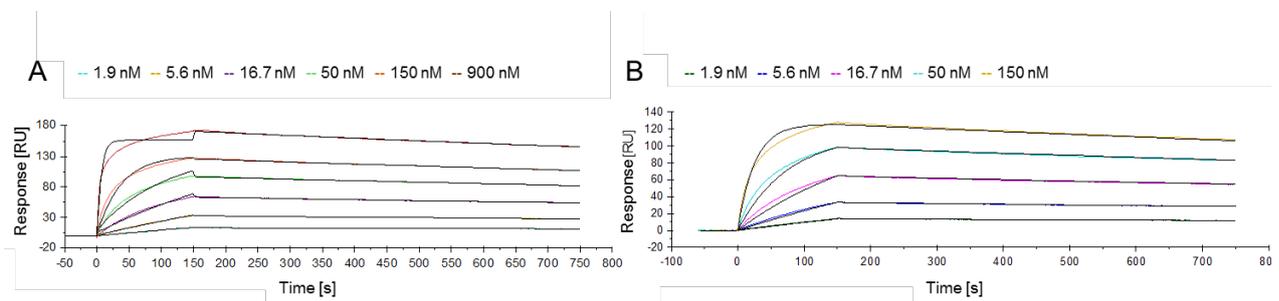


Abb. 3.3-4: Biacore Sensorgramme zur Ermittlung des KD-Wertes des bispezifischen Theophyllin bindenden Antikörpers

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität des bispezifischen Theophyllin bindenden Antikörpers wurde das Theo-monovalente Konstrukt JA0019 mittels SPR-Spektroskopie untersucht. Dafür wurde Theophyllin-BSA auf der Chipoberfläche eines CM5 Chips gekoppelt. Der anti-Theophyllin-Antikörper JA0019 wurde in ansteigenden Konzentrationen zwischen 1.9 und 900 nM aufgegeben. Die Kontaktzeit (Assoziationsphase) für den Antikörper ist 3 min, die Waschzeit (Dissoziationsphase) mit Laufpuffer ist 10 min. **A** zeigt die Konzentrationsreihe von JA0019 mit Fit unter Einbezug aller Konzentrationen, **B** zeigt die Konzentrationsreihe von JA0019 mit Fit ohne die Konzentration 900nM (nach dem 1:1 Langmuir-Modell), aus welcher eine KD von 1.1 nM ermittelt wird.

3.3.3 Expression und Reinigung des Theo-trivalenten Triple-Fab

Basierend auf dem DIG-trivalenten Antikörperderivat JA0011 bzw. JA0024 (Kapitel 3.2.1), welches 3 Valenzen für die Bindung einer DIG-Payload hatte, wurde ein Antikörperderivat entwickelt, welches 3 Valenzen für die Bindung einer Theophyllin-Payload hatte. Die zweite Spezifität für die Antigenbindung wurde nach dem Prinzip der *Dual-Variable-Domain* über eine zweite variable Domäne am N-Terminus realisiert (C. Wu *et al.*, 2007). Ebenso wie das Antikörper-Format JA0011 bzw. JA0024 handelt es sich bei diesem bispezifischen Antikörperderivat um einen Antikörper, der aus zwei Theophyllin bindenden *CrossFabs*

besteht, an den C-terminal ein weiterer Theo-bindender Fab über einen $(G_4S)_2$ -Linker fusioniert wurde. Anders als bei den Konstrukten JA0011 bzw. JA0024 wurde keine VH44-VL100 Disulfidbrücke zur Stabilisierung am zentralen anti-Theo-Fab eingeführt, da Vorversuche zeigten, dass die VH44-VL100 Disulfidbrücke in Kombination mit einer N-terminalen Verknüpfung an der variablen Domäne zu einer fehlerhaften bzw. nicht erfolgreichen Expression führt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Antigenbindung wird durch die *Dual-Variable-Domain* am N-Terminus der beiden Theo-Fabs realisiert. Die VH-Sequenz von anti-LeY oder anti-CD33 wurde über einen $(G_4S)_2$ -Linker N-terminal an die VH-Sequenz von anti-Theo fusioniert. Ebenso wurde die VL-Sequenz von anti-LeY oder anti-CD33 über einen $(G_4S)_2$ -Linker N-terminal an die VL-Sequenz von anti-Theo fusioniert. Hier wurde eine Stabilisierung der VH- und VL-Domäne von anti-LeY oder anti-CD33 wie bei JA0011 bzw. JA0024 durch eine VH44-VL100 Disulfidbrücke realisiert. Um eine korrekte Heterodimerisierung der leichten und schweren Ketten zu gewährleisten, wurden die oberen beiden Fabs des Antikörpers nach dem *CrossMab*-Prinzip entwickelt (Schaefer *et al.*, 2011). Dafür wurden die CH1- und die C κ -Domäne getauscht. Der Antikörper wurde, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, in HEK293-F Zellen transient exprimiert. Der Überstand wurde nach 7 Tagen von den Zellen getrennt und mittels Western-Blot auf erfolgreiche Expression der Antikörper-Formate untersucht. Zur Detektion wurde ein AP-konjugierter anti-human-kappa-light-chain Antikörper eingesetzt. Die schweren Ketten haben ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 65 kDa und die leichten Ketten haben ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 35 kDa. Sowohl bei dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper JA0022 als auch bei dem CD33-DIG-bispezifischen Antikörper JA0025 ist nur 1 Bande in Höhe des theoretisch erwarteten Molekulargewichts der schweren Ketten erkennbar. Die LCs enthalten keine C κ -Domäne, weshalb diese nicht durch den eingesetzten anti-human-kappa-light-chain Antikörper visualisiert werden können.

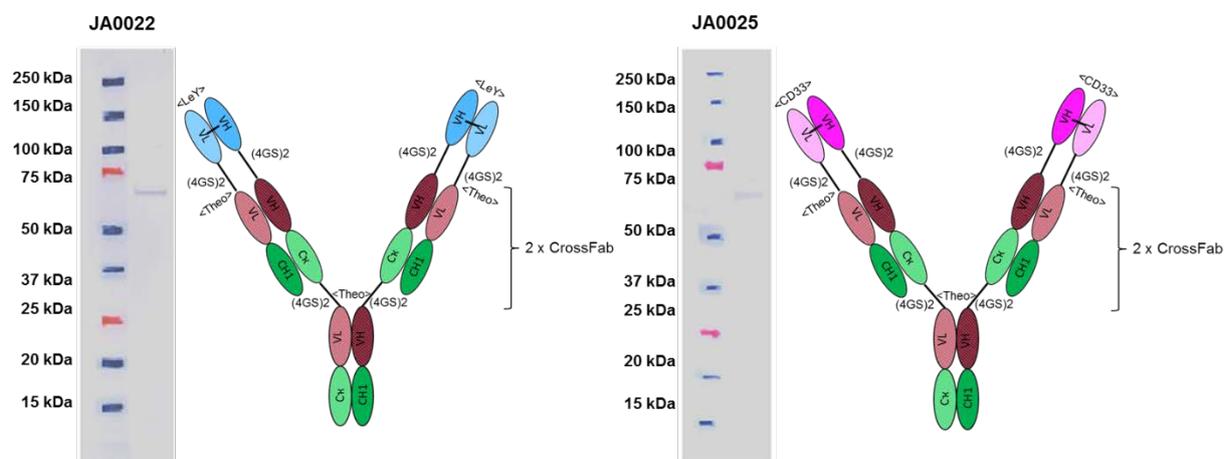


Abb. 3.3-5: Western Blot der Kulturüberstände und schematische Darstellung von JA0022 und JA0025

Um zu testen, ob die Antikörperketten exprimiert wurden und die erwartete Größe aufwiesen, wurde ein Western Blot der Kulturüberstände nach Antikörper-Expression und Zellernte durchgeführt. Dafür wurde eine reduzierende SDS-Page gemacht, welcher mittels einer Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) auf eine Nitrocellulosemembran geblottet wurde. Die Detektion erfolgte über Sekundärantikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert und gegen die humane LC und den humanen Fc-Teil gerichtet waren. Der Größenstandard wurde für die Darstellung mit Farbstift nachgezeichnet, da dieser nach Trocknung der Membran sonst kaum mehr sichtbar gewesen wäre.

Anschließend wurde der Überstand nur über Kappa-Select-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Auf eine präparative Größenausschlusschromatographie wurde aufgrund der geringen Ausbeute verzichtet. Aus 1 L des JA0022 Überstandes konnte 0.5 mg Antikörper gereinigt werden. Aus 1 L des JA0025 Überstandes konnte 1.8 mg Antikörper gereinigt werden.

3.3.4 Charakterisierung des Theo-trivalenten Triple-Fab

3.3.4.1 Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page

Die gereinigten Antikörper wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie analysiert. Für JA0022 und JA0025 wurden jeweils 20 µg gereinigtes Protein auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen und mit einer Flussrate von 1 mL/min getrennt. Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert. Es zeigte sich ein Hauptpeak, der dem gewünschten Antikörper mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa entspricht. Zusätzlich können ein HMW-Anteil, der Antikörper Di- bzw. Oligomere enthält, und ein LMW-Anteil, der beispielsweise Antikörper ohne HC oder LC enthält, gefunden werden. Bei JA0022 ist neben einem relativen Antikörper-Monomeranteil von 81.1 %, ein HMW-Anteil von 10.9 % und LMW-Anteil von 8.0 % detektierbar. Bei JA0025 ist der relative Antikörper-Monomeranteil mit 73.7 % etwa 7 % niedriger als bei JA0022. Außerdem ist mit 20.5 % ein höherer HMW-Anteil als bei JA0022 erkennbar.

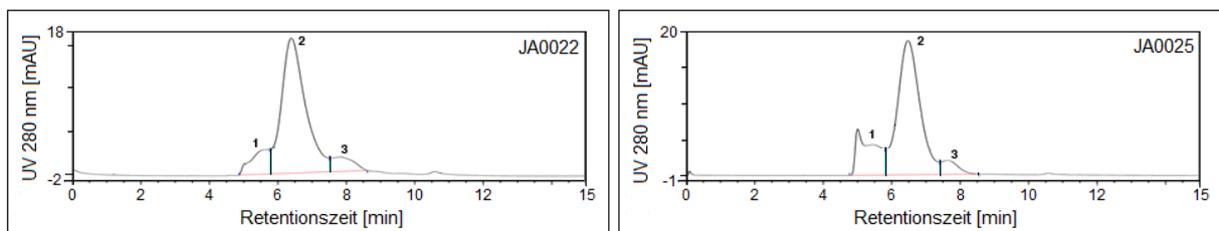


Abb. 3.3-6: Analytische Gelpermeationschromatographie der Theo-trivalenten Triple-Fabs

Die Überstände der Proben JA0022 und JA0025 wurden mittels Kappa-Select-Affinitätschromatographie gereinigt und in 20 mM His/ 140 mM NaCl pH 6.0 umgepuffert und konzentriert. Anschließend wurden die Endprodukte mittels analytischer SEC analysiert. Dafür wurden

je 20 µg gereinigtes Protein von JA0022 und JA0025 auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert und aufgeteilt. Eine Übersicht der Fraktionen ist in Tabelle 3.3.1 dargestellt. Peak 1 (HMW) ist die Fraktion, welche Oligomere des Antikörpers enthält. Peak 2 ist die Hauptfraktion, welche das Monomer des Antikörpers enthält und die letzte Fraktion unter Peak 3 enthält Antikörperbruchstücke bzw. Antikörper, welchem LC und/oder HC fehlt.

Peak-Nr.	Fraktion	JA0022 [area %]	JA0025 [area%]
1	HMW	10,9	20,5
2	Monomer	81,1	73,7
3	LMW	8,0	5,8

Tabelle 3.3.1: Fraktionen der analytischen SEC von JA0022 und JA0025

Für die Auswertung der Gelfiltrationschromatogramme wurde eine Kalibrierkurve aus dem Ergebnis des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad erstellt, anhand derer die Fraktionen der Proben identifiziert wurden. Es wurden dabei höhermolekulare Spezies (HMW), Antikörper-Monomer und niedermolekulare Spezies (LMW) unterschieden.

Zusätzlich zur analytischen SEC wurde noch eine SDS-Page gemacht. Dafür wurde je 8 µg gereinigtes Protein auf ein NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt. Bei beiden Antikörpern ist im nicht reduzierten Zustand eine Hauptbande bei etwa 200 kDa erkennbar. Daneben ist bei beiden eine deutliche Bande um 100 kDa erkennbar, was etwa dem Molekulargewicht des halben Antikörpers entspricht. Allein bei JA0022 sind noch einige schwache Banden zwischen 100 und 200 kDa vorhanden. Im reduzierten Zustand sind bei beiden Antikörpern die Banden in Höhe der leichten und schweren Ketten erkennbar.

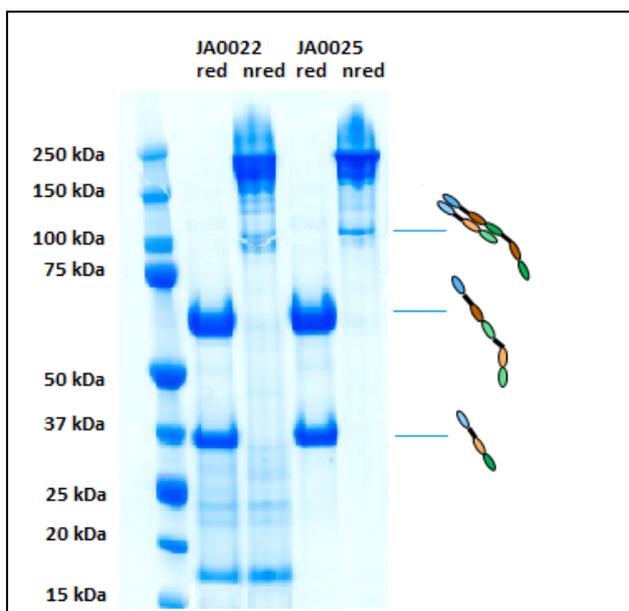


Abb. 3.3-7: SDS-Page der Theo-trivalenten Triple-Fabs

Die über Kappa-Select-Affinitätschromatographie gereinigten, umgepufferten und konzentrierten Produkte der Proben JA0022 und JA0025 wurden mittels SDS-Page analysiert. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Die Proben wurden reduziert und nicht reduziert auf ein NuPAGE® 4 – 12 % Bis-Tris Gel aufgetragen. Neben den Proben wurden 10 µL Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) als Größenstandard mitgeführt.

Ebenso wie der korrespondierende DIG-trivalente LeY-bindende Antikörper JA0011 (3.2.2.1) mit etwa 40 % zeigt der Theo-trivalente LeY-bindende Antikörper JA0022 mit etwa 19 % einen relativ hohen Anteil an unerwünschten Antikörper-Nebenprodukten.

3.3.4.2 Massenspektrometrie

Die Molekularmassen der einzelnen leichten und schweren Ketten sowie die Gesamtmassen der Antikörper wurden mittels ESI-Massenspektrometrie untersucht. Für die Bestimmung der Molekularmassen der leichten und schweren Ketten wurden die Antikörper mit TCEP reduziert. Vor der Analyse mittels ESI-qTOF-MS wurden die Proben noch entsalzt.

		Theoretisches Mw [Da]	Experimentelles Mw [Da]
JA0022	Gesamt	197780	197788
	LC	36083	36082
	HC-1	63158	63156
	HC-2	62499	62496
JA0025	Gesamt	196582	196587
	LC	35855	35855
	HC-1	62787	62787
	HC-2	62127	62127

Tabelle 3.3.2: Massenspektrometrische Ergebnisse der Antikörperkonstrukte JA0022 und JA0025

Die aufgereinigten Proben von JA0022 und JA0025 wurden mittels ESI-MS analysiert und ausgewertet. Für die Bestimmung der molekularen Massen von leichter und schwerer Kette wurden die Proben mit TCEP reduziert. In der Tabelle ist auf der linken Seite das aus der Aminosäuren Abfolge berechnete theoretische Molekulargewicht aufgeführt. Auf der rechten Seite ist das mittels MS experimentell ermittelte Molekulargewicht dargestellt.

Sowohl bei JA0022 als auch bei JA0025 konnten sowohl die Molekulargewichte der einzelnen leichten und schweren Ketten als auch die molekularen Gesamtmassen der Antikörper experimentell bestätigt werden. Bei beiden Antikörpern wurde neben dem vollen Antikörper deutliche Anteile von halbem Antikörper festgestellt, welcher hauptsächlich aus der HC, die nur die C κ -Domäne enthält (entspricht HC-1), und einer LC besteht. Außerdem wurde im reduzierten Zustand bei JA0022 eine unbekannte Masse von 13789 Da und bei JA0025 eine von 27683 Da detektiert.

3.3.5 Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MCF-7 Zellen

Um nachzuweisen, dass die Theo-trivalenten Antikörper sowohl spezifisch an das Target als auch gleichzeitig an eine haptenylierte Payload binden können, wurde die Durchflusszytometrie genutzt. Hierfür wurden die bispezifischen Theo-trivalenten Antikörper für 1 h bei RT im Dunkeln mit einem FITC-konjugierten anti-human-kappa-LC Sekundärantikörper oder mit Theo-Cy5 als fluoreszierende Payload vorinkubiert. Die bispezifischen Theo-trivalenten Antikörper wurden mit dem Sekundärantikörper in äquimolarem Verhältnis und mit Theo-Cy5 in einem Antikörper-Payload-Verhältnis von 1:3 vorinkubiert. Der vorbereitete Antikörper-Sekundärantikörper- oder Antikörper-Theo-Cy5-Mix wurde in einer finalen Konzentration des bispezifischen Theo-trivalenten Antikörpers von 3.43 nM zu den Zellen gegeben und 45 Minuten auf Eis inkubiert, um eine Internalisierung der Antikörper zu verhindern. Es wurde außerdem je ein Ansatz mitgeführt, bei dem der Sekundärantikörper bzw. die fluoreszierende Payload Theo-Cy5 ohne weiteren Antikörper zu den MCF-7 Zellen gegeben wurde. Die Messung wurde an einem BD FACSCanto II™ (BD Biosciences) durchgeführt. Die Bindung der bispezifischen Theo-trivalenten Antikörper an das LeY-Target auf MCF-Zellen wurde mittels FITC-konjugiertem anti-human-kappa-LC Sekundärantikörper nachgewiesen, der im FITC-Kanal analysiert werden konnte. Um nachzuweisen, dass bei gleichzeitiger Bindung der Theo-Payload auch weiterhin die LeY-Target-Bindung möglich ist, wurde Theo-Cy5 als Payload verwendet, welche im Cy5-Kanal detektiert werden konnte. MCF-7 Zellen, die mit dem LeY-bindenden Theo-trivalenten Antikörper JA0022 und Sekundärantikörper (Abb. 3.3-8-A) oder Theo-Cy5 (Abb. 3.3-8-B) inkubiert wurden, zeigten ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den Kontrollen. Das belegt, dass sowohl die Target-Bindung als auch die Theophyllin Bindung grundsätzlich funktionell ist und beide gleichzeitig binden können. Eine Aussage über die Anzahl der funktionellen Bindungsstellen ist mittels dieser Ergebnisse allerdings nicht möglich.

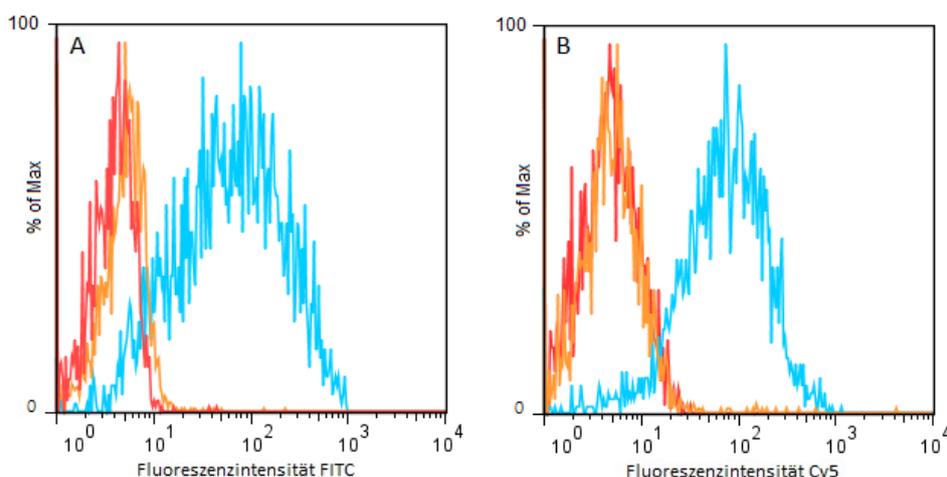


Abb. 3.3-8: FACS der bispezifischen Theo-bindenden Antikörperkonstrukte auf MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden ohne Antikörper (-- **allele**) oder mit LeY-bindendem Theo-Triple-Fab (-- **JA0022**) oder CD33-bindendem Theo-Triple-Fab (-- **JA0025**) inkubiert und mittels FACS analysiert. **A** Detektion mittels Sekundärantikörper, welcher an die hu-kappa-LC bindet **B** Detektion mittels Theo-Cy5

3.3.6 Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe an MOLM-13 Zellen

Die bispezifischen Theo-trivalenten Antikörper wurden außerdem auf MOLM-13 Zellen, welche das myeloide Oberflächenantigen CD33 exprimieren mittels Durchflusszytometrie getestet. Dadurch sollte gezeigt werden, dass der bispezifische Theo-trivalente Antikörper auch auf einer anderen Zelllinie mit einem anderen Target funktionell ist. Der Versuch wurde, ähnlich dem Versuch mit MCF-7 Zellen, wie unter 3.3.5 beschrieben, durchgeführt. Der CD33-bindende Triple-Fab JA0025 zeigt sowohl mit dem Sekundärantikörper (Abb. 3.3-9-A) als auch mit Theo-Cy5 (Abb. 3.3-9-B) ein deutlich erhöhtes zellassoziertes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den beschriebenen Kontrollen. Das belegt, dass das Recruiting der Payload Theo-Cy5 durch den entwickelten bispezifischen Theo-trivalenten Antikörper auch auf andere Antikörper bzw. Antigene und Zellen angewendet werden kann.

