

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
TUM School of Life Sciences

**Entwicklung eines rekombinanten Fab-Fragments zur *in vivo* Immun-
PET Bildgebung des Schilddrüsenkarzinoms**

Emanuel Peplau, M. Sc.

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Prof. Angelika Schnieke, Ph. D.

Prüfer der Dissertation: Prof. Dr. Arne Skerra
Prof. Dr. Wolfgang A. Weber

Die Dissertation wurde am 26.04.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die
TUM School of Life Sciences am 16.11.2022 angenommen.

Danksagung

Diese interdisziplinäre Arbeit wäre ohne zahlreiche Unterstützungen nicht zustande gekommen, weshalb ich allen Verantwortlichen, die zum Gelingen des spannenden Projektes beigetragen haben, ausdrücklich danken möchte. Ein großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra, ohne dessen konstruktive Hilfestellung und Erfahrung die Anfertigung meiner Doktorarbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Prof. Schnieke bedanke ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes, ebenso bei Herrn Prof. Dr. Weber für seine Bereitschaft, das Korreferat zu übernehmen.

Weiterhin möchte ich mich bei Andreas Achatz für die technische Unterstützung zur Auswertung der Datenbanken bedanken. Ebenso danke ich ihm und Christian Deuschle für die wiederkehrenden Messungen der Massenspektren (auch zu unmöglichen Zeiten). Dr. Andreas Eichinger danke ich für die Hilfe bei den Kristallisationsexperimenten sowie der Strukturbestimmung, die als Grundlage für das Humanisierungsprojekt diente. Bei Sabrina Brockmüller und Sebastian Ebert bedanke ich mich für deren Beiträge im Rahmen Ihrer Projektarbeiten, sowie für das hervorragende Teamwork.

Vielen Dank auch an Francesco De Rose und Dr. Calogero D'Alessandria. Die Kooperation für die Immun-PET Bildgebung war stets eine Freude und führte sogar zu zwei gemeinsamen Publikationen.

Auch Prof. Dr. Armando Bartolazzi und Dr. Giorgia Scafetta möchte ich für die Anleitung und ihrer Expertise bei den histologischen Experimenten danken. Ich hatte in Rom eine bereichernde Zeit und komme gerne wieder.

Ein besonderer Dank gilt meinen Laborkollegen Fabian Rodewald, Julia Martin, Benjamin Escher, Carina Sommer, Christian Deuschle, Elena Ilyukhina, Mikhail Barkovsky, Volker Morath und Dr. Lars Friedrich für zahlreiche Ratschläge, Diskussionen und die tolle Zusammenarbeit. Es war eine schöne Zeit mit euch, im Labor und besonders auch bei anderen Gelegenheiten.

Darüber hinaus sei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gedankt für das angenehme Klima im Kollegium. Vielen Dank insbesondere an Resi, Martina und Klaus für die Unterstützung im täglichen Laboralltag – ohne euch hätte so manches Experiment wohl erst deutlich verspätet stattfinden können.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. An eurem Beispiel konnte ich lernen, dass Geduld, Beharrlichkeit und Zuversicht einen früher oder später ans Ziel bringen. Vielen Dank für diese geistige Haltung.

Einen Riesen-Dank an dich Anne! Du warst immer für mich da, hast alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit hautnah mitbekommen und musstest wegen den zeitraubenden Experimenten genauso verzichten wie ich. Die Selbstverständlichkeit mit der du mich unterstützt hast, ist nicht selbstverständlich. Danke dafür.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Peplau, E. et al. (2020) Development of a chimeric Fab directed against human galectin-3 and validation as an immune-PET tracer for the sensitive in vivo imaging of thyroid cancer. *Thyroid* **30**, 1314-1326

Peplau, E. et al. (2021) Effective rational humanization of a PASylated anti-galectin-3 Fab for the sensitive PET imaging of thyroid cancer in vivo. *Sci Rep* **11**, 7358

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Schilddrüsenkrebs.....	1
1.2.	Galectin 3 als innovatives Ziel der Immundiagnostik	3
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	6
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Material	7
2.1.1.	Bakterienstämme	7
2.1.2.	Plasmide	7
2.1.3.	Oligodesoxynukleotide	7
2.1.4.	Enzyme und sonstige Proteine.....	9
2.1.5.	Chemikalien.....	9
2.1.6.	Standards und Kits.....	11
2.1.7.	Geräte	11
2.1.8.	Sonstiges Material	13
2.1.9.	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen.....	14
2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.1.	RNA-Extraktion aus Hybridom-Zelllinien und cDNA-Synthese	19
2.2.2.	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	19
2.2.3.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	19
2.2.4.	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	20
2.2.5.	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA.....	20
2.2.6.	Modifizierung von DNA	20
2.2.6.1.	Quik Change Mutagenese.....	20
2.2.6.2.	Zirkuläre Amplifizierungsreaktion (CPEC).....	21
2.2.6.3.	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	21
2.2.6.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifizierung und Gensynthese	21
2.2.6.5.	Dephosphorylierung von DNA.....	21
2.2.6.6.	Ligierung von DNA-Fragmenten	22
2.2.6.7.	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	22
2.3.	Gentechnische Methoden	22
2.3.1.	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	22
2.3.2.	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben.....	22
2.3.2.1.	Periplasmatische Proteinproduktion	22
2.3.2.2.	Cytoplasmatische Proteinproduktion.....	23
2.3.3.	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter	23
2.4.	Proteinchemische Methoden.....	24
2.4.1.	Proteolytischer Verdau des monoklonalen Antikörpers	24
2.4.2.	Chromatographische Verfahren.....	24
2.4.2.1.	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose	24
2.4.2.2.	Metallchelat-Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose.....	25

2.4.2.3.	Ionenaustauschchromatographie.....	25
2.4.2.4.	Größenaustauschchromatographie.....	25
2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.4.4.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	26
2.4.5.	Konzentrierung von Proteinen.....	27
2.4.6.	Proteinkonjugation mit funktionellen Gruppen.....	27
2.4.6.1.	Kopplung an Lysinreste.....	27
2.4.6.2.	Konjugation von Cysteinresten.....	28
2.4.7.	Markierung von Proteinen mit Zirkonium.....	29
2.4.8.	Peptid Synthese an Membranen (SPOT).....	29
2.4.9.	Proteinkristallisation.....	30
2.5.	Immunchemische Methoden.....	31
2.5.1.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	31
2.5.2.	Western Blotting.....	32
2.5.3.	Histochemische Untersuchungen.....	32
2.6.	Biophysikalische Methoden.....	33
2.6.1.	Massenspektrometrie.....	33
2.6.2.	Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR).....	33
2.7.	Tierexperimentelle Methoden.....	34
2.8.	Bioinformatische Methoden.....	35
3.	Ergebnisse.....	37
3.1.	Klonierung, Produktion in <i>E. coli</i> und funktionelle Analyse von Fragmenten des menschlichen Galectin3-Antigens.....	37
3.2.	Reinigung des α hGal3-mAk und proteolytische Präparierung des Fab-Fragments.....	41
3.3.	Klonierung und Charakterisierung der variablen Immunglobulindomänen des α -hGal3-mAk aus der Hybridomzelllinie M3/38.....	42
3.4.	Produktion funktioneller chimärer Fab-Fragmente (GaletuxiFab) in <i>E. coli</i> und deren funktionelle Analyse.....	45
3.4.1.	Konstruktion des Expressionsvektors für die bakterielle Fab-Produktion.....	46
3.4.2.	Bakterielle Produktion und Reinigung von GaletuxiFab.....	48
3.4.3.	Untersuchung der Antigenbindung im ELISA und Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie.....	50
3.5.	Einfluss der PASylierung auf die Ausbeute des rekombinanten Fab-Fragments.....	51
3.5.1.	Genetische Fusion der PAS-Sequenz mit der schweren Kette von GaletuxiFab, Produktion und funktionelle Analyse.....	52
3.5.2.	Genetische Fusion der PAS-Sequenz mit der leichten Kette von GaletuxiFab, Produktion und funktionelle Analyse.....	52
3.6.	Chemische Konjugation von GaletuxiFab mit Fluorophoren und Chelatoren über Lysin-Seitenketten.....	54
3.6.1.	Kopplung von GaletuxiFab mit dem Fluorophor Cyanin-5.5.....	56
3.6.2.	Kopplung von GaletuxiFab mit dem Chelator Deferioxamin.....	57
3.6.3.	Funktionelle Charakterisierung der Kopplungsprodukte.....	58
3.7.	Humanisierung der variablen Immunglobulindomänen durch CDR-Grafting von GaletuxiFab mit Hilfe eines automatischen Algorithmus.....	58

3.7.1.	Klonierung und Produktion funktioneller humanisierter Fab-Fragmente in <i>E. coli</i> und deren funktionelle Analyse	63
3.8.	Ermittlung des durch GaletuxiFab erkannten Epitops in hGal 3	66
3.9.	Strukturaufklärung des hGalectin3/GaletuxiFab-Komplexes durch Proteinkristallisation	68
3.10.	Humanisierung der variablen Immunglobulindomänen der Ratte durch CDR Grafting von GaletuxiFab mit Hilfe von rationalem Protein-Design	70
3.10.1.	Klonierung und Produktion humanisierter Fab-Fragmente in <i>E. coli</i> und deren funktionelle Analyse	74
3.10.2.	Affinitätsmaturierung durch Einführung von konservativen Mutationen im humanisierten Rückgrat der variablen Domänen	76
3.10.3.	Synergistische Effekte von Mutationen auf die Affinität	78
3.10.4.	Klonierung des PASylierten GaletuzuFab (GaletuzuFab-PAS200)	80
3.11.	Chemische Konjugation von funktionellen Gruppen mit GaletuzuFab durch Einführung eines Cysteinrests.....	80
3.11.1.	Klonierung und Produktion des GaletuzuFab-PAS200 mit freiem Cysteinrest.....	81
3.11.2.	Kopplung von GaletuzuFab mit dem Fluorophor Cyanin-7	82
3.11.3.	Kopplung von GaletuzuFab mit dem Chelator Deferioxamin	83
3.11.4.	Funktionelle Analyse der Kopplungsprodukte	84
3.12.	Immunologische Diagnostik von Schilddrüsenkrebs.....	86
3.12.1.	Histochemische Untersuchungen mit GaletuzuFab an humanen Gewebeschnitten	86
3.12.2.	Untersuchung der Biodistribution mit α hGal3-Immunglobulin basierten Tracern in Xenograft-Mausmodellen	87
4.	Diskussion.....	91
4.1.	Das Fab als ideales Antikörperfragment für die bildgebende Immundiagnostik.....	91
4.2.	Charakterisierung der Epitop/Paratop-Interaktion zwischen Gal3 und GaletuxiFab.....	94
4.3.	PASylierung als innovative Technologie zur Optimierung der Plasmahalbwertszeit von Proteinen.....	96
4.4.	Humanisierung von Immunglobulinen im Hinblick auf verringerte Immunogenität	97
4.5.	Vergleich der Methoden zur selektiven chemischen Konjugation von Proteinen mit funktionellen Gruppen	101
4.6.	<i>In vivo</i> Bildgebung der α -hGal3-Immunglobulinvarianten.....	103
5.	Zusammenfassung	107
6.	Summary	109
7.	Abkürzungen.....	111
8.	Literatur	113

1. Einleitung

1.1. Schilddrüsenkrebs

Die Schilddrüse (*Glandula thyreoidea*) ist die größte endokrine Drüse des Menschen. Durch ihre schmetterlingsartige Form umschließt sie mit ihren zwei Lappen (*Lobus dexter* und *Lobus sinister*) den Kehlkopf und ist für die Synthese der iodhaltigen Hormone Triiodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄) wie auch des Peptidhormons Calcitonin verantwortlich. Ihre funktionelle Einheit bilden Follikel, in deren Epithel durch Thyreozyten T₃ und T₄ synthetisiert und zur Speicherung in die Follikel eingelagert werden. Zwischen den Follikel befinden sich vereinzelt C-Zellen, die das Peptidhormon Calcitonin produzieren (Heinrich et al., 2014). Durch ihre im Organismus einzigartige Eigenschaft Iod zu binden, nehmen die Schilddrüsenhormone eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Stoffwechsel und des Zellwachstums ein (Dratman, 1974). Calcitonin spielt eine wichtige Rolle bei der Calciumhomöostase und hemmt darüber hinaus den Knochenabbau (Wallach et al., 1993).

Durch die Abhängigkeit der Schilddrüse von dem chemischen Element Iod ist ihre Funktion eng an die biologisch verfügbare Menge des Halogens geknüpft. Starker Iodmangel in der frühkindlichen Entwicklung führt zu geistiger Retardierung bis hin zum Kretinismus und war insbesondere in früheren Zeiten ein endemisches Problem, dass durch die künstliche Iodierung von Lebensmitteln eingedämmt werden konnte (Lindholm and Laurberg, 2011). Trotz dieser Maßnahmen geht die WHO derzeit weltweit von einer Unterversorgung von 2 Milliarden Menschen aus. In Mittel- und Osteuropa betrifft dies 460 Millionen Menschen (de Benoist, 2008). Ein chronischer Iodmangel führt zu einer Vergrößerung der gesamten Schilddrüse (*diffuse Struma*) oder zur Ausbildung von Knoten (*Knotenstruma*). Durch die Vergrößerung kann mehr Jod aus der Nahrung aufgenommen werden. So konnte zum Beispiel für Deutschland, einem Gebiet mit relativem Iodmangel, gezeigt werden, dass aus einer Gruppe von 96.278 Personen im Alter von 18 bis 65 Jahren 33% eine vergrößerte Schilddrüse oder Knoten aufwiesen. 12 % der untersuchten Personen entwickelten Knoten > 1 cm und bei 20 bis 48 % dieser Gruppe konnten wiederum mehrere Knoten entdeckt werden (Reiners et al., 2004). Diese zunächst morphologische Veränderung der Schilddrüse führt in der Regel zu keinen Beschwerden, abgesehen von einem Druck-, Enge- oder Kloßgefühl am Kehlkopf mit zunehmender Vergrößerung des *Struma*.

Ca. 5% dieser Knoten sind jedoch bösartige Neubildungen der Schilddrüse, die sich in vier Typen einteilen lassen: papilläres Schilddrüsenkarzinom (PTC, ca. 60–80 %), follikuläres Schilddrüsenkarzinom (FTC, ca. 10–30 %), anaplastisches Karzinom (ATC, 5%) und medulläres Schilddrüsenkarzinom (MTC, 5%). Schilddrüsenkrebs ist in der Regel relativ gut therapierbar mit einer 5 Jahres-Überlebensrate von 98%, sofern das Karzinom erkannt wird (Nguyen et al., 2015). Das führt auch zum eigentlichen Problem bei der Diagnose von Schilddrüsenknoten: Wie ist es möglich bei der hohen Prävalenz an Schilddrüsenknoten ein gutartiges Knotenstruma von einer bösartigen Neubildung effizient zu unterscheiden und unnötige Eingriffe zu vermeiden?