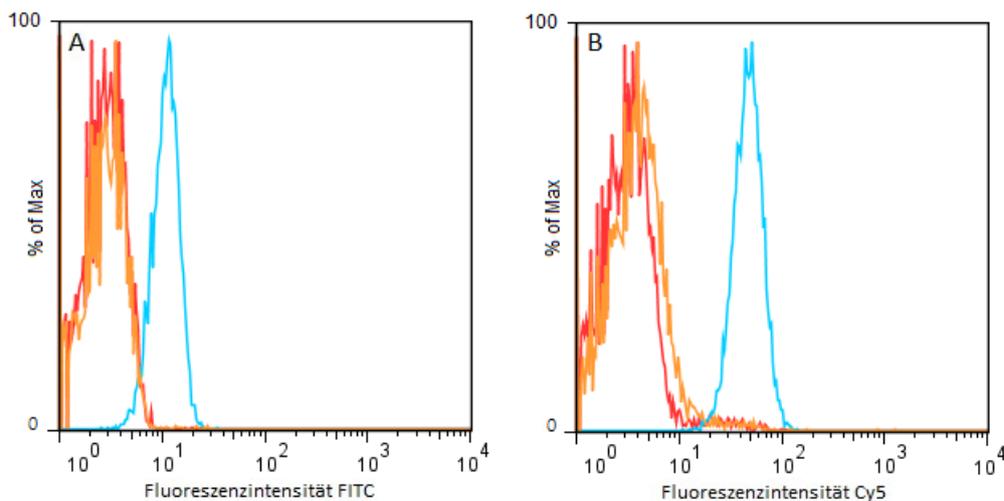


Abb. 3.3-9: FACS-Analyse der bispezifischen Theo-bindenden Antikörperkonstrukte auf MOLM-13

MOLM-13 Zellen wurden ohne Antikörper (-- **allele**) oder mit CD33-bindendem Theo-Triple-Fab (-- **JA0025**) oder LeY-bindendem Theo-Triple-Fab (-- **JA0022**) inkubiert und mittels FACS analysiert. **A** Detektion mittels Sekundärantikörper, welcher an die hu-kappa-LC bindet **B** Detektion mittels Theo-Cy5

3.3.7 Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur

Die Fähigkeit der bispezifischen Theo-trivalenten Antikörper LeY-positive Brustkrebszellen töten zu können, wurde mit dem Toxin, welches sich in den Vorversuchen (3.1.2.2 und 3.1.2.3)

als wirksamstes herausgestellt hat, in Zellkultur untersucht. Außerdem sollte durch den Vergleich mit dem DIG-trivalenten LeY-bindenden Antikörper JA0011 gezeigt werden, ob die Zytotoxizität der beiden LeY-bindenden Antikörper JA0011 und JA0022 vergleichbar sind. JA0011 hat drei Bindestellen für das DIG-Toxin und JA0022 hat drei Bindestellen für das Theo-Toxin. Der einzige Unterschied der Antikörper ist, dass JA0011 am zentralen Fab eine stabilisierende VH44-VL100 Disulfidbrücke hat, die Anzahl der Toxinmoleküle pro Antikörper ist gleich. Für die Zytotoxizitätsversuche in Zellkultur wurde die bereits zur FACS-Analyse verwendete MCF-7 Zelllinie verwendet. Mittels FACS konnte bereits gezeigt werden, dass der LeY-bindende Theo-trivalente Antikörper JA0022 spezifisch an diese Zelllinie bindet. Der bispezifische Theo-trivalente Antikörper wurde in einem Theo-Toxin:Antikörper-Verhältnis von 3:1 24 h bei 4 °C inkubiert und anschließend auf die Zellen aufgebracht. Als Negativkontrolle bzw. Isotypkontrolle zum Nachweis der unspezifischen Toxizität wurde der auch bereits im FACS verwendeten CD33-bindende Theo-trivalente Antikörper JA0025 verwendet, welcher ebenso mit dem Theo-Toxin vorinkubiert wurde. Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen der Theo-Saporin-Antikörper-Komplexe 96 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität bestimmt.

Aus den gewonnenen Daten wurde der IC50-Wert nach Formel 2.2-2 bestimmt.

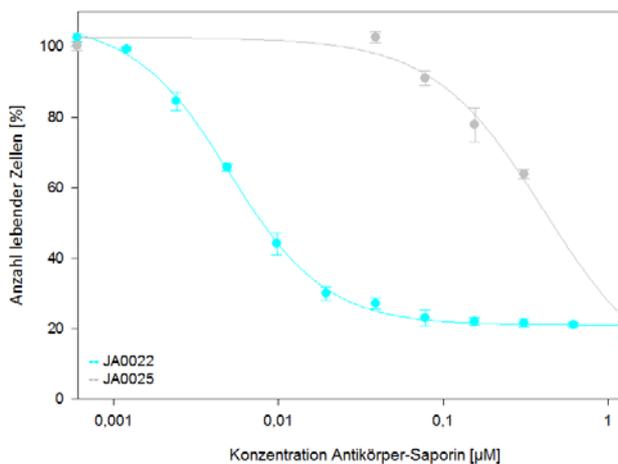


Abb. 3.3-10: Zytotoxizität des bispezifischen Theo-bindenden Antikörperkonstrukts

Um die Spezifität, die biologische Wirksamkeit des Theo-Toxin-Antikörper-Komplexes zu untersuchen, wurden dieser auf der LeY-positiven Zelllinie MCF-7 getestet. Die MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format bei etwa 20 % Konfluenz mit verschiedenen Konzentrationen des Theo-Toxin-Antikörper-Komplexes 96 h inkubiert. Anschließend wurden 100 µL des CellTiter-Glo®-Reagenz pro Well dazugegeben und das Lumineszenz-Signal an einem Mikrotiterplatten-Reader ausgelesen. Die Lumineszenz ist ein Maß für den ATP-Gehalt, welcher proportional zur Anzahl lebender Zellen ist und wurde hier auf eine prozentuale Skala normiert, die gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen ist. Alle Messpunkte wurden in dreifacher Ausführung bestimmt. Die Linien beschreiben die Anpassung an die experimentellen Daten, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen

Messwerte dar. Der IC₅₀-Wert des Theo-Triple-Fab JA0022 wurde mit der Formel 2.2-2 berechnet und liegt bei 5.07 nM.

Theo-Saporin wurde mit dem jeweiligen Antikörper in einer Toxinkonzentration von 1.25 bis 0.0006 µM aufgetragen. Der DIG-trivalente LeY-bindende Antikörper JA0011 zeigt für DIG-Saporin eine IC₅₀ von 4.53 nM. Der Theo-trivalente LeY-bindende Antikörper JA0022 zeigt für Theo-Saporin eine IC₅₀ von 5.07 nM. Das weist zum einen darauf hin, dass der Theo-trivalente LeY-bindende Antikörper JA0022 erfolgreich das Theophyllin markierte Saporin wie auch das Oberflächenantigen LeY binden und internalisiert werden kann und zum anderen, dass eine Kopplung von Theophyllin genauso wenig wie eine Kopplung von Digoxigenin an Saporin die Zytotoxizität nach Internalisierung beeinträchtigt.

3.3.8 Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit sollte ein alternatives Hapten zu Digoxigenin gefunden werden, da es ein Aglykon des bekannten „Herzglykosids“ Digoxin ist, welches in der Therapie mit den zielgerichteten anti-Payload-Antikörpern möglicherweise die Herzfunktion beeinträchtigen könnte und außerdem die Bildung Hapten abhängiger anti-Payload-Antikörper bei therapeutischer Anwendung auftreten könnten. Es wurde Theophyllin als alternatives Hapten charakterisiert. Die Proteinsequenz für die leichte und schwere Kette des Theophyllin bindenden Antikörpers wurden isoliert und humanisiert. Für die Affinitätsbestimmung der Theophyllin-Bindung wurde ein bispezifischer Theo-monovalenter dsscFv generiert, welcher eine KD von 1.1 nM in der SPR-Spektroskopie zeigte. Damit besitzt der anti-Theo-Antikörper eine etwa 10fach höhere Affinität als der anti-DIG-Antikörper. Analog der DIG-spezifischen Antikörperderivate wurde ein Format mit 3 Theophyllin-Bindungsstellen und 2 Antigen-Bindungsstellen entwickelt (Abb. 3.3-1). Der Antikörper besaß sowohl eine Spezifität für das Antigen LeY oder CD33 als auch für das Hapten Theophyllin. Mit dem Theo-trivalenten LeY/CD33 Triple-Fab wurde ein ähnliches Antikörperkonstrukt wie JA0011/ JA0024 generiert, bei welchem die DIG-Bindung über 2 *CrossFabs* mit einem C-terminal angehängten Fab realisiert wird und die Antigenbindung über 2 DVDs, welche N-terminal an die *CrossFabs* fusioniert wurden. Der Theo-trivalente Triple-Fab wies im Vergleich zu dem DIG-trivalenten Triple-Fab für LeY mit etwa 0.5 mg/ L eine 85 % niedrigere Ausbeute, für CD33 eine etwa 60 % niedrigere Ausbeute auf. Der mit der SEC bestimmte Monomeranteil lag bei dem Theo-trivalenten LeY Triple-Fab allerdings trotzdem etwa 20 % höher als bei dem DIG-trivalenten LeY Triple-Fab. Der Theo-trivalente CD33 Triple-Fab zeigte in der analytischen SEC einen etwa 10 % geringeren Monomeranteil im Vergleich zu dem DIG-trivalenten CD33 Triple-Fab. Mittels ESI-MS konnte die Identität der Gesamtantikörper und der einzelnen schweren und leichten Ketten bestätigt werden. Die targetspezifische Bindung konnte bei beiden Theo-

trivalenten Triple-Fabs mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass die Antikörperkonstrukte JA0022 und JA0025 nicht nur an das Target LeY oder CD33, sondern auch gleichzeitig an die fluoreszierende Payload Theo-Cy5 binden können. Anhand von Zellviabilitätsassays mit MCF-7 Zellen sollte festgestellt werden, wie hoch die Toxizität des Antikörpers ist, wenn an diesen die toxische Payload Theo-Saporin gekoppelt wird. Mit einer IC50 von 5.07 nM ist diese mit der IC50 des DIG-trivalenten Triple-Fab JA0011 vergleichbar. Das Bindungsverhalten des Antikörper JA0022 an Theo-Saporin und das Oberflächenantigen LeY und die intrazelluläre Wirkung des Theo-Saporin scheint somit vergleichbar zu dem DIG-trivalenten Triple-Fab JA0011 mit DIG-Saporin zu sein.

3.4 Trispezifische Digoxigenin und Theophyllin bindende Antikörperderivate

Neben den Antikörperderivaten, die entweder eine DIG-Payload oder eine Theo-Payload binden können, wurde außerdem ein trispezifischer Antikörper entwickelt (Abb. 3.4-1) und getestet, der neben dem Zielantigen sowohl eine DIG-Payload als auch eine Theo-Payload binden kann. Dieses Format wäre v.a. zur Testung additiver oder synergistischer Effekte zweier Payloads von Nutzen.

Trispezifischer DIG-Theo-LeY/CD33-Antikörper

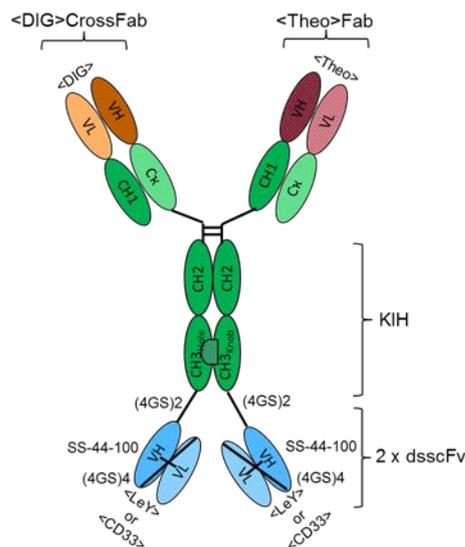


Abb. 3.4-1: Schema des hergestellten trispezifischen DIG-Theo-LeY/CD33-Antikörpers

3.4.1 Expression und Reinigung des trispezifischen DIG-Theo-Antikörpers

Ausgehend von den DIG- und Theo-trivalenten Antikörperkonstrukten wurde ein weiteres Antikörperkonstrukt entwickelt, welches neben dem Antigen sowohl eine DIG- als auch eine Theo-Payload binden kann. Dieses Format basiert auf einem IgG, dessen einer „Arm“ eine DIG-Payload und dessen anderer „Arm“ eine Theo-Payload binden kann. Um die richtige Kombination der schweren Ketten zu gewährleisten, wurde in der CH3-Region die *Knob-into-Hole*-Strategie verwendet, welche bereits seit mehreren Jahren erfolgreich angewendet wird, um das *Mispairing* von Antikörperketten zu vermeiden (Ridgway *et al.*, 1996)(Merchant *et al.*, 1998). Die „*Knob*“-Mutation (T366W) wurde, wie bei den Konstrukten JA0015 und JA0029, in die CH3-Domäne der einen HC eingefügt und drei „*Hole*“ Mutationen (T366S, L368A, and Y407V) wurden in die CH3-Domäne der anderen HC eingefügt (Atwell *et al.*, 1997). Außerdem wurde mit der S354C Mutation auf der „*Knob*“-Seite und der Y349C Mutation auf der „*Hole*“-Seite eine zusätzliche Disulfidbrücke zur Stabilisierung eingefügt (Carter, 2001). Um die korrekte Heterodimerisierung der leichten und schweren Ketten zu gewährleisten, wurde wie bei den Konstrukten JA0011 und JA0024 der DIG-Fab des Antikörpers nach der *CrossMab*-Strategie entwickelt (Schaefer *et al.*, 2011), was heißt, dass die CH1 und die C κ -Domäne getauscht wurden. Die dritte Spezifität wurde durch einen LeY-bindenden oder CD33-bindenden dsscFv, der C-terminal an beide schweren Ketten über einen (G₄S)₂-Linker fusioniert wurde, realisiert. Die VH- und VL-Domäne des scFv, welcher über einen (G₄S)₄-Linker verbunden war, wurde über eine VH44-VL100 Disulfidbrücke stabilisiert (Jung *et al.*, 1994)(Reiter *et al.*, 1996). Der Antikörper wurde, wie unter 2.2.3.4 beschrieben, in HEK293-F Zellen transient exprimiert. Der Überstand wurde nach 7 Tagen von den Zellen getrennt und mittels Western-Blot auf erfolgreiche Expression der Antikörper-Formate untersucht (Abb. 3.4-2). Die schweren Ketten haben ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 75 kDa und die leichten Ketten ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 25 kDa. Sowohl bei dem LeY-DIG-Theo-trispezifischen mAb JA0020 als auch bei dem CD33-DIG-Theo-trispezifischen mAb JA0028 ist sowohl eine Bande in Höhe des theoretisch zu erwartenden Molekulargewichts der schweren als auch der leichten Kette erkennbar.

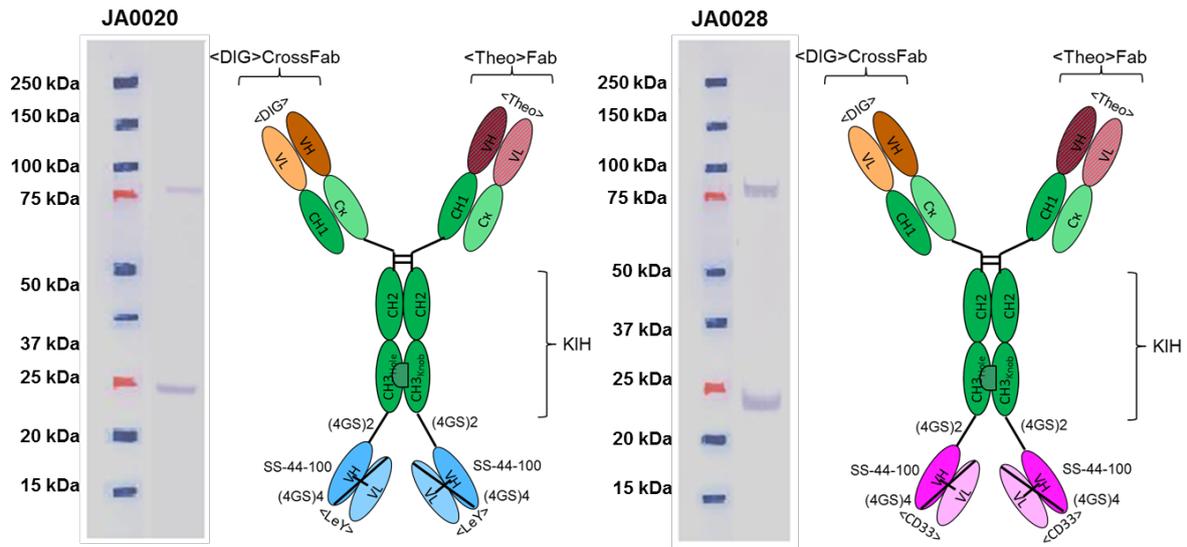


Abb. 3.4-2: Western Blot der Kulturüberstände und schematische Darstellung von JA0020 und JA0028

Um zu testen, ob die Antikörperketten exprimiert wurden und die erwartete Größe aufwiesen, wurde ein Western Blot der Kulturüberstände nach Antikörper-Expression und Zellernte durchgeführt. Die Detektion erfolgte über AP-konjugierte Sekundärantikörper, die gegen die humane LC oder gegen den humanen Fc-Teil gerichtet waren. Der Größenstandard wurde für die Darstellung mit Farbstift nachgezeichnet, da dieser nach Trocknung der Membran sonst kaum mehr sichtbar gewesen wäre.

Die Zellüberstände wurden über Protein-A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluss wurde eine präparative Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Aus 1 L des JA0020 Überstandes und 1L des JA0028 Überstandes konnte je 1.1 mg Antikörper gereinigt werden.

3.4.2 Charakterisierung des trispezifischen DIG-Theo-Antikörpers

3.4.2.1 Analytische Größenausschlusschromatographie und SDS-Page

Die gereinigten Antikörper wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie analysiert. Für JA0020 und JA0028 wurden jeweils 22 µg gereinigtes Protein auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Es zeigte sich, dass der Hauptpeak dem gewünschten Antikörper mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa entspricht. Daneben finden sich bei dem DIG-Theo-CD33 mAb J0028 allerdings auch höhermolekulare Spezies, wie Antikörper Di- bzw. Oligomere, und niedrigmolekulare Spezies, wie beispielsweise Antikörper, denen eine LC, eine HC o.ä. fehlt. Bei JA0020 ist eine kleine Schulter vor und etwas Tailing nach dem Hauptpeak erkennbar. Da eine genaue Abgrenzung dieser Anteile nicht vorgenommen werden konnte, wurden diese nicht integriert, d.h. der DIG-Theo-LeY mAb JA0020 enthält möglicherweise ebenso einen geringen LMW und HMW-Anteil, welcher aber aufgrund der

Auflösung der Säule nicht genau bestimmt werden kann und der Monomergehalt somit 100 % beträgt. Der DIG-Theo-CD33 mAb zeigt einen deutlichen HMW-Anteil von 7 % und einen LMW-Anteil von 3.7 %.

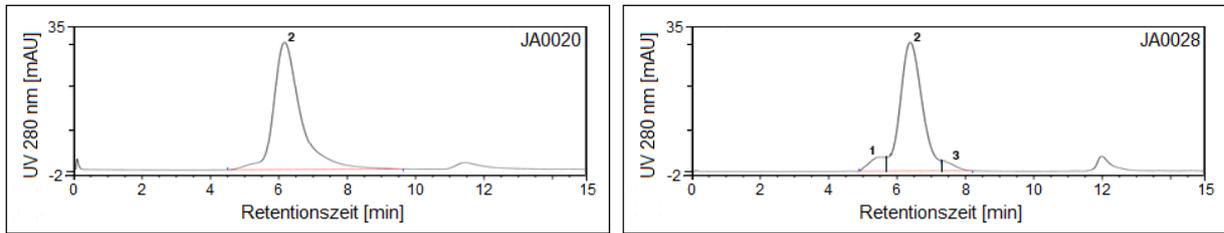


Abb. 3.4-3: Analytische Gelpermeationschromatographie der trispezifischen DIG-Theo- LeY/CD33-Antikörper

Die Überstände der Proben JA0020 und JA0028 wurden mittels Kappa-Select-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie gereinigt und in 20 mM His/140 mM NaCl pH 6.0 umgepuffert und konzentriert. Diese Endprodukte wurden mittels analytischer SEC analysiert. Dafür wurden je 22 µg gereinigtes Protein von JA0020 und JA0028 auf eine TSK3000 SWXL aufgetragen. Die Fraktionen wurden anhand des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad identifiziert und aufgeteilt. Eine Übersicht der Fraktionen ist in Tabelle 3.4.1 dargestellt. Peak 1 (HMW) ist die Fraktion, welche Oligomere des Antikörpers enthält. Peak 2 ist die Hauptfraktion, welche das Monomer des Antikörpers enthält und unter die letzte Fraktion unter Peak 3 (LMW) enthält Antikörperbruchstücke bzw. Antikörper, welchem LC und/oder HC fehlt.

Peak-Nr.	Fraktion	JA0020 [area %]	JA0028 [area%]
1	HMW	—	7,0
2	Monomer	100	89,3
3	LMW	—	3,7

Tabelle 3.4.1: Fraktionen der analytischen SEC von JA0020 und JA0028

Die SEC wurde wie in Abb. 3.4-3 beschrieben durchgeführt. Für die Auswertung der Chromatogramme wurde eine Kalibrierkurve aus dem Ergebnis des Gelfiltrationsstandards von Bio-Rad erstellt, anhand derer die Fraktionen der Proben identifiziert wurden. Es wurden dabei höhermolekulare Spezies (HMW), Antikörper-Monomer und niedrigmolekulare Spezies (LMW) unterschieden.

Zusätzlich zur analytischen SEC wurde noch eine SDS-Page gemacht. Dafür wurde je 8 µg gereinigtes Protein auf ein NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt. Bei beiden Antikörpern ist im nicht reduzierten Zustand eine Hauptbande bei etwa 200 kDa erkennbar, was dem gesamten Antikörper entspricht. Darunter ist eine Bande bei etwa 150 kDa zu sehen, welche wahrscheinlich dem Antikörper ohne LCs zuzuordnen ist. Daneben ist bei beiden eine schwache Bande eines Antikörperbruchstücks um etwa 40 kDa erkennbar, was möglicherweise einem LC-Dimer entsprechen könnte. Im reduzierten Zustand sind bei beiden Antikörpern die Banden in Höhe der schweren Ketten erkennbar – allerdings sind die leichten Unterschiede im Molekulargewicht nicht trennbar, da

die Auflösung des Gels in diesem Massenbereich nicht hoch genug ist. Ebenso sind bei beiden Antikörpern die Banden in Höhe der leichten Ketten vorhanden und auch trennbar, da die Auflösung in dem unteren Massenbereich deutlich besser als im oberen ist. Die untere Bande entspricht der DIG-LC und die obere der Theo-LC.

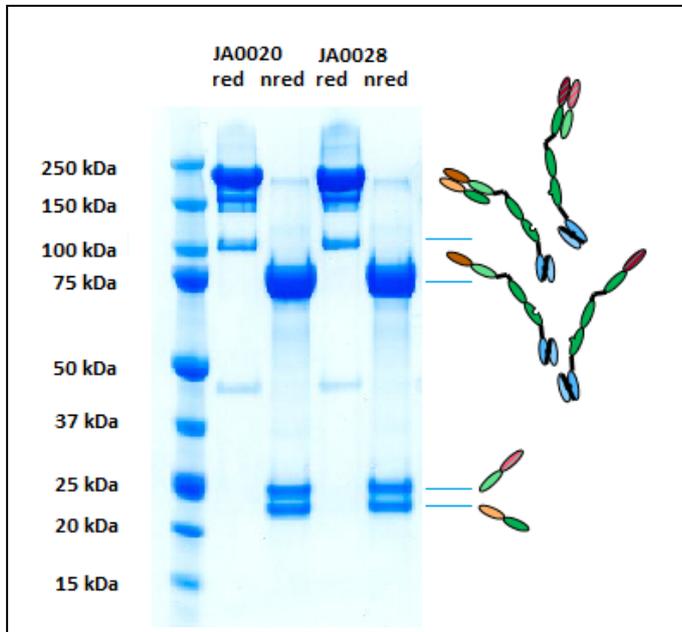


Abb. 3.4-4: SDS-Page der trispezifischen DIG-Theo-LeY/CD33 *Knob-into-Hole-Variable-Domain* Antikörperkonstrukte

Die über Kappa-Select-Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie gereinigten, umgepufferten und konzentrierten Produkte der Proben JA0020 und JA0028 wurden mittels SDS-Page analysiert. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Die Proben wurden reduziert und nicht reduziert auf ein NuPAGE® 4 – 12 % Bis-Tris Gel aufgetragen. Neben den Proben wurden 10 µL Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad) als Größenstandard mitgeführt.

3.4.2.2 Massenspektrometrie

Die Antikörperderivate setzen sich aus jeweils 2 unterschiedlichen leichten als auch schweren Ketten zusammen. Die Molekularmassen dieser einzelnen Ketten sowie die Gesamtmassen der Antikörper wurden mittels ESI-Massenspektrometrie untersucht. Für die Bestimmung der Massen wurden die Antikörper standardmäßig mit N-Glycosidase F deglykosiliert oder mit N-Glycosidase F deglykosiliert und TCEP reduziert, wenn die molekularen Massen von leichter und schwerer Kette bestimmt werden sollten. Nach dem Verdau wurden die Proben entsalzt und mittels ESI-qTOF-MS untersucht.

		Theoretisches Mw [Da]	Experimentelles Mw [Da]
JA0020	Gesamt	201138	201172
	LC-1	24201	24201
	LC-2	22356	22356
	HC-1	76556	76561
	HC-2	78070	78075
JA0028	Gesamt	199940	199948
	LC-1	24201	24201
	LC-2	22356	22356
	HC-1	75956	75956
	HC-2	77473	77473

Tabelle 3.4.2: Massenspektrometrische Ergebnisse der Antikörperkonstrukte JA0020 und JA0028

Die aufgereinigten Proben von JA0020 und JA0028 wurden mittels ESI-MS analysiert und ausgewertet. Für die Bestimmung der Gesamtmasse wurden die Proben deglykosiliert. Für die Bestimmung der molekularen Massen von leichter und schwerer Kette wurden die Proben deglykosiliert und reduziert. In der Tabelle ist auf der linken Seite das aus der Aminosäuren Abfolge berechnete theoretische Molekulargewicht aufgeführt. Auf der rechten Seite ist das mittels MS experimentell ermittelte Molekulargewicht dargestellt.

Bei JA0020 konnten nur die Molekulargewichte der einzelnen leichten Ketten im reduzierten Zustand experimentell bestätigt werden. Die Molekulargewichte der einzelnen schweren Ketten sind um etwa 5 Da im Vergleich zum theoretischen Molekulargewicht zu hoch. Auch die Gesamtmasse im nicht reduzierten Zustand ist bei der experimentellen Bestimmung etwa 30 Da zu hoch. Die Messungengenauigkeit der Methode durch einen Kalibrationsfehler liegt für den gesamten Antikörper mit einer Masse von etwa 200 kDa im Bereich von ± 10 Da, was heißt, dass bei der Expression des Antikörpers bzw. der schweren Ketten ein Fehler aufgetreten sein muss. Ebenso wie bei JA0020 konnte bei dem DIG-Theo-CD33 mAb JA0028 im deglykosilierten Zustand die Molekulargewichte der einzelnen leichten Ketten mittels MS-Analytik bestätigt werden. Darüber hinaus konnten auch die Massen der schweren Ketten und des Gesamtantikörpers im nicht reduzierten Zustand verifiziert werden. Bei beiden Antikörpern lagen neben dem vollen Antikörper Anteile von halbem Antikörper, HC-Heterodimer und LC-Heterodimer vor.

3.4.3 Bindung der Antikörper-Payload-Komplexe auf MOLM-13 Zellen

Zum Nachweis der targetspezifischen Bindung der Antikörperkonstrukte und um zu belegen, dass der Antikörper gleichzeitig sowohl das Target, eine DIG- als auch eine Theo-Payload binden kann, wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Da sich in der massenspektrometrischen Analytik herausgestellt hat, dass der trispezifische DIG-Theo-LeY

mAb nicht die Sollmasse besitzt und Vorversuche mittels FACS zeigten, dass die LeY-Bindung nicht funktionell ist (Daten nicht abgebildet), wurde der trispezifische DIG-Theo-CD33 mAb auf MOLM-13 Zellen getestet. Hierfür wurden die trispezifischen DIG-Theo-LeY bzw. -CD33 mAbs für 1 h bei RT im Dunkeln mit einer oder mehreren fluoreszierenden Payloads oder einem FITC-konjugierten anti-human-kappa-LC Sekundärantikörper vorinkubiert. Um die simultane Kopplung unterschiedlich haptenylierter Payloads an die beiden Haptenbindungsstellen zu zeigen, wurden zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe benötigt. Hierfür wurde Theo-markiertes Cy5 und Alexa Fluor 488-Streptavidin, welches an biotinyliertes DIG gebunden wurde, verwendet. Das Alexa Fluor 488-Streptavidin-Konjugat wurde mit dem Bi-DIG in einem molaren Verhältnis von 1:3 10 min bei RT vorinkubiert. Der trispezifische DIG-Theo-LeY und DIG-Theo-CD33 mAb wurden mit dem Sekundärantikörper oder mit Theo-Cy5 und Alexa Fluor 488-Streptavidin-Bi-DIG-Konjugat in äquimolarem Verhältnis vorinkubiert. Die MOLM-13 Zellen wurden in einer 96-well Rundbodenplatte in einer finalen Dichte von 3×10^5 ausgesät. Mit den Zellen wurde auf Eis der vorbereitete Antikörper-Sekundärantikörper-Mix oder die beiden anderen Fluoreszenz-Payloads, welche einzeln oder gleichzeitig mit dem trispezifischen DIG-Theo-LeY/CD33 mAb vorinkubiert wurden, in einer finalen Antikörperkonzentration von 10.29 nM inkubiert. Die Inkubation erfolgte auf Eis, um eine Internalisierung der Antikörper zu verhindern. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 100 μ L 1x PBS pH 7.4 gewaschen und für die Analyse in 100 μ L 1x PBS resuspendiert. Für die Bestimmung des Hintergrundsignals wurde je ein Ansatz mitgeführt, bei dem der Sekundärantikörper bzw. die fluoreszierende Payload Theo-Cy5 oder Alexa Fluor 488-Streptavidin-Bi-DIG ohne weiteren Antikörper zu den MOLM-13 Zellen gegeben wurde. Die Messung wurde an einem BD FACSCanto II™ (BD Biosciences) durchgeführt. Der FITC-konjugierte anti-human-kappa-LC Sekundärantikörper wurde verwendet, um die Bindung des trispezifischen DIG-Theo-CD33 mAbs an das CD33-Target auf MOLM-13-Zellen nachzuweisen und konnte im FITC-Kanal analysiert werden. Um nachzuweisen, dass bei gleichzeitiger Bindung der Theo-Payload auch weiterhin die CD33-Target-Bindung möglich ist, wurde Theo-Cy5 als Payload verwendet, welche im Cy5-Kanal detektiert werden konnte. Um nachzuweisen, dass bei gleichzeitiger Bindung der DIG-Payload auch weiterhin die CD33-Target-Bindung möglich ist, wurde ein Alexa Fluor 488-Streptavidin-Konjugat verwendet, welches mit Bi-DIG komplexiert wurde und im FITC-Kanal detektiert werden konnte. Die Inkubation der MOLM-13 Zellen zeigt mit Sekundärantikörper alleine oder mit fluoreszierender Payload ohne trispezifischen Antikörper zeigt kein erhöhtes Fluoreszenzsignal (Daten nicht abgebildet). Einzig der CD33-bindende DIG-Theo-trivalente Antikörper JA0028 zeigt erhöhte zellassoziierte Fluoreszenzsignale. Sowohl mit Theo-Cy5 (Abb. 3.4-5-Q1) und Alexa Fluor 488-Streptavidin-Bi-DIG (Abb. 3.4-5-Q3) allein als auch mit beiden fluoreszierenden Payloads gemeinsam (Abb. 3.4-5-Q2) war ein deutlich erhöhtes Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den

beschriebenen Kontrollen erkennbar. Das belegt, dass sowohl die Target-Bindung als auch die gleichzeitige Bindung der Theo- und DIG-Payload funktionell ist.

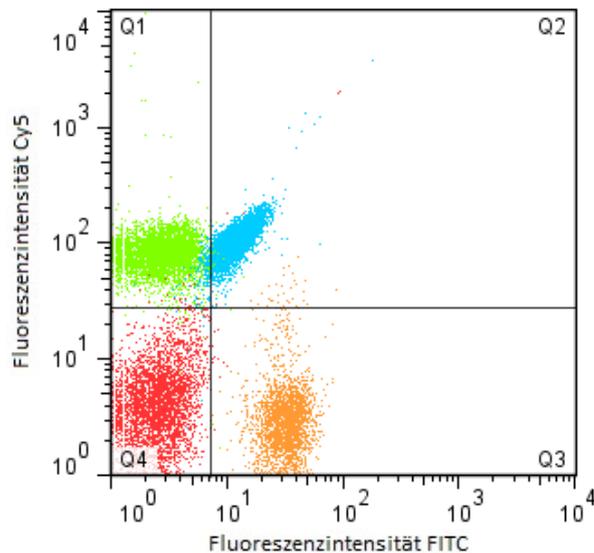


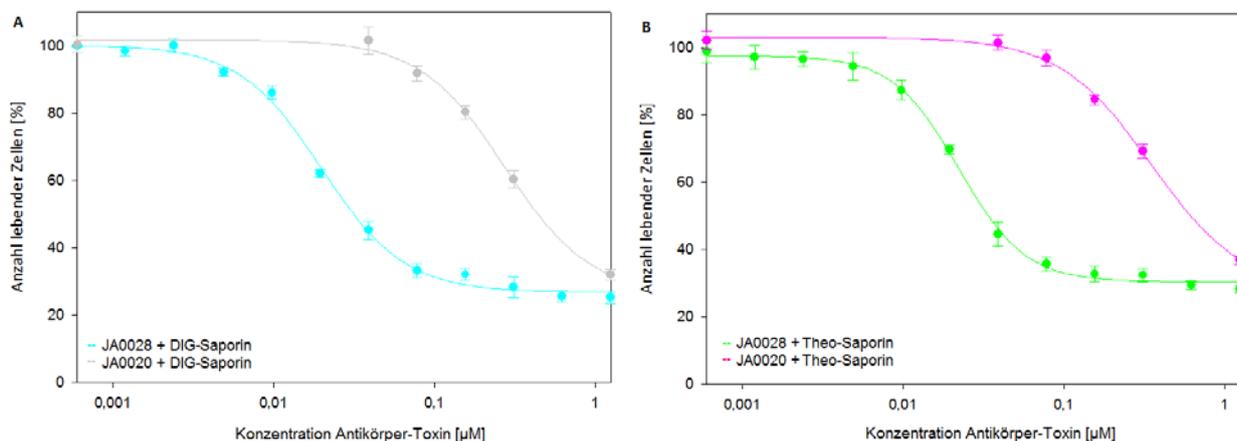
Abb. 3.4-5: FACS-Analyse des trispezifischen DIG-Theo-bindenden Antikörperkonstrukts auf MOLM-13

Um festzustellen, ob eine gleichzeitige Bindung aller drei Spezifitäten möglich ist, wurden MOLM-13 Zellen mit dem trispezifischen anti-CD33-Antikörperkonstrukt JA0028, welches zuvor mit Theo-Cy5 und DIG-Bi-Strep-Alexa Fluor 488 inkubiert wurde, im FACS analysiert (-- JA0028 + Theo-Cy5 + DIG-Bi-Strep-Alexa Fluor 488). Als Kontrolle wurde das trispezifische anti-LeY-Antikörperkonstrukt mit Theo-Cy5 und DIG-Bi-Strep-Alexa Fluor 488 (-- JA0020 + Theo-Cy5 + DIG-Bi-Strep-Alexa Fluor 488) und das trispezifische anti-CD33-Antikörperkonstrukt mit je nur einem der beiden Fluoreszenzfarbstoffe (-- JA0028 + Theo-Cy5; -- JA0028 + DIG-Bi-Strep-Alexa Fluor 488) mitgeführt.

3.4.4 Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur

Bei der Behandlung von Krebs setzt man nicht mehr nur auf die alleinige Applikation einer zytotoxischen Substanz, sondern vielmehr auf die synergistische Wirkung zweier Substanzen. So wurde z.B. beobachtet, dass die Kombination eines Immuntoxins mit einer weiteren zytotoxischen Substanz wie z.B. Taxol, welche die Endothelzellen zerstört, eine gesteigerte Aufnahme des Immuntoxins in Tumorzellen verursacht (Zhang *et al.*, 2006). Auch die kombinierte Verabreichung des seit Jahrzehnten eingesetzten Zytostatikum Doxorubicin mit einer weiteren Substanz wie z.B. dem selektiven Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen (Chuang *et al.*, 2013) oder dem Nukleosidantibiotikum Tunicamycin (Hiss *et al.*, 2007) weist auf eine gesteigerte therapeutische Wirksamkeit hin. Basierend auf diesen und weiteren zahlreichen Beobachtungen (Vassilopoulos *et al.*, 2014), dass es synergistische Effekte von Wirkstoffen gibt, wurde ein Antikörper-Format entwickelt, welches gleichzeitig sowohl eine DIG-Payload als auch eine Theo-Payload an ein Oberflächenantigen einer Zelle, hier LeY oder

CD33, bringen kann. Zur Untersuchung synergistischer Effekte waren PE38 und Saporin nicht geeignet, da beide einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen. Deshalb sollte durch den Zellviabilitätsassay mit den beiden Toxinen DIG-Saporin und Theo-Saporin belegt werden, dass die zielgerichtete Payload-Applikation sowohl eines DIG-Toxins wie auch eines Theo-Toxins durch den trispezifischen CD33-bindenden mAb JA0028 erreicht werden kann. Sind die IC₅₀ beider Hapten-Toxine ähnlich, wenn sie nach Vorinkubation mit dem trispezifischen CD33-bindenden mAb JA0028 auf CD33-positive MOLM-13 Zellen aufgebracht werden, so kann auf eine erfolgreiche zielgerichtete Payload-Applikation beider Toxine geschlossen werden. Dafür wurde der trispezifische DIG-Theo-CD33 mAb mit mit Theo-Saporin oder mit DIG-Saporin jeweils in einem Toxin-Antikörper-Verhältnis von 1:1 24 h bei 4 °C inkubiert und anschließend auf die Zellen aufgebracht. Es wurde die bereits zur FACS-Analyse verwendete MOLM-13 Zelllinie verwendet, da mittels FACS gezeigt werden konnte, dass der trispezifische CD33-bindende DIG-Theo Antikörper JA0028 sowohl simultan eine DIG- und Theo-Payload als auch CD33 auf der Zelloberfläche binden kann. Als Negativkontrolle bzw. Isotypkontrolle zum Nachweis der unspezifischen Toxizität wurde der auch bereits im FACS verwendete trispezifische DIG-Theo-LeY mAb JA0020 verwendet, welcher ebenso mit Theo-Saporin oder DIG-Saporin vorinkubiert wurde. Dieser Kontrollantikörper zeigte zwar Auffälligkeiten in der Massenspektrometrie bzgl. der exakten Masse des Gesamtantikörpers und der einzelnen schweren Ketten (siehe 3.4.2.2). Da aber mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie gezeigt werden konnte, dass die simultane Bindung einer DIG- und einer Theo-Payload möglich ist (Daten siehe Anhang) und aufgrund des FACS, welches keine Bindung des Antikörpers an LeY zeigt, vermutet werden kann, dass der Fehler im Bereich der Antigenbindungsstelle liegt, wurde dieser Antikörper trotzdem als Isotypkontrolle verwendet. Die zelltypunspezifische Toxizität wurde auf CD33-negativen MCF-7 Zellen getestet. Die MOLM-13 und MCF-7 Zellen wurden im 96-Well-Format in einer Dichte von etwa 5000 bis 10000 Zellen pro Well mit verschiedenen Konzentrationen der DIG- oder Theo-Toxin-Antikörper-Komplexe 72 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellviabilität bestimmt.



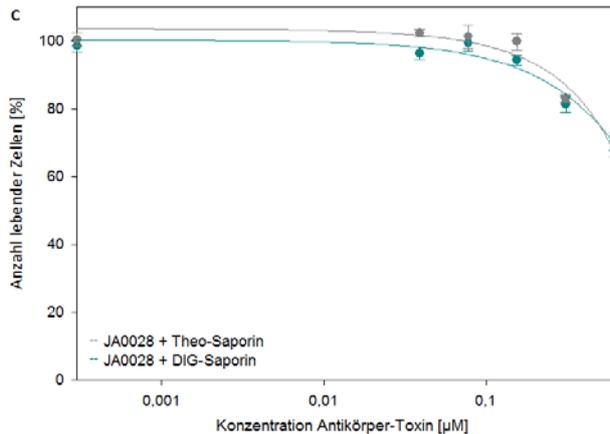


Abb. 3.4-6: Zytotoxizität des trispezifischen DIG-Theo-bindenden Antikörperkonstrukts

Um die Spezifität und biologische Wirksamkeit der trispezifischen DIG-Theo-bindenden Antikörper mit DIG- oder Theo-Toxinen zu untersuchen, wurden diese auf der CD33-positiven Zelllinie MOLM-13 getestet. Die zelltypunspezifische Toxizität des anti-CD33-Antikörpers JA0028 wurde auf CD33-negativen MCF-7 Zellen getestet. Das trispezifische Antikörperkonstrukt wurde mit DIG- oder Theo-Saporin 2 h im Kühlschrank vorinkubiert bevor es auf die Zellen aufgetragen wurde. Es wurden etwa 5000 bis 10000 Zellen pro Well im 96-Well-Format ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen der Toxin-Antikörper-Komplexe 72 h inkubiert. Danach wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay die Zellviabilität ausgelesen. Die Lumineszenz ist ein Maß für den ATP-Gehalt, welcher proportional zur Anzahl lebender Zellen ist. Diese wurde hier auf eine prozentuale Skala normiert, die gegen die jeweilige Toxinkonzentration aufgetragen ist. Alle Messpunkte wurden in dreifacher Ausführung bestimmt. Die Linien beschreiben die Anpassung an die experimentellen Daten, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der einzelnen Messwerte dar. Die IC50-Werte sind in Tabelle 3.4.3 zusammengefasst. **A** Trispezifischer DIG-Theo-CD33-Antikörper JA0028 mit DIG-Saporin im Vergleich zur Isotypkontrolle JA0020 mit DIG-Saporin auf MOLM-13 Zellen **B** Trispezifischer DIG-Theo-CD33-Antikörper JA0028 mit Theo-Saporin im Vergleich zur Isotypkontrolle JA0020 mit Theo-Saporin auf MOLM-13 Zellen **C** Trispezifischer DIG-Theo-CD33-Antikörper JA0028 mit DIG-Saporin und Theo-Saporin auf MCF-7 Zellen bis zu einer Antikörper-Toxin-Konzentration von 0.625 μM

Aus den gewonnenen Daten wurde der IC50-Wert gemäß Formel 2.2-2 für das jeweilige Toxin mit dem trispezifischen DIG-Theo-CD33-Antikörper JA0028 (Tabelle 3.4.3) bestimmt. Der Vergleich der IC50-Werte sollte Aufschluss darüber geben, ob die Spezifität und der zytotoxische Effekt bei beiden Hapten-Toxinen vergleichbar sind. Ist die Zytotoxizität von Theo-Saporin ähnlich wie die des DIG-Saporin, wenn es zusammen mit dem DIG-Theo-CD33 mAb auf MOLM-13 Zellen aufgetragen wird, so kann davon ausgegangen werden, dass die zielgerichtete Payload-Applikation und -Internalisierung von DIG-Saporin und Theo-Saporin vergleichbar sind.

	JA0028	JA0020
DIG-Saporin	19,9 nM	0,27 µM
Theo-Saporin	22,3 nM	0,35 µM

Tabelle 3.4.3: IC50-Werte der DIG- und Theo-Saporin-Antikörper-Komplexe

Um zu testen, wie stark der zytotoxische Effekt bei Kopplung von DIG- oder Theo-Saporin an das trispezifische DIG-Theo-Antikörperkonstrukt ist, wurde der Antikörper sowohl nur mit DIG-Saporin als auch mit Theo-Saporin vorinkubiert und auf MOLM-13 Zellen aufgebracht. Die Zellviabilität wurde mittels CellTiter-Glo®-Assay ermittelt. Mit der Formel 2.2-2 wurden dann die IC50-Werte aus der Auftragung des prozentualen Anteils lebender Zellen gegen die Antikörper-Toxin-Konzentration berechnet.

Die zelltypunspezifische Toxizität des trispezifischen anti-CD33-Antikörpers JA0028 plus DIG- oder Theo-Saporin auf MCF-7 Zellen ist in etwa mit der Toxizität der Isotypkontrolle JA0020 plus Theo-Saporin auf MOLM-13 Zellen vergleichbar.

3.4.5 Zusammenfassung

Innerhalb dieser Arbeit sollte neben den Antikörperderivaten, die entweder eine DIG-Payload oder eine Theo-Payload binden können, außerdem ein trispezifischer Antikörper entwickelt und getestet werden, der neben dem Zielantigen sowohl eine DIG-Payload als auch eine Theo-Payload binden kann (Abb. 3.4-1). Der eine „Arm“ des Antikörpers bindet an das Hapten Digoxigenin, der andere „Arm“ an Theophyllin. Um das *Mispairing* von schweren und leichten anti-Theo und anti-DIG Ketten zu reduzieren, wurde die DIG-Bindung über einen *CrossFab* und die Theo-Bindung über einen „normalen“ Fab realisiert. Die CH2-Domäne mit Hinge-Region entsprach einem „normalen“ IgG. Für die CH3-Domäne wurde die KIH-Strategie verwendet, um eine korrekte Heterodimerisierung der zwei unterschiedlichen schweren Ketten zu gewährleisten.

Sowohl der trispezifische LeY-bindende als auch der CD33-bindende mAb zeigte eine Ausbeute von 1.1 mg/L. Mittels analytischer SEC wurde beim LeY-bindenden mAb ein Monomergehalt von 100 % und beim CD33-bindenden mAb ein Monomeranteil von etwa 89 % analysiert. Mittels ESI-MS konnte die Identität der beiden LCs des LeY-bindende mAb JA0020 bestätigt werden, die beiden HCs allerdings zeigten eine etwa 5 Da zu große Masse. Auch die Gesamtmasse war 30 Da zu hoch. Die Identität des trispezifischen CD33-bindenden Gesamtantikörpers und der einzelnen schweren und leichten Ketten konnte bestätigt werden. Bei beiden mAbs sind auch Anteile von halbem Antikörper, HC- und LC-Heterodimer vorhanden. Die SDS-Page konnte das Auftreten der genannten Antikörperfragmente bestätigen. In der Durchflusszytometrie mit MCF-7 Zellen zeigte sich, dass der LeY-bindende

mAb JA0020 nicht mehr an das LeY-Target bindet (Daten nicht gezeigt). Weitere Versuche mit MOLM-13 Zellen und dem CD33-bindenden mAb JA0028 zeigten eine erfolgreiche targetspezifische Bindung. Durch die Verwendung von Alexa Fluor 488-Strepavidin-Bi-DIG und Theo-Cy5 als fluoreszierende Payloads wurde belegt, dass sowohl eine DIG- als auch eine Theo-Payload bei gleichzeitiger Target-Bindung gebunden werden kann. Anhand eines Zellviabilitätsassays mit MOLM-13 Zellen sollte untersucht werden, ob die zielgerichtete Payload-Applikation des Antikörpers JA0028 für DIG-Saporin und Theo-Saporin vergleichbar ist, wenn diese einzeln als toxische Payload mit dem Antikörper komplexiert werden. Mit einer IC₅₀ von 22.3 nM für den mAb mit Theo-Saporin alleine und einer IC₅₀ von 19.9 nM für den mAb mit DIG-Saporin alleine, konnte eine vergleichbare Toxizität beider Hapten-Toxine gezeigt werden. Die zelltypenspezifische Toxizität des anti-CD33-Antikörpers JA0028 mit DIG- oder Theo-Saporin auf CD33-negativen MCF-7 Zellen war in etwa vergleichbar mit der Toxizität der Isotypkontrolle JA0020 mit DIG-Saporin oder Theo-Saporin. Zusammen mit den Ergebnissen aus der Durchflusszytometrie konnte so die grundsätzliche Funktionalität des Antikörpers für die kombinierte Kopplung zweier unterschiedlich haptenylierter Toxine belegt werden.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl bi- und trispezifische Antikörperderivate für die zielgerichtete Payload-Applikation als auch haptenylierte Toxine als Payload-Moleküle entwickelt und charakterisiert. Mit Theophyllin wurde ein alternatives Hapten zu Digoxigenin identifiziert. Die Proteinsequenz für die leichte und schwere Kette des Theophyllin bindenden Antikörpers wurde isoliert und die neuen Antikörper-Formate auf das alternative Hapten übertragen. Neben der haptenspezifischen Bindungsdomäne besaßen die Antikörperderivate mit anti-LeY oder anti-CD33 eine tumorspezifische Bindungsdomäne. Neue bispezifische Antikörperderivate mit der Möglichkeit drei gleiche Haptene zu binden oder zwei unterschiedliche Haptene zu binden, wurden generiert. Nach Herstellung und Charakterisierung der Antikörperderivate und haptenylierten Toxine wurde die biologische Aktivität in Zellkulturexperimenten untersucht.