Die gängige klinische Methode, um die Schilddrüse zu untersuchen, ist das Abtasten des Gewebes nach festen, knotenartigen Strukturen. Doch selbst wenn die Schilddrüse während einer Operation in die Hand genommen wird, ist dies eine sehr ungenaue Methode und etliche Knoten werden übersehen (Mortensen et al., 1955). Dies zeigt sich auch im Vergleich zu Ultraschalluntersuchungen, bei denen 30 % der untersuchten Personen unnatürliche Veränderungen aufweisen von denen jedoch nur 5 % ertastbar sind (Brander et al., 1991). Trotz der aktuellen Möglichkeiten der Ultraschalltechnik ist auch mit dieser Methode keine eindeutige Identifizierung von bösartigen Gewebestrukturen möglich. Ist ein Knoten entdeckt, wird laut den aktuellen Richtlinien der *American Thyroid*

Association (Cooper et al., 2009) für die initiale Evaluierung von Schilddrüsenknoten eine Messung des Thyreoidea-stimulierendes Hormons (TSH) im Serum vorgeschlagen. TSH reguliert die Produktion der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ durch negative Rückkopplung im Rahmen des thyreotropen Regelkreises. Aus diesem Wert lässt sich daher auf hyper-, normo- oder hypofunktionelle Knoten schließen. Dies ist ein wichtiges Kriterium, da hyperfunktionelle Knoten nur selten bösartig sind. Wird eine Normal- oder Unterfunktion festgestellt, sollten die Knoten in einer Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) näher charakterisiert werden. Die FNAB ist aktuell die genaueste, günstigste und schnellste Methode, um die Knoten zu bewerten und hat sich als Schlüsseltechnik bewährt (Castro and Gharib, 2003). Hierbei werden unter Ultraschallkontrolle Zellen aus dem Gewebe entnommen und anschließend cytologisch untersucht. Jedoch hat auch diese Methode ihre Beschränkung. So lässt sich zum Beispiel ein follikuläres Adenom nicht von einem follikulären Karzinom unterscheiden. Solche Gewebestrukturen werden als follikuläre Geschwulst eingestuft (ca. 20 – 30% der Fälle) und bedürfen einer operativen Biopsie (Cooper et al., 2009). Weiterhin ist das Verfahren der FNAB fehleranfällig. Wie Hall et al. (1998) zeigen konnten sind 10 - 28 % der FNAB Diagnosen, die zu einer operativen Entfernung der Geschwulst führten, falsch. Gründe für diese große Zahl an Fehlinterpretationen sind ungeeignetes Material für die Diagnose (30 %), Probenentnahmefehler (10 %) oder diagnostische Fehler (60 %) (Muratli et al., 2014, Hall et al., 1989). Insbesondere der hohe Anteil an diagnostischen Fehlern zeigt das allgemeine Problem der pathologischen Schilddrüsendiagnose, die mit hoher Unsicherheit behaftet ist und stark von dem zu untersuchenden Biopsiematerial abhängt. Zusammengefasst zeigen sich bei der Diagnose zwei Probleme: die Unsicherheit der aktuellen Methode bei der Unterscheidung eines Knotenstruma von einer bösartigen Neubildung, sowie die hohe Prävalenz der Knoten. Es lässt sich nur erahnen, wie viele unnötige Behandlungen vorgenommen werden, die mit einer genaueren Diagnosemethode verhindert werden könnten.

Die Therapie eines diagnostizierten Schilddrüsenkarzinoms variiert in Abhängigkeit von Typ und Stadium. Es sind verschiedene Richtlinien der Gesellschaften für Onkologie verfügbar. Doch empfehlen die meisten eine operative Entfernung der gesamten Schilddrüse bei Tumoren größer als 1 cm (Thyreoidektomie) oder eines Schilddrüsenlappens bei Tumoren kleiner als 1 cm (Lobektomie).

Nach der chirurgischen Entfernung ist die Radioiodtherapie die wichtigste darauffolgende Therapieform (Haugen, 2017, Dietlein et al., 2015). Durch die besondere Eigenschaft der Iodaufnahme in diesem Organ ist mit der Radioiodtherapie für die meisten Schilddrüsenkarzinome eine sehr effiziente und selektive Therapieform vorhanden. Über 90% der differenzierten Schilddrüsenkarzinome können durch die Kombination aus Resektion und Radioiodtherapie behandelt werden (Dietlein et al., 2015). Dadurch sind die Folgen eines therapierten Schilddrüsenkarzinoms mit einer regelmäßigen Nachkontrolle und der Hormonsubstitutionstherapie im Vergleich zu anderen Krebsarten gering, sodass ein normales Leben weitgehend möglich ist.

Deutlich ungünstiger wird die Prognose, wenn der Tumor keine Radioiod-Aufnahme oder -Speicherfähigkeit zeigt. Eine Rezidivtherapie mit Radioiod ist folglich nicht mehr möglich und die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt in dieser Gruppe der Patienten auf knapp 10 % (Dietlein et al., 2015). In diesen Fällen ist die Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren die letzte Möglichkeit (Iwasaki et al., 2019). Der Einsatz von Tyrosinkinasehemmern hat die Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenen Radioiod-refraktären differenzierten Schilddrüsenkarzinomem zwar entscheidend verbessert, doch eine Komplettremission wurde mit dieser Therapieform bisher selten beschrieben (Schlumberger et al., 2015, Wagle et al., 2014). Eine Verlängerung des Gesamtüberlebens konnte ebenfalls nicht gezeigt werden (Cabanillas et al., 2019). Gleichzeitig weist die notwendige Dauertherapie

Nebenwirkungen auf, die teilweise die Lebensqualität erheblich einschränken, so dass die Auswahl der für diese Therapieform in Frage kommenden Patienten sehr streng ist (Haugen, 2017).

Anhand der beschriebenen Problematiken der aktuellen diagnostischen wie auch therapeutischen Behandlungsmethoden von Schilddrüsenkrebs zeigt sich, dass Patienten von einer neuen, gerichteten Herangehensweise stark profitieren könnten.

1.2. Galectin 3 als innovatives Ziel der Immundiagnostik

Galectine sind eine evolutionär hoch konservierte Klasse von Kohlenhydratbindeproteinen, die sich durch ihre Affinität zu β -Galactosiden auszeichnen. Sie besitzen als strukturell charakteristisches Merkmal ein oder zwei 130 Aminosäuren lange Kohlenhydratbindedomänen (CRD) (Barondes et al., 1994). Aktuell sind 15 Galectine bekannt, wobei diese in drei Subklassen eingeteilt werden. Subklasse 1 (Prototyp) umfasst jene Galectine, die aus einer einzelnen β -Galactosid Bindedomäne bestehen (Gal1, Gal2, Gal5, Gal7, Gal10, Gal11, Gal13, Gal14 und Gal15). Subklasse 2 ist charakterisiert durch 2 sich wiederholende Kohlenhydrat-Bindedomänen (Tandem Repeats), welche mit einem Linker verbunden sind (Gal4, Gal6, Gal8, Gal9 und Gal12). Subklasse 3 stellt einen Sonderfall dar und wird derzeit durch ein einziges Mitglied des sogenannten chimären Typus repräsentiert, Galectin 3 (Gal3) (Yang et al., 2008). In diesem Fall ist die C-terminal angeordnete Kohlenhydrat-Bindedomäne über einen Linker, bestehend aus 7 bis 14 Wiederholungen der Aminosäuresequenz Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly-X-X-X mit einer N-terminalen regulatorischen Domäne verbunden. Über diese regulatorische Domäne können bis zu fünf Gal3-Einheiten oligomerisieren, sodass ein Aviditätseffekt gegenüber dem, in der Regel an Zelloberflächen in vielfacher Kopie präsentierten Liganden entsteht (Gong et al., 1999).

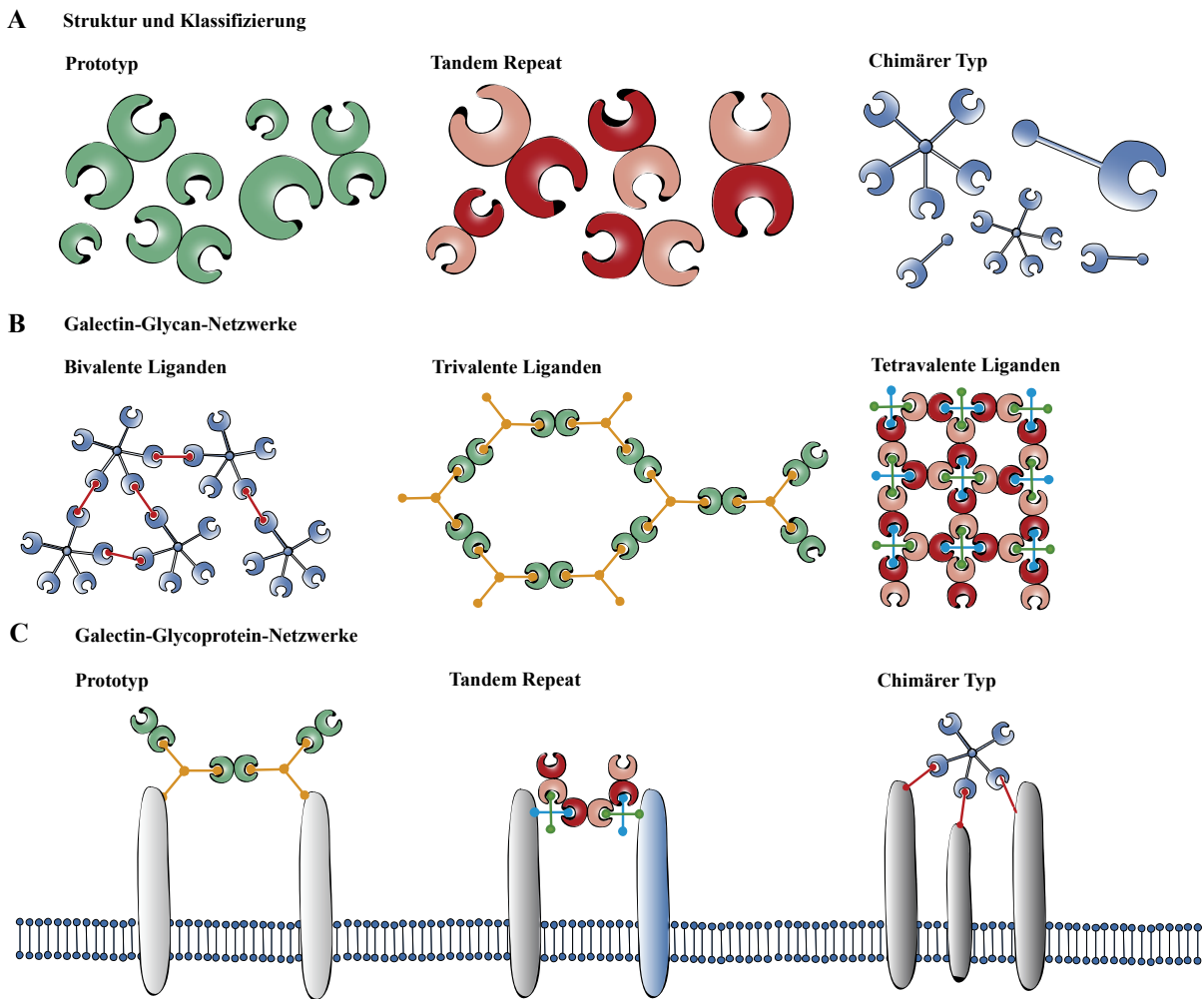


Abbildung 1 Galectin-Glycan-Interaktionen: strukturelle und biochemische Aspekte. **A)** Schematische Darstellung der strukturellen Details der Galectinfamilie. Galectine sind in drei Klassen eingeteilt: Prototyp-Galectine bestehen aus nur einer Kohlenhydratbindedomäne (CRD) und bilden Homodimere. Tandem-Repeat-Galectine bestehen aus zwei CRD mit einer Affinität für verschiedene Glycane und bilden somit Heterodimere. Der chimäre Typ besteht aus einer CRD, die über einen Linker mit einer Oligomerisierungsdomäne verbunden ist. In Abhängigkeit der Ligandenbindung kommt es zur Oligomerisierung als Pentamer. **B)** Schematische Darstellung der verschiedenen Galectin-Glycan-Netzwerke: Es sind beispielhaft bi-, tri- und tetravalente Oligosaccharid-Liganden dargestellt. **C)** Schematische Darstellung der Wechselwirkung von Galectinen mit membranassoziierten Glycoproteinen. Durch die unterschiedlichen Bindungsmodi der Galectine kann die Entfernung zwischen den Glycoproteinen reguliert werden.

Gal-3 ist an einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt, zu denen RNA-Splicing, Gentranskription, Immunantwort, Entzündungsreaktionen, Signaltransduktion, Apoptose sowie Zellmigration und Differenzierung gehören. Damit nehmen diese Proteine auch eine wichtige Rolle bei Krankheiten wie Krebs, Herzerkrankungen oder Fibrose ein (Liu and Rabinovich, 2005). Diese pleiotropen Moleküle werden im Cytoplasma synthetisiert und sind hauptsächlich im Cytosol oder Nucleus präsent. Für die Interaktion mit ihren extrazellulären β -Galactosid-Liganden werden sie auf einem nicht-klassischen Weg, der den Golgi-Apparat umgeht, sekretiert (Cummings et al., 2015).

Es ist zwar bekannt, dass Galectine auch mit anderen Bindepartnern wechselwirken (Kim et al., 2013, Saggiorato et al., 2001), doch ist die wohl wichtigste Funktion die extrazelluläre Übersetzung von Glycan-dekodierter Information in zellbiologische Programme. Hierfür kommt es zu einer spezifischen Interaktion der CRD mit

Sacchariden von Glycoproteinen an der Zelloberfläche, wie bei T-Lymphozyten und Endothelzellen (z. B. TCR, CD13, CD36, CD44, CD98) oder extrazellulären Glycoproteinen (z.B. Elastin, Lymphokine, Fibronectin) (Johannes et al., 2018). Diese Wechselwirkung wird beeinflusst durch die unterschiedlichen Oligosaccharidmodifikationen (N- oder O-verknüpfte Saccharide), den Ort der Glykolysierung, die über den Golgikomplex abhängige Glykolysierungsrate, sowie dessen Modifizierung (z. B. Sialylierung, N-Acetylierung), sodass es zu der Spezifität gegenüber den unterschiedlichen Galectinen kommt (Mendez-Huergo et al., 2017).

Da die Interaktion zwischen Galectinen und Glycoproteinen multivalent ist, kann sich auf der Zelloberfläche ein Galectin-Netzwerk ausbilden. Dieses Netzwerk wiederum führt zu einer Mobilitätseinschränkung der Glycoproteine, was die Protein-Protein Wechselwirkungen fördert oder inhibiert und die Diffusion durch die Plasmamembran beeinflusst. Abhängig vom jeweiligen Galectin entsteht so die spezifische biologische Funktion, die sehr unterschiedlich sein kann. Betrachtet man z. B. die gut untersuchten Galectine Gal1 und Gal3, zeigen beide durch Wechselwirkung mit der Phosphatase CD45 auf T-Zelloberflächen einen starken Einfluss auf deren Funktion. Gal1, das aus nur einer einzelnen β -Galactosid Bindedomäne besteht, hat hierbei einen geringeren Vernetzungsgrad und führt zu einer Trennung von CD45 in einzelne Membrandomänen. Diese verteilen sich gleichmäßig auf der Zelloberfläche, was zu einer hohen Antigensensitivität führt (Nguyen et al., 2001). Gal3 hingegen vernetzt CD45-Domänen über seine Fähigkeit der Oligomerisierung. Diese Vernetzung bindet die Glycoproteine in einer Membrandomäne, wodurch diese lokal präsentiert werden und die Sensitivität gegenüber dem Antigen eingeschränkt wird (Clark et al., 2012). Durch die unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber dem Antigen der T-Zellen kommt es so im Fall von Gal1 zu einer Aktivierung der T-Zellen und zur Apoptose, wohingegen Gal3 die T-Zellaktivität einschränkt und die Apoptose verhindert (Nabi et al., 2015).

Veränderte Glykolysierungsmuster sind ein typisches Merkmal von Krebs. Diese nutzen die Eigenschaften der Galectine, um das Tumorstadium und die Stimulation einer Immunantwort zu umgehen. Aus der tumorspezifischen „Galectin-Signatur“ ergeben sich jedoch auch interessante Möglichkeiten im Hinblick auf eine biomarkerbasierte Diagnostik und sind aktuell ein vielfach untersuchtes Thema (Thijssen et al., 2015). Gal3, dessen Expressionsverhalten vielfach in gutartigem und bösartigem Schilddrüsengewebe untersucht wurde, scheint ein geeigneter Kandidat für die Immundiagnostik von Schilddrüsenkrebs zu sein. Dieses Protein ist nicht detektierbar in normalem und gutartig vergrößertem Schilddrüsengewebe, wohingegen die differenzierten Schilddrüsenkarzinome PTC und FTC eine starke Gal3 Expression im Cytosol, auf der Zellmembran und im perizellulären Raum zeigen (Papotti et al., 2004, Saggiorato et al., 2001). Gal3 nimmt hierbei eine entscheidende Rolle in der Regulation der Differenzierung des Gewebes ein. So führt die induzierte Überexpression von Gal3 in Schilddrüsenzellen zu einem transformierten Phänotyp und die Inhibierung der Gal3 Expression in PTC-Zelllinien zur Umkehr des Phänotyps (Takenaka et al., 2003). Auch das Tumorstadium wird durch die Blockierung der Apoptose bei einer erhöhten Gal3 Expression gefördert (Akahani et al., 1997).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine immunhistochemische Methode zur Evaluierung von Schilddrüsengewebe anhand der Gal3 Expression entwickelt, mit der die diagnostische Genauigkeit der FNAB verbessert werden sollte. Wie in einer breit angelegten Studie gezeigt werden konnte, ist die Unterscheidung eines Knotenstruma von einer bösartigen Neubildung über diese Methode mit einer positiven Vorhersage von 98 %, einer negativen Vorhersage von 94 % und einer diagnostischen Genauigkeit von 96 % möglich (Bartolazzi et al., 2008). Vergleicht man diese Werte mit den Erfolgsraten der gängigen FNAB ist dies eine erhebliche Verbesserung.

Eine nicht-invasive Alternative zur cytologischen Diagnose von Gewebebiopsien ist das bildgebende Verfahren der Positronen-Emissionstomographie (PET). Diese Methode detektiert paarweise γ -Quanten, die indirekt von einem Positron-emittierenden Radionuklid erzeugt werden. Durch die Kopplung des Radionuklids an ein biologisch aktives Molekül kann so dessen Wechselwirkung *in vivo* sichtbar gemacht werden. Auch für die Diagnostik von Schilddrüsenkrebs über Gal3 stellt dies eine sinnvolle Weiterentwicklung dar. Insbesondere in Fällen von sehr kleinen Knoten, also einer sehr frühen Diagnose oder bei multiplen Knoten und Metastasen ist so eine Unterscheidung zu normalem Gewebe und die exakte Lokalisierung der bösartigen Neubildung möglich. Erste Ergebnisse in einem Xenograft Tumormodell von Schilddrüsenkrebs in Mäusen mit einem Gal3 bindenden monoklonalen Antikörper (α -hGal3-mAk), der mit dem Radionuklid Zirkonium (^{89}Zr) gekoppelt war, zeigen beeindruckende Resultate. So sind spezifische Immun-PET Aufnahmen von Tumoren mit einer minimalen Größe von 2,5 mm möglich (Alessandria et al., 2016). Dieses erfolgsversprechende Ergebnis gibt Hoffnung, dass eine effiziente Charakterisierung von Schilddrüsenknoten und eine Frühdiagnose von Schilddrüsenkrebs durch medizinische Bildgebung in naher Zukunft verfügbar sein wird und so ein Großteil von unnötigen Thyreoidektomien vermieden werden kann.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Um für eine translationale Anwendung geeignet zu sein, muss ein Diagnostikum neben der Selektivität und Spezifität für das Tumorantigen weitere wichtige Faktoren erfüllen. Zum einen sollte es möglich sein das Diagnostikum in einer ausreichenden Menge und in hohem Reinheitsgrad zu produzieren, was aus regulatorischen Gründen eine entscheidende Rolle spielt. Auch die pharmakokinetischen Eigenschaften sind insbesondere bei der Verwendung von Radionukliddiagnostika wichtig, da häufig ein enges Zeitfenster zwischen Halbwertszeit des Radionuklids, der glomerulären Filtration und der Anreicherung im Tumor besteht. Des Weiteren sind toxische Eigenschaften des Diagnostikums zu minimieren, um mögliche Nebenwirkungen zu vermeiden.

Ausgehend von dem α -hGal3-mAk aus der Hybridomzelllinie M3/38, der sich in vorausgegangenen Immun-PET Experimenten bewiesen hatte, sollte auf der Grundlage seines Fab-Fragments ein Diagnostikum entwickelt werden, das die hohen Ansprüche einer klinischen Anwendung erfüllt.

RNA-Gewinnung, Sequenzanalyse und Klonierung des α -hGal3 bindenden Immunglobulin-Fragments waren hierbei die Basis für die folgenden Arbeiten. Damit das Fab-Fragment in ausreichender Menge und konstanter Reinheit produziert werden konnte, mussten die heterologe Produktion in *E. coli* und eine geeignete Reinigungsstrategie etabliert werden. Durch unterschiedliche Protein-Engineering Ansätze sollte das Fragment im Hinblick auf die Plasmahalbwertszeit (PASylierung), niedrige Toxizität/Immunogenität (Humanisierung) und molekulare Homogenität (Konjugationschemie mit Chelatoren und Fluoreszenzmarkern) optimiert werden. Durch die Kombination der verschiedenen Ansätze sollte die Translation des für die Schilddrüsendiagnostik validierten Biomarkers Gal3 ermöglicht werden, was anhand von Mausmodellen nachgewiesen werden sollte.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

E. coli K12-Stämme

W3110 F⁻ λ⁻ IN(rrnD-rrnE)1 rph-1 (Hayashi et al., 2006)

XL1-Blue recA1, endA1, gyrA96 (Nal^r), thi-1, hsdR17, glnV44, relA1, lac, [F['] proABlacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] (Bullock et al., 1987)

E. coli B-Stämme

BL21 F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) [malB⁺]_{K-12}(λ^S) (Studier and Moffatt, 1986)

Alle *E. coli*-Stämme stammten aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, Lehrstuhl für Biologische Chemie, TU München.

2.1.2. Plasmide

pASK75-mBiP (Skerra, 1994b) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

pASK88-H4D5 (Skerra et al., 2007) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

pASK88-H4D5-HC-PAS#1(200)-His/LC-PAS#1(200)-StrepII

(Schlapschy et al., 2013) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

pASK111-CD30A (Schlapschy et al., 2005) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

pXL1-PAS#1.2(200) (Schlapschy et al., 2013) aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra, TU München

2.1.3. Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide für die DNA-Sequenzierung

D11 5'-TGGAGGAGGGTGCCAGG-3'

D12 5'-AACTGCTCATCAGATGGC-3'

D20 5'-CCACTCCCTATCAGTGA-3'

PR1 5'-CGCAGTAGCGGTAAACG-3'

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese und PCR

(dT) ₁₈	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
InFab11	5'-TTTGATCTCGAGCTTGGTCCCAGAACC-3'
PR-hGal3-P113	5'-GCGCATATGCCACTGATT-3'
RatVHF6	5'-GATCGGCGCGCCAGGCCAGCTGCAGTCTGG-3'
RatVH17	5'-GATCGGCGCGCCAAGVGGTGCAGCTWGTKGAGWC-3'
RatVH21	5'-GATCGGCGCGCCAAGAGGTGCAGCTGAAGGAATC-3'
RatVHRef2	5'-GGAGACGGTGACCATGACTCCTTGG-3'
RatVLf2	5'-GATCGCCGGCGAAACTGTGATGACCCAGTC-3'
RatVL13b	5'-GATCGCCGGCGATGTTGTGATGACCCAG-3'
RatVLf18	5'-GATCGCCGGCGACGTTGTGCTGACTCAGTC-3'
VHNtermFow	5'-CGTAGCGCAGGCCCAGATCCAGCTTGTACAGTCTGGACCTGAGC-3'
VHNtermRev	5'-GCTCAGGTCCAGACTGTACAAGCTGGATCTGGGCCTGCGCTACG-3'
RatVLFow	5'-GATGTTGAGCTCACCCAGACTCCAGTGTCT-3'
RatVLNtermRev	5'-CACTGGAGTCTGGGTCATGACAACGTCGGCTTTTGT CACA-3'
RMG	5'-AGGTCGCCACACGTGTGG-3'
RMK	5'-GACCTCCACGGAGTCAGC-3'
VLNtermFow	5'-TGTGACAAAAGCCGACGTTGTCATGACCCAGACTCCAGTG-3'
VLNtermRev	5'-CACTGGAGTCTGGGTCATGACAACGTCGGCTTTTGT CACA -3'
4NRY_VH_I69FRev	5'-GCTTTTATCCAGGCTAAAAATCACCTGGCC-3'
4NRY_VH_I69FFow	5'-GGCCAGGTGATTTT TAGCCTGGATAAAAAGC-3'
4NRY_VH_E46K_Fow	5'-CCTGGTAAAGGTCTGAAATGGATGGGTTGGATT-3
4NRY_VH_E46K_Rev	5'-AATCCAACCCATCCATTT CAGACCTTTACCAGG-3'
4NRY_VH_K74A_Fow	5'-GTGATTATCAGCCTGGATGCGAGCATT AATACCG-3'
4NRY_VH_K74A_Rev	5'-CGGTATTAATGCTCGCATCCAGGCTGATAATCAC-3'
4NRY_VH_676870Fow	5'-GCCGATGATTTTAAAGGCCGTTTCATTTT TAGCCTGGATAAAAAGC-3'
4NRY_VH_676870Rev	5'-GCTTTTATCCAGGCTAAAAATGAAACGGCCTTTAAAATCATCGGC-3'
4NRY_VL_L4MRev	5'-GCTCGGACTCTGGGTCATAACAACATCGGCTTT-3'
4NRY_VL_L4MFow	5'-AAAGCCGATGTTGTTATGACCCAGAGTCCGAGC-3'
SapICysFow	5'-CCGCACCGGCGGCCTGCTAAGCTTGACCTGTGA-3'
SapICysRev	5'-TCACAGGTCAAGCTTAGCAGGCCGCCGGTGCGG -3'

2.1.4. Enzyme und sonstige Proteine

Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Anti-human-Kappa-leichte-Kette-IgG (aus Ziegen)-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Anti-human-Kappa-leichte-Kette-IgG (aus Kaninchen) - Ready-to-use-Lösung	Dako, Carpinteria
Anti-rat-Kappa-leichte-Kette-IgG (aus Ziegen)-Alkalische Phosphatase-Konjugat	Abcam, Cambridge
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Alkoholdehydrogenase	Sigma-Aldrich, Darmstadt
β -Amylase	Sigma-Aldrich, Darmstadt
CytochromC	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Envision Flex HRP Magenta	Dako, Carpinteria
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	ThermoFisherScientific, Geel
Herculase II Fusion DNA-Polymerase	Agilent, Santa Clara
Lysozym aus Hühnereiweiß	Applichem, Darmstadt
Myoglobin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Ovalbumin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Pfu DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Rinderserumalbumin (Fraktion V, pH 7)	Applichem, Darmstadt
Streptavidin, Reinheit > 98 % (SDS-PAGE), rekombinant	Ina Theobald, AG Prof. Dr. Skerra, TU München
T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l) MBI	Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.5. Chemikalien

Acrylamid-Stammlösung (30 % w/v mit 0,8 % w/v Bisacrylamid)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Agarose, Typ GTQ	Carl Roth, Karlsruhe
Aminosäurederivate für die Peptidsynthese:	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH	
Ammoniumacetat (Gesamtmetallgehalt < 0,0001%)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Anhydrotetracyclin Hydrochlorid (aTc)	Thermo Fisher Scientific, Geel
Antifoam Y-30-Emulsion	Sigma-Aldrich, Darmstadt

Bacto Agar	Becton Dickinson, Sparks
Bacto Yeast Extract	Becton,Dickinson, Sparks
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit
Blue Dextran	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Basel
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Desferrioxamin-Maleimid (DFO-MI)	Macrocyclics, Dallas
Dimethylformamid (DMF, zur Synthese)	Merck, Darmstadt
dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Dehydroascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Ethanolamin/HCl, 1 M Lösung, pH 8,5	Biacore, Uppsala
Ethyl-cyanohydroxyiminoacetat (Oxyrna)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Ethyl(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)	Sigma-Aldrich, Darmstadt
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Alfa Aesar, Karlsruhe
N-Hydroxysuccinimid	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid	Carl Roth, Karlsruhe
p-Isothiocyanatobenzyl-Deferoxamin (pSCN-DFO)	Macrocyclics, Dallas
Kanamycin A Monosulfat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP); >99,5 %	Sigma-Aldrich, Darmstadt
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Sulfo-Cyanin5.5-N-Hydroxysuccinimid (Cy5.5-NHS)	Lumiprobe, Hannover
Sulfo-Cyanin7-Maleimid (Cy7-MI)	Lumiprobe, Hannover
Synthetisches Peptid: Ac-Q-A-P-P-G-A-Y-P-G	Peptide Speciality Laboratories, Heidelberg
Thiaminhydrochlorid	Applichem, Darmstadt
Triisopropylsilan < 99 %	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Zirconium-89 (IV)-oxalat in 1 M Oxalsäurelösung	BA, Louvain-la-Neuve, Belgien

Weitere im Laboralltag üblichen Chemikalien, die an dieser Stelle nicht aufgelistet sind, wurden von Sigma-Aldrich (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) bezogen.

2.1.6. Standards und Kits

DNA-Größenstandard

GeneRuler 1 kb-DNA-Leiter

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

GeneRuler 0,1 kb-DNA-Leiter

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

DNA-Auftragspuffer

6x DNA Loading Dye

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Kits zur DNA-Isolierung

Wizard SV Gel- und PCR Reinigungssystem

Promega, Mannheim

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit Quiagen

Quiagen, Hilden

PCR Purification Kit

Quiagen, Hilden

Immunhistochemische Kits

Dako Target Retrieval Solution, 10x Tris/EDTA Puffer, pH 9

Dako, Carpinteria

REAL EnVision Detection System

Dako, Carpinteria

Kit zur Isolierung von RNA

RNeasy Mini Kit

Quiagen, Hilden

Kit zur cDNA-Synthese

First Strand cDNA Synthesis Kit

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Kit für den Papainverdau

Pierce Fab preparation kit

Thermo Fisher Scientific, Geel

Kristallisations-Screens

Vector Screen 1-5, 480 Bedingungen

AG Prof. A. Skerra, TU München

Protein-Größenstandards

Pierce Unstained Protein MW Marker

Thermo Fisher Scientific, Geel

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder

Thermo Fisher Scientific, Geel

PageRuler Prestained NIR Protein Ladder

Thermo Fisher Scientific, Geel

2.1.7. Geräte

Fluoreszenz-Scanner Odyssey

Li-Cor, Lincoln

Fluoreszenz-Tomographiescanner FMT2500

VisEn Medical, Bedford

FPLC

Äkta Explorer

GE Healthcare Europe, Freiburg

Äkta Pure 25M

GE Healthcare Europe, Freiburg

Äkta Purifier

GE Healthcare Europe, Freiburg

Äkta Prime

GE Healthcare Europe, Freiburg

French Press-Hochdruckhomogenisator

SLM Instruments, Urbana

Instrumente für die Histologie

HistoCore Biocut

PT Link

Aperio CS2

Laborchromatographieanlagen

Durchflussphotometer UVis-920

Fraktionssammler Redi Frac

Peristaltikpumpe P1

Schreiber REC 112

Laborfermenter

Biostat B mit UniVessel Glass 10 l

pH Elektrode, EasyFerm Plus PHI VP 425

Sauerstoffelektrode, VisiFerm DO 425

Massenspektrometer

maXis Quadropol Time-of-Flight (qTOF) ESI-MS

Oberflächenplasmonresonanzspektrometer

Biacore 2000

Peptidsyntheseautomat

MultiPep RS

Pipettierroboter

Freedom Evo

Reinstwasser-Anlagen

ELGA PURELAB Classic

Taumelrollenmischer

Thermocycler

Mastercycler gradient

TPersonal

UV-Vis-Photometer

NanoDrop 2000

UltraSpec 2000

SpectraMax 250 Microplate-Reader

Instrumente für die PET-Bildgebung

γ -Counter 1480 Wallac Wizard

Bildplattenscanner CR 35 BIO

Dosiskalibrator CRC-15R

Leica Biosystems, Wetzlar

Agilent, Santa Clara

Leica Biosystems, Wetzlar

GE Healthcare Europe, Freiburg

GE Healthcare Europe, Freiburg

GE Healthcare Europe, Freiburg

GE Healthcare Europe, Freiburg

Sartorius Stedim Biotech, Göttingen

Hamilton, Reno

Hamilton, Reno

Bruker Daltonik, Bremen

Biacore, Uppsala

INTAVIS Bioanalytical Instruments, Köln

Tecan, Männedorf

VWS Deutschland, Celle

Stuart SRT1 Bibby Scientific, Staffordshire

Eppendorf, Hamburg

Biometra, Göttingen

PEQLAB Biotechnologie, Erlangen

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Molecular Devices, Sunnyvale

PerkinElmer, Turku

Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt

Capintec, Ramsey

Mini-Scan TLC Imaging Scanner	BIOSCAN Analytical Instruments, Washington D.C.
PET-CT-Kleintierscanner	Siemens Healthcare, Erlangen
Kryostat-Mikrotom HM-500	Microm International, Walldorf

Zentrifugen

Sigma 4K15C mit Rotoren 11156 und 11118	Sigma, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H6000A/HBB6	Kendro Laboratory Products, München
Sorvall RC 5C Plus und RC 6 Plus mit Rotoren SS-34, SLA-1500, SLA-3000, F10-4x1000	Thermo Fisher Scientific, Geel

Die vorhandene Grundausstattung eines biotechnologischen, bzw. biochemischen Labors wird vorausgesetzt und hier nicht näher beschrieben.