Das modulare System der zielgerichteten Payload-Applikation mit bispezifischen oder trispezifischen Antikörpern soll im Vergleich zu den ADCs und Immuntoxinen zum einen den Vorteil besitzen, dass durch die getrennte Entwicklung des Hapten-Toxins und des bispezifischen Hapten-bindenden Antikörpers Entwicklungsarbeit eingespart wird. Denn in der Therapie könnte ein solches System beispielsweise helfen, schnell und kostengünstig auf ein anderes Toxin umzusteigen, falls MDR oder HATAs auftreten, indem mit dem gleichen bispezifischen Hapten-bindenden Antikörper weiter behandelt und alleine die toxische Hapten-Payload ausgetauscht wird. Zum anderen soll es die einfache Herstellung genau definierter Antikörper-Payload-Moleküle ermöglichen, da die Heterogenität diesbezüglich ein großes Problem in der Produktion herkömmlicher ADCs oder Immuntoxine darstellt. Durch Erhöhung der Hapten-Bindestellen von 2 auf 3 pro Antikörper sollte erreicht werden, dass pro Antikörpermolekül mehr toxische Payload zur Zielzelle gelangt und so die zytotoxische Wirkung pro Antikörper-Payload-Molekül erhöht wird.

Das Molekulargewicht der bisher entwickelten bispezifischen Antikörper von etwa 200 kDa sollte nicht noch weiter erhöht werden, da sich das nachteilig auf die Tumorpenetration auswirken könnte und sich in Vorversuchen gezeigt hat, dass die Exprimierbarkeit noch größerer Konstrukte erhebliche Schwierigkeiten mit sich bringt.

Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sich das modulare Konzept der bi- bzw. trispezifischen Antikörper, die in dieser Arbeit entwickelt wurden, für die zielgerichtete Applikation haptenylierter Toxine eignet und mit haptenylierten Fluoreszenzfarbstoffen auch gleichzeitig diagnostische Anwendungen zugänglich macht. Die Ausbeuten der bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper liegen in etwa in dem Bereich, der für IgG mit DVD-Format erwartet wird (C. Wu *et al.*, 2009). Die Theo-trivalenten Antikörper zeigen allerdings schlechtere Ausbeuten,

weshalb in jedem Fall, wie unter 4.3 beschrieben, näher analysiert werden sollte, ob das an dem Hapten selbst, dem Antikörper-Format oder der fehlenden Disulfidbrücke am zentralen anti-Theo Fab liegt. Außerdem sollte genauer untersucht werden, ob bzw. welche Einschränkungen die trivalenten Antikörper mit DVD-Format bei Bindung großer haptenylierter Payloads zeigen. Falls sich zeigen sollte, dass es durch eingeschränkte Zugänglichkeit und Flexibilität zu Problemen in der Bindung der Hapten-Payload an der inneren VD kommt, könnte entweder die Hapten- mit der Antigenbindung innerhalb der DVD getauscht oder ein weiteres trivalentes Antikörper-Format getestet werden. Dabei wäre es bei einem neuen Format, für die Zugänglichkeit der Haptenbindung, vermutlich von Vorteil, wenn die Antigenbindung nicht durch die DVD, sondern in Form eines c-terminal angehängten dsscFv, ähnlich dem trispezifischen Format, realisiert wird.

Keines der Hapten-Toxine zeigte mit dem bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper *in vitro* eine höhere Toxizität als mit dem bispezifischen DIG-bivalenten Antikörper, obwohl der verwendete Zellviabilitätsassay es bei zumindest bei DIG-Saporin auflösen könnte. Der Grund hierfür kann zum einen im Hapten-Toxin, wie unter 4.1.1 beschrieben, liegen oder zum anderen im Antikörper. Es sollte in jedem Fall eine geändertes Reinigungsprotokoll, wie unter 4.2.1 vorgeschlagen, angewendet werden, um die Antikörper in höherer Reinheit zu gewinnen und sie für weitere *in vitro* und *in vivo* Versuche benutzen zu können. Dabei sollten die bispezifischen LeY-bindenden Antikörper in jedem Fall auf einer LeY-negativen Zelllinie kontrolliert werden, um die zelltypunspezifische Toxizität zu untersuchen.

4.1 Toxine als Payloads

4.1.1 Haptenylierung und Targeting

Die in dieser Arbeit untersuchten Toxine sind vielversprechende Kandidaten aus der neuesten Forschung, welche für die Entwicklung von ADCs bzw. Immuntoxinen verwendet werden (Polito *et al.*, 2013)(W. Liu *et al.*, 2012). Da es sich bei der Haptenylierung um eine chemische Modifikation des Moleküls handelt, ist es nicht selbstverständlich, dass die Wirksamkeit des Moleküls erhalten bleibt. Eine Reduktion der Toxizität nach Haptenylierung wäre unkritisch, wenn bei Applizierung mit bispezifischem Antikörper eine ausreichende spezifische Zytotoxizität vorhanden ist.

DIG-Mitomycin zeigte im Vergleich zu Mitomycin nach Inkubation auf MCF-Zellen einen Zytotoxizitätsverlust von 10 – 30 %. Außerdem ist bei DIG-Mitomycin kein Targeting Effekt auf MCF-7 Zellen bei Applikation mit LeY-DIG-bispezifischem Antikörper erkennbar. Der Grund

hierfür kann entweder an der veränderten Internalisierung in die Zelle oder der, durch die Haptenylierung verursachten, veränderten Interkalation des Mitomycin in die DNA liegen.

Mittels SEC, zellbasiertem ELISA und Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass DIG-NPs spezifisch durch LeY-DIG-bispezifische Antikörper komplexiert werden und diese Komplexe spezifisch an das Oberflächenantigen LeY auf MCF-7 Zellen binden. Da der CD33-DIG-bispezifische Antikörper sich nur in der Antigenbindungsregion von dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper unterscheidet, kann eine unspezifische Bindung des LeY-DIG-bispezifischen Antikörpers an das Antigen LeY über eine übrige Antikörperregion ausgeschlossen werden. Trotzdem zeigten sie nur einen sehr schwachen Targeting-Effekt im Zellviabilitätsassay bei für Doxo-NPs üblichen Konzentrationen (Shi *et al.*, 2009)(Ren *et al.*, 2011). In der Konfokalmikroskopie konnte dieser Targeting-Effekt nicht bestätigt werden und es zeigte sich, dass Doxorubicin auch bei Anwendung ohne bispezifische Antikörper von den NPs abgepalten wird und in den Zellkern gelangt. Im Vergleich mit freiem Doxorubicin, war die Intensität des Doxorubicin bei beiden NPs etwas niedriger, was vermutlich an der Kinetik der Abspaltung des Doxorubicins von den NPs liegt. Die AG Haag konnte in pH-abhängigen Studien zeigen (Mehrabadi & Adelman *et al.*, 2016), dass das Doxorubicin unter sauren Bedingungen ($\text{pH} < 6$) von dem übrigen dPG-NP abgespalten wird. Das dafür nötige saure Milieu ist nur in Endosomen bzw. Lysosomen vorhanden. Der geringe Targeting-Effekt und der Befund der Konfokalmikroskopie lassen deshalb darauf schließen, dass die Abspaltung des Doxorubicins durch das zusätzlich am Nanopartikel gekoppelte DIG nicht negativ beeinflusst wird und diese NPs auch passiv, nicht Antikörper vermittelt, von den Zellen aufgenommen werden. Der Grund für die passive Aufnahme ist vermutlich darin zu suchen, dass sie hinsichtlich Struktur, Größe, Molekulargewicht und Hydrophobizität für die passive Aufnahme optimiert wurden (Calderón *et al.*, 2011). Die in diesen Versuchen verwendeten, für Doxo-NPs üblichen, Konzentrationen und die Eigenschaften dieser NPs sind offensichtlich für eine erfolgreiche tumortherapeutische Anwendung ausreichend – ohne, dass es bispezifische Antikörper für das Targeting oder die Internalisierung der NPs bedarf. Die Antigen-vermittelte Aufnahme der DIG-Doxo-NPs durch LeY-DIG-bispezifische Antikörper wird vermutlich durch die unspezifische Bindung und passive Aufnahme der Doxo- und DIG-Doxo-NPs überlagert, wodurch nur ein schwacher Targeting-Effekt im Zellviabilitätsassay resultiert. Es sollte ein *in vivo* Versuch durchgeführt werden, da sich der volle Nutzen des aktiven Targeting durch die bispezifischen Antikörper wahrscheinlich erst dadurch zeigen lässt.

Für die weitere Testung neuer Antikörper-Formate in dieser Arbeit wurden diese NPs nicht verwendet, da sie für die Anwendungen mit bispezifischen Antikörpern hinsichtlich Struktur und Größe optimiert werden sollten. Man könnte beispielsweise DIG-Doxo-NPs testen, an die nicht nur 4, sondern evtl. 8 oder mehr Doxorubicin-Moleküle konjugiert werden – die Löslichkeit

darf durch die zunehmende Hydrophobizität allerdings nicht zu stark herabgesetzt sein. Durch die höhere Beladung mit Doxorubicin-Molekülen könnte evtl. die Zytotoxizität der Komplexe weiter gesteigert werden. Außerdem könnte man versuchen durch Variation des gebundenen PEG die unspezifische Wechselwirkung mit der Zellmembran zu reduzieren. Darüber hinaus wäre es sinnvoll die Kopplung des DIG von 4 auf 1 DIG-Rest pro NP zu reduzieren, um die potentielle Entstehung hochmolekularer Komplexe zu vermeiden.

Als Proteintoxine wurden Saporin und PE38 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Haptenylierung bei Saporin zwar eine Abschwächung der Toxizität nach sich zog, aber mit Bindung des Hapten-Saporins an einen bispezifischen Antikörper eine gute IC₅₀ im nanomolaren Bereich erzielt werden konnte. Bei PE38 ist durch die Haptenylierung keine signifikant niedrigere Toxizität erkennbar. Die IC₅₀ lag hier bei Komplexierung des DIG-PE38 mit LeY-DIG-bispezifischem Antikörper auf MCF-7 Zellen im picomolaren Bereich.

Vergleicht man die Zellviabilitätsdaten der Antikörper-Toxin-Komplexe, so fällt auf, dass hier zwei unterschiedliche Beobachtungen bei den Proteintoxinen gemacht werden können. Bei DIG-Saporin konnte ein Unterschied zwischen DIG-monovalentem und DIG-bivalentem Antikörper mittels des Zellviabilitätsassays aufgelöst werden, bei DIG-PE38 nicht. Dies könnte entweder mit der Heterogenität oder mit der Struktur von DIG-Saporin und DIG-PE38 zu tun haben. Beide Proteintoxine sind keine einfach digoxigenylierten Payloads. Das in dieser Arbeit verwendete Saporin ist darüber hinaus eine Mischung mehrerer Isoformen. Die rekombinante Herstellung einer Isoform, wie z.B. Saporin S6, welches die Isoform mit der besten Aktivität, Stabilität und Konjugierbarkeit darstellt (Polito *et al.*, 2011), wäre ein erster Schritt, um eine genauer definierte, weniger heterogene Payload zu gewährleisten. Allerdings bestünde dann immer noch die Problematik der Heterogenität durch die DIG-Kopplung. Es liegt eine unterschiedlich mehrfach haptenylierte Payload vor, da das Hapten über NHS-Ester an die Lysine des Toxins gekoppelt wird. Eine denkbare Lösung für diese Problematik wäre nicht nur eine bekannte Isoform rekombinant herzustellen, sondern die Sequenz für diese Isoform auch noch an geeigneten Stellen zu mutieren, um die Anzahl der möglichen Haptenylierungssites zu reduzieren. Auf Grundlage der Kristallstruktur könnten die Anzahl und Lage der exponierten Lysine, welche potentielle Kopplungsstellen für das Haptenylierungsreagenz darstellen, aber nachweislich nicht für die enzymatische Aktivität benötigt werden sollten, identifiziert werden und durch Austausch gegen eine andere ähnliche Aminosäure wie Glutamin, auf ein Minimum reduziert werden. Ein ähnliches Heterogenitätsproblem zeigt sich bei PE38. Diese toxische Payload wurde zwar rekombinant hergestellt, allerdings wurde bisher auf eine Mutation exponierter Lysine verzichtet. Ebenso wie bei Saporin sollten die exponierten Lysine gegen eine andere ähnliche Aminosäure wie Glutamin ausgetauscht werden, damit optimaler Weise ein einfach haptenyliertes Toxin entsteht. Denkbar wäre auch die *Site-specific Conjugation*,

wie unter 1.2.1.4 beschrieben, für die Kopplung des Haptens an das Toxin einzusetzen. So könnte über das Einbringen einer unnatürlichen Aminosäure in die Sequenz des Toxins oder die chemoenzymatische Konjugation über Sortase A die definierte Haptenylierung des Proteintoxins mit genau 1 Hapten gewährleistet werden. Denn nur durch die erwähnten Maßnahmen wäre der Vorteil des exakt definierten Antikörper-Payload Verhältnisses dieses modularen Systems nutzbar. Sonst besteht immer die Möglichkeit, dass sich durch die Vernetzung der mehrfach haptenylierten Payloads über die Antikörper hochmolekulare Komplexe bilden können, welche die Wirksamkeit einschränken und bei therapeutischer Anwendung immunogen wirken könnten. Um die Bildung solch hochmolekularer nicht kovalenter Komplexe vor der weiteren Toxin Optimierung zu untersuchen wäre evtl. die dynamische Lichtstreuung oder die Elektronenmikroskopie geeignet. Ein weiterer Grund für den fehlenden Unterschied zwischen DIG-monovalentem und DIG-bivalentem Antikörper bei DIG-PE38 könnte sein, dass nur 1 mehrfach haptenyliertes Toxinmolekül von den zwei Haptenbindungsstellen des bispezifischen Antikörpers gebunden wird. Diese Fragestellung könnte man mit Oberflächenplasmonenresonanz, bei der der Antikörper auf der Chipoberfläche immobilisiert und die mehrfach haptenylierte Payload in unterschiedlichen Konzentrationen titriert wird, geklärt werden. Dafür müssten allerdings die mehrfach haptenylierten Payloads vorher chromatographisch aufgereinigt werden, damit man reine mehrfach haptenylierte Payloads mit definierter Masse, also z.B. PE38 + 1xDIG, PE38 + 2xDIG, etc. erhält. Evtl. könnte man auch mittels analytischer SEC untersuchen, ob nur 1 DIG-PE38 pro Antikörper gebunden wird, wobei sehr auf stabile und reproduzierbare Messbedingungen geachtet werden muss, da der Retentionszeit Shift durch die gebundene Payload sehr gering ausfallen wird. Durch einen Proteinverdau des PE38 könnte dann außerdem geklärt werden, welche Lysine den DIG-Rest enthalten. Korreliert man die Kristallstruktur des PE38 dann mit diesen Ergebnissen, könnte man genau bestimmen, welche Lysinreste bzw. DIG-Lysinreste dafür verantwortlich sein könnten, dass 1 DIG-Toxin von zwei Haptenbindungsstellen des Antikörpers gebunden werden.

Durch die räumliche Struktur der DIG-Toxine könnte es nicht nur zu einer Mehrfachbindung des DIG-Toxin-Moleküls kommen, sondern auch zu sterischen Problemen. Möglicherweise sind sterische Probleme der Grund dafür, dass bei DIG-PE38 kein Unterschied zwischen DIG-bivalentem und DIG-monovalentem LeY-bindendem Antikörper in der Toxizität beobachtet werden kann, obwohl gezeigt wurde, dass der verwendete Zellviabilitätsassay diesen Unterschied bei der mehrfach haptenylierten Payload DIG-Saporin auflöst. Denn die räumliche Struktur des *Pseudomonas* Toxins (siehe 3D Struktur PDB Eintrag: 1iqk) ist im Vergleich zu Saporin (siehe 3D Struktur PDB Eintrag: 1qi7), mit seinen 3 Domänen, deutlich „sperriger“ und weist einen relativ hohen nicht helikalen Anteil auf. Dadurch könnte verhindert werden, dass zwei bzw. drei DIG-PE38-Moleküle gleichzeitig an einen Antikörper gebunden werden können.

Außerdem ist PE38 ein Toxin, bei dem theoretisch ein Molekül pro Zelle ausreichend ist, um die Zelle zu töten (Pastan *et al.*, 1992). Möglicherweise liegt auch darin der Grund, warum kein Unterschied zwischen mono- und bivalentem LeY-bindendem Antikörper detektiert werden kann. Mit dem bivalenten Antikörper wird, gleiche Zellbindung und Internalisierung vorausgesetzt, zwar die doppelte Menge DIG-PE38 in die Zelle eingebracht, die IC50 wird aber deshalb nicht verbessert, weil mit dem monovalenten Antikörper bereits ausreichend Toxinmoleküle in die Zelle eingebracht werden, um die vorhandenen Zellen zu töten. Mehr Toxinmoleküle pro Zelle würden dementsprechend keine Steigerung der Toxizität nach sich ziehen.

4.1.2 Charakterisierung

Mittels Durchflusszytometrie konnte die targetspezifische Applikation und mittels CellTiter-Glo[®]-Zellviabilitätsassay die prinzipielle Wirkung der Toxine bzw. der Antikörper-Toxin-Komplexe anhand dosisabhängiger Wirkungskurven gezeigt werden, was zwei zentrale Fragen dieser Doktorarbeit waren. Bei der Entwicklung von Immuntoxinen ist es wichtig die genauen Wirkmechanismen derer zu kennen, um das Immuntoxinmolekül optimieren zu können. Von ungebundenem Saporin weiß man, dass eine der toxischen Wirkungen darauf beruht, dass durch Deadenylierung der ribosomalen RNA die Proteinsynthese gehemmt wird und es nachfolgend zur Apoptose kommt (Polito *et al.*, 2009). Daneben wird allerdings auch vermutet, dass Saporin durch Deadenylierung die Fragmentierung der DNA bewirkt und so die Apoptose einleitet (Bagga *et al.*, 2003b)(Bolognesi *et al.*, 2012). Das intrazelluläre Routing und die Lokalisation des haptenylierten Toxins sollten deshalb genauer z.B. mit Imaging-Methoden wie der Konfokal Mikroskopie unter Zuhilfenahme geeigneter Fluoreszenzmoleküle untersucht werden. Denn ist für eine möglichst toxische Wirkung des Saporins auch die DNA-Fragmentierung wichtig, sollte geprüft werden, ob Saporin nach Digoxigenylierung immer noch in den Nukleus eindringen kann. Falls nicht, könnte z.B. über einen säurelabilen Linker versucht werden, das Digoxigenin vom Toxin abzuspalten und so das Eindringen des Toxins in den Nukleus wieder zu gewährleisten und so die Potenz des DIG-Saporin noch weiter zu erhöhen. Auch bei DIG-PE38 sollte geklärt werden, ob das intrazelluläre Routing noch das gleiche wie beim nicht haptenylierten Toxin ist, um ggf. Modifikationen an dem DIG-Toxin-Molekül bzw. dem Linker vornehmen und die zytotoxische Potenz so erhöhen zu können.

4.2 Bispezifische Digoxigenin bindende Antikörperderivate

Es gibt eine Vielzahl neuer Antikörper-Formate, die in den letzten Jahren entwickelt wurden. Von kleinen monovalenten scFv-Formaten oder Fabs, die aufgrund ihrer kleinen Größe insbesondere Vorteile in der Tumorpenetration solider Tumoren aufweisen, aber dafür den Nachteil einer kurzen Halbwertszeit und kurzer Retentionszeit am Tumor besitzen (Sanz *et al.*, 2004), bis hin zu größeren multivalenten Formaten, bei denen mehrere scFv oder Fab über unterschiedliche Multimerisierungsmotive mittels unterschiedlichster Prinzipien aneinander „gekoppelt“ werden (Holliger & Hudson, 2005). Für die therapeutische Anwendung ist eine Molekülgröße von mindestens 70 kDa von Vorteil, um die renale Clearance zu erniedrigen und dadurch die Halbwertszeit zu erhöhen. Durch bivalente Target-Bindung können die Bindungsaffinität und Retention des Antikörpers am Tumor erhöht werden. In dieser Arbeit konnten zwei neue bispezifische trivalente Antikörper-Formate entwickelt werden, die mit etwa 200 kDa und zwei LeY-Bindestellen diese beiden Kriterien erfüllen und zusätzlich den Vorteil aufweisen, dass pro Antikörper genau drei haptenylierte Toxin-Moleküle gebunden werden. Die Antikörper-Formate basieren auf einem IgG, welche aber nicht alle funktionellen Domänen von diesem enthalten. Es wurde ein DIG-trivalenter LeY/CD33 Triple-Fab generiert, welchem die CH2- und die CH3-Domäne des „normalen“ IgG fehlt. Außerdem wurde ein DIG-trivalenter KIH-VD Antikörper generiert, welchem ebenso die CH2-Domäne fehlt, der aber die CH3-Domäne mit KIH-Mutation besitzt. Über die CH2- und CH3-Domäne, genauer gesagt den CH2-CH3-Übergangsbereich kann der Antikörper an den neonatalen Fc-Rezeptor binden (Kim *et al.*, 1994)(Burmeister *et al.*, 1994) und wieder an die Zelloberfläche gebracht und recycelt werden, wodurch er eine deutlich längere Halbwertszeit hat (Yeung *et al.*, 2009). Antikörper mit längerer Halbwertszeit können Vorteile haben, da die pharmakokinetischen Eigenschaften besser sind (Kuo & Aveson, 2011)(Yip *et al.*, 2014), im Falle von Immuntoxinen und den in dieser Arbeit entwickelten bispezifischen Antikörpern können sie aber auch Nachteile haben. So wäre eine fehlende FcRn-Bindung hier möglicherweise sogar von Nutzen, da die häufigste und äußerst ernsthafte Nebenwirkung, das *Vascular Leak Syndrom* (VLS) – eine erhöhte Durchlässigkeit der Blutgefäße und somit erhöhte Gefahr für Ödeme – durch eine kürzere Halbwertszeit vermutlich reduziert werden kann (X. Liu *et al.*, 2012). Die genauen pharmakokinetischen Eigenschaften müssten deshalb in *in-vivo* Versuchen untersucht werden. Über die CH2-Domäne kann der Antikörper den Faktor C1q binden und das Komplement aktivieren (Duncan & Winter, 1988). Über die Bindung an Rezeptoren der Fcγ-Familie, welche auf der Oberfläche verschiedener Effektorzellen, wie Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen exprimiert werden, wird das zelluläre Immunsystem, insbesondere die ADCC durch die natürlichen Killerzellen stimuliert (Duncan *et al.*, 1988). Es gibt zahlreiche therapeutische Antikörper, wie z.B. der anti-CD20 Antikörper Rituximab, für den gezeigt werden konnte, dass vor allem die ADCC und CDC für

therapeutische Wirkung verantwortlich ist (Lim *et al.*, 2010). Den bispezifischen trivalenten Antikörper-Formaten dieser Arbeit fehlt die CH2-Domäne, weshalb höchstwahrscheinlich weder CDC noch ADCC durch sie vermittelt werden kann. Für den Einsatz dieser bispezifischen Antikörper für die zielgerichtete Toxin-Applikation ist das allerdings nicht von Bedeutung, da der Antikörper-Toxin-Komplex nach Target-Bindung internalisiert wird und somit ohnehin nicht mehr auf der Zelloberfläche vorhanden und für Immunzellen zugänglich ist. Die entwickelten bispezifischen Antikörper sind somit sehr gut für die zielgerichtete Payload-Applikation geeignet.