2.1.8. Sonstiges Material

Adhäsionsobjektträger SuperFrost Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific, Geel
<u>Affinitätschromatographie-Materialien</u>	
Strep-Tactin Superflow	IBA, Göttingen
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Europe, Freiburg
<u>Affinitätschromatographiesäulen</u>	
HisTrap 1 und 5 ml	GE Healthcare Europe, Freiburg
<u>Dialysemembranen und -schläuche</u>	
Spectra/Por, MWCO: 6-8 kDa	Roth, Karlsruhe
Slide-A-Lyzer, MWCO: 10 kDa	Thermo Fisher Scientific, Geel
<u>Größenausschlusschromatographie-Säulen</u>	
PD-10	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 HR 10/30	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade	GE Healthcare Europe, Freiburg
Superdex 200 HiLoad 26/60 prep grade	GE Healthcare Europe, Freiburg
<u>Ionenaustauschchromatographie-Säulen</u>	
Resource Q, 1 und 6 ml	GE Healthcare Europe, Freiburg
<u>Konzentratoren</u>	
Amicon Ultra-4, MWCO: 10 kDa	Millipore, Eschborn

Amicon Ultra-15, MWCO: 10 kDa	Millipore, Eschborn
Amicon Ultra-4, MWCO: 30 kDa	Millipore, Eschborn
Amicon Ultra-15, MWCO: 30 kDa	Millipore, Eschborn
Vivaspin 500, MWCO: 10 kDa	Sartorius, Göttingen
<u>Membran für die SPOT-Synthese</u>	
Amino-PEG500-UC540; 100×150 mm	INTAVIS Bioanalytical Instruments, Köln
<u>Mikrotiterplatten</u>	
Immuno Plate F96-Maxisorp	Nunc, Roskilde
<u>Petrischalen</u>	
Rund, 94x16mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<u>Küvetten</u>	
Polystyrol: 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Quarz: 108.002-QS, 10 mm	Hellma, Mühlheim
<u>SPR Sensorchip</u>	
CM5	Biacore, Uppsala
<u>Sterilfilter</u>	
Microsart CN-Filter (Cellulosenitrat); 0,2 µm	Sartorius Stedim Biotech, Göttingen
NC20 (Cellulosenitrat); 0,45 µm	Whatman, Dassel
Ultrafree Centrifugal Filters (PVDF); 0,22 und 0,45 µm	Merck-Millipore, Darmstadt
Filtropur S Spritzenfilter; 0,2 und 0,45 µm	Sarstedt, Nümbrecht
<u>Zellkulturgefäße</u>	
Zellkulturflasche Cellstar mit 25 oder 150 mm Wachstumsfläche	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<u>Kristallisationsplatten</u>	
96well CrystalQuick-Platten	Greiner BioOne, Frickenhausen
<u>Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotoren</u>	
SS-34, SLA-1500, SLA-3000 und F10-4x1000	Nalgene Company, New York

2.1.9. Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Die Medien und Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Proteinen und DNA wurden entweder für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert oder durch Filtration sterilisiert. Es wurde bei allen Lösungen mit Reinstwasser (Typ I, 18,2 MΩ·cm) gearbeitet. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte bei Festmedien vor dem Gießen der leicht abgekühlten Medien (ca. 50 °C) und bei Flüssigmedien unmittelbar vor der Verwendung.

Antibiotika-Stammlösungen

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden steril filtrierte Antibiotika-Stammlösungen verwendet, die bei -20 °C gelagert wurden.

Ampicillin (Amp) 100 mg/ml	in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam) 30 mg/ml	in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)

Induktor-Stammlösung

Anhydrotetracyclin (aTc) 5 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium)

Lagerung bei -20 °C

LB-Medium

Bacto Tryptone 10 g/l

Bacto Yeast Extract 5 g/l

NaCl 5 g/l

Bacto Agar (nur für Kulturplatten) 15 g/l

Mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklav sterilisiert.

TB-Medium

TB-Puffer-Stammlösung (10x)

KH₂PO₄ 0,17 M

K₂HPO₄ 0,72 M

TB-Medium

Bacto Tryptone 12 g/l

Bacto Yeast Extract 24 g/l

Glycerin 4 ml/l

Nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums wurde die autoklavierten Pufferstammlösung im Verhältnis 1:10 zugegeben.

KB-Puffer

Pipes/NaOH 10 mM

MnCl₂ 55 mM

CaCl₂ 15 mM

KCl 250 mM

Alle Komponenten, außer MnCl₂ wurden in H₂O gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 6,7 eingestellt, anschließend das MnCl₂ hinzugegeben und im Autoklav sterilisiert.

SOB-Medium

Bacto Tryptone 20 g/l

Bacto Yeast Extract 5 g/l

NaCl 10 mM

KCl 2,5 mM

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt. Im Anschluss wurde je Liter 10 ml 1 M MgCl₂ und 10 ml 1 M MgSO₄ zugegeben.

SOC-Medium

Bacto Tryptone	20 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Vor dem Autoklavieren wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und im Anschluss je Liter 20 ml 20 % Glucose, 10 ml 1 M MgCl₂ und 10 ml 1 M MgSO₄ zugegeben.

Lösungen für die Fermentation

Mineralsalzlösung

Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	5,51 g/l (31 mM)
KH ₂ PO ₄	2,58 g/l (19 mM)
NH ₄ Cl	1,33 g/l (25 mM)
Na ₃ -Citrat • 2 H ₂ O	0,47 g/l (5 mM)

Die Mineralsalzlösung hat nach dem Autoklavieren einen pH-Wert von 6,9.

Glucoselösungen

- 20 % (w/v) Glucose (separat autoklaviert)
- 50 % (w/v) Glucose (separat autoklaviert)

MgSO₄-Stammlösung

MgSO ₄	1 M (separat autoklaviert)
-------------------	----------------------------

Thiamin-Stammlösung

Thiamin-Hydrochlorid	10,0 mg/ml (sterilfiltriert)
----------------------	------------------------------

FeCl₃-Stammlösung

FeCl ₃ • 6 H ₂ O	35,0 g/l (mit konz. HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert; sterilfiltriert)
--	--

Zn-Acetat-Stammlösung

Zn-Acetat • 2 H ₂ O	8,0 g/l (sterilfiltriert)
--------------------------------	---------------------------

Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert)

MnCl ₂ • 4H ₂ O	3,0 g/l
CuCl ₂ • 6 H ₂ O	0,3 g/l
H ₃ BO ₃	0,6 g/l
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,5 g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4 H ₂ O	1,2 g/l
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	4 mM

Weitere Lösungen für die Fermentation

- 12,5 % (w/v) NH₃ und 15 % H₃PO₄ zur pH-Regulierung

Puffer für die SDS-PAGE

1x SDS-Laufpuffer:

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l
pH 8,8 stellt sich ein.	

4x Lower-Tris:

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS	4 g/l

4x Upper-Tris:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS	4 g/l

5x Auftragspuffer:

Tris/HCl pH 8,0	250 mM
SDS	7,5 % w/v
Glycerin	25 % v/v
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
2-Mercaptoethanol	12,5 % v/v (bei reduzierendem Auftragspuffer)

Färbelösung:

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v
Coomassie Brilliantblau R-250	0,25 % w/v

Entfärbelösung:

Essigsäure	10 % v/v
Methanol	40 % v/v

AP-Puffer

Tris/HCl pH 8,8	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

HBS-Puffer

HEPES/NaOH pH 7,5	10 mM
MgCl ₂	5 mM
NaCl	130 mM
KCl	5 mM

PBS

KH ₂ PO ₄	4 mM
NaHPO ₄	15 mM
NaCl	115 mM

Der pH-Wert des Puffers liegt bei pH 7,4. PBS wurde für einige Experimente in Kombination mit 0,01 oder 0,005 % (v/v) Tween 20 (PBS/T_{0,01} bzw. PBS/T_{0,005}) sowie mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin (PBS/BSA) verwendet.

Periplasma-Aufschlusspuffer

Saccharose	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer)

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	50 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

Puffer für die Metallchelate-Affinitätschromatographie

IMAC-Laufpuffer

NaPi pH 7,5	40 mM
NaCl	500 mM

IMAC-Elutionspuffer

NaPi pH 7,5	40 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	150 mM

Puffer für die Ionenaustauschchromatographie

AAC-Laufpuffer

Tris/HCl pH 9,0	20 mM
-----------------	-------

AAC-Elutionspuffer

Tris/HCl pH 9,0	20 mM
NaCl	1 M

Medien, Medienzusätze und Puffer für die Zellkultur

Medium RPMI-1640	Invitrogen, Paisley
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN biotech, Aidenbach
Dulbecco's PBS mit Mg und Ca	Merck Millipore, Darmstadt
Accutase mit 0,5 mM EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. RNA-Extraktion aus Hybridom-Zelllinien und cDNA-Synthese

Die Zelllinie M3/38 (erhalten von Prof. Bartolazzi) wurde in 150 mm-Kulturflaschen mit RPMI1640-Medium (10 % v/v FCS) über mehrere Passagen kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Nach dem Ablösen der Zellen durch Inkubation mit 7 ml Accutase (10 min, 37°C) wurden diese durch Zentrifugation (5 min, 300 g, 4°C) in 50 ml-PP-Röhrchen (Greiner) geerntet. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini-Kit (Quiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm und unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes mit einem Extinktionskoeffizienten von 0,025 (µg/ml)⁻¹ cm⁻¹ bestimmt. Die Ausbeute betrug ca. 100 µg RNA aus etwa 2×10⁷ Zellen.

Ausgehend von der extrahierten RNA wurde mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) die cDNA nach Anleitung des Herstellers synthetisiert. Für die enzymatische Reaktion mit (M-MuLV)-Reverser Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus wurde 0,2 µg Gesamt-RNA und 0,5 µg des Oligo(dT)18-Primers eingesetzt. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2. Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Um Einzelkolonien aus *E. coli*-Suspension zu erhalten, wurden die Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Zugabe von Antibiotika zum Nährmedium konnte auf die jeweiligen Plasmide selektiert werden. Nach Inkubation wurden die Platten bei 4°C gelagert und so für 4 Wochen zur Inokulation von LB- oder TB-Flüssigmedien verwendet. Für eine 2 ml Kultur wurden sterile 13 ml Kulturröhrchen verwendet wohingegen größere Ansätze im Erlenmeyerkolben mit einem 2,5-fachen Nennvolumen in Relation zum Kulturvolumen angesetzt wurden. Die Kulturen wurden bei der gewünschten Temperatur im Schüttelinkubator bei 180 rpm kultiviert.

2.2.3. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Chemisch transformationskompetente *E. coli*-Zellen wurden nach Inoue et. al. (1990) hergestellt. Hierbei wurden 100 ml SOB Medium ohne Antibiotikum mit einer stationären Übernachtkultur des zu transformierenden Stamms inokuliert und bei 22°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Nach Abkühlen der Kultur im Eisbad für 10 min wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 5000 rpm, 4416 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 30 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 8 ml eiskaltem TB-Puffer mit 7% DMSO (v/v) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zu je 200 µl aliquotiert und entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation der kompetenten Zellen wurde 1 ng Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligierungsansatzes mit der Zellsuspension gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 30 s auf 42°C erhitzt, 1 min auf Eis gestellt, anschließend die Suspension in 1 ml BL-Medium überführt und für 1 Stunde bei 37°C im

Schüttelinkubator kultiviert. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl auf eine LB-Agarplatte verteilt und diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten wurden für die weitere Verwendung bis zu 2 Wochen bei 4°C gelagert.

2.2.4. DNA-Isolierung aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das Plasmid-Miniprep-Kit von Quiagen nach der Herstellervorschrift verwendet. Die extrahierte DNA wurde im beiliegenden TE-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle der Plasmide nach Subklonierungen wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei der Klonierung von PCR-Fragmenten oder Mutageneseprodukten wurde eine DNA-Sequenzierung durchgeführt.

2.2.5. Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Die größenabhängige Trennung von DNA-Fragmenten für analytische sowie präparative Zwecke wurde über die in der Literatur ausführlich beschriebene Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook and Russell, 2001) erreicht. In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentration von 0,8 - 1,2 % (w/v) in TAE-Puffer unter Erhitzen gelöst. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht wurde nach Abkühlen der noch flüssigen Agarose 1/10.000 Volumen einer 1 % (w/v) Ethidiumbromid-Stammlösung zugesetzt. Das erkaltete und erstarrte Agarosegel wurden mit DNA bestückt, die mit DNA-Auftragspuffer verdünnt wurde. Anschließend wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 90 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese konnten die DNA-Fragmente durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) detektiert werden. Für präparative Zwecke wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mit dem Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem (Promega) nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers isoliert. Von der gereinigten DNA wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und unter Verwendung des Extinktionskoeffizient mit dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration berechnet. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich aus der durchschnittlichen Absorption von $600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pro Basenpaar.

2.2.6. Modifizierung von DNA

2.2.6.1. Quik Change Mutagenese

Zur ortsgerichteten Mutagenese in einem kleinen Bereich des Plasmids (< 100 bp) zu erreichen wurde das Quik-Change II Mutagenesekit von Agilent nach Anleitung des Herstellers verwendet. Bei dieser Methode werden Plasmide aus *dam*⁺ *E. coli* Stämmen mit Hilfe von komplementären Primern, welche die gewünschte Mutation tragen, durch lineare PCR vollständig synthetisiert. Anschließend wird die *dam*-methylierungsspezifische Restriktionsendonuclease DpnI hinzugegeben, die das methylierte Ausgangsplasmid abbaut. Dadurch wird bei der folgenden Transformation von *E. coli*-Zellen gewährleistet, dass das synthetische unmethylierte Plasmid einen Selektionsvorteil hat.

2.2.6.2. Zirkuläre Amplifizierungsreaktion (CPEC)

Die Mutagenese an zwei weit entfernten Positionen in einem Plasmid erfolgte durch die Circular Extension Polymerase Cloning (CPEC) (Quan and Tian, 2009). Hierbei wird das mutierte Plasmid mit dem QuikChange II Mutagenese-kit (Agilent) und Primerpaaren für beide Positionen in zwei Schritten erzeugt. Zu Beginn wird ein Reaktionsansatz mit der Plasmid-DNA, dem Vorwärts Primer für Position 1 und Reversen Primer für Position 2, sowie ein zweiter Ansatz mit der Plasmid-DNA, dem Vorwärts Primer für Position 2 und Reversen Primer für Position 1 angesetzt. Durch die Synthese entstehen so zwei Fragmente mit komplementären Bereichen, die nach gelelektrophoretischer Reinigung in einer zweiten PCR ohne Primer miteinander verbunden werden. Hierbei wurden jeweils 100 ng beider Fragmente eingesetzt. Während der 5 Amplifizierungszyklen mit dem QuikChange II Mutagenese-kit hybridisieren die zwei Fragmente und werden zu einem vollständigen doppelsträngigen Plasmid verlängert. Da bei dieser Methode keine Ligase verwendet wird, besitzt das entstehende Plasmid zwei einzelsträngige Lücken oder Nicks, die nach der Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen geschlossen werden.

2.2.6.3. Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von doppelsträngiger DNA wurde zur Restriktionsanalyse oder für Klonierungsarbeiten vorgenommen, wobei in allen Fällen mit Typ-II-Restriktionsenzymen nach Herstellervorgaben gearbeitet wurde. Analytische Ansätze erfolgten in einem 20 µl Maßstab mit 0,5 µg DNA und je 5 Units des Restriktionsenzym, präparative Ansätze in 20 µl mit 1 - 2 µg DNA und 10 Units des Restriktionsenzym bei 37°C für jeweils eine Stunde.

2.2.6.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifizierung und Gensynthese

Für die Amplifizierung von Genfragmenten wurde die Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) nach Anleitung des Herstellers in einem Volumen von 20 µl verwendet. Es wurden ca. 0,1 ng Plasmid-DNA oder cDNA zur Amplifizierung verwendet. Als Primer dienten jeweils zwei synthetische Oligodesoxynucleotide, die komplementäre Sequenzen zu den flankierenden Bereichen des relevanten DNA-Abschnitts besaßen. Die komplementären Sequenzen wurden so gewählt, dass sie bei einer Länge von 18 bp im Idealfall 10 G/C-Basen enthielten. Die Einführung weiterer Genelemente, wie zum Beispiel eines zusätzlichen Aminosäurecodons oder einer Restriktionsschnittstelle, gelang durch Verlängerung des Primers um die gewünschte Sequenz, sodass das PCR-Produkt dies ebenfalls enthielt. Zur Reinigung der amplifizierten DNA für anschließende Klonierungsarbeiten wurden nach Gelelektrophorese das Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem unter Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.6.5. Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung der Selbstzirkularisierung bei einer Ligierung wurde das DNA-Vektorfragment mit der Fast AP alkalischen Phosphatase (Thermo Fisher Scientific) dephosphoryliert. Hierfür wurde 1 µl der alkalischen Phosphatase zu 50 µl Restriktionsansatz für die letzten 20 min des Restriktionsverdaus zugegeben. Anschließend wurde

die Phosphatase für 10 min bei 65°C inaktiviert und im Verlauf der Reinigung der DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese abgetrennt.

2.2.6.6. Ligierung von DNA-Fragmenten

Die Ligierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4-DNA-Ligase nach Anleitung des Herstellers (New England Biolabs). Vor der Ligierung wurde die DNA mit dem Wizard SV Gel- und PCR-Reinigungssystem gereinigt. Die Ligierung wurde in einem Volumen von 10 µl mit ca. 100-200 ng des Vektorrückgrats und der dreifachen molaren Menge des Inserts entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C durchgeführt. Nach der Deaktivierung der DNA-Ligase durch Erhitzen auf 65°C für 10 min wurden kompetente *E. coli* Zellen mit 5 µl des Ansatzes transformiert.

2.2.6.7. Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder auch von PCR-Produkten wurde durch den Eurofins Genomics durchgeführt. Hierfür wurde 15 µl der gereinigten DNA (100 ng/µl) mit 2 µl eines geeigneten Primers (10mM) versetzt und zur Sequenzierung an den Dienstleister versandt.

2.3. Gentechnische Methoden

2.3.1. Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die Produktion von Proteinen in *E. coli* wurden Expressionsvektoren verwendet, die das dicht regulierte tet-Promoter/Operator-System nutzen, welches mit Anhydrotetracyclin chemisch induziert werden kann (Skerra, 1994b). Mit diesem System können die Bakterienkulturen ohne Belastung durch die heterologe Genexpression kultiviert und erst bei einer gewünschten Zelldichte die Überexpression induziert werden. Für Proteine mit essenziellen Disulfidbindungen, z.B. Fab-Fragmente, wurde mit Expressionsvektoren gearbeitet, die eine Sec-abhängige Sekretion des Proteins in das oxidierende Milieu des Periplasmas von *E. coli* erlauben. Dies wurde erreicht durch eine translationale Fusion der OmpA-, bzw. PhoA-Signalsequenz (Plückthun and Skerra, 1989). Andere Proteine, wie das hGal3 wurden in löslicher Form im Cytoplasma von *E. coli* produziert.

2.3.2. Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Schüttelkolben

2.3.2.1. Periplasmatische Proteinproduktion

Mit einer Einzelkolonie des transformierten *E. coli* K12-Stamms W3110 wurde eine 50 ml Vorkultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Mit dieser Kultur wurde am nächsten Tag eine 2 L Kultur (TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) im Verhältnis 1:50 inokuliert. Nach einer Wachstumsphase bei 22°C und 180 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 5 wurde die Genexpression durch Zugabe von aTc (Endkonzentration 200 µg/l) induziert. Die Bakterien wurden nach 2 h auf Eis für 15 min

gekühlt und durch Zentrifugation sedimentiert (F10-4x1000-Rotor, 15 min, 5.000 rpm, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 20 ml PPA-Puffer vorsichtig resuspendiert und für 30 min auf einem Taumelrollenmischer bei 4°C inkubiert. Die gebildeten Sphäroplasten wurden in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (4°C, Sigma 4K10, 5.000 rpm, 15 min sowie SS-34, 15.000 rpm, 15 min). Der geklärte Periplasmaextrakt wurde über Nacht bei 4°C gegen den Puffer des folgenden Chromatographieschrittes dialysiert.

2.3.2.2. Cytoplasmatische Proteinproduktion

Eine Vorkultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) wurde mit einer Einzelkolonie des transformierten *E. coli*-Stamms BL21 angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm bis zur stationären Phase kultiviert. Ausgehend von dieser Kultur wurde am nächsten Tag eine 2 L Kultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) im Verhältnis 1:50 inokuliert. Nach Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,6 bei 22°C und 180 rpm wurde mit aTc (Endkonzentration 200 µg/l) induziert und für weitere 12 h kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis für 15 min gekühlt, die Zellen sedimentiert (F10-4x1000-Rotor, 15 min, 5.000 rpm, 4 °C) und in 10-20 ml 40 mM NaPi-Puffer (pH 7.5) resuspendiert. Nach Zugabe der entsprechenden Menge der Proteaseinhibitortabletten (Roche) wurde der Zellaufschluss in der French-Press bei einem Druck von 6,9 kPa durchgeführt. Die lösliche Fraktion wurde durch Zentrifugation isoliert (SS-34, 15.000 rpm, 4 °C). Der Rohextrakt wurde sterilfiltriert und für die weitere Aufarbeitung gegen einen entsprechenden Chromatographie-Puffer dialysiert oder in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.3. Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Die periplasmatische Produktion von rekombinanten Proteinen im 10 L Fermenter wurde basierend auf einem Protokoll von Schiweck und Skerra (1995) durchgeführt. Hierfür wurde eine 2 ml Vorvorkultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie des transformierten *E. coli* K12-Stamms W3110 angeimpft und für 6-8 h bei 37°C und 180 rpm herangezogen. Mit dieser Vorvorkultur wurde im Verhältnis 1/50 eine Vorkultur inokuliert, die dem Kulturmedium der Fermentation entsprach. Nach einem Wachstum bei 30°C und 180 rpm für 26 h hatte diese Vorkultur in der Regel eine OD₅₅₀ zwischen 1,5 und 2,0. Das UniVessel 10 L Glasgefäß des Fermenters wurde mit 7,2 L Mineralsalzlösung befüllt, verschlossen und im Autoklaven sterilisiert. Nach Anschluss aller Elektroden und Zuflüsse wurden 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO₄ je 8 ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 ml FeCl₃- und Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung und 800 µl Antifoam Y-30-Emulsion hinzugegeben. Vor Zugabe der Vorkultur wurde das Medium auf 30°C erwärmt. Während der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch eine gesteuerte Begasung auf 40 % des atmosphärischen Drucks geregelt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak oder 15% Orthophosphorsäure bei 7,0 ± 0,1 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug zu Beginn 400 rpm. Ab einer OD₅₅₀ von ca. 1,5 war diese Geschwindigkeit nicht mehr ausreichend, um die Sauerstoffsättigung auf 40 % zu halten und wurde automatisch ab diesem Zeitpunkt auf 800 rpm erhöht. Um während des exponentiellen Wachstums der Kultur die Kohlenstoffversorgung zu gewährleisten, wurde ab einer OD₅₅₀ von 2,5 Glucose (50 % w/v) mit 40 ml/h hinzugegeben. Außerdem wurden bei dieser OD nochmals je 4 ml Fe- bzw.

Zn-Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Ab einer OD₅₅₀ von 50 wurde die Temperatur auf 25°C verringert und die Zellen für 1 h weiter kultiviert. Durch Einstellen einer aTc-Konzentration von 0,5 mg/L wurde anschließend induziert und die Expression für 2,5 h fortgesetzt. Danach wurden die Zellen in entsprechenden Zentrifugenbecher überführt, mit Eis für 10 min gekühlt und für 45 min abzentrifugiert (Sorvall RC 3B plus-Zentrifuge, 4 °C, 5.000 rpm). Die sedimentierten Zellen wurden in ein kaltes 2 L Becherglas überführt und in eiskaltem PPA-Puffer (Volumen [ml] = OD₅₅₀ · 15) resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden weiterhin Na₂EDTA (Endkonzentration 15 mM) und Lysozym (Endkonzentration 250 µg/ml) hinzugegeben und anschließend für 30 min inkubiert (4°C, 150 rpm). Die Sphäroplasten wurden in mehreren Zentrifugationsschritten vollständig abgetrennt (SLA-1500-Rotor, 4°C, 20 min, 11.500 rpm). Der geklärte Periplasmaextrakt wurde durch Dialyse (3-5 x gegen 5L, jeweils mehr als 12 h) für die anschließende IMAC-Reinigung mit dem entsprechenden Puffer äquilibriert. Damit lag die verbleibende EDTA-Konzentration unter 5 µM.

2.4. Proteinchemische Methoden

2.4.1. Proteolytischer Verdau des monoklonalen Antikörpers

Die Zelllinie M3/38 wurden in 150 mm-Kulturflaschen mit RPMI1640-Medium (10 % v/v FCS) über mehrere Passagen kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Zur Reinigung des monoklonalen Antikörpers wurden 150 ml Zellkulturüberstand auf eine Protein G Agarosesäule (Bettvolumen 2 ml) aufgetragen und anschließend der Antikörper mit 0.1 M Glycin/HCl pH 2,6 eluiert. Das Eluat wurde sofort mit 1 M Tris neutralisiert. Um das Fab-Fragment zu gewinnen, wurde ein proteolytischer Verdau mit Papain durchgeführt. Das hierfür verwendete Pierce Fab Preparationskit wurde nach den Angaben des Herstellers benutzt.

2.4.2. Chromatographische Verfahren

2.4.2.1. Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Für die Reinigung von Proteinen mit C-terminalem Strep-tag II wurde der cytoplasmatische Zellextrakt gegen SA-Puffer dialysiert, durch 0,45 µm Cellulosenitrat sterilfiltriert und mit Streptavidin (Endkonzentration 1 µM) versetzt. Nach der Äquilibrierung einer Strep-Tactin-Säule (für eine 2 L Schüttelkolbenkultur wurde eine Säule mit Bettvolumen von 2 ml eingesetzt) an einer Laborchromatographieranlage mit SA-Puffer wurde das Extrakt aufgetragen und die Säule solange mit SA-Puffer gewaschen, bis das UV-Absorptionssignal die Basislinie erreichte. Das über den Strep tag II gebundene Protein wurde daraufhin mit D-Desthiobiotin (2,5 mM in SA-Puffer) eluiert und in Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde nach jeder Chromatographie mit HABA (5mM in SA-Puffer) regeneriert und so das D-Desthiobiotin verdrängt. Vor erneuter Verwendung wurde die Säule solange mit SA-Puffer gespült, bis das UV-Absorptionssignal die Basislinie erreichte und das HABA vollständig entfernt war.

2.4.2.2. Metallchelate-Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Zur Reinigung von Proteinen mit Hexahistidinhängsel (His₆-tag) wurde der periplasmatische Zellextrakt gegen IMAC-Laufpuffer dialysiert und durch 0,45 µm Cellulosenitrat sterilfiltriert. Vor der Reinigung wurde die Säulenmatrix (HisTrap 1 oder 5 ml) mit dem Metallion beladen, welches für die Wechselwirkung mit den Histidin-Seitenketten verantwortlich ist. Hierfür wurde die Säule an das Äkta-FPLC System angeschlossen, bis zum Erreichen der Basislinie mit Wasser und dann mit einem Säulenvolumen 100 mM NiSO₄ gespült. Nachdem ungebundene Ni-Ionen mit weiteren 10 Säulenvolumen Wasser entfernt waren, wurde der Periplasmaaufschluss aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden anschließend mit IMAC-Laufpuffer bis zum Erreichen der Basislinie ausgewaschen. Die Elution erfolgte im Verlauf eines linearen Konzentrationsgradienten bis 150 mM Imidazol/HCl im Laufpuffer (Elutionspuffer), wobei Fraktionen gesammelt wurden. Die Fraktionen wurden sofort danach mit 500 mM Na₂EDTA-Lösung auf eine Endkonzentration von 5 mM eingestellt, um eine Metall-Komplex-induzierte Proteinpräzipitation zu vermeiden. Durch SDS-PAGE wurden die einzelnen Fraktionen analysiert, relevante Fraktionen vereinigt und bei 4°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Zur Regenerierung wurde die Säulenmatrix mit 10 Säulenvolumen IMAC-Laufpuffer, versetzt mit 50 mM Na₂EDTA, gespült. Anschließend wurde das Na₂EDTA durch Spülen mit 20 Säulenvolumen Wasser verdrängt.

2.4.2.3. Ionenaustauschchromatographie

Zur Auftrennung des mit Papain verdauten mAk anhand der spezifischen Oberflächenladung der Fragmente wurde ein starker Anionentauscher verwendet. Die verwendete Resource Q Säule besteht aus einer Polystyrol-Divinylbenzol-Matrix, die mit quartären Ammoniumionen funktionalisiert ist. Nach Äquilibrierung der 1 ml Säule mit 10 Säulenvolumen des AAC Laufpuffer (20 mM Tris/HCl pH 9,0) mit 10 Säulenvolumen wurde die sterilfiltrierte Proteinlösung (2 ml) an einer Äkta-FPLC aufgetragen und die Säule erneut mit dem AAC Laufpuffer bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Zur Elution wurde ein linearer Konzentrationsgradient bis 1 M NaCl (in AAC Elutionspuffer) angelegt. Die gesammelten Fraktionen wurden mithilfe eines SDS-PAGE analysiert und relevante Fraktionen vereinigt.

2.4.2.4. Größenaustauschchromatographie

Als abschließender Reinigungsschritt sowie zur funktionellen Charakterisierung des Aggregations- bzw. Oligomerisierungsgrades der Proteine wurde die Größenausschlusschromatographie angewendet. In Abhängigkeit von der Proteingröße wurde das kleinporige S75 (Protein < 30 kDa) oder das großporige S200 Material (Protein > 30 kDa) verwendet. Für analytische sowie kleinere präparative Ansätze von bis zu 5 mg Protein wurden Chromatographiesäulen mit einer Länge von 30 cm und einem Durchmesser von 1 cm (Bettvolumen 24 ml) verwendet. Für präparative Ansätze wurden Säulen mit einer Länge von 60 cm und einem Durchmesser von 1,6 cm (Bettvolumen 120ml) oder 2,6 cm (Bettvolumen 330 ml) verwendet. Für alle Säulen wurden die vom Hersteller angegebene Flussrate eingehalten. Vor der Chromatographie wurden die Säulen mit 1,5 Säulenvolumen PBS äquilibriert. Die Proteinlösung wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit einer geeigneten Ultrafiltrationseinheit auf maximal 3 % des Bettvolumens konzentriert und sterilfiltriert. Für präparative Ansätze wurde das Eluat in

Fraktionen aus ca. 4 % des Bettvolumens gesammelt. Die apparente Molekülmasse des Zielproteins wurde anhand einer Kalibrierung der Säule mit Proteinen unterschiedlicher Größe (Aprotinin, Alkoholdehydrogenase, Carboanhydrase, Cytochrom C, Myoglobin) und dem makromolekularen Polysaccharid Blue Dextran bei halblogarithmischer Auftragung durch eine nicht-lineare Regression bestimmt.

2.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analytik von Proteinreinigungen oder Kopplungsreaktionen wurde die größenabhängige Trennung von Proteinen durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (1986) angewendet. Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem Mini-Gel-Twin-System (Biometra) und den dazugehörigen Glasplatten für Gele mit einer Größe von 8,6 cm × 7,7 cm (B × L) und einer Dicke von 0,75 mm. Die Gele wurden selbst gegossen, wobei die unteren $\frac{3}{4}$ des Gels, die zur Trennung der Proteine dienen, aus 12 % (w/v) Polyacrylamid bestanden. Das obere $\frac{1}{4}$ des Gels, in das die Geltaschen integriert wurden, bestand aus 7 % (w/v) Acrylamid. Zur Probenvorbereitung wurde jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und in die Probentaschen des vollständig polymerisierten Gels pipettiert. Die Proteine wurden bei 100 V für ca. 2,5 h elektrophoretisch getrennt, bis der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreichte. Gele mit fluoreszenzmarkierten Proben wurden direkt nach der Entnahme aus den Glasplatten mit dem Fluoreszenzscanner Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Europe) analysiert. Zur colorimetrischen Analyse der Proben wurden die Gele für 30 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend für 20 min in der Entfärbelösung geschwenkt.

2.4.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinlösungen (c) wurde mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Beer, 1852) basierend auf der Absorption bei 280 nm (A) und dem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) des jeweiligen Proteins errechnet, wobei d die Schichtdicke der Küvette ist:

$$A = \epsilon [L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] \cdot c [\text{mol} \cdot L^{-1}] \cdot d [\text{cm}] \quad (1)$$

Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des ProtParam-Tools des ExPASy-Servers ermittelt. Dieser berechnete Wert setzt sich aus der Summe von Absorptionsbeiträgen der Tyrosin- und Tryptophanseitenketten des Polypeptids zusammen (Wilkins et al., 1999).