4.2.1 Expression und Reinigung

In dieser Arbeit wurden die Hapten-trivalenten Konstrukte zuerst über eine Kappa-Select-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Über Kappa-Select-Affinitätschromatographie werden weder Aggregate noch Fragmente, welche die Kappa-Domäne enthalten, entfernt, weshalb für die weitere Aufreinigung eine Größenausschlusschromatographie gemacht wurde. Der LeY-KIH-VD Antikörper JA0015 zeigt zwar einen etwa 20 % höheren Monomeranteil als der LeY-Triple-Fab JA0011, aber es ist trotzdem noch ein deutlicher HMW- und LMW-Anteil vorhanden. Der höhere Monomeranteil ist vermutlich dadurch zu erklären, dass durch die vielfach publizierte *Knob-into-Hole* mutierte CH3-Domäne weniger *Mispairing* auftritt – denn das zusätzliche Heterodimerisierungsmotiv der zentralen anti-DIG VH/VL ist bei beiden Antikörper-Formaten vorhanden. Die CD33-Antikörper weisen ein ähnliches Verhalten wie die LeY-Antikörper auf, allerdings zeigen diese jeweils einen deutlich niedrigeren Aggregat- und Fragmentgehalt, was möglicherweise mit der Proteinsequenz der Antigenbindungsstelle und deren Einfluss auf die Proteinstabilität zu tun hat. Es konnte in der Reinigung monoklonaler Antikörper beobachtet werden, dass sich die präparative SEC aufgrund ihrer schlechten Auflösung häufig nicht für die Abtrennung der genannten Spezies eignet (Wang *et al.*, 2006). Möglicherweise wäre eine chromatographische Trennung über Ionenauschromatographie oder hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) eine effizientere Methode. Auch könnte die Bildung von Fragmenten und Aggregaten eventuell bereits während der Reinigung reduziert werden indem man die sauren Bedingungen bei der Kappa-Select-Elution etwa auf pH 3.6 mildert, denn therapeutische Proteine können durch niedrigen pH zu Fragmentierung und Aggregation neigen (Vázquez-Rey & Lang, 2011).

Peak-Nr.	Fraktion	JA0011 [area%]	JA0015 [area%]	JA0024 [area%]	JA0029 [area%]
1	HMW	5,8	2,3	3,2	2,2
2	Monomer	60,3	77	81,2	97,8
3	LMW	33,9	20,7	15,6	–

Tabelle 4.2.1: Fraktionen der analytischen SEC der DIG-Triple-Fabs und DIG-KIH-VD Antikörper

Zieht man allerdings in Betracht, dass industrielle Produktionsprozesse für IgG Ausbeuten um 10 g/L in Säugerzellen und für scFvs Ausbeuten um 1 g/L in *E.coli* zeigen (Frenzel *et al.*, 2013), so sollten zu allererst die Ausbeuten optimiert werden, da die Herstellung dieser Formate sonst nicht wirtschaftlich wäre. In Schüttelkolben kann man etwa von 10-fach geringeren Ausbeuten ausgehen, d.h. Titer von etwa 1 g/L wären für die Expression der Formate dieser Doktorarbeit anstrengenswert. Die Expression in HEK293-F Zellen sollte hinsichtlich physikalischen (z.B. Temperatur), chemischen (z.B. pH) und biologischen (z.B. Zelldichte und -viabilität) Zellkulturbedingungen nochmals sorgfältig geprüft und ggf. modifiziert werden. Außerdem sollte getestet werden, was eine Sequenzänderung am Übergang der VH zur „Knob“-mutierten CH3-Domäne bzw. der VL zur „Hole“-mutierten CH3-Domäne bewirkt. Man könnte die ersten 3-5 Aminosäuren der Sequenz so anpassen, dass diese den natürlicherweise nachfolgenden CH1- bzw. C κ -Domänen entspricht. Möglicherweise könnten die Expressionsraten dadurch gesteigert werden.

4.2.2 Charakterisierung

Die Expression der Antikörperderivate wurde über einen Western-Blot nachgewiesen. Für die KIH-VD Antikörper ist sowohl bei dem LeY-DIG-bispezifischen Antikörper JA0015 als auch bei dem CD33-DIG-bispezifischen Antikörper JA0029 nur eine Bande in Höhe des theoretisch zu erwartenden Molekulargewichts der leichten Kette erkennbar (Abb. 3.2-5). Da die nachfolgende Analytik der gereinigten Antikörper die Integrität derer bestätigte, ist möglicherweise ein Detektionsproblem mit dem Sekundärantikörper dafür verantwortlich, dass die Bande in Höhe des HCs im Western-Blot nicht nachgewiesen werden konnten. Denn die HC enthält als konstante Region nur die CH3-Domäne statt der sonst für IgG üblichen CH2- und CH3-Domäne im Fc-Teil. Anstelle der CH2-Domäne wurde eine variable Domäne gesetzt und noch dazu wurde in der CH3-Domäne eine KIH-Mutation vorgenommen. Möglicherweise wurde dadurch das Epitop für den Detektionsantikörper zu stark verändert, was in der Folge ein Problem mit der Bindung des anti-human-Fc Antikörpers verursacht haben kann.

In der biochemischen Analytik lassen sich bei den unterschiedlichen Antikörper-Formaten, je nach Methode, unterschiedliche relative Anteile von Spezies, die größer oder kleiner als das entsprechende Antikörper-Monomer sind, beobachten. Eine Beurteilung der Ergebnisse muss immer unter Berücksichtigung der Messkonditionen durchgeführt werden. Die durchgeführte SDS-PAGE ist eine Methode, welche durch die Probenvorbereitung mit Natriumdodecylsulfat entfaltetete und, nach Reduktion der Disulfidbrücken, nahezu vollständig denaturierte Proben misst. Die Größe kann nur anhand des Vergleichs mit einem Größenstandard abgeschätzt werden, die Quantifizierung ist schwierig und nicht kovalent gebundene Antikörpernebenprodukte bzw. -aggregate können nicht detektiert werden. In der analytischen

SEC können diese hingegen detektiert werden, da die Antikörper im nativen Zustand unter nicht denaturierenden Bedingungen gemessen werden. Die Bestimmung des Molekulargewichts ist allerdings auch hier nur anhand einer Kalibrationsgeraden möglich. Die Genauigkeit könnte durch einen Lichtstredetektor verbessert werden, welcher aber auch noch einen relativ hohen Fehler in der Molekulargewichtsbestimmung aufweist. Die Massenspektrometrie ist die einzige Methode, die das genaue Molekulargewicht der Moleküle bestimmen kann. In dieser Arbeit konnte mittels SDS-PAGE, SEC und denaturierender MS eine erste biochemische Beurteilung der Konstrukte vorgenommen werden. In den SEC-Ergebnissen der Triple-Fabs und KIH-VD Antikörper zeigt sich allerdings die Tendenz, dass die LMW-Fraktion insbesondere bei der TSKgel G3000SWXL Säule schlecht abtrennbar ist, was entweder an der Trennleistung der Säule oder der Heterogenität der Probe liegen kann. Um die Probe besser charakterisieren zu können, sollten neuere Methoden wie die SEC-MS im nativen Zustand eingesetzt werden. Denn Habegger und Kollegen konnten zeigen, dass nicht kovalent gebundene Aggregate und Antikörpernebenprodukte, die speziell bei *CrossMabs* auftreten können, nur mit nativer MS nachweisbar sind (Habegger *et al.*, 2016). Die Proteine können in einem Ammoniumformiatpuffer, welcher für die Massenspektrometrie verwendbar ist, da es sich um flüchtigen Salzpuffer handelt, direkt analysiert werden. Die in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometrie wurde, wie für die Analytik monoklonaler Antikörper üblich, unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Nicht kovalent gebundene Aggregate können damit nicht analysiert werden. Es ist außerdem möglich, dass Spezies ähnlicher Masse in der SEC koeluieren bzw. schlecht abtrennbar sind. Mit UV-Detektion, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, ist eine Detektion und Identifizierung der koeluierenden Spezies nicht oder nur mit sehr hohem Material- und Zeitaufwand möglich. Antikörper, denen z.B. eine leichte Kette fehlt, sind in der SDS-PAGE aufgrund der geringen Größenauflösung in dem Bereich zwischen 150 und 250 kDa nicht getrennt detektierbar. Liegt ein solches Fragment dann noch als nicht kovalent gebundenes Aggregat mit z.B. einem LC-Dimer vor, so kann es in seiner tatsächlichen Größe in der SDS-Page mit NuPAGE® 4 - 12 % Bis-Tris Gelen ohnehin nicht aufgetrennt und detektiert und in der SEC nicht vom Monomer unterschieden werden. Wie Habegger und Kollegen zeigen konnten (Habegger *et al.*, 2016), ermöglichen die in den letzten Jahren auf dem Markt erschienenen UHPLC-SEC-Säulen, die kaum ausbluten und eine bessere Auflösung als die verwendete Standard TSKgel G3000SWXL Säule besitzen, die massenspektrometrische Detektion sogar gering konzentrierter SEC-Fractionen. Durch den ESI-Prozess induzierte nicht kovalent gebundene Aggregate, wie sie in der denaturierenden MS entstehen können, treten in der nativen MS mit SEC kaum auf, da die Antikörper hier stark verdünnt gemessen werden. Damit wäre die SEC-MS eine nützliche neue Technik, um weitere Schritte zur Optimierung des Moleküls, wie

Strategien zur Vermeidung oder Entfernung unerwünschter Antikörpernebenprodukte entwickeln zu können.

4.2.3 Funktionalitätsnachweis drei aktiver DIG-Bindestellen

Da sich die DIG-trivalenten Antikörperkonstrukte, also der Triple-Fab JA0011 und das KIH-VD Konstrukt JA0015 in ihrer Konformation bezüglich der DIG-bindenden Domänen räumlich nicht unterscheiden, wurde nur das Antikörperkonstrukt JA0015 analysiert.

Für JA0015 konnte nachgewiesen werden, dass alle drei DIG-Bindestellen des DIG-trivalenten Antikörpers intakt sind, indem der LeY-KIH-VD Antikörper mit der etwa 15 kDa großen DIG-siRNA-Cy5 titriert und anschließend über Größenausschlusschromatographie mit Fluoreszenzdetektion analysiert wurde. Hier wurde nicht DIG-Cy5, sondern die etwa 15 kDa große DIG-siRNA-Cy5 verwendet, da die Funktionalität der DIG-Bindungen für größere Payloads belegt werden sollte. Die in dieser Arbeit designten bispezifischen Antikörper enthalten alle eine DVD. Da die LeY- bzw. CD33-Bindung über die äußere und die DIG-Bindung über die innere variable Domäne der DVD und die zentrale variable Domäne des KIH-VD Antikörpers vollzogen wird, sollten sterische Bindungsprobleme mit einer zumindest 15 kDa großen DIG-Payload überprüft werden. Für die äußere Bindung des Antigens ist ein Unterschied zu der Antigenbindung eines „normalen“ IgG eher unwahrscheinlich, wohingegen die innere Antigen- bzw. Haptenbindung, hier also die DIG-Bindung, durch die Zugänglichkeit des Antigens zur Antigenbindungsstelle beeinträchtigt werden kann (Jakob *et al.*, 2013)(C. Wu *et al.*, 2007). Da in dieser Arbeit das Hapten DIG über einen Linker an ein größeres Toxin gekoppelt wird, kann es dadurch zusätzlich zu sterischen Problemen kommen, die eine erfolgreiche Bindung des Haptens bzw. der hapentylierten Payload verhindern. Ebenso kann es an der zentrale VD zu Problemen in der Hapten-Payload-Bindung kommen, da aufgrund der räumlichen Enge der Zugang zum Paratop evtl. erschwert ist. Mit der 15 kDa großen DIG-siRNA-Cy5 konnte gezeigt werden, dass mit dem $(G_4S)_2$ -Linker sowohl in der DVD als auch in der zentralen VD, eine erfolgreiche Bindung dieser Payload möglich ist. Basierend auf den Ergebnissen von Metz und Kollegen (Metz *et al.*, 2012) wurde eine ausreichende Zugänglichkeit und Flexibilität für diesen Linker in der DVD erwartet und konnte hiermit bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Ersatz der Hinge-Region gegen einen $(G_4S)_2$ -Linker eine erfolgreiche Bindung einer DIG-Payload auch an der zentralen VD ermöglicht. Eine unspezifische Bindung von DIG-siRNA-Cy5, auf welche ein Payload:Antikörper Beladungsverhältnis $> 3:1$ hinweisen könnte, wurde nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der analytischen SEC mit DIG-siRNA-Cy5 konnten durch SPR-Spektroskopie, welche mit DIG-Doxorubicin als etwa 1 kDa große Payload durchgeführt wurde, bestätigt

werden. Die SPR-Spektroskopie zeigte, dass rechnerisch 3.2 Payloads pro Antikörper gebunden werden. Für beide Methoden wurde der Antikörper JA0015 verwendet, welcher in der analytischen SEC allerdings nur ein Monomeranteil von 77 % und einen Fragment Anteil von über 20% zeigte. Diese Fragmente könnten die Ergebnisse verfälschen. Hier sei darauf hingewiesen, dass die SDS-Page aber nahezu keine Fragmente und die MS mit < 5 % nur wenige Fragmente zeigte. Es könnte sich also bei den in der analytischen SEC detektierten Fragmenten möglicherweise um Methoden induzierte Fragmente handeln. Für die analytische SEC mit DIG-siRNA-Cy5 wurde die Probe außerdem nochmals über eine SEC-Säule aufgetrennt, was gewährleistet, dass nur das Monomer für die Kalkulationen verwendet wurde. Für die SPR-Spektroskopie wurde ein Fab Capture Kit verwendet. Damit wird nicht der Antikörper JA0015 direkt auf die Chipoberfläche gekoppelt, sondern ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch die Fab Region, genauer die Kappa LC, humaner Antikörper fängt. Fragmente wie 2xHC ohne LC werden somit nicht gefangen und können auch nicht das Ergebnis verfälschen. Einzelne LCs könnten zwar gefangen werden, sind aufgrund der analytischen SEC aber auszuschließen, da diese aufgrund der Größe Signale bei deutlich späteren Retentionszeiten zeigen müssten. Einzig ein kleiner Anteil Antikörper, dem 1 oder 2 LC fehlen oder $\frac{1}{2}$ Antikörper könnten das Ergebnis verfälschen.

Die Funktionalität der 3 DIG-Bindungen konnte durch zwei unabhängige Methoden mit der kleinen Payload DIG-Doxorubicin und der mittelgroßen DIG-siRNA-Cy5 gezeigt werden. Um das Design der Linker verbessern zu können und sterische Probleme größerer Payloads zu bestimmen, sollte die Funktionalität der DIG-Bindung in Abhängigkeit von der Größe der Payload bestimmt werden, indem z.B. DIG-siRNA-Cy5 Moleküle unterschiedlichster Größe und bispezifische Antikörper mit unterschiedlichen Linker-Längen hergestellt und mit den verwendeten Methoden analysiert werden.

4.2.4 Zytotoxizität der Antikörper-Toxin-Komplexe in der Zellkultur

Sowohl der DIG-trivalente Triple-Fab JA0011 als auch der DIG-trivalente KIH-VD Antikörper JA0015 zeigte bei DIG-Saporin keine gesteigerte Toxizität im Vergleich zu dem DIG-bivalenten LeY-bindenden Antikörper, obwohl gezeigt werden konnte, dass mit diesem Zellviabilitätsassay bei DIG-Saporin aufgelöst werden kann, wenn ein DIG-Toxin mehr pro Antikörper internalisiert und so die IC50 erniedrigt wird. Der Grund dafür ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass JA0011 und JA0015 mit ~40 % bzw. ~20 %, wie unter 3.2.4.1 beschrieben, einen relativ hohen Anteil an unerwünschten Antikörper-Nebenprodukten enthält. Die Expression und Reinigung sollte, wie weiter oben unter 4.2.1 diskutiert, optimiert werden, da nur intakte Antikörper-Monomere der DIG-trivalenten bispezifischen Antikörper ohne Nebenprodukte einen Vergleich mit dem DIG-bivalenten

bispezifischen Antikörper zulassen, der einen Monomergehalt über 99 % aufweist. Die zelltypunspezifische Toxizität auf einer LeY-negativen Zelllinie konnte aus Gründen der Materiallimitation im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt werden. Die Messpunkte der Zellviabilitätsassays wurden dreifach bestimmt, aber innerhalb eines Versuchs. Deshalb sollten für eine verbesserte statistische Auswertung die Versuche in voneinander unabhängigen Experimenten wiederholt werden.

4.3 Bispezifische Theophyllin bindende Antikörperderivate

Das modulare Konzept der bispezifischen DIG-bindenden Antikörper für die zielgerichtete Applikation von Toxinen sollte um ein weiteres Hapten erweitert werden. Der Grund hierfür liegt zum einen darin, dass Digoxigenin ein Aglykon des herzaktiven Glykosids Digoxin ist, welches zu therapeutischen Zwecken in Konzentrationen von etwa 1 nM/L eingesetzt wird (Terra *et al.*, 1999) und zum anderen darin, dass Patienten v.a. mit soliden Tumoren bei der Behandlung mit Immuntoxinen bereits nach ein bis zwei Behandlungszyklen Hapten assoziierte anti-Immuntoxin Antikörper (Raffit Hassan *et al.*, 2013) ausbilden können. Mit dem Purinalkaloid Theophyllin, welches bei Bronchialerkrankungen eingesetzt wird, dessen therapeutische Dosis aber 10000 Mal höher als die von Digoxin ist (Markham & Faulds, 1998), konnte ein geeignetes Hapten identifiziert werden. Nach erfolgreicher Isolation und anschließender Humanisierung der VH- und VL-kodierenden Sequenzen der anti-Hapten Antikörper, konnte das Format des DIG-Triple-Fab auf Theophyllin übertragen werden. Vorher musste allerdings noch getestet werden, ob die Affinität der Theo-Bindung mit der Affinität der DIG-Bindung vergleichbar ist, denn eine geringere Affinität könnte dazu führen, dass Antikörper und Theo-Payload nicht stabil genug gebunden sind und eine zielgerichtete Applikation der Antikörper-Payload-Komplexe an die Tumorzelle dann nicht in dem Maße möglich ist, wie sie es für das Hapten DIG gezeigt werden konnte.

Der SPR Versuch zeigt in der Assoziationsphase einen schlechten Fit, was vermutlich an der schlechten Zugänglichkeit des Theophyllin im Theo-BSA für den Antikörper liegt. Um die sterische Hinderung bzw. Abschirmung des Theophyllin durch zu viel BSA zu minimieren, wurden die Beladungsdichte der Chipoberfläche mit Theo-BSA und die Oberfläche des Chips in einigen Versuchen optimiert. Es wurde ein C1 Chip statt eines CM5 Chips verwendet, bei dem das Fangreagenz direkt auf der carboxymethylierten Oberfläche gekoppelt wurde, wodurch die Bindekapazität geringer ist als bei dem CM5 Chip mit verzweigter Dextranoberfläche. Dies sollte zu besserer Zugänglichkeit des Theophyllin führen, eine Verbesserung des Signals konnte allerdings nicht erreicht werden. Bei einer vergleichsweise niedrigen Beladung der Chipoberfläche mit Theo-BSA sind zwar weniger BSA-Moleküle vorhanden, allerdings tragen die vorhandenen BSA-Moleküle wahrscheinlich immer noch zur

sterischen Hinderung bei, da sie durch die Immobilisierung ein recht starres Proteingerüst ergibt. Das mit 66000 Da im Vergleich zu Theophyllin mit 180 Da sehr große Protein kann also immer noch das Theophyllin teilweise abschirmen und so zu einem schlechten Zugang für den Antikörper führen, was sich dann in dem schlechteren Fit in der Assoziationsphase zeigt. Da die Dissoziationsphase aber einen sehr guten Fit mit einer sehr langsamen Dissoziation zeigte, konnte die KD zuverlässig bestimmt werden. Die KD von Theophyllin lag mit etwa 1 nM allerdings sogar etwas unterhalb der KD von DIG, welche etwa 16 nM beträgt (Metz *et al.*, 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass die Bindungsaffinität von Theophyllin sogar etwas stärker ist und sich beide Haptene hinsichtlich Größe und chemischer Konjugierbarkeit sehr ähnlich sind, wurde das Triple-Fab Format auf Theophyllin übertragen. Mit dem DIG-trivalenten LeY mAb JA0015, welcher einen ähnlichen Antikörperaufbau und eine vergleichbare Lage der zwei Antigen- und drei Haptenbindungsstellen hat, konnte zwar bereits die Funktionalität der drei Haptenbindungsstellen belegt werden. Allerdings bindet der Theo-trivalente LeY Triple-Fab JA0022 ein anderes Hapten und besitzt außerdem am zentralen anti-Theo-Fab keine VH44-VL100 Disulfidbrücke zur Stabilisierung, weshalb die Funktionalität der 3 Theo-Bindestellen mit einer geeigneten monohaptenylierten Payload noch eindeutig nachgewiesen werden sollte.

Für potentielle therapeutische Anwendungen sei außerdem mithilfe von z.B. ELISA in jedem Fall noch zu klären, ob eine Kreuzreaktivität zu chemisch sehr ähnlichen Strukturen, wie z.B. Koffein, stattfindet (Franco *et al.*, 2010). Denn Koffein könnte im Körper eine kompetitive Wirkung zu einem Theo-Toxin haben, wodurch die Wirksamkeit des Therapeutikums verringert und die Nebenwirkung dessen erhöht werden könnte.

Vorversuche zeigten (Daten nicht dargestellt), dass auf die stabilisierende VH44-VL100 Disulfidbrücke am zentralen anti-Theo-Fab verzichtet werden muss. Denn es zeigte sich, dass diese in Kombination mit einer N-terminalen Verknüpfung an der variablen Domäne zu einer fehlerhaften bzw. nicht erfolgreichen Expression führt. Auffällig ist außerdem die extrem schlechte Ausbeute von 0.5 mg/L für den Theo-LeY Triple-Fab JA0022 nach Kappa-Select-Affinitätschromatographie. Diese liegt etwa 85 % unter der des DIG-LeY Triple-Fab JA0011 nach Kappa-Select-Affinitätschromatographie. Die Ausbeute des Theo-CD33 Triple-Fab JA0025 liegt etwa 60 % unter der des DIG-CD33 Triple-Fab JA0024. Der einzige Unterschied zwischen beiden Konstrukten ist das Paratop, welches Theophyllin statt Digoxigenin bindet, und die fehlende Disulfidbrücke am zentralen anti-Theo-Fab. Zusammen mit dem Ergebnis des Western-Blot ist die schlechte Ausbeute wahrscheinlich auf eine schlechtere Exprimierbarkeit des Theo-LeY Triple-Fab zurückzuführen. Möglicherweise könnte durch

veränderte Humanisierung mittels CDR-Grafting und einer damit einhergehenden Änderung des Frameworks eine bessere Exprimierbarkeit erreicht werden.

In der SDS-Page und der Massenspektrometrie zeigten sich ähnliche Anteile an nicht richtig verbrücktem Material und halbem Antikörper wie bei den DIG-trivalenten Triple-Fabs JA0011 und JA0024, was vermuten lässt, dass die VH44-VL100 Disulfidbrücke am zentralen anti-DIG-Fab nicht unbedingt für eine stabilere Bindung der beiden schweren Ketten benötigt wird, sondern die eine Disulfidbrücke in der konstanten Region des zentralen Fab ausreichend ist. Man sollte den Antikörper allerdings nochmal bei steigender Temperatur mittels z.B. dynamischer Lichtstreuung oder dynamischer Differenzkalorimetrie analysieren (Lowe *et al.*, 2011), um genauere Aussagen über die Stabilität der Antikörper bzw. den Beitrag der zentralen VH44-VL100 Disulfidbrücke zur Stabilität der Antikörper treffen zu können.

Worin die Ursache für den höheren Monomergehalt in der analytischen SEC liegt, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Hier könnte wie unter 4.2.2 beschrieben, SEC-MS sehr hilfreich sein. Denn es kann sein, dass sowohl Antikörper Homodimere, also mit zwei gleichen schweren Ketten, oder Antikörper Heterodimere, also mit zwei unterschiedlichen schweren Ketten, denen jeweils evtl. zusätzlich eine LC fehlt, in der Monomer Fraktion enthalten sind und nicht aufgetrennt werden können. Um zu testen, ob die fehlende Disulfidbrücke ursächlich für den erhöhten Monomergehalt ist, könnte man aus dem Konstrukt JA0011 die VH44-VL100 Disulfidbrücke am zentralen Fab entfernen und mittels SEC und SDS-PAGE untersuchen, ob der Anteil an HMWs und LMWs geringer wird. Um herauszufinden, ob es an den Sequenzen der VH bzw. VL liegt, könnte man außerdem ein Antikörperkonstrukt des JA0022 herstellen, welches exakt die gleichen Framework-Regionen wie das Konstrukt JA0011 hat, um auszuschließen, dass Unterschiede in den Framework-Regionen ursächlich für das Auftreten eines erhöhten HMW- bzw. LMW-Anteils sind.

Da trotz des höheren Monomeranteils in der analytischen SEC der Theo-LeY Triple-Fab JA0022 das gleiche Problem mit der HC-Homodimerisierung wie der DIG-LeY Triple-Fab JA0011 aufweisen kann, sollte in jedem Fall ein Theo-bindender KIH-VD Antikörper wie JA0015/ JA0029 generiert und mittels nativer SEC-MS getestet werden.

4.4 Trispezifische Digoxigenin und Theophyllin bindende Antikörperderivate

In dieser Arbeit konnte erstmals ein trispezifischer Antikörper für die zielgerichtete Payload-Applikation erfolgreich hergestellt werden, der neben dem Zielantigen sowohl eine DIG-Payload als auch eine Theo-Payload binden kann. Ein solches Format könnte v.a. für die Testung additiver oder synergistischer Effekt zweier toxischer Payloads von Nutzen sein

(Miskimins *et al.*, 2014). Definierte zielgerichtete Immunkonjugate, die zwei zytotoxische Substanzen spezifisch in die gebundene Tumorzelle einbringen, könnten *in vivo* deutliche Vorteile gegenüber der systemischen Kombinationstherapie mit zwei Zytostatika aufweisen (Firestone *et al.*, 1996). Ein und dieselbe Tumorzelle könnte gezielt mit zwei Wirkstoffen behandelt werden, da mit Internalisierung des Antikörpers zwei Wirkstoffe gleichzeitig aufgenommen werden würden. Möglicherweise könnte dadurch z.B. die benötigte Konzentration des zweiten supportiven Wirkstoffs wesentlich verringert werden.

Die mit Massenspektrometrie bestimmten Molekulargewichte der beiden einzelnen schweren Ketten des LeY-bindenden DIG-Theo-trivalenten Antikörpers JA0020 sind um etwa 5 Da, im Vergleich zum theoretischen Molekulargewicht, zu hoch. Die Gesamtmasse des Antikörpers ist etwa 30 Da zu hoch. Durch einen Kalibrationsfehler wäre allerdings für die Gesamtmasse von etwa 200 kDa nur eine Messungenauigkeit von ± 10 Da zu erwarten. Der Grund für die Abweichung muss also wahrscheinlich am Antikörper selbst liegen. Es könnte z.B. an einer fehlerhaften DNA Sequenz, welche für die Klonierung verwendet wurde, liegen oder an einer posttranslationalen Modifikation. Denkbar wäre eine Oxidation, wobei beispielsweise eine Methioninoxidation einen Unterschied von 16 Da erwarten lassen würde und eine Tryptophanoxidation mit einem Unterschied von 4 Da zwar bekannt ist, aber eher selten vorkommt. Häufiger kommt es zu Deamidierungen, wobei für eine Abweichung von 5 Da etwa 4 – 6 Deamidierungen aufgetreten sein müssten, was wiederum eher unwahrscheinlich ist. Zur Kontrolle sollte die DNA Sequenz der schweren Antikörperketten nochmal sequenziert und der Antikörper nochmal rekloniert werden. Um den Fehler in der Proteinsequenz identifizieren zu können, müsste ein tryptischer Verdau des Proteins mit anschließender LC-MS Analytik gemacht werden. Außerdem ist nicht klar, warum der Fehler der Gesamtmasse mit 30 Da höher als 2×5 Da ist. Möglicherweise liegt das daran, dass die Deglykosylierung der reduzierten und nicht reduzierten Probenansätze Unterschiede aufwies. In der Durchflusszytometrie mit MCF-7 Zellen zeigte sich, dass der LeY-bindende mAb JA0020 nicht mehr an sein Target bindet, was darauf schließen lässt, dass der Massenunterschied in der ESI-MS durch eine Modifikation in der CDR des dsscFv verursacht wurde und deshalb keine Target-Bindung mehr möglich ist. Dies könnte, wie bereits erwähnt, mittels Sequenzvariantenanalyse in der Massenspektrometrie geklärt werden.

Im Zellviabilitätsassay mit MOLM-13 Zellen wurde getestet, ob die Zytotoxizität von DIG-Saporin und Theo-Saporin ähnlich stark ist. Dadurch sollte belegt werden, dass die zielgerichtete Payload-Applikation sowohl eines DIG-Toxins wie auch eines Theo-Toxins durch den trispezifischen CD33-bindenden mAb JA0028 erreicht werden kann. Die simultane Bindung von DIG, Theo und dem Oberflächenantigen CD33 konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden. Zur Austestung additiver bzw. synergistischer Effekte wären DIG-PE38 und Theo-Saporin keine geeigneten Payloads, da beide Toxine in die

Proteinbiosynthese eingreifen und somit einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen. In weiteren Versuchen sollte deshalb die Kombination von zwei Toxinen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen getestet werden. Beispielsweise könnte ein Zytostatikum wie Daunorubicin oder Doxorubicin in Kombination mit Theo-Saporin getestet werden. So könnte die Zellteilung und gleichzeitig auch die Proteinbiosynthese gehemmt werden. Die unter 3.1.1 getesteten DIG-Doxo-NPs könnten hierfür eine Option sein, wenn sie hinsichtlich der Anzahl der gebundenen Doxorubicin-Moleküle, wie unter 4.1.1 beschrieben, optimiert werden. Vielversprechender wäre aber, weil etwa 1000fach toxischer als Doxorubicin, das bereits erwähnt (1.2.1.4) Calicheamycin mit z.B. Theo-Saporin zu kombinieren. Calicheamycin ist ein Bakterientoxin, welches eine Endiin-Einheit enthält, die dafür verantwortlich ist, dass das Toxin zu DNA-Doppelstrangbrüchen führt (Sissi *et al.*, 1999). Ob und bei welchen Kombinationen ein synergistischer Effekt erzielt werden kann, müsste *in vitro* mit weiteren Zellviabilitätsassays und ggf. *in vivo* in Mausmodellen untersucht werden.

Neben der Applikation von Hapten-Toxinen wäre außerdem die Applikation anderer haptenylierter Biomoleküle und deren Kombination miteinander denkbar. Solche Biomoleküle wären beispielsweise haptenylierte RNAs oder LNAs (*locked nucleic acids*) für antisense- oder siRNA-Anwendungen, welche entweder das gezielte Ausschalten mutierter Gene, die für das unregulierte Wachstum von Tumorzellen oder auch die Resistenz gegen Chemotherapeutika verantwortlich sind, ermöglichen oder haptenylierte Peptide, die in Zellzyklusprozesse eingreifen oder wie das Bim Peptid beispielsweise die Überexpression antiapoptotischer Proteine in Tumorzellen hemmen (Xu & Wang, 2015)(Delgado-Soler *et al.*, 2012). Die Zielstrukturen dieser therapeutischen Nukleinsäuren und Peptide befinden sich meist im Zytosol, was eines der größten Probleme in der Anwendung darstellt, da es sich um relativ große, geladene Moleküle handelt und diese physikochemischen Eigenschaften für die Überwindung von Zellmembranen ungeeignet sind. Die trispezifischen Hapten-bindenden Antikörper dieser Doktorarbeit könnten beispielsweise mit einer DIG-siRNA und einem Theo-Peptid angewendet werden, was den Vorteil hätte, dass beide Payloads, die ungebunden die Zellmembran kaum überwinden können, durch den Antikörper internalisiert werden. Ein zweites Problem, welches sich bei therapeutischen Nukleinsäuren und Peptiden ergeben kann, ist nach Einschleusen in die Zelle, der Austritt dieser Moleküle aus den Vesikeln bzw. Endosomen in das Zytosol. Ein Lösungsansatz für dieses Problem sind zellpenetrierende Peptide (*cell penetrating peptides*, CPPs). In früheren Arbeiten von A. Haas und Kollegen wurden einzelne CPPs identifiziert, die sich für das „Ausschleusen“ der Payloads aus den Vesikeln in Anwendung mit bispezifischen Hapten-bindenden Antikörpern eignen (Haas *et al.*, 2012). Eine Verknüpfung der Peptidsequenzen des therapeutischen Peptids und des CPPs in der Synthese und anschließende Theophyllin-Kopplung, könnte in Kombination mit einer DIG-siRNA zu neuen innovativen Therapieansätzen führen.

5 Ausblick

Das Ziel die Anzahl der Haptenbindungsstellen pro Antikörpermolekül zu erhöhen, konnte in dieser Arbeit erreicht werden. Dabei ist allerdings nicht zu vergessen, dass eine Maximierung des Verhältnisses von Toxin zu Antikörper (DAR) *in vivo* nicht zwingend eine erhöhte Wirksamkeit zeigen muss, weil der erhöhte Anteil der toxischen Payload auch die Pharmakokinetik, die Biodistribution, die Antigenbindung, das Aggregationsverhalten des ADCs und die maximal tolerierte Dosis beeinflussen kann. In der Entwicklung herkömmlicher ADCs konnte man beobachten, dass es keinen Nutzen bringt die Anzahl gebundener Toxinmoleküle beliebig zu erhöhen, da im Vergleich zu dem korrespondierenden unkonjugierten Antikörper, ADCs mit beispielsweise 8 Toxinmolekülen pro Antikörpermolekül, wahrscheinlich aufgrund der erhöhten Hydrophobizität, eine deutlich höhere Clearance-Rate aufwiesen. ADCs mit 2 bis 4 Toxinmolekülen pro Antikörpermolekül zeigten eine dem unkonjugierten Antikörper vergleichbare Clearance-Rate (Hamblett *et al.*, 2004)(King *et al.*, 1999) mit besserer Wirksamkeit, die vermutlich dadurch erzielt wird, dass durch die längere Zirkulation im Blut, die Bioverfügbarkeit pro Antikörpermolekül besser ist. Bei den in dieser Arbeit entwickelten Antikörperkonstrukten mit maximal 3 Valenzen für eine haptenylierte toxische Payload, sollten demnach im Vergleich zu den korrespondierenden Antikörpern ohne bzw. mit 1 oder 2 gebundenen Payloads keine schlechteren pharmakokinetischen Eigenschaften zu erwarten sein. Dies und ob das Tumorstadium bei dem bispezifischen DIG-trivalenten Antikörper mit DIG-Toxin stärker gehemmt wird als bei dem bispezifischen DIG-bivalenten Antikörper in gleicher Dosis und somit einen therapeutischen Vorteil bringt, müsste allerdings noch in weiteren Versuchsreihen *in vivo* geklärt werden. In Vorversuchen konnte bereits die maximal tolerierte einmalige intravenöse Dosis für DIG-PE38 und DIG-Saporin im Komplex mit bispezifischen DIG-bivalenten Antikörpern ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Auf Basis dieser Daten müsste ein Tierversuch aufgesetzt werden, der die Wirksamkeit und die Pharmakokinetik der DIG-bivalenten und DIG-trivalenten LeY-bindenden Antikörper mit DIG-Toxin in einem MCF-7 Xenograft Mausmodell untersucht. Die maximal injizierte Dosis sollte, laut Vorversuch, für DIG-PE38 (komplexiert mit dem DIG-bispezifischen Antikörper) 10 µg pro 25 g Maus und für DIG-Saporin (komplexiert mit dem DIG-bispezifischen Antikörper) 50 µg pro 25 g Maus nicht übersteigen. Auch eine *Pretargeting* Anwendung, bei dem erst der bi- oder trispezifische Antikörper und zeitversetzt die haptenylierte Payload appliziert wird, müsste *in vivo* getestet werden.

Um eine breite Entwicklungsplattform zu generieren, ist es unerlässlich neben weiteren und optimierten Hapten-Toxinen v.a. auch weitere Tumorantigene als Targets zu testen.

6 Abstract

Cancer has become a worldwide widespread disease these days. A common drug therapy with therapeutic antibodies or chemotherapeutics or both in combination comprises many systemic side effects. A more advanced approach are immunotoxins and antibody drug conjugates which are antibody toxin bifunctional molecules that should reduce such side effects and improve efficacy. But many criteria like, for example, target selection, toxin properties and conjugation must be taken into account for the development of each new molecule which makes it time-, cost- and resource-consuming.

Within this thesis bispecific hapten binding antibodies are used as antibody toxin bifunctional molecules. They are non-covalent coupling modules for haptenylated toxins which should convey targeted payload delivery to tumor cells. Different haptens hooked up to various toxins and human derived cancer specific antibody derivatives in multiple formats create a modular building block system. This should offer a more efficient way of developing antibody toxin bifunctional molecules with a defined antibody:toxin stoichiometry.

First toxins known from literature was screened for the suitability to use them as digoxigenylated payloads. Second bispecific antibodies against the tumor antigens LeY and CD33 and the alternative hapten Theophylline were produced. To increase the toxin load a trivalent bispecific antibody format was created which should bind not only two but three haptenylated toxins per antibody molecule. Finally trispecific antibodies against the tumor antigens LeY and CD33 and the two different haptens Digoxigenin and Theophylline were produced.

The doxorubicin containing DIG-nanoparticles showed a stable complex formation and target specific binding if applied with bispecific DIG-binding antibodies but most likely due to the nanoparticles' properties only a slight targeting effect *in vitro*. Saporin and *pseudomonas* exotoxin could be digoxigenylated successfully but did reveal only a slight enhanced or no enhanced cytotoxicity when they were coupled to the trivalent bispecific DIG-binding antibodies which may be caused by the relatively high proportion of antibody side products after purification and heterogeneous drug-antibody-ratios due to multiple haptenylated toxins. The generation of monoclonal anti-Theo antibodies enabled, for the first time, the targeted payload delivery of Theo-toxins.

The simultaneous attachment of two different haptenylated toxins to the developed trispecific antibody proved to work. This could provide the opportunity to investigate two different haptenylated toxins coupled to the same antibody molecule. So these trispecific antibodies could be a useful tool for the testing of additive or synergistic effects of two different toxins.

7 Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten und der Einbuchstabencode für Nukleotide und Aminosäuren werden hier nicht explizit aufgeführt.

A	Absorption
A _x	Absorption bei x nm
ADCC	<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
ADC	<i>Antibody drug conjugate</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALCL	<i>Anaplastic large cell lymphoma</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
ARC	<i>Antibody radionuclide conjugate</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	<i>Complement dependent cytotoxicity</i>
CDCC	<i>Complement dependent cellular cytotoxicity</i>
CDR	<i>Complementarity determining regions</i>
CH	Konstante Domäne der schweren Kette
CL	Konstante Domäne der leichten Kette
CPP	<i>Cell penetrating peptide</i>
CRR	<i>Complete response rate</i>
Cy5	Carboxymethylindocyanin 5
Da	Dalton
DAR	<i>Drug antibody ratio</i>
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DM1	N(2')-deacetyl-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin
cDNA	<i>Complementary desoxyribonucleic acid</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	<i>Disulfide stabilized</i>
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dsFv	<i>Disulfide stabilized fragment variable</i>
dsscFv	<i>Disulfide stabilized single chain fragment variable</i>
DT	Diphtherie Toxin
DVD	<i>Dual variable domain</i>

EF-2	Elongationsfaktor 2
EPR	Erhöhte Permeabilität und Retention
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisation
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FcRn	<i>Neonatal Fc receptor</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fv	<i>Fragment variable</i>
HAMA	<i>Human anti-mouse antibody</i>
HATA	<i>Human anti-toxin antibody</i>
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HC	<i>Heavy chain</i>
HMW	<i>High molecular weight</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatoprahy</i>
IC50	<i>Median inhibitory concentration</i>
Ig	Immunglobulin
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LC	<i>Light chain</i>
LC-MS	<i>Liquid chromatography – mass spectrometry</i>
LeY	Lewis Y
LMW	<i>Low molecular weight</i>
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
KD	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KIH	<i>Knob-into-Hole</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MAC	<i>Membrane attacking complexes</i>
MBC	<i>Metastatic breast cancer</i>
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MMAE	Monomethylauristatin E
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular weight</i>
NHL	Non-Hodgkin's Lymphom
NHS	N-Hydroxysuccinimid

NP	Nanopartikel
OSu	O-Succinimid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PE	<i>Pseudomonas</i> Exotoxin
PS	Polysorbat
qTOF	<i>Quadrupol-Time-of-Flight</i>
RACE	<i>Rapid amplification of c-DNA ends</i>
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein
RKI	Robert Koch Institut
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
sc	<i>Single chain</i>
scFv	<i>Single chain fragment variable</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
Theo	Theophyllin
VD	Variable Domäne
VH	Variable Domäne der schweren Kette
VL	Variable Domäne der leichten Kette
VLS	<i>Vascular leak syndrom</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

8 Literaturverzeichnis

- Allured, V. S., Collier, R. J., Carroll, S. F., & McKay, D. B. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(5), 1320–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3006045>
- An, Q., Han, C., Zhou, Y., Li, F., Li, D., Zhang, X., ... Kan, Q. (2015). In vitro effects of mitomycin C on the proliferation of the non-small-cell lung cancer line A549. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(11), 20516–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26884968>
- Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, 11(6), 1101–1110. <http://doi.org/10.1002/bit.260110607>
- Atwell, S., Ridgway, J. B., Wells, J. A., & Carter, P. (1997). Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library. *Journal of Molecular Biology*, 270(1), 26–35. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1116>
- Axup, J. Y., Bajjuri, K. M., Ritland, M., Hutchins, B. M., Kim, C. H., Kazane, S. A., ... Schultz, P. G. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), 16101–16106. <http://doi.org/10.1073/pnas.1211023109>
- Bagga, S., Seth, D., & Batra, J. K. (2003). The Cytotoxic Activity of Ribosome-inactivating Protein Saporin-6 Is Attributed to Its rRNA N-Glycosidase and Internucleosomal DNA Fragmentation Activities. *Journal of Biological Chemistry*, 278(7), 4813–4820. <http://doi.org/10.1074/jbc.M207389200>
- Becker, N., & Benhar, I. (2012). Antibody-Based Immunotoxins for the Treatment of Cancer. *Antibodies*, 1(3), 39–69. <http://doi.org/10.3390/antib1010039>
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., ... Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4877), 423–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3140379>
- Bolognesi, A., Polito, L., Scicchitano, V., Orrico, C., Pasquinelli, G., Musiani, S., ... Battelli, M. G. (n.d.). Endocytosis and intracellular localisation of type 1 ribosome-inactivating protein saporin-s6. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 26(1), 97–109. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22475101>
- Boylan, N. J., Zhou, W., Proos, R. J., Tolbert, T. J., Wolfe, J. L., & Laurence, J. S. (2013). Conjugation Site Heterogeneity Causes Variable Electrostatic Properties in Fc Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 24(6), 1008–1016. <http://doi.org/10.1021/bc4000564>
- Brinkmann, U., Pai, L. H., FitzGerald, D. J., Willingham, M., & Pastan, I. (1991). B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a human carcinoma in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), 8616–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1924323>
- Burmeister, W. P., Huber, A. H., & Bjorkman, P. J. (1994). Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature*, 372(6504), 379–383. <http://doi.org/10.1038/372379a0>
- Calderón, M., Graeser, R., Kratz, F., & Haag, R. (2009). Development of enzymatically cleavable prodrugs derived from dendritic polyglycerol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 3725–3728. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.058>
- Calderón, M., Welker, P., Licha, K., Fichtner, I., Graeser, R., Haag, R., & Kratz, F. (2011).