Tabelle 1 Molmassen und Extinktionskoeffizienten der hergestellten Proteine

	Molmasse [Da]	ϵ [$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
hGal3	27348,60	41370
hGal3-P113	17007,03	15470
GaletuxiFab-N	48179,83	69830
GaletuxiFab	48266,48	69830
GaletuxiFab-PAS200	66228,42	75330
5ikl-CDR	48257,80	70158
3KYM	48209,07	72935
4NRY	48289,36	78435
4KQ3	48248,11	72935
5I8C	48309,3	71445
4NRY(L4M)	48307,4	78435
4NRY(E46K)	48288,42	78435
4NRY(I70F)	48323,38	78435
4NRY-K74A	48342,38	78435
GaletuzuFab	48306,45	78435
GaletuzuFab-PAS200	64895,93	78435
GaletuzuFab-PAS200-Cys	65007,07	78435

2.4.5. Konzentrierung von Proteinen

Um eine ausreichende Konzentration der Proteine, z. B. für Kristallisations- oder Kopplungsansätze zu erreichen, wurden Proteinlösungen mit Hilfe von Konzentratoreinheiten durch Ultrafiltration eingeeengt. Die geeignete Ausschlussgröße der verwendeten Amicon Ultra Filter (Millipore) wurde entsprechend der Proteingröße gewählt und die Lösung durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 4 °C, 3.000 g) auf das gewünschte Volumen eingeeengt.

2.4.6. Proteinkonjugation mit funktionellen Gruppen

2.4.6.1. Kopplung an Lysinreste

Die Modifizierung der Fab-Fragmente über Lysin-Seitenketten wurde mit dem funktionalisierten Fluorophor Sulfo-Cyanin5.5-N-Hydroxysuccinimid (Cy5.5-NHS) sowie dem funktionalisierten Chelator p-Isothiocyanatobenzyl-Deferoxamin (pSCN-DFO) durchgeführt. Die Kopplung mit dem Fluorophor erfolgte in PBS. Aufgrund der schlechteren Reaktivität von Isothiocyanaten bei neutralem pH-Wert wurde für die Kopplung mit dem Chelator das Protein gegen 100 mM Natriumbicarbonatpuffer pH 9 dialysiert. Für die Konjugationsreaktion wurden die Proteinlösungen auf eine Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml eingeeengt. Die Kopplungsreagenzien wurden zunächst in DMF mit einer Konzentration von 40 mM gelöst und dann in einem dreifach molaren Verhältnis von Cy5.5-NHS, bzw. einem achtfach molaren Verhältnis von pSCN-DFO hinzugegeben. Nach einer Reaktionsdauer

von 3 h bei Raumtemperatur wurden nicht gekoppelte Anteile mittels Gelfiltration über eine in PBS äquilibrierte PD-10-Säule entfernt.

Das gereinigte Produkt wurde mittels ESI-MS analysiert, um aus dem Spektrum die Kopplungseffizienz bestimmen zu können. Hierfür wurden die ESI-MS Daten als .xy-Datei in Origin importiert und das Integral der Peaks für die einzelnen Kopplungsspezies berechnet. Diese Werte wurden für das unkonjugierte Protein bis zur Spezies mit der Stöchiometrie 5:1 bestimmt. Die Näherung erfolgte durch Verwendung der Poisson Verteilung: der diskreten Wahrscheinlichkeitsverteilung von Ereignissen, die unabhängig voneinander in einem zeitlich oder räumlich begrenzten Rahmen stattfinden (Haight, 1967). Somit beschreibt der Erwartungswert λ der Poisson Verteilung $P_\lambda(x)$ (Formel 2) das mittlere Kopplungsverhältnis von Label/Protein (VLP). Die Berechnung wurde in Origin durchgeführt:

$$P_\lambda(x) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!} \quad (2)$$

Unabhängig von Bestimmung über das Massenspektrum konnte das Kopplungsverhältnis des Fluorophors absorptionsphotometrisch bestimmt werden. Hierbei wird das Verhältnis der Konzentrationen von Fluorophor und Protein ermittelt:

$$VLP = \frac{c(\text{Label})}{c(\text{Protein})} \quad (3)$$

Zur Berechnung der Farbstoffkonzentration wurde die Absorption bei 675 nm gemessen und anschließend mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Formel 1) berechnet, wobei für Cy5.5 mit einem Extinktionskoeffizienten nach Angabe des Herstellers Lumiprobe von $\epsilon_{675} = 190000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ gerechnet wurde. Für die Berechnung der Proteinkonzentration in Form des Konjugats muss der Absorptionsanteil des gekoppelten Fluorophors bei 280 nm beachtet werden. Hierfür wird ein Korrekturfaktor (KF) in das Lambert-Beer'sche Gesetz eingeführt (Formel 4), der das Verhältnis der Absorption des Fluorophors bei 675 nm und 280 nm wiedergibt. Der Korrekturfaktor für Cy5.5 liegt nach Angaben des Herstellers bei 0,105.

$$c(\text{Protein}) = \frac{(A_{280} \cdot \text{KF} \cdot A_{675}) \cdot d}{\epsilon_{\text{Protein}}} \quad (4)$$

2.4.6.2. Konjugation von Cysteinresten

Zur selektiven Konjugation des eingeführten reaktiven Cysteinrests in dem Fab-Fragment wurden der funktionalisierte Fluorophor Sulfo-Cyanin7-Maleimid (Cy7-MI) und der funktionalisierte Chelator Deferoxamin-Maleimid (DFO-MI) verwendet. Durch die Produktion der Fab-Fragmente im oxidierenden Milieu des Periplasma von *E. coli* lagen die Cysteinreste als gemischtes Disulfid vor, welches vor der Kopplung durch milde Reduktion gespalten wurde. Hierfür wurde das Protein auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingengt und in einem 10-fach molaren Verhältnis mit Dithiothreitol (DTT) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung des DTT sowie der freigesetzten niedermolekularen Sulfide wurde eine PD10 Säule verwendet, die mit 50 mM NaPi, pH 5,5, 100 mM NaCl äquilibriert war. Da die reaktive Form des Thiolats das negativ geladene S^- ist, kann durch den niedrigen pH-Wert eine Rückoxidation verhindert werden. Nach der Abtrennung wurde die Proteinlösung mit Na_3PO_4 (0,5 M) auf einen pH-Wert von 7 titriert. Bei der Reduktion eines Fab-Fragments mit seinen fünf nativen Disulfidbrücken besteht allerdings bei einer solchen Reduktion die Möglichkeit, nicht nur das gemischte Disulfid sondern auch die nativen Cystine zu reduzieren. Dies gilt insbesondere für die exponierte interchenare Disulfidbindung am

C-terminalen Ende beider Immunglobulinketten. Aus diesem Grund wurde eine milde Oxidation mit Dehydroascorbinsäure (dhAS) durchgeführt, welches in einem 20-fach molaren Verhältnis zu der Proteinlösung gegeben und für weitere 3 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zur Abtrennung der dhAS wurde erneut eine PD10 Säule verwendet. Für den Kopplungsansatz mit dem Fluorophor wurde die Säule mit PBS äquilibriert. Zur Kopplung des Chelators wurde die Säule dagegen mit 150 mM Ammoniumacetat (Gesamtmetallgehalt < 0,0001 %) äquilibriert, sodass eine unerwünschte Komplexbildung mit Metallverunreinigungen ausgeschlossen werden konnte. So aufbereitet, waren die Proben bereit zur Konjugationsreaktion mit den maleimid-funktionalisierten Reagenzien, wobei die Proteinlösung eine Konzentration von ca. 2 mg/ml aufwies. Cy7-MI und DFO-MI wurden in DMF (40 mM) gelöst, in einem 5-fach molaren Verhältnis zur Proteinlösung gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Zur Abtrennung von überschüssigen Reagenzien wurde abschließend eine weitere PD10 Säule verwendet. Diese war, wie oben bereits beschrieben, für die Kopplung mit dem Fluorophor mit PBS und für den Kopplungsansatz des Chelators mit Ammoniumacetat äquilibriert. Anschließend wurde die Kopplungseffizienz der erhaltenen Probe mittels ESI-MS analysiert.

2.4.7. Markierung von Proteinen mit Zirkonium

Für die Immun-PET-Bildgebung wurde jeweils 1 mCi Zr(IV)-Oxalat (BV Cyclotron, PerkinElmer, Amsterdam, Niederlande) in 1 M Oxalsäure (Volumen 200 µl) mit 150 µL Wasser versetzt. Durch Zugabe von 50 µL einer 2 M Na₂CO₃-Lösung wurde die Lösung neutralisiert und abgewartet bis kein CO₂ mehr freigesetzt wurde. Anschließend wurden 200 µL 0,5 M HEPES/NaOH pH7, 75 µL 1 M Gentsinsäure/NaOH pH 7,0 und 75 µL einer Lösung von 130 µg αGal3-Fab-PAS200-DFO in 20 mM HEPES/NaOH pH 7 zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 60 min bei Raumtemperatur. Die Überprüfung der Komplexbildung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie auf Glasmikrofaserpapier (DC Kieselgel 60, Supelco) mit 0,1 M Zitronensäure/NaOH pH 5 als Laufmittel. Die Detektion erfolgte durch γ-Szintillationszählung (Mini-Scan TLC Imaging Scanner). Der R_F-Wert des radioaktiv markierten Fab-Fragments lag bei 0, während nicht gebundenes Zr einen R_F-Wert > 0 aufwies. Die Abtrennung von freiem Zirkonium und überschüssigen Reagenzien erfolgte mittels einer mit PBS äquilibrierten PD-10-Säule. Die radiochemische Reinheit des so erhaltenen markierten Proteins, die nochmals mittels Dünnschichtchromatographie überprüft wurde, betrug > 95 %.

2.4.8. Peptid Synthese an Membranen (SPOT)

Die systematische Synthese kurzer immobilisierter Peptide wurde mit der SPOT-Methode (Frank, 2002) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine parallele Synthese von unterschiedlichen Peptiden, die kovalent an eine Membran gebunden sind. Um das lineare Epitop des α-hGal3-Fab eingrenzen zu können, wurden 18-, 12- und 8-mer Peptide synthetisiert, die die Aminosäuresequenz der N-terminalen Domäne von hGal3 (AS1-113) abbilden. Zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peptiden wurde ein Versatz der Aminosäuresequenz um je zwei Reste gewählt. Die Verwendung des MultiPep RS (Intavis) ermöglichte eine vollautomatisierte parallele Synthese der Peptide nach der Merrifield-Festphasensynthese (Frank and Döring, 1988) auf einer mit Amino-PEG500 derivatisierten Cellulosemembran (Beutling et al., 2008). Die automatisierte Synthese wurde mit der vom Gerätehersteller

gestellten MultiPep-Software programmiert, welche auch die nötige Menge der eingesetzten Chemikalien berechnete. Die mit F-moc geschützten Aminosäuren wurden in N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) gelöst und durch Veresterung der freien Carboxylgruppe mit Oxyma und N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC) im ersten Schritt des Synthesesyklus aktiviert. Der Aktivester reagiert im nächsten Schritt mit der Aminogruppe der derivatisierten Cellulosemembran bzw. mit der Aminogruppe des Peptids aus dem vorausgegangenen Synthesesyklus und führt zur Ausbildung einer neuen Peptidbindung. Abschließend wurden verbliebene freie N-terminale Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid (5 % in DMF) acetyliert. Hierdurch werden die freien Aminogruppen auf der Membran außerhalb der Spots abgesättigt und in weiteren Zyklen die Verlängerung von nicht reagierten Peptiden abgebrochen. Um einen weiteren Zyklus zu beginnen, wurden die N-terminalen F-moc Schutzgruppen des verlängerten Peptids durch Inkubation mit Piperidin (20 % (v/v) in DMF) entschützt, sodass eine neue Aminogruppe für die Kopplung vorhanden war. Nach dem letzten Kopplungszyklus wurden alle N-terminalen Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid (5 % in DMF) acetyliert. Um Schutzgruppen der Seitenketten von einigen Aminosäuren zu entfernen, wurde die Membran für 2 h mit einer Lösung aus Trifluoressigsäure (95 % (v/v)), Triisopropylsilan (3 % (v/v)) und H₂O (2 % (v/v)) inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung durch mehrmaliges abwechselndes Waschen in Ethanol und Dichlormethan wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Bindungsanalyse wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in PBS/T_{0,01} rehydriert und anschließend mit Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200 (2 µg/ml in PBS/T_{0,01}) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Fab-Fragment wurde durch dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 10 min in PBS/T_{0,01} entfernt. Die Detektion des gebundenen fluoreszenzmarkierten GaletuxiFab erfolgte direkt mit Hilfe des Odyssey-Fluoreszenzscanners (Anregung bei 685 nm, Detektion bei 720 nm) und konnte mit dem Programm Quant version 12.2 (TotalLab) densitometrisch ausgewertet werden.

2.4.9. Proteinkristallisation

Zur Kristallisation des GaletuxiFab-Peptid-Komplexes wurde das gereinigte GaletuxiFab bei 4°C über Nacht gegen 10 mM HEPES/NaOH, pH7,5, 100 mM NaCl dialysiert und auf eine Konzentration von 18 mg/ml durch Ultrafiltration eingeengt. Das synthetische Peptid Ac-Q-A-P-P-G-A-Y-P wurde in H₂O gelöst (30 mg/ml). Schließlich wurde das Peptid in einem dreifach molaren Verhältnis zu der Proteinlösung gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Sterilfiltration mit einem Ultrafree Centrifugal Filter (0,22 µm) wurde die Probe zur Kristallisation eingesetzt.

Die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurde mit Hilfe der Sparse Matrix Sampling Methode (Jancarik et al., 1991) unter Verwendung des Vector Screen durchgeführt. Dieser Screen besteht aus 480 Pufferbedingungen die am Lehrstuhl für biologische Chemie zusammengestellt wurden. Grundlage für diesen Screen bildete die BDP, eine Datenbank aller Kristallisationsbedingungen, die in der Protein Datenbank (PDB) hinterlegt sind (Peat et al., 2005). Die Bedingungen wurden nach Häufigkeit des Kristallisationserfolgs bewertet und auf Ähnlichkeit überprüft. Für den Vector Screen wurden die 480 Bedingungen mit der größten Wahrscheinlichkeit einer Kristallisation ausgewählt. Die Kristallisation des Komplexes wurde nach der Dampf-Diffusionsmethode mit sitzendem Tropfen durchgeführt. Hierfür wurden mit einem Kristallisationsroboters (FreedomEvo) 40 µl der Protein-Peptid-Lösung und 40 µl des Kristallisationspuffers gemischt und in eine 96well CrystalQuick-Platte pipettiert. Als Reservoir dienten jeweils 100 µl des Puffers. Nachdem die Platten mit Klebefolie (CrystalClear)

verschlossen waren, wurden diese bei 20,0 °C für mehrere Wochen gelagert und der Kristallisationsverlauf mit Hilfe eines Olympus SZX12 Mikroskops verfolgt und mit der Olympus DP12 Kamera aufgenommen.

Das Einfrieren der Kristalle für die Kryokristallographie, die Sammlung der Röntgenbeugungsdaten am BESSY Linearbeschleuniger 14.1 (Berlin) sowie die Lösung der Kristallstruktur wurde von Dr. Andreas Eichinger am Lehrstuhl für biologische Chemie durchgeführt.

2.5. Immunchemische Methoden

2.5.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Messung der Bindung zwischen dem Fab-Fragment und hGal3 wurde der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Hierfür wurden 50 µl einer Lösung des gereinigten rekombinanten Antigens hGal3 oder dessen verkürzter Variante hGal3-P113 (jeweils 5 µg/ml in PBS) auf einer Mikrowellplatte (Nunc MaxiSorp) über Nacht bei 4°C adsorbiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T_{0,01} wurden verbliebene Bindungsstellen mit 100 µl einer BSA-Lösung (3 % (w/v) BSA in PBS/T_{0,01}) durch Inkubation für 1 h bei RT abgesättigt. Die Platte wurde erneut dreimal mit PBS/T_{0,01} gewaschen, um dann eine Verdünnungsreihe des Fab-Fragments anzusetzen. Hierfür wurde in jeder Vertiefung 50 µl PBS/T_{0,01} vorgelegt. Anschließend wurde in die erste Reihe der Platte 50 µl einer definierten Lösung des Fab-Fragments zugegeben, von dieser wurden wiederum 50 µl in die nächste Vertiefung pipettiert. So entstand von Vertiefung zu Vertiefung ein Verdünnungseffekt von 1:2, jeweils mit einem Gesamtvolumen von 50 µl. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde ungebundenes Fab-Fragment durch dreimaliges Waschen mit PBS/T_{0,01} entfernt. Zum Nachweis des gebundenen Fab-Fragments wurden 50 µl einer Cκ-spezifischen IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugat-Lösung (Anti-human-Kappa-leichte-Kette-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat oder Anti-rat-Kappa-leichte-Kette-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, 1:1000 in PBS/T_{0,01}) unter Zusatz von 100 mM Lactose für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit PBS wurden für die enzymatische Nachweisreaktion 50 µl des chromogenen Substrats p-Nitrophenylphosphat (0,5 mg/ml in AP-Puffer) hinzugegeben. Die Reaktion zum farbigen p-Nitrophenolat wurde bei λ = 405 nm und 30°C für 30 min mit dem SpectraMax 250 Microplate-Reader verfolgt.