- Development of efficient acid cleavable multifunctional prodrugs derived from dendritic polyglycerol with a poly(ethylene glycol) shell. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 151(3), 295–301. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.01.017>
- Carter, P. (2001). Bispecific human IgG by design. *Journal of Immunological Methods*, 248(1–2), 7–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223065>
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology*, 157(2), 220–33. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00190.x>
- Chari, R. V., Jackel, K. A., Bourret, L. A., Derr, S. M., Tadayoni, B. M., Mattocks, K. M., ... Goldmacher, V. S. (1995). Enhancement of the selectivity and antitumor efficacy of a CC-1065 analogue through immunoconjugate formation. *Cancer Research*, 55(18), 4079–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7545085>
- Chen, F., Liu, Y., Wang, S., Li, R., & Dong, H. (2013). Drug-sensitivity of resistant acute myeloid leukemia cell line to Doxorubicin is enhanced by Triptolide through down-regulation of HIF-1 α and Nrf2. *Blood*, 122(21). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/4921?sso-checked=true>
- Chiron, M. F., Fryling, C. M., & FitzGerald, D. J. (1994). Cleavage of pseudomonas exotoxin and diphtheria toxin by a furin-like enzyme prepared from beef liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(27), 18167–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027078>
- Chuang, P.-Y., Huang, C., & Huang, H.-C. (2013). The use of a combination of tamoxifen and doxorubicin synergistically to induce cell cycle arrest in BT483 cells by down-regulating CDK1, CDK2 and cyclin D expression. *Journal of Pharmaceutical Technology and Drug Research*, 2(1), 12. <http://doi.org/10.7243/2050-120X-2-12>
- Cocconi, G., Bella, M., Zironi, S., Algeri, R., Di Costanzo, F., De Lisi, V., ... Soldani, M. (1994). Fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin combination versus PELF chemotherapy in advanced gastric cancer: a prospective randomized trial of the Italian Oncology Group for Clinical Research. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 12(12), 2687–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989945>
- Collier, R. J., Gilliland, D. G., & Lory, S. (1979). Structure-activity relationships in diphtheria toxin and exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Progress in Clinical and Biological Research*, 31, 751–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/119972>
- Cuesta, A. M., Sainz-Pastor, N., Bonet, J., Oliva, B., & Alvarez-Vallina, L. (2010). Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends in Biotechnology*, 28(7), 355–62. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.03.007>
- Danhier, F., Feron, O., & Pr at, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135–146. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>
- Delgado-Soler, L., Pinto, M., Tanaka-Gil, K., & Rubio-Martinez, J. (2012). Molecular Determinants of Bim(BH3) Peptide Binding to Pro-Survival Proteins. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(8), 2107–2118. <http://doi.org/10.1021/ci3001666>
- destatis. (n.d.). Retrieved December 14, 2015, from https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2015/02/PD15_034_232pdf.pdf?__blob=publicationFile
- Doronina, S. O., Mendelsohn, B. A., Bovee, T. D., Cervený, C. G., Alley, S. C., Meyer, D. L., ... Senter, P. D. (n.d.). Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. *Bioconjugate Chemistry*, 17(1), 114–24. <http://doi.org/10.1021/bc0502917>

- Drugs@FDA: FDA Approved Drug Products. (n.d.).
- Duk, M., Westerlind, U., Norberg, T., Pazynina, G., Bovin, N. N., & Lisowska, E. (2003). Specificity of human anti-NOR antibodies, a distinct species of "anti-alpha-galactosyl antibodies. *Glycobiology*, 13(4), 279–284. <http://doi.org/10.1093/glycob/cwg036>
- Duncan, A. R., & Winter, G. (1988). The binding site for C1q on IgG. *Nature*, 332(6166), 738–740. <http://doi.org/10.1038/332738a0>
- Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., & Winter, G. (1988). Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature*, 332(6164), 563–564. <http://doi.org/10.1038/332563a0>
- Eisenbeis, C. F., Caligiuri, M. A., & Byrd, J. C. (2003). Rituximab: converging mechanisms of action in non-Hodgkin's lymphoma? *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(16 Pt 1), 5810–2. <http://doi.org/10.1056/nejmoa011795>
- Erickson, H. K., Park, P. U., Widdison, W. C., Kovtun, Y. V., Garrett, L. M., Hoffman, K., ... Blättler, W. A. (2006). Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. *Cancer Research*, 66(8), 4426–33. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4489>
- Ferreras, J. M., Barbieri, L., Girbés, T., Battelli, M. G., Rojo, M. A., Arias, F. J., ... Stirpe, F. (1993). Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1216(1), 31–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8218413>
- Firestone, R. A., Willner, D., Hofstead, S. J., King, H. D., Kaneko, T., Braslawsky, G. R., ... Hellström, K. E. (1996). Synthesis and antitumor activity of the immunoconjugate BR96-Dox. *Journal of Controlled Release*, 39(2–3), 251–259. [http://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00160-3](http://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00160-3)
- FitzGerald, D., Idziorek, T., Batra, J. K., Willingham, M., & Pastan, I. (n.d.). Antitumor activity of a thioether-linked immunotoxin: OVB3-PE. *Bioconjugate Chemistry*, 1(4), 264–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2096919>
- FitzGerald, D. J., Kreitman, R., Wilson, W., Squires, D., & Pastan, I. (2004). Recombinant immunotoxins for treating cancer. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 293(7–8), 577–82. <http://doi.org/10.1078/1438-4221-00302>
- Franco, E. J., Sonneson, G. J., DeLegge, T. J., Hofstetter, H., Horn, J. R., & Hofstetter, O. (2010). Production and characterization of a genetically engineered anti-caffeine camelid antibody and its use in immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, 878(2), 177–186. <http://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.017>
- Frenzel, A., Hust, M., & Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in Immunology*, 4, 217. <http://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00217>
- Gerber, H.-P., Senter, P. D., & Grewal, I. S. (2009). Antibody drug-conjugates targeting the tumor vasculature: Current and future developments. *mAbs*, 1(3), 247–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20069754>
- Goldmacher, V. S., & Kovtun, Y. V. (2011). Antibody-drug conjugates: using monoclonal antibodies for delivery of cytotoxic payloads to cancer cells. *Therapeutic Delivery*, 2(3), 397–416. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22834009>
- Greish, K., Fang, J., Inutsuka, T., Nagamitsu, A., & Maeda, H. (2003). Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(13), 1089–105. <http://doi.org/10.2165/00003088-200342130-00002>
- Grenader, T., Rosengarten, O., Isacson, R., Plotkin, Y., & Gabizon, A. (2012). Pegylated

- liposomal doxorubicin/carboplatin combination in ovarian cancer, progressing on single-agent pegylated liposomal doxorubicin. *World Journal of Clinical Oncology*, 3(10), 137–41. <http://doi.org/10.5306/wjco.v3.i10.137>
- Gu, M., Gordon, V. M., Fitzgerald, D. J., & Leppla, S. H. (1996). Furin regulates both the activation of Pseudomonas exotoxin A and the Quantity of the toxin receptor expressed on target cells. *Infection and Immunity*, 64(2), 524–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550202>
- Haas, A. K., Maisel, D., Adelmann, J., Schwerin, V., Kahnt, I., & Brinkmann, U. (2012). Human-protein-derived peptides for intracellular delivery of biomolecules. *Biochem. J*, 442, 583–593. <http://doi.org/10.1042/BJ20111973>
- Haberger, M., Leiss, M., Heidenreich, A.-K., Pester, O., Hafenmair, G., Hook, M., ... Bulau, P. (2016). Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry. *mAbs*, 8(2), 331–9. <http://doi.org/10.1080/19420862.2015.1122150>
- Hamaguchi, T., Matsumura, Y., Suzuki, M., Shimizu, K., Goda, R., Nakamura, I., ... Kakizoe, T. (2005). NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *British Journal of Cancer*, 92(7), 1240–1246. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602479>
- Hamblett, K. J., Senter, P. D., Chace, D. F., Sun, M. M. C., Lenox, J., Cerveny, C. G., ... Francisco, J. A. (2004). Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate, 7063–7070.
- Hassan, R., Bullock, S., Premkumar, A., Kreitman, R. J., Kindler, H., Willingham, M. C., & Pastan, I. (2007). Phase I Study of SS1P, a Recombinant Anti-Mesothelin Immunotoxin Given as a Bolus I.V. Infusion to Patients with Mesothelin-Expressing Mesothelioma, Ovarian, and Pancreatic Cancers. *Clinical Cancer Research*, 13(17), 5144–5149. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0869>
- Hassan, R., Miller, A. C., Sharon, E., Thomas, A., Reynolds, J. C., Ling, A., ... Pastan, I. (2013). Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression. *Science Translational Medicine*, 5(208), 208ra147. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006941>
- Hess, C., Venetz, D., Neri, D., Carter, P. J., Walsh, G., Coiffier, B., ... Braisted, A. C. (2014). Emerging classes of armed antibody therapeutics against cancer. *MedChemComm*, 5(4), 408. <http://doi.org/10.1039/c3md00360d>
- Hiss, D. C., Gabriels, G. A., & Folb, P. I. (2007). Combination of tunicamycin with anticancer drugs synergistically enhances their toxicity in multidrug-resistant human ovarian cystadenocarcinoma cells. *Cancer Cell International*, 7(1), 5. <http://doi.org/10.1186/1475-2867-7-5>
- Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1126–36. <http://doi.org/10.1038/nbt1142>
- Huang, J., Gao, F., Tang, X., Yu, J., Wang, D., Liu, S., & Li, Y. (2010). Liver-targeting doxorubicin-conjugated polymeric prodrug with pH-triggered drug release profile. *Polymer International*, 59(10), 1390–1396. <http://doi.org/10.1002/pi.2880>
- Hussain, A. F., Krüger, H. R., Kampmeier, F., Weissbach, T., Licha, K., Kratz, F., ... Barth, S. (2013). Targeted delivery of dendritic polyglycerol-doxorubicin conjugates by scFv-SNAP fusion protein suppresses EGFR+ cancer cell growth. *Biomacromolecules*, 14(8), 2510–20. <http://doi.org/10.1021/bm400410e>
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotný, J., Margolies, M. N., ... Crea, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), 5879–83.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045807>

- Iglewski, B. H., Liu, P. V., & Kabat, D. (1977). Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infection and Immunity*, 15(1), 138–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/188760>
- Jakob, C. G., Edalji, R., Judge, R. A., DiGiammarino, E., Li, Y., Gu, J., & Ghayur, T. (2013). Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-IgTM) molecule. *mAbs*, 5(3), 358–63. <http://doi.org/10.4161/mabs.23977>
- Jeger, S., Zimmermann, K., Blanc, A., Grünberg, J., Honer, M., Hunziker, P., ... Schibli, R. (2010). Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(51), 9995–9997. <http://doi.org/10.1002/anie.201004243>
- Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S., & Winter, G. (n.d.). Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321(6069), 522–5. <http://doi.org/10.1038/321522a0>
- Jung, S. H., Pastan, I., & Lee, B. (1994). Design of interchain disulfide bonds in the framework region of the Fv fragment of the monoclonal antibody B3. *Proteins*, 19(1), 35–47. <http://doi.org/10.1002/prot.340190106>
- Junttila, T. T., Li, G., Parsons, K., Phillips, G. L., & Sliwkowski, M. X. (2011). Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 128(2), 347–56. <http://doi.org/10.1007/s10549-010-1090-x>
- Junutula, J. R., Flagella, K. M., Graham, R. A., Parsons, K. L., Ha, E., Raab, H., ... Sliwkowski, M. X. (2010). Engineered thio-trastuzumab-DM1 conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(19), 4769–78. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0987>
- Junutula, J. R., Raab, H., Clark, S., Bhakta, S., Leipold, D. D., Weir, S., ... Mallet, W. (2008). Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nature Biotechnology*, 26(8), 925–932. <http://doi.org/10.1038/nbt.1480>
- Kabat, E. A., Wu, T. Te, Perry, H. M., Gottesman, K. S., & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. *National Institutes of Health Publication*, 5th Ed., No. 91-3242.
- Kalim, M., Chen, J., Wang, S., Lin, C., Ullah, S., Liang, K., ... Zhan, J. (2017). Intracellular trafficking of new anticancer therapeutics: antibody-drug conjugates. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 2265–2276. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S135571>
- Kato, J., O'Donnell, R. T., Abuhay, M., & Tuscano, J. M. (2012). Efficacy and toxicity of a CD22-targeted antibody-saporin conjugate in a xenograft model of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncoimmunology*, 1(9), 1469–1475. <http://doi.org/10.4161/onci.21815>
- Kessler, C. (1991). The digoxigenin:anti-digoxigenin (DIG) technology—a survey on the concept and realization of a novel bioanalytical indicator system. *Molecular and Cellular Probes*, 5(3), 161–205. [http://doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90041-H](http://doi.org/10.1016/0890-8508(91)90041-H)
- Kim, J. H., & Hong, H. J. (2012). Humanization by CDR grafting and specificity-determining residue grafting. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 907, 237–45. http://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_13
- Kim, J.-K., Tsen, M.-F., Ghetie, V., & Sally Ward, E. (1994). Identifying amino acid residues that influence plasma clearance of murine IgG1 fragments by site-directed mutagenesis. *European Journal of Immunology*, 24(3), 542–548. <http://doi.org/10.1002/eji.1830240308>
- King, H. D., Yurgaitis, D., Willner, D., Firestone, R. A., Yang, M. B., Lasch, S. J., ... Trail, P. A. (1999). Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched linkers:

- A novel method for increasing the potency of doxorubicin immunoconjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 10(2), 279–88. <http://doi.org/10.1021/bc980100i>
- Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1172191>
- Koppe, M. J., Postema, E. J., Aarts, F., Oyen, W. J. G., Bleichrodt, R. P., & Boerman, O. C. (2005). Antibody-guided radiation therapy of cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 24(4), 539–67. <http://doi.org/10.1007/s10555-005-6195-z>
- Kovtun, Y. V., Audette, C. A., Ye, Y., Xie, H., Ruberti, M. F., Phinney, S. J., ... Goldmacher, V. S. (2006). Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen. *Cancer Research*, 66(6), 3214–21. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3973>
- Kovtun, Y. V., & Goldmacher, V. S. (2007). Cell killing by antibody-drug conjugates. *Cancer Letters*, 255(2), 232–40. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.04.010>
- Kreitman, R. J., & Pastan, I. (1995). Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *The Biochemical Journal*, 307 (Pt 1, 29–37. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1136741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kreitman, R. J., Tallman, M. S., Robak, T., Coutre, S., Wilson, W. H., Stetler-Stevenson, M., ... Pastan, I. (2012). Phase I trial of anti-CD22 recombinant immunotoxin moxetumomab pasudotox (CAT-8015 or HA22) in patients with hairy cell leukemia. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(15), 1822–8. <http://doi.org/10.1200/JCO.2011.38.1756>
- Kretschmann, E., & Raether, H. (1968). Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Z. Naturforsch*, 23, 2135–2136. Retrieved from http://zfn.mpg.de/data/Reihe_A/23/ZNA-1968-23a-2135_n.pdf
- Kuo, T. T., & Aveson, V. G. (2011). Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *mAbs*, 3(5), 422–30. <http://doi.org/10.4161/mabs.3.5.16983>
- Lee, Y.-J., Lee, Y.-J., Im, J.-H., Won, S. Y., Kim, Y.-B., Cho, M.-K., ... Lee, S.-H. (2013). Synergistic anti-cancer effects of resveratrol and chemotherapeutic agent clofarabine against human malignant mesothelioma MSTO-211H cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 52, 61–8. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.060>
- Lefranc, M.-P. (2005). IMGT, the international ImMunoGeneTics information system: a standardized approach for immunogenetics and immunoinformatics. *Immunome Research*, 1, 3. <http://doi.org/10.1186/1745-7580-1-3>
- Lewis Phillips, G. D., Li, G., Dugger, D. L., Crocker, L. M., Parsons, K. L., Mai, E., ... Sliwkowski, M. X. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Research*, 68(22), 9280–90. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1776>
- Lim, S. H., Beers, S. A., French, R. R., Johnson, P. W. M., Glennie, M. J., Cragg, M. S., ... Introna, M. (2010). Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica*, 95(1), 135–43. <http://doi.org/10.3324/haematol.2008.001628>
- Liu, C., Tadayoni, B. M., Bourret, L. A., Mattocks, K. M., Derr, S. M., Widdison, W. C., ... Chari, R. V. (1996). Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8618–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710920>
- Liu, W., Onda, M., Lee, B., Kreitman, R. J., Hassan, R., Xiang, L., & Pastan, I. (2012). Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by

- identifying and silencing human B-cell epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11782–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1209292109>
- Liu, X., Pop, L. M., Schindler, J., & Vitetta, E. S. (2012). Immunotoxins constructed with chimeric, short-lived anti-CD22 monoclonal antibodies induce less vascular leak without loss of cytotoxicity. *mAbs*, 4(1), 57–68. <http://doi.org/10.4161/mabs.4.1.18348>
- Lo, B. K. C. (2004). Antibody humanization by CDR grafting. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 248, 135–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970494>
- Lonberg, N. (2008). Human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (181), 69–97. http://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_4
- Lord, J. M., Roberts, L. M., & Robertus, J. D. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(2), 201–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8119491>
- Lowe, D., Dudgeon, K., Rouet, R., Schofield, P., Jermutus, L., & Christ, D. (2011). Aggregation, stability, and formulation of human antibody therapeutics. In *Advances in protein chemistry and structural biology* (Vol. 84, pp. 41–61). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-386483-3.00004-5>
- Lu Wang, †, Geoff Hale, ‡ and, & Raja Ghosh*, †. (2006). Non-Size-Based Membrane Chromatographic Separation and Analysis of Monoclonal Antibody Aggregates. <http://doi.org/10.1021/AC060790G>
- Lübbe, A. S., Bergemann, C., Huhnt, W., Fricke, T., Riess, H., Brock, J. W., & Huhn, D. (1996). Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. *Cancer Research*, 56(20), 4694–701. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840986>
- Lyons, A., King, D. J., Owens, R. J., Yarranton, G. T., Millican, A., Whittle, N. R., & Adair, J. R. (1990). Site-specific attachment to recombinant antibodies via introduced surface cysteine residues. *Protein Engineering, Design and Selection*, 3(8), 703–708. <http://doi.org/10.1093/protein/3.8.703>
- Macky, T. A., Oelkers, C., Rix, U., Heredia, M. L., Künzel, E., Wimberly, M., ... Rohr, J. (2002). Synthesis, Pharmacokinetics, Efficacy, and Rat Retinal Toxicity of a Novel Mitomycin C-Triamcinolone Acetonide Conjugate. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(5), 1122–1127. <http://doi.org/10.1021/jm010511b>
- Madej, M. P., Coia, G., Williams, C. C., Caine, J. M., Pearce, L. A., Attwood, R., ... Adams, T. E. (2012). Engineering of an anti-epidermal growth factor receptor antibody to single chain format and labeling by Sortase A-mediated protein ligation. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(6), 1461–70. <http://doi.org/10.1002/bit.24407>
- Markham, A., & Faulds, D. (1998). Theophylline. A review of its potential steroid sparing effects in asthma. *Drugs*, 56(6), 1081–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9878995>
- Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46(12 Pt 1), 6387–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2946403>
- Mehrabadi, F. S., Adelman, J., Gupta, S., Wedepohl, S., Calderón, M., Brinkmann, U., & Haag, R. (2016). Bispecific Antibodies for Targeted Delivery of Dendritic Polyglycerol (dPG) Prodrug Conjugates. *Current Cancer Drug Targets*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853135>
- Merchant, A. M., Zhu, Z., Yuan, J. Q., Goddard, A., Adams, C. W., Presta, L. G., & Carter, P.

- (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nature Biotechnology*, 16(7), 677–81. <http://doi.org/10.1038/nbt0798-677>
- Metz, S., Haas, A. K., Daub, K., Croasdale, R., Stracke, J., Lau, W., & Georges, G. (2011). Bispecific digoxigenin-binding antibodies for targeted payload delivery, 3–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1018565108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018565108>
- Metz, S., Panke, C., Haas, A. K., Schanzer, J., Lau, W., Croasdale, R., ... Brinkmann, U. (2012). Bispecific antibody derivatives with restricted binding functionalities that are activated by proteolytic processing. *Protein Engineering, Design and Selection*, 25(10), 571–580. <http://doi.org/10.1093/protein/gzs064>
- Miskimins, W. K., Ahn, H. J., Kim, J. Y., Ryu, S., Jung, Y.-S., & Choi, J. Y. (2014). Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PloS One*, 9(1), e85576. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085576>
- Mori, K., Iida, S., Yamane-Ohnuki, N., Kanda, Y., Kuni-Kamochi, R., Nakano, R., ... Satoh, M. (2007). Non-fucosylated therapeutic antibodies: the next generation of therapeutic antibodies. *Cytotechnology*, 55(2–3), 109–14. <http://doi.org/10.1007/s10616-007-9103-2>
- Neuberger, M. S., Williams, G. T., Mitchell, E. B., Jouhal, S. S., Flanagan, J. G., & Rabbitts, T. H. (n.d.). A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature*, 314(6008), 268–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2580239>
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Current Opinion in Immunology*, 19(2), 239–245. <http://doi.org/10.1016/j.coi.2007.01.005>
- Ogata, M., Chaudhary, V. K., Pastan, I., & FitzGerald, D. J. (1990). Processing of Pseudomonas exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(33), 20678–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2122978>
- Onda, M., Beers, R., Xiang, L., Nagata, S., Wang, Q.-C., & Pastan, I. (2008). An immunotoxin with greatly reduced immunogenicity by identification and removal of B cell epitopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(32), 11311–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0804851105>
- Oudard, S., Thierry, A., Jorgensen, T. J., & Rahman, A. (1991). Sensitization of multidrug-resistant colon cancer cells to doxorubicin encapsulated in liposomes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 28(4), 259–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1678995>
- Padera, T. P., Kadambi, A., di Tomaso, E., Carreira, C. M., Brown, E. B., Boucher, Y., ... Jain, R. K. (2002). Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science (New York, N. Y.)*, 296(5574), 1883–6. <http://doi.org/10.1126/science.1071420>
- Panasci, L., Jean-Claude, B. J., Vasilescu, D., Mustafa, A., Damian, S., Damian, Z., ... Leyland-Jones, B. (1996). Sensitization to doxorubicin resistance in breast cancer cell lines by tamoxifen and megestrol acetate. *Biochemical Pharmacology*, 52(7), 1097–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8831729>
- Panowski, S., Bhakta, S., Raab, H., Polakis, P., & Junutula, J. R. (2014). Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *mAbs*, 6(1), 34–45. <http://doi.org/10.4161/mabs.27022>
- Pastan, I., Chaudhary, V., & FitzGerald, D. J. (1992). Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 331–54. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.001555>
- Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J., & Kreitman, R. J. (2007). Immunotoxin treatment of cancer. *Annual Review of Medicine*, 58, 221–37. <http://doi.org/10.1146/annurev.med.58.070605.115320>

- Peters, C., & Brown, S. (2015). Antibody-drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports*, 35(4). <http://doi.org/10.1042/BSR20150089>
- Pistillo, M. P., Tazzari, P. L., Palmisano, G. L., Pierri, I., Bolognesi, A., Ferlito, F., ... Ferrara, G. B. (2003). CTLA-4 is not restricted to the lymphoid cell lineage and can function as a target molecule for apoptosis induction of leukemic cells. *Blood*, 101(1), 202–9. <http://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1668>
- Podgorski, I., & Sloane, B. F. (2003). Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochemical Society Symposium*, (70), 263–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14587299>
- Polito, L., Bortolotti, M., Farini, V., Battelli, M. G., Barbieri, L., & Bolognesi, A. (2009). Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41, 1055–1061. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.09.021>
- Polito, L., Bortolotti, M., Mercatelli, D., Battelli, M. G., & Bolognesi, A. (2013). Saporin-S6: a useful tool in cancer therapy. *Toxins*, 5(10), 1698–722. <http://doi.org/10.3390/toxins5101698>
- Polito, L., Bortolotti, M., Pedrazzi, M., & Bolognesi, A. (2011). Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy. *Toxins*, 3(6), 697–720. <http://doi.org/10.3390/toxins3060697>
- Pollack, M. (n.d.). The role of exotoxin A in pseudomonas disease and immunity. *Reviews of Infectious Diseases*, 5 Suppl 5, S979-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6419320>
- Polson, A. G., Calemene-Fenaux, J., Chan, P., Chang, W., Christensen, E., Clark, S., ... Ebens, A. (2009). Antibody-drug conjugates for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: target and linker-drug selection. *Cancer Research*, 69(6), 2358–64. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2250>
- Pujade-Lauraine, E., Wagner, U., Aavall-Lundqvist, E., Gebiski, V., Heywood, M., Vasey, P. A., ... du Bois, A. (2010). Pegylated liposomal Doxorubicin and Carboplatin compared with Paclitaxel and Carboplatin for patients with platinum-sensitive ovarian cancer in late relapse. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20), 3323–9. <http://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.7519>
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B., & Pastan, I. (1996). Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nature Biotechnology*, 14(10), 1239–45. <http://doi.org/10.1038/nbt1096-1239>
- Ren, D., Kratz, F., & Wang, S.-W. (2011). Protein Nanocapsules Containing Doxorubicin as a pH-Responsive Delivery System. *Small*, 7(8), 1051–1060. <http://doi.org/10.1002/smll.201002242>
- Ridgway, J. B., Presta, L. G., & Carter, P. (1996). “Knobs-into-holes” engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Engineering*, 9(7), 617–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8844834>
- RKI. (n.d.). Retrieved December 14, 2015, from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/Archiv/datenbank_aktualisiert_2015.html
- Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 715–725. <http://doi.org/10.1038/nri2155>
- Roscoe, D. M., Pai, L. H., & Pastan, I. (1997). Identification of epitopes on a mutant form of Pseudomonas exotoxin using serum from humans treated with Pseudomonas exotoxin containing immunotoxins. *European Journal of Immunology*, 27(6), 1459–68. <http://doi.org/10.1002/eji.1830270624>
- Saelinger, C. B., & Morris, R. E. (1987). Intracellular trafficking of Pseudomonas exotoxin A.