Die Dissoziationskonstante konnte aus der Umsatzrate durch folgende Gleichung bestimmt werden, die die Gleichgewichtskonstante K_D für den Bindungspartner [P] sowie dem immobilisierten Ligand [L] beschreibt (Voss and Skerra, 1997):

$$[P \cdot L] = \frac{[P_0][L_0]}{[P_0] + K_D} \quad (5)$$

Durch eine Auftragung des gemessenen Substratumsatzes ($\Delta A_{405}/\Delta t$ [10^{-3}min^{-1}]) gegen die eingesetzte Konzentration des Bindungspartners [P₀] (in diesem Fall das Fab-Fragment) wurde durch nicht-lineare Regression mit dem Programm Origin (OriginLabs) über Formel 5 durch Anpassung der konstanten Gesamtkonzentration des immobilisierten Liganden [L₀] die Dissoziationskonstante K_D berechnet.

2.5.2. Western Blotting

Für die nähere Charakterisierung des Epitops in hGal3 wurde die Methode des Western Blotting verwendet. Hierfür wurde zunächst ein SDS-PAGE mit den Proteinen hGal3 und hGal3-P113 wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben. Anschließend wurde das Gel für 20 min in Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) inkubiert. Für den Transfer wurden 3 Blatt, ebenfalls in Transferpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere 9 x 8 cm² auf die Kathode der Blotapparatur gelegt und dann mit dem Trenngel bedeckt. Es folgten die in Methanol aktivierte PVDF-Membran und nochmals 3 Blatt Whatman-Filterpapier, bevor die Anodenplatte aufgelegt wurde. Der Transfer erfolgte bei 65 V für 50 min. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in PBS/T_{0,01} geschwenkt. Für den immunologischen Nachweis wurde die Membran mit Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200 (2 µg/ml in PBS/T_{0,01}) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS/T_{0,01} für jeweils 10 min. Die Detektion des gebundenen fluoreszenzmarkierten GaletuxiFab erfolgte direkt mit Hilfe des Odyssey-Fluoreszenzscanners (Anregung bei 685 nm, Detektion bei 720 nm) und wurde mit der Gerätesoftware Image Studio ausgewertet.

2.5.3. Histochemische Untersuchungen

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die für diese Studie verwendeten menschlichen Gewebeschnitte stammen aus der Gewebebank der Pathologieabteilung des Universitätskrankenhauses Sapienza Sant'Andrea und wurden mit Genehmigung der Ethikkommission des Krankenhauses verwendet (Prot. CE Nr. 8391/2013).

Die histologische Charakterisierung der Fab-Fragmente wurde mit humanen Gewebeproben durchgeführt, die mit freundlicher Genehmigung von Dr. Giorgia Scafetta (Universität Sapienza, Rom) präpariert und zur Verfügung gestellt wurden. Das in Formaldehyd fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebe wurde in 10 µm Sektionen geschnitten (Histocore Biocut) und danach in einem Wasserbad bei 37°C auf dem Glasobjektträger aufgebracht. Durch die Behandlung des Gewebes mit Formaldehyd kann es zur Quervernetzung von oberflächenpräsentierten Antigenen über die Bildung von Methylenbrücken kommen, was häufig die Detektion stört.

Zur Demaskierung der Antigene werden die Gewebeschichten hitzebehandelt, was die Methylenbrücken bricht. Hierfür wurden die Sektionen für 1 h in Tris/EDTA, pH 9 (Dako Target Retrieval Solution) auf 95°C erhitzt (PT Link). Der colorimetrische Nachweis der Antigen-Antikörper-Interaktion gelang indirekt in mehreren Abschnitten wobei zwischen den einzelnen Schritten das Gewebe jeweils dreimal mit PBS/T_{0,01} gespült wurde. Zu Beginn wurde der Schnitt mit 200 µl Peroxidase-Block-Lösung (REAL EnVision Detection System) versetzt, um endogene Peroxidasen, die den späteren Nachweis verfälschen könnten, zu inaktivieren. Danach wurde das Gewebe mit jeweils 200 µl des hGal3 bindenden IgG (GaletuzuFab-PAS200-Cys oder α-hGal3-mAk, 50 µg/ml in PBS/T_{0,01}), gefolgt von einer Cκ-spezifischen Sekundärantikörperlösung (Anti-human-Kappa-leichte-Kette-IgG (aus Kaninchen), Ready-to-use-Lösung) und schließlich einer Kaninchen-spezifischen-Antikörper-Meerrettichperoxidase-Konjugat-Lösung (Envision Flex HRP Magenta) für je 1 h inkubiert. Für den colorimetrischen Nachweis wurde DAB verwendet, was von der Meerrettichperoxidase zu dem braunen Präzipitat DAB⁺ umgesetzt wird. Hierfür wurden 200 µl einer DAB-Lösung (REAL EnVision Detection System) für 3 min zugegeben. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit 200 µl einer Hämatoxylin-Lösung (REAL EnVision Detection System) und

wurde für 1 min inkubiert. Durch Einscannen bei einer 40-fachen Vergrößerung (Aperio CS2) konnten die Gewebeschnitte dokumentiert werden. Die Analyse erfolgte mit der Aperio slide Viewing Software Version 12.3.3 (Leica Microsystems).

2.6. Biophysikalische Methoden

2.6.1. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proteinproben erfolgte mit einem maXis quadrupol time-of-flight (qTOF)-Massenspektrometer. Die Massenspektren wurden im positiven Ionen Modus aufgenommen und mit der Bruker Compass Data Analysis Software unter Verwendung des MaxEnt oder MaxEntX Algorithmus dekonvolviert. Zur Bestimmung der intakten Masse (unter denaturierenden Bedingungen) wurde die Probe (mind. 10 μ M) bei 4°C über Nacht gegen 10 mM Ammoniumacetat dialysiert. Vor der Injektion in das Massenspektrometer verdünnte man die Probe zu 50 % (v/v) mit einer Mischung aus Methanol (LiCrosolv Hypergrade, Merckmillipore) und 0,1 % Essigsäure (LiCrosolv Hypergrade, Merckmillipore). Standardmäßig wurde der Ionen transfer mit einer Kapillarspannung von 3400 V, einer Spannungsdifferenz zur Endplatte von 500 V im Gegenstrom von 4 L/min N_2 bei 200°C, 0,3 bar Verdampfungsdruck und 10 eV Kollisionsenergie erzeugt. Für PASylierte Proteine wurde die Kollisionsenergie auf 3 eV verringert.

2.6.2. Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Zur Echtzeitanalyse der Bindung zwischen Fab-Fragment und dem Antigen hGal3 wurde die Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie an einem Biacore 2000 durchgeführt. Das Fab-Fragment wurde auf der Oberfläche des Sensorchips (CM5) immobilisiert und die Interaktion des Analyt hGal3 mit der Methode der kinetischen Titration (Karlsson et al., 2006) gemessen.

Die Immobilisierung der Fab-Fragmente erfolgte auf den Sensorchip-Kanälen 4 bzw. 2 mit Hilfe von N-hydroxysuccinimid (NHS) und N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), was zu einer kovalenten Verbrückung der ϵ -Aminogruppen von Lysin-Seitenketten mit den Carboxylgruppen der Sensorchip-Oberfläche führte. Hierfür wurde die Sensorchipoberfläche mit einer 1:1 Mischung von NHS (0,05 M) und EDC (0,1 M) bei einer Flussrate von 10 μ l/min für 7 min inkubiert, sodass es zur Bildung des reaktiven N-Hydroxysuccinimid-Esters an der Carboxyldextran-Oberfläche kommt. Um für die Messung eine ausreichend hohe Konzentration des Fab-Fragments auf der negativ geladenen Carboxymethyldextran-Oberfläche des Sensorchips zu erreichen, musste dieses in einem Prä-Konzentrationsschritt über ionische Wechselwirkungen auf der aktivierten Oberfläche angereichert werden. Hierfür wurde das Fab-Fragment in einem Na-Acetatpuffer (5 μ g/ml in 10 mM Na-Acetat/HCl, pH 4,5) gelöst und der Sensorchip mit einer Flussrate von 10 μ l/min beladen bis eine stabile Resonanzveränderung von 1050 RU für die Fab-Fragmente erreicht wurde. Durch anschließende Inkubation der Membran mit Ethanolamin bei 10 μ l/min für 7 min konnten die restlichen freien NHS-Estergruppen abgesättigt werden. Die Referenzkanäle 3, bzw. 1 wurden wie die Messkanäle zuerst mit NHS und EDC aktiviert und ohne Immobilisierung eines Proteins direkt mit Ethanolamin abgesättigt.

Die Messungen wurden bei 25°C und mit dem steril filtrierten und entgasten Laufpuffer PBS/T_{0,005} durchgeführt. Um mögliche Puffereinflüsse auf die Messung zu minimieren, erfolgte eine Dialyse des Analyten hGal3 über Nacht bei 4°C gegen den Laufpuffer. Ausgehend von der Maximalkonzentration von 4,05 nM wurde eine Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 3 erstellt. Hierfür wurde jeweils 1 Teil der Proteinlösung mit 2 Teilen PBS/T_{0,005} verdünnt. Mit der Methode der kinetischen Titration werden 5 unterschiedliche Konzentrationen in einem Zyklus vermessen, was im Vergleich zur herkömmlichen Multi-Zyklus-Kinetik den Vorteil bietet, dass dazwischen keine Regenerierung der Chipoberfläche nötig ist. Insbesondere bei starken Antikörper-Antigen-Interaktionen kann dies sehr hilfreich sein, da für die Regenerierung harsche Bedingungen benötigt werden, die häufig mit einer partiellen Denaturierung des immobilisierten Proteins einhergehen. Für die Interaktionsanalyse wurde bei einer Flussrate von 20 µl/min die Verdünnungsreihe mit einer Assoziationsdauer von je 6 min injiziert. Die Dissoziationsdauer zwischen den einzelnen Verdünnungen lag bei 3 min und bei 50 min nach der letzten Injektion. Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit der BIAevaluation Software (GE Healthcare). Damit wurde zunächst das spezifische Bindungssignal durch Subtraktion des Signals für den Referenzkanal berechnet. Daraufhin wurden durch Anpassung der Daten an ein 1:1 Bindungsmodell im Rahmen der kinetischen Titration (Karlsson et al., 2006) die Gleichgewichtskonstanten berechnet.

2.7. Tierexperimentelle Methoden

Die Tierexperimente wurden in Kooperation und mit Übereinstimmung der Richtlinien des Klinikums rechts der Isar durchgeführt und waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Antragsnummer 55.2-1-54-2532-216-15). Die tumortragenden Mäuse wurden mit freundlicher Genehmigung von Francesco de Rose, Abteilung für Nuklearmedizin, zur Verfügung gestellt. Für die Xenotransplantation wurde 6 Wochen alte athymische weiblichen Foxn1^{nu/nu}-Nacktmäusen 5 × 10⁶ Zellen der Krebszelllinie FRO82-1 (RRID: CVCL_6287) und CAL62 (RRID: CVCL_1112) in den rechten Schilddrüsenlappen injiziert.

Zur Evaluierung der radioaktiv markierten Fab-Fragmente wurde jeweils 5 Mäusen eine Dosis von 3 MBq (~ 9 µg) des ⁸⁹Zr-DFO-GaletuxiFab-PAS200 bzw. ⁸⁹Zr-DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys in die Schwanzvene injiziert. Um die injizierte Gesamtaktivität zu ermitteln, wurden die Spritzen vor und nach der Injektion mit dem CRC-15R-Dosiskalibrator (Capintec) analysiert und um die im Schwanz der Maus gemessene Aktivität korrigiert. Unspezifisches Bindungsverhalten wurde an jeweils einer weiteren Gruppe von Mäusen untersucht. Hierfür wurde 30 min vor der Injektion des radioaktiv markierten Fab-Fragments das entsprechende unmarkierte Fragment in einem 1000-fachen Überschuss injiziert. Für die Aufnahme von statischen PET-Bildern (30 min) wurden die Mäuse 24 h nach Injektion mit Isofuran betäubt und in einem Kleintier PET/CT Scanner (Inveon) analysiert. Aus den gewonnenen Messdaten konnten mit Hilfe des 3D-OSEM (Three-Dimensional Ordered-Subsets Expectation Maximum) Algorithmus und des Programms Inveon Research Workplace Bilder in einer Maximum Intensity Projection (MIP) dargestellt werden. Um mit diesen Bildern die Strahlungsmenge in einzelnen Organen zu quantifizieren, wurden Bereiche mit einer hohen Intensität der PET Aufnahmen in sphäroider Form ausgewählt. Die Abgrenzung der Sphäroide erfolgte anhand der Isokontur bei 50 % der maximal gemessenen Strahlungsintensität des jeweiligen Sphäroids. Durch den Abgleich mit den CT-Aufnahmen konnte die Strahlung den Organen zugeordnet werden. Nach Aufnahme der PET/CT-Bilder wurden die Tiere mit CO₂ eingeschläfert und seziiert. Zur Messung der radioaktiven Strahlung wurden die Organe sowie das Blut mit dem γ-Counter 1480 Wallac Wizard analysiert.

Neben den PET/CT-Messungen wurden tumortragende Mäuse mittels Fluoreszenztomographie untersucht. Hierfür wurde diesen 54 µg des Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys (2 nmol) in die Schwanzvene injiziert. Nach 24 h wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt und in einem Fluoreszenzscanner (VisEn Medical Inc., Bedford) analysiert. Die Rekonstruktion und Auswertung der Daten erfolgte mit der VisEn FMT™2500 Software. Um die molare Konzentration des Fluorophors im Gewebe aus der Signalstärke zu berechnen, wurde eine Kalibration mit 5 definierten Konzentrationen des Fluorophors erstellt.

2.8. Bioinformatische Methoden

Zur Analyse von DNA-Sequenzen, Proteinsequenzen und zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme Geneious 5.5 (Biomatters) und ANTICALIGN (Jarasch et al., 2016) verwendet.

Die Digitalisierung von SDS-PAGE-Gelen erfolgte mit Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Software). Die Bilder wurden lediglich auf Helligkeit und Kontrast verändert.

Die graphische Darstellung und Auswertung der Messdaten von ELISAs, SPR und Massenspektrometrie wurden mit Origin 2017 (OriginLabs) durchgeführt. Hierfür wurden die Rohdaten jeweils als ASCII oder XY-Datei in das Programm importiert.

Zur densitometrischen Auswertung von Fluoreszenzscans, wie für die Analyse der Peptid-SPOT Assays, wurde das Programm Quant version 12.2 (TotalLab) verwendet.

Um die digitalisierten Aufnahmen der histologischen Gewebeschnitte zu analysieren wurde die Aperio slide Viewing Software Version 12.3.3 (Leica Microsystems) genutzt.

Mit Hilfe von Pymol 2.2.0 (Schrödinger (DeLano, 2002)) wurden Proteinstrukturen dreidimensional visualisiert und nach einer $C\alpha$ -Überlagerung miteinander verglichen werden.

Serverbasierte Programme

Zur Berechnung der Proteineigenschaften wie Extinktionskoeffizient, Molekülmasse und isoelektrischen Punkte wurde das Programm ProtPARAM (Gasteiger et al., 2003) eingesetzt.

URL: <https://web.expasy.org/protparam>

DisEMBL (Linding et al., 2003) ist ein Programm zur Vorhersage von potentiell ungeordneten Strukturen basierend auf der Aminosäuresequenz und wurde zur Analyse von hGal3 verwendet.

URL: <http://dis.embl.de>

Die Modellierung von Fab-Fragment 3D-Strukturen basierend auf der Aminosäuresequenz wurde mit dem Programm Prediction of ImmunoGlobulin Structure (PIGS (Marcatili et al., 2008)) durchgeführt.