- Antibiotics and Chemotherapy*, 39, 149–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3118781>
- Sanz, L., Blanco, B., & Alvarez-Vallina, L. (2004). Antibodies and gene therapy: teaching old “magic bullets” new tricks. *Trends in Immunology*, 25(2), 85–91. <http://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.001>
- Schaefer, W., Regula, J. T., Bähner, M., Schanzer, J., Croasdale, R., Dürr, H., ... Klein, C. (2011). Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 11187–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.1019002108>
- Schneider, B., Grote, M., John, M., Haas, A., Bramlage, B., Ickenstein, L. M., ... Brinkmann, U. (2012). Targeted siRNA Delivery and mRNA Knockdown Mediated by Bispecific Digoxigenin-binding Antibodies. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 1(9), e46. <http://doi.org/10.1038/mtna.2012.39>
- Schrapppe, M., Bumol, T. F., Apelgren, L. D., Briggs, S. L., Koppel, G. A., Markowitz, D. D., ... Reisfeld, R. A. (1992). Long-term growth suppression of human glioma xenografts by chemoimmunoconjugates of 4-desacetylvinblastine-3-carboxyhydrazide and monoclonal antibody 9.2.27. *Cancer Research*, 52(14), 3838–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1617657>
- Scott, A. M., Geleick, D., Rubira, M., Clarke, K., Nice, E. C., Smyth, F. E., ... Old, L. J. (2000). Construction, Production, and Characterization of Humanized Anti-Lewis Y Monoclonal Antibody 3S193 for Targeted Immunotherapy of Solid Tumors, 193, 3254–3261.
- Senter, P. D. (2009). Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(3), 235–44. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.023>
- Senter, P. D., & Sievers, E. L. (2012). The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nature Biotechnology*, 30(7), 631–7. <http://doi.org/10.1038/nbt.2289>
- Shi, M., Ho, K., Keating, A., & Shoichet, M. S. (2009). Doxorubicin-Conjugated Immuno-Nanoparticles for Intracellular Anticancer Drug Delivery. *Advanced Functional Materials*, 19(11), 1689–1696. <http://doi.org/10.1002/adfm.200801271>
- Singh, K. V., Khanna, P., Suri, C. R., & Garg, M. L. (2010). Structural and immunogenic effects of multiple hapten loading on carrier protein. *Journal of AOAC International*, 93(1), 59–65. Retrieved from <http://www.mendeley.com/catalog/structural-immunogenic-effects-multiple-hapten-loading-carrier-protein/>
- Singh, M. K., Srivastava, S., Raghava, G. P. S., & Varshney, G. C. (2006). HaptenDB: a comprehensive database of haptens, carrier proteins and anti-hapten antibodies. *Bioinformatics*, 22(2), 253–255. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti692>
- Sissi, C., Aiyar, J., Boyer, S., Depew, K., Danishefsky, S., & Crothers, D. M. (1999). Interaction of calicheamicin gamma1(I) and its related carbohydrates with DNA-protein complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), 10643–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10485879>
- Sloan, R. W. (1983). Digitalis glycosides. *American Family Physician*, 28(5), 206–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6314796>
- Smyth, M. J., Pietersz, G. A., & McKenzie, I. F. (1987). The mode of action of methotrexate-monooclonal antibody conjugates. *Immunology and Cell Biology*, 65 (Pt 2), 189–200. <http://doi.org/10.1038/icb.1987.21>
- Sochaj, A. M., Świdarska, K. W., & Otlewski, J. (2015). Current methods for the synthesis of homogeneous antibody–drug conjugates. *Biotechnology Advances*, 33(6), 775–784. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.001>
- Steiner, M., & Neri, D. (2011). Antibody-radionuclide conjugates for cancer therapy: historical considerations and new trends. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the*

- American Association for Cancer Research*, 17(20), 6406–16.
<http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0483>
- Stimmel, J. B., Merrill, B. M., Kuyper, L. F., Moxham, C. P., Hutchins, J. T., Fling, M. E., & Kull, F. C. (2000). Site-specific Conjugation on Serine -> Cysteine Variant Monoclonal Antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, 275(39), 30445–30450.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M001672200>
- Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A., & Stevens, W. A. (1983). Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *The Biochemical Journal*, 216(3), 617–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6667259>
- Tang, R., Cohen, S., Perrot, J.-Y., Faussat, A.-M., Zuany-Amorim, C., Marjanovic, Z., ... Kavallaris, M. (2009). P-gp activity is a critical resistance factor against AVE9633 and DM4 cytotoxicity in leukaemia cell lines, but not a major mechanism of chemoresistance in cells from acute myeloid leukaemia patients. *BMC Cancer*, 9(1), 199.
<http://doi.org/10.1186/1471-2407-9-199>
- Tanimoto, M., Scheinberg, D. A., Cordon-Cardo, C., Huie, D., Clarkson, B. D., & Old, L. J. (1989). Restricted expression of an early myeloid and monocytic cell surface antigen defined by monoclonal antibody M195. *Leukemia*, 3(5), 339–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2716349>
- Teicher, B. A., & Chari, R. V. J. (2011). Antibody conjugate therapeutics: challenges and potential. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(20), 6389–97. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1417>
- Terra, S. G., Washam, J. B., Dunham, G. D., & Gattis, W. A. (1999). Therapeutic range of digoxin's efficacy in heart failure: what is the evidence? *Pharmacotherapy*, 19(10), 1123–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10512061>
- Tolcher, A. W., Ochoa, L., Hammond, L. A., Patnaik, A., Edwards, T., Takimoto, C., ... Rowinsky, E. K. (2003). Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(2), 211–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525512>
- Tolcher, A. W., Sugarman, S., Gelmon, K. A., Cohen, R., Saleh, M., Isaacs, C., ... Slichenmyer, W. (1999). Randomized phase II study of BR96-doxorubicin conjugate in patients with metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(2), 478–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080588>
- Torchilin, V. P., Zhou, F., & Huang, L. (1993). pH-Sensitive Liposomes. *Journal of Liposome Research*, 3(2), 201–255. <http://doi.org/10.3109/08982109309148213>
- Tsuneoka, M., Nakayama, K., Hatsuzawa, K., Komada, M., Kitamura, N., & Mekada, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26461–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8253774>
- Tyagi, A. K., Agarwal, C., Chan, D. C. F., & Agarwal, R. (2004). Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncology Reports*, 11(2), 493–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14719089>
- van der Velden, V. H. J. (2001). Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood*, 97(10), 3197–3204.
<http://doi.org/10.1182/blood.V97.10.3197>
- Vassilopoulos, A., Xiao, C., Chisholm, C., Chen, W., Xu, X., Lahusen, T. J., ... Deng, C.-X.

- (2014). Synergistic therapeutic effect of cisplatin and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors in cancer growth and metastasis of Brca1 mutant tumors. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(35), 24202–14. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.567552>
- Vasylyeva, N., Ahn, K. C., Barnych, B., Gee, S. J., & Hammock, B. D. (2015). Development of an Immunoassay for the Detection of the Phenylpyrazole Insecticide Fipronil. *Environmental Science & Technology*, 49(16), 10038–47. <http://doi.org/10.1021/acs.est.5b01005>
- Vázquez-Rey, M., & Lang, D. A. (2011). REVIEW Aggregates in Monoclonal Antibody Manufacturing Processes. *Biotechnol. Bioeng*, 108, 1494–1508. <http://doi.org/10.1002/bit.23155>
- Wagenaar, H. C., Pecorelli, S., Mangioni, C., van der Burg, M. E., Rotmensz, N., Anastasopoulou, A., ... Vermorken, J. B. (2001). Phase II study of mitomycin-C and cisplatin in disseminated, squamous cell carcinoma of the uterine cervix. A European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Gynecological Cancer Group study. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 37(13), 1624–8. [http://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00178-2](http://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00178-2)
- WAKAKI, S., MARUMO, H., TOMIOKA, K., SHIMIZU, G., KATO, E., KAMADA, H., ... FUJIMOTO, Y. (1958). Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiotics & Chemotherapy (Northfield, Ill.)*, 8(5), 228–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24544727>
- WHO | Cancer. (n.d.). Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Widdison, W. C., Wilhelm, S. D., Cavanagh, E. E., Whiteman, K. R., Leece, B. A., Kovtun, Y., ... Chari, R. V. J. (2006). Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(14), 4392–408. <http://doi.org/10.1021/jm060319f>
- Wolf, P., & Elsässer-Beile, U. (2009). Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 299(3), 161–76. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.08.003>
- Wu, A. M., & Senter, P. D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnology*, 23(9), 1137–46. <http://doi.org/10.1038/nbt1141>
- Wu, C., Ying, H., Bose, S., Miller, R., Medina, L., Santora, L., & Ghayur, T. (2009). Molecular construction and optimization of anti-human IL-1alpha/beta dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig) molecules. *mAbs*, 1(4), 339–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068402>
- Wu, C., Ying, H., Grinnell, C., Bryant, S., Miller, R., Clabbers, A., ... Ghayur, T. (2007). Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1290–7. <http://doi.org/10.1038/nbt1345>
- Xu, C., & Wang, J. (2015). Delivery systems for siRNA drug development in cancer therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1–12. <http://doi.org/10.1016/J.AJPS.2014.08.011>
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., & Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment a introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 15(1), 245–250. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90099-5](http://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90099-5)
- Yang, H. M., & Reisfeld, R. A. (1988). Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(4), 1189–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3422487>
- Yeung, Y. A., Leabman, M. K., Marvin, J. S., Qiu, J., Adams, C. W., Lien, S., ... Lowman, H.

- B. (2009). Engineering Human IgG1 Affinity to Human Neonatal Fc Receptor: Impact of Affinity Improvement on Pharmacokinetics in Primates. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7663–7671. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0804182>
- Yip, V., Palma, E., Tesar, D. B., Mundo, E. E., Bumbaca, D., Torres, E. K., ... Boswell, C. A. (2014). Quantitative cumulative biodistribution of antibodies in mice. <http://dx.doi.org/10.4161/mabs.28254>.
- Young, T. S., & Schultz, P. G. (2010). Beyond the Canonical 20 Amino Acids: Expanding the Genetic Lexicon. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11039–11044. <http://doi.org/10.1074/jbc.R109.091306>
- Zhang, Y., Xiang, L., Hassan, R., Paik, C. H., Carrasquillo, J. A., Jang, B.-S., ... Pastan, I. (2006). Synergistic antitumor activity of taxol and immunotoxin SS1P in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(15), 4695–701. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0346>

9 Anhang

Proteinsequenz LEY-DIG HC

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKRLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASG
FTFSDYAMSWIRQAPGKCLEWVSSINIGATYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRA
EDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQ
SPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSRFSGSGSG
TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGCGTKVEIK

Proteinsequenz LEY-DIG LC

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0011_CH_CH1

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSS
INIGATYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSM
AYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKCLEWVSS
INIGATYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSM
AYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Proteinsequenz JA0011_CH_Ck

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGLVTVSSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSS
INIGATYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSM
AYWGQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECG
GGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSS
TLLSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGCGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0011_LC

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Proteinsequenz JA0024_HC_CH1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYN
QKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGLVTVSSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSSINIG
ATYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYW
GQGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKCLEWVSSINIG
ATYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Proteinsequenz JA0024_HC_Ck

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYN
QKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSSINIG
ATYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYW
GGGTTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG
SGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIKYNLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGCGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0024_LC

DIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRASESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYAASNQGGSGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQTKVEPWSFGCGTKVEVKGSGGGGGSGGGGS
DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIKYNLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQSITLPPTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Proteinsequenz JA0015_HC_HOLE

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGTLVTVSSG
GGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSS
INIGATYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSM
AYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGGS
GGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIKYNLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQSITLPPTFGCGTKVEIKGQPREPQVCTLP
PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Proteinsequenz JA0015_HC_KNOB

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGLVTVSSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSACAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSS
INIGATYIYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSM
AYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGG
GGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSACAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKCLEWVSSINIGA
TYIYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYWG
QGTTTVTVSSGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Proteinsequenz JA0015_LC

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPTFGCGTKLEIKRGGGGSGGGG
SDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0029_HC_HOLE

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYN
QKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGLVTVSSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSACAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSSINIG
ATYIYYADSVKGRFTISRDNANSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGGSGGG
GSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGCGTKVEIKGQPREPQVCTLP
PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Proteinsequenz JA0029_HC_KNOB

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYN
QKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGLTVTVSSGGGG
SGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSSINIG
ATYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCGGGGSGGG
GSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKCLEWVSSINIGATYIY
YADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYWGQG
TVTSSGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Proteinsequenz JA0029_LC

DIQLTQSPSTLSASVGDRVTITCRASESLDNYGIRFLTWFAQKPGKAPKLLMYAASNQGGSGV
PSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQTKEVPCSFQGGTKVEVKGGGGSGGGGSD
IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQSITLPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0022_HC_CH1

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGLTVTVSSG
GGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGY
IRYSGHTGYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGQGLTV
TVSSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSQV
QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYIRYSGHTGYNPS
LKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Proteinsequenz JA0022_HC_Ck

DVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAY
SDTVKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGLVTVSSG
GGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGY
IRYSGHTGYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGGQGLV
TVSSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSDV
VMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNNRYTYLEWFQQRPGQSPRLLIYGVSNRFSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGTHAPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0022_LC

DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGCGTKLEIKGGGGSGGGGS
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNNRYTYLEWFQQRPGQSPRLLIYGVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGTHAPYTFGQGTKLEIKSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Proteinsequenz JA0025_HC_CH1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYN
QKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGLVTVSSGGGG
SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYIRYS
GHTGYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGGQGLVTVSS
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSQVQLQE
SGPGLVKPSQTLSLTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYIRYSGHTGYNPSLKS
RTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Proteinsequenz JA0025_HC_CK

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYN
QKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLVTVSSGGGG
SGGGGSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYIRYS
GHTGYNPSLKSRTVSRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGQGTLVTVSS
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSDVVMVTQ
SPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNNRYTYLEWFQQRPGQSPRLLIYGVSNRFSGVPDRFS
GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGTHAPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0025_LC

DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASESLDNYGIRFLTWFFQKPGKAPKLLMYAASNQGGSGV
PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQTKEVPWSFGCGTKVEVKGGGGSGGGGS
DVVMVTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNNRYTYLEWFQQRPGQSPRLLIYGVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGTHAPYTFGQGTKLEIKSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

Proteinsequenz JA0020_HC_HOLE

QVQLVESGGGLVKGSSLRSLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSSINIGATYIYYA
DSVKGRTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYWGQGTTV
TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP
SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDVKLVESGGGLVQPG
GSLKLSCATSGFTFSDYYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAYSDTVKGRFTISRDNAR
NTLYLQMSRLKSEDTAIYYCARGLAWGAWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSDVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGCGTKLEIK

Proteinsequenz JA0020_HC_KNOB

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIHQHPGKGLEWIGYIRYSGHTGYN
PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDVKLVESGGGLVQPGGSLKLSKATSGFTFS
DYMYWVRQTPEKCLEWVAYISNDDSSAAYSSTVTKGRFTISRDNARNTLYLQMSRLKSEDT
AIYYCARGLAWGAWFAYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDVLMTQSPL
SLPVSLGDQASISCRSSQIIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSG
SGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPFTFGCGTKLEIK

Proteinsequenz JA0020_LC1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Proteinsequenz JA0020_LC2

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNNRYTYLEWFQQRPGQSPRLLIYGVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGTHAPYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSST
LTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Proteinsequenz JA0028_HC_HOLE

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWIRQAPGKGLEWVSSINIGATYIYYA
DSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARPGSPYEYDKAYYSMAYWGQGTTV
TVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDESTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP

SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPG
SSVKVSCKASGYTITDSNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPT
NTAYMELSSLRSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
GSDIQLTQSPSTLSASVGDRVITICRASESLDNYGIRFLTWFFQQKPGKAPKLLMYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGCGTKVEVK

Proteinsequenz JA0028_HC_KNOB

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQHPGKGLEWIGYIRYSGHTGYN
PSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARWVDYFDYWGQGLTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTITD
SNIHWVRQAPGQCLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSLRSEDTA
FYYCVNGNPWLAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPSTLSAS
VGDRVITICRASESLDNYGIRFLTWFFQQKPGKAPKLLMYAASNQGS GVPSRFSGSGSGTEF
TLTISLQPDDEFATYYCQQTKEVPWSFGCGTKVEVK

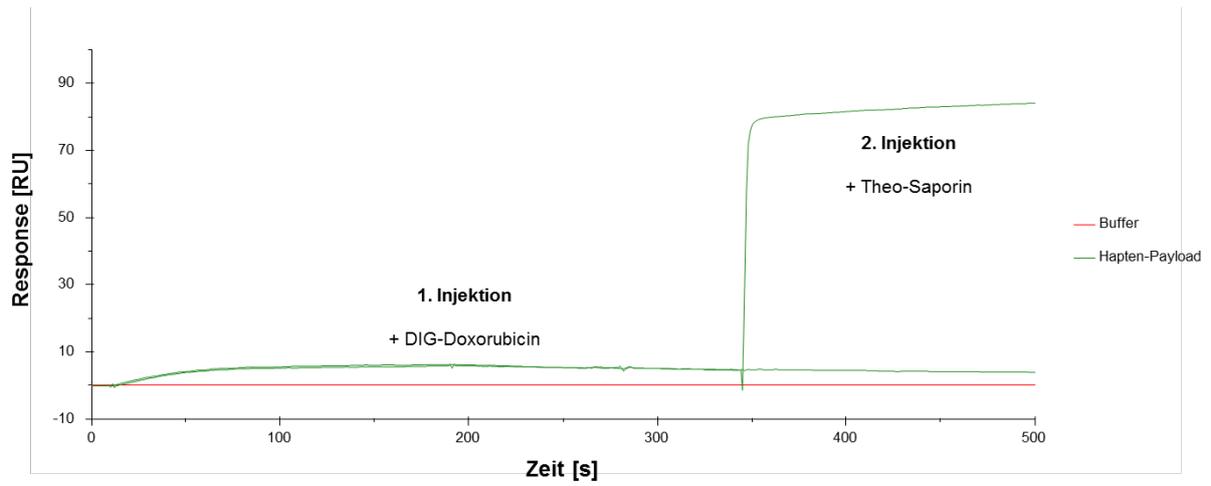
Proteinsequenz JA0028_LC1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIKNYLNWYQQKPGKAPKLLIYSSSTLLSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSITLPPTFGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSK
STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

Proteinsequenz JA0028_LC2

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVYNNRYTYLEWFQQRPGQSPRLLIYGVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGTHAPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sensorgram zum trispezifischen DIG-Theo-bindenden Antikörper JA0020



Ligand	MW Ligand [kDa]	Capture Level Ligand [RU]	Analyt	MW Analyt [kDa]	c Analyt [nM]	$R_{\max \text{ theor}} [RU]$ (n=1)	$R_{\max \text{ exp}} [RU]$	berechnete Stöchiometrie
JA0020	198	792	DIG-Doxorubicin	1,09	900	1,00	4,8	0,9
	198	792	Theo-Saporin	~ 30	900	1,00	77,4	1,5

Danksagung

Zu Beginn möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Hauke Lilie für die Möglichkeit zur Promotion, die Betreuung der Doktorarbeit in Kooperation mit der Roche Diagnostics GmbH und die hilfreiche Unterstützung während der gesamten Zeit danken.

Der Roche Diagnostics GmbH und Hr. Dr. Hendrik Knoetgen danke ich für die Möglichkeit die Doktorarbeit im Bereich pRED der Roche Diagnostics GmbH in Penzberg durchführen zu können.

Hr. Dr. Ulrich Brinkmann danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung am Anfang der Doktorarbeit. Besonders danke ich auch Hr. Dr. Alexander Haas, der es mir nach der Schwangerschaft ermöglichte die Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe weiterzuführen und der mich immer wissenschaftlich unterstützt und in schwierigen Zeiten motiviert hat.

Mein besonderer Dank gilt Klaus Mayer und Michael Tischler durch deren unentbehrliche Unterstützung im Labor ein Abschluss dieser Arbeit nicht machbar gewesen wäre.

Ebenfalls danke ich Christian Spick, der mir sowohl wissenschaftlich bei den Biacore Versuchen als auch freundschaftlich immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch Katja Montán und Achim Gärtner danke ich herzlich für ihre Unterstützung in der Massenspektrometrie und die äußerst hilfsbereite, kollegiale Zusammenarbeit.

Hr. Dr. Rudolph Vogel und Hr. Dr. Hans-Peter Josel mit Mitarbeitern danke ich für die Synthese und Bereitstellung der DIG- und Theo-Reagenzien.

Fr. Dr. Eike Hoffmann danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung bei der Isolation des anti-Theo-Antikörpers.

Hr. Dr. Olaf Mundigl und Heike Seul danke ich für die Durchführung der Konfokalmikroskopie.

Allen Kollegen, die mich während der Zeit bei der Roche Diagnostics GmbH begleitet haben, danke ich sehr für ihre jahrelange Unterstützung, die Hilfsbereitschaft, die wertvollen Diskussionen und den freundschaftlichen Umgang.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei Alexander und meiner Tochter Anna, für ihre Unterstützung und die Geduld bedanken. Schön, dass es euch gibt!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Juliane Adelman
Geburtsdatum: 23.07.1978
Geburtsort: Würzburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg

seit April 2011 Promotion im Fachbereich Biochemie/ Biotechnologie, Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Betreuung von Prof. Dr. Hauke Lilie in Kooperation mit der Roche Diagnostics GmbH
Thema: „Design neuer bi- und trispezifischer Antikörperderivate für die zielgerichtete Applikation haptenylierter toxischer Payloads“

Okt 2001 – Jun 2006 Studium der Biotechnologie an der FH Weihenstephan mit Abschluss als Dipl.-Ing. der Biotechnologie (Note 1.7)

Aug 1998 – Jul 2001 Ausbildung zur Chemielaborantin

Sep 1989 – Jul 1998 Matthias-Grünwald-Gymnasium in Würzburg (Abiturnote 2.2)

Publikationen

Ortiz-Soto, M. E., Ertl, J., Muth, J., Adelman, J., Le, T. A., Shan, J., Teßmar, J., Schlosser, A., Engels, B., Seibel, J. (2018). Product-oriented chemical surface modification of a Levansucrase (SacB) *via* an ene-type reaction. *Chemical Science*, Vol. 9, No. 24, S. 5312-5321

Mehrabadi, F. S., Adelman, J. *, Gupta, S., Wedepohl, S., Calderón, M., Brinkmann, U., Haag, R. (2016). Bispecific antibodies for targeted delivery of dendritic polyglycerol (dPG) prodrug conjugates. *Current Cancer Drug Targets*, Vol.16, No.2, S. 1-11, *geteilte Erstautorenschaft

Haas, A. K., Maisel, D., Adelman, J., von Schwerin, C., Kahnt, I., Brinkmann, U. (2012). Human-protein-derived peptides for intracellular delivery of biomolecules. *Biochemical Journal*, Vol. 442, No. 3, S. 583 - 593

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die aus den anderen Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Die Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Würzburg, Oktober 2019

Juliane Adelman