URL: <http://circe.med.uniroma1.it/pigs>

Das Programm PDBeFold (Krissinel and Henrick, 2004) ermöglicht den paarweisen Abgleich von $C\alpha$ -Positionen einer Proteinstruktur gegen eine Datenbank und bewertet diese nach Ähnlichkeit. Bei den Proteinstrukturen kann es sich auch um mehrere Polypeptidketten handeln, sodass sich dieses Programm für die Bewertung von Fab-Fragmenten eignet.

URL: <https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>

Zur Analyse von Sequenz- oder Strukturdaten wurden folgende öffentlich zugänglichen Datenbanken verwendet:

Protein Data Bank (PDB, (Berman et al., 2000))	https://www.rcsb.org
ExPASy (Gasteiger et al., 2003)	https://web.expasy.org
Kabat (Kabat et al., 1991)	http://www.bioinf.org.uk
ImMunoGeneTics; IMGT (Lefranc et al., 2015))	http://www.imgt.org
Antibody Structure Database; AbdB (Ferdous and Martin, 2018)	http://www.bioinf.org.uk

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung, Produktion in *E. coli* und funktionelle Analyse von Fragmenten des menschlichen Galectin3-Antigens

Voraussetzung für die Charakterisierung der Antigen/Antikörper-Wechselwirkung und die darauf folgende Optimierung des Antikörperfragments von M3/38 war die gentechnische Herstellung des humanen Galectin 3 (hGal3) als Antigen. Für die vorliegende Arbeit spielten auch die biophysikalischen Eigenschaften des Linkers, der die N-terminale Oligomerisierungsdomäne mit der C-terminalen Kohlenhydrat-Bindedomäne verbindet, eine Rolle. Diese als Coiled coil beschriebenen Sequenz besitzt eine auffällige Sequenzhomologie zu Kollagen $\alpha 1$ (II) (Raz et al., 1989) und eine Röntgen-kristallographische Strukturbestimmung blieb bis heute erfolglos (Manzoni et al., 2018).

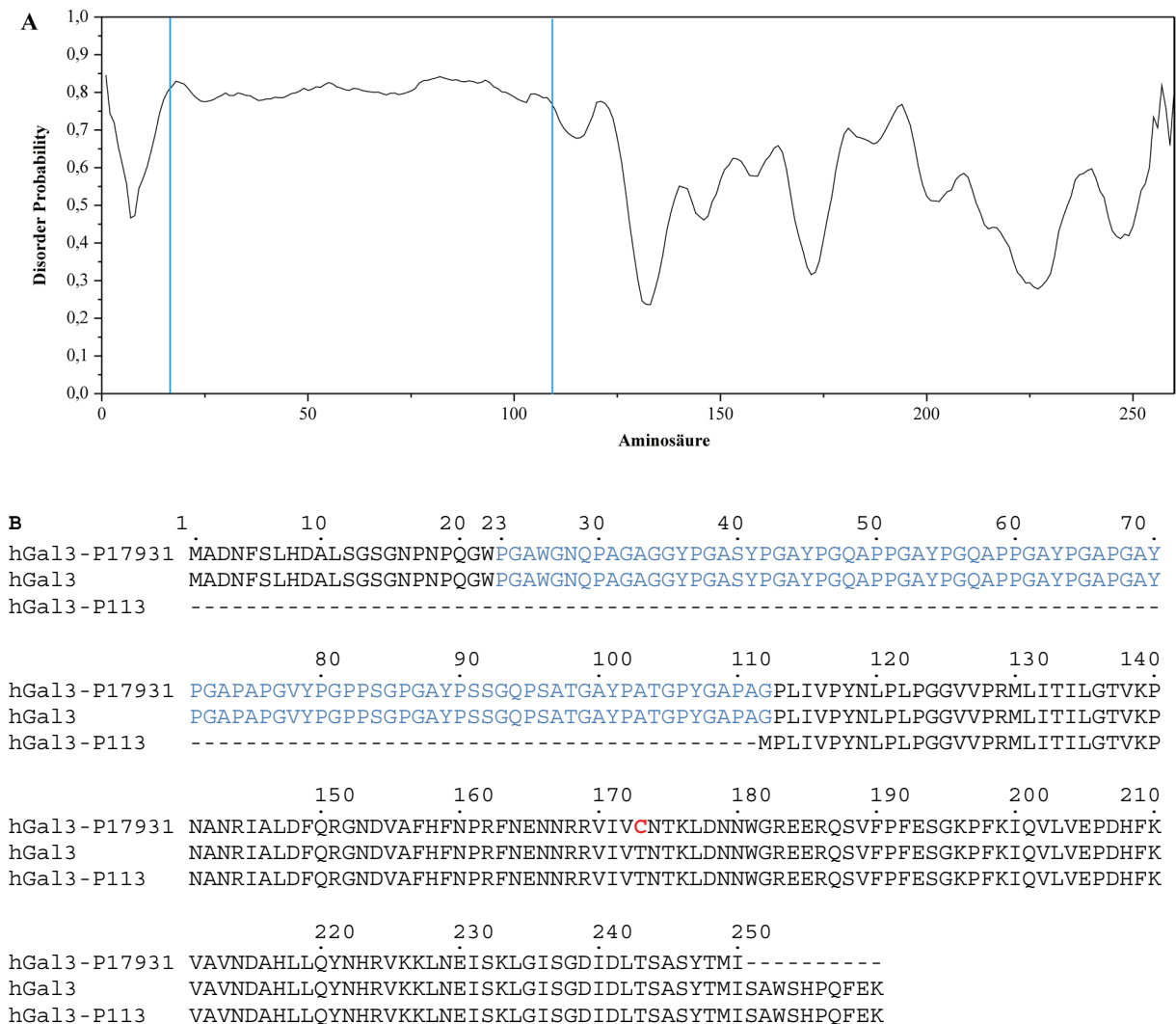


Abbildung 2 A) Wahrscheinlichkeit eines Random Coils in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz des hGal3. Das Segment der Reste 23-113 zeigt durchgängig eine hohe Wahrscheinlichkeit für ungeordnete Strukturen (in B blau hervorgehoben) **B)** Aminosäuresequenz von Galectin 3, (1) theoretische Sequenz hGal3-P17931 (UniProt), (2) rekombinantes komplettes hGal3 mit C-terminalem Strep-tag II, der Rest Cys173 wurde ausgetauscht (3) verkürzte Variante hGal3-P113. Man beachte, dass das Protein keine sekretorische Signalsequenz besitzt.

In diesem Zusammenhang zeigt eine Strukturvorhersage mit dem Algorithmus DisEMBL, der die Wahrscheinlichkeit einer Random Coil Konformation in Abhängigkeit der gegebenen Aminosäuresequenz beschreibt (Linding et al., 2003), ein interessantes Ergebnis. Für hGal3 wird damit der Sequenzbereich von Aminosäure 20 bis 110, welcher die Linkersequenz beinhaltet, mit einer Wahrscheinlichkeit von 80% als Radom Coil vorhergesagt (Abbildung 2). Es kann davon ausgegangen werden, dass Bereiche mit ungeordneter Struktur dieser Größe die Ko-Kristallisation eines Antigen/Antikörper-Komplexes behindern. Deshalb wurde zusätzlich zu dem kompletten hGal3 eine verkürzte Variante hergestellt, im weiteren als hGal3-P113 bezeichnet. Diese beginnt mit dem Rest P113 und besteht lediglich aus der Kohlenhydrat-Bindedomäne, deren Kristallstruktur bereits bekannt ist (Seetharaman et al., 1998). Das mature hGal3 (UniProtKB : P17931) besteht aus 250 Aminosäuren, entsprechend einer Masse von 26,15 kDa, in unglykosylierter Form. Basierend auf dieser Sequenz wurden Genfragmente für die gentechnische Produktion in *E. coli* geplant, bei der jedoch zwei Änderungen eingeführt wurden: In der C-terminalen Kohlenhydrat-Bindedomäne befindet sich an Position 173 ein ungepaarter Cysteinrest. Für das murine Gal3 ist bekannt, dass es über dessen Thiolgruppe zu einer Dimerisierung durch Bildung einer Disulfidbrücke kommen kann (Woo et al., 1991). Die exakte Charakterisierung der Antigen/Antikörper-Wechselwirkung setzt jedoch voraus, dass beide Interaktionspartner in monomerer Form vorliegen. Cys173 wurde daher gegen Threonin ersetzt. Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften sollte diese hydrophile Aminosäure nur geringen Einfluss auf die Faltung von hGal3 haben. Weiterhin wurde für die einfache Reinigung mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie C-terminal der Strep-tag II eingeführt (Schmidt and Skerra, 2007). Mit diesen Änderungen umfasst das intakte rekombinante hGal3 260 Aminosäuren mit einer Masse von 27,35 kDa und die verkürzte Variante hGal3_P113 149 Aminosäuren mit 17,01 kDa (vgl. Abbildung 2).

Für die bakterielle Produktion der beiden Proteine mit dem Ziel der cytoplasmatischen Expression in *E. coli* wurden kodierende Regionen auf dem Vektor pASK75 (Skerra, 1994b) über die Restriktionsschnittstellen NdeI/Eco47III kloniert. Stromaufwärts zur kodierenden Sequenz befand sich auf dem als „String“ bezogenen synthetischen Genfragment für das komplette hGal3 eine Bindestelle für den Primer D20 gefolgt von einer NdeI-Schnittstelle. Zudem wurde C-terminal eine Eco47III-Schnittstelle, gefolgt von einer Bindestelle für den Primer PR1 eingeführt (Abbildung 3). Die Primer-Bindestellen dienten zur Amplifizierung des synthetischen Genfragments zwecks Klonierung auf dem Expressionsvektor. Das Genfragment für die verkürzte hGal3-Variante wurde durch Einführung einer NdeI-Schnittstelle mittels PCR-Amplifizierung ausgehend von dem gensynthetischen Fragment erzeugt, wobei die Primer PR-hGal3-P113 und PR1 verwendet wurden. Nach Transformation von *E. coli* X11 blue wurde durch einen Restriktionsverdau mit NdeI und Eco47III der korrekte Einbau der synthetischen Genkassette überprüft, wobei die DNA-Fragmente mit 753 bp für hGal3 bzw. 421 bp für hGal3-P113 nachgewiesen wurden. Von jeweils einem korrekten Plasmid wurde die DNA-Sequenz durch Sequenzierung mit dem Primer PR1 überprüft. Die bakterielle Produktion von hGal3 und dessen Fragment erfolgte im 2l-Maßstab in *E. coli* BL21 wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Zur Genexpression wurde mit aTc (200 µg/l) bei $OD_{550} = 0,8$ für 12 h induziert, bis sich die Zellen in der stationären Phase befanden ($OD_{550} = 5$). Nach Abkühlung der Kultur im Eisbad wurden die Zellen mittels Zentrifugation geerntet und anschließend mit Hilfe einer French Press aufgeschlossen. Die Reinigung der rekombinanten Proteine durch Streptavidin-Affinitätschromatographie und Größenausschusschromatographie führte jeweils zu einer homogenen Präparation, wie durch SDS-PAGE überprüft wurde (Abbildung 4).


```

      1      10      20      30      40      50      60
      NdeI
(D20) CCACTCCCTATCAGTGAT >
hGal3-Syngen CCACTCCCTATCAGTGATCATATGCCGATAACTTTAGCCTGCATGATGCACTGAGCGGTAGCGGTAAT
      MetAlaAspAsnPheSerLeuHisAspAlaLeuSerGlySerGlyAsn
      70      80      90      100      110      120      130
hGal3-Syngen CCGAATCCGCAGGGTTGGCTGGTGCATGGGGTAATCAGCCTGCCGGTGCCGGTGGTTATCCGGGTGCA
      ProAsnProGlnGlyTrpProGlyAlaTrpGlyAsnGlnProAlaGlyAlaGlyGlyTyrProGlyAla
      140      150      160      170      180      190      200
hGal3-Syngen AGCTATCCTGGTGCCTATCCGGGTGAGCACCTCCGGGTGCGTATCCAGGTCAAGCTCCGCTGGCGCA
      SerTyrProGlyAlaTyrProGlyGlnAlaProProGlyAlaTyrProGlyGlnAlaProProGlyAla
      210      220      230      240      250      260      270
hGal3-Syngen TATCCAGGTGCACCGGGTGCATACCCTGGTGCCTCCGCTCCGGGTGTTTATCCTGGTCCGCTAGCGGT
      TyrProGlyAlaProGlyAlaTyrProGlyAlaProAlaProGlyValTyrProGlyProProSerGly
      280      290      300      310      320      330      340
hGal3-Syngen CCTGGTGCCTACCCGAGTAGCGGTGAGCCGAGCGCAACCGGTGCATATCCGGCAACCGGTCCGTATGGT
      ProGlyAlaTyrProSerSerGlyGlnProSerAlaThrGlyAlaTyrProAlaThrGlyProTyrGly
      350      360      370      380      390      400      410
      NdeI
(PR-hGal3-P113) GCGCATATGCCGCTGATT >
      MetProLeuIle
hGal3-Syngen GCTCCGGCAGGTCCGCTGATTGTTCCGTATAATCTGCCGCTGCCTGGTGGCGTTGTTCCGCGTATGCTG
      AlaProAlaGlyProLeuIleValProTyrAsnLeuProLeuProGlyGlyValValProArgMetLeu
      420      430      440      450      460      470      480
hGal3-Syngen ATTACAATTCTGGGCACCGTTAAACCGAATGCAAATCGTATTGCACTGGATTTTCAGCGTGGTAATGAT
      IleThrIleLeuGlyThrValLysProAsnAlaAsnArgIleAlaLeuAspPheGlnArgGlyAsnAsp
      490      500      510      520      530      540      550
hGal3-Syngen GTGGCCTTTTCATTTTAATCCGCGTTTCAATGAAAACAACCGTTCGTGTTATTTGTGACCAATACCAAACTG
      ValAlaPheHisPheAsnProArgPheAsnGluAsnAsnArgArgValIleValThrAsnThrLysLeu
      560      570      580      590      600      610      620
hGal3-Syngen GATAACAATTGGGGTCGTGAAGAACGTCAGAGCGTTTTTCCGTTTGAAGCGGTAAAACCGTTTAAAATC
      AspAsnAsnTrpGlyArgGluGluArgGlnSerValPheProPheGluSerGlyLysProPheLysIle
      630      640      650      660      670      680      690
hGal3-Syngen CAGGTTCTGTTGAACCGGATCATTTTAAAGTTGCAGTTAATGATGCACATCTGCTGCAGTATAATCAC
      GlnValLeuValGluProAspHisPheLysValAlaValAsnAspAlaHisLeuLeuGlnTyrAsnHis
      700      710      720      730      740      750
hGal3-Syngen CGTGTGAAAAAAGTGAACGAGATTAGCAAAGTGGGTATCAGCGGTGATATTGATCTGACCAGCGCAAGC
      ArgValLysLysLeuAsnGluIleSerLysLeuGlyIleSerGlyAspIleAspLeuThrSerAlaSer
      760      770      780      790
      Eco47III
hGal3-Syngen TATACCATGATTAGCGCTCGTTTACCGCTACTGCG
      < GCAAATGGCGATGACGC (PR1)
      TyrThrMetIle

```

Abbildung 3 Nucleotidsequenz des synthetischen Gen-String von hGal3 mit für *E. coli* optimierter Codonverwendung. Nur die kodierende Sequenz ist gezeigt, mit der Aminosäuresequenz darunter. Die Anordnung des Primers PR1 entspricht dem Gegenstrang.

Die anschließende analytische Größenausschlusschromatographie an einer S200 10/300 GL Säule zeigte zudem, dass beide Varianten als Monomer vorlagen. Eine Massenbestimmung mittel ESI-MS bestätigte im Wesentlichen die theoretischen Molekülmassen. Das intakte hGal3 wich mit 27258,50 Da im Vergleich zum theoretischen Wert von 27217,41 Da um ca. 41 Da ab, was durch eine posttranslationale N-Acetylierung am Methionin-Rest zu erklären ist (Arnesen, 2011). Mit 16875,86 Da für hGal3_P113 zeigte sich ebenfalls eine Abweichung gegenüber dem theoretischen Wert von 17007,53 Da, was sich wiederum durch die posttranslationale Abspaltung des N-terminalen Methioninrests erklären ließ. Die Ausbeute an gereinigtem Protein lag für hGal3 bei 12,9 mg und für

hGal3-P113 bei 10,1 mg aus jeweils 2l Kulturmedium. Diese Mengen waren ausreichend für die folgende Charakterisierung der Antigen/Antikörper-Wechselwirkung, sodass von einer weiteren Maßstabsvergrößerung oder Optimierung der Expression abgesehen werden konnte.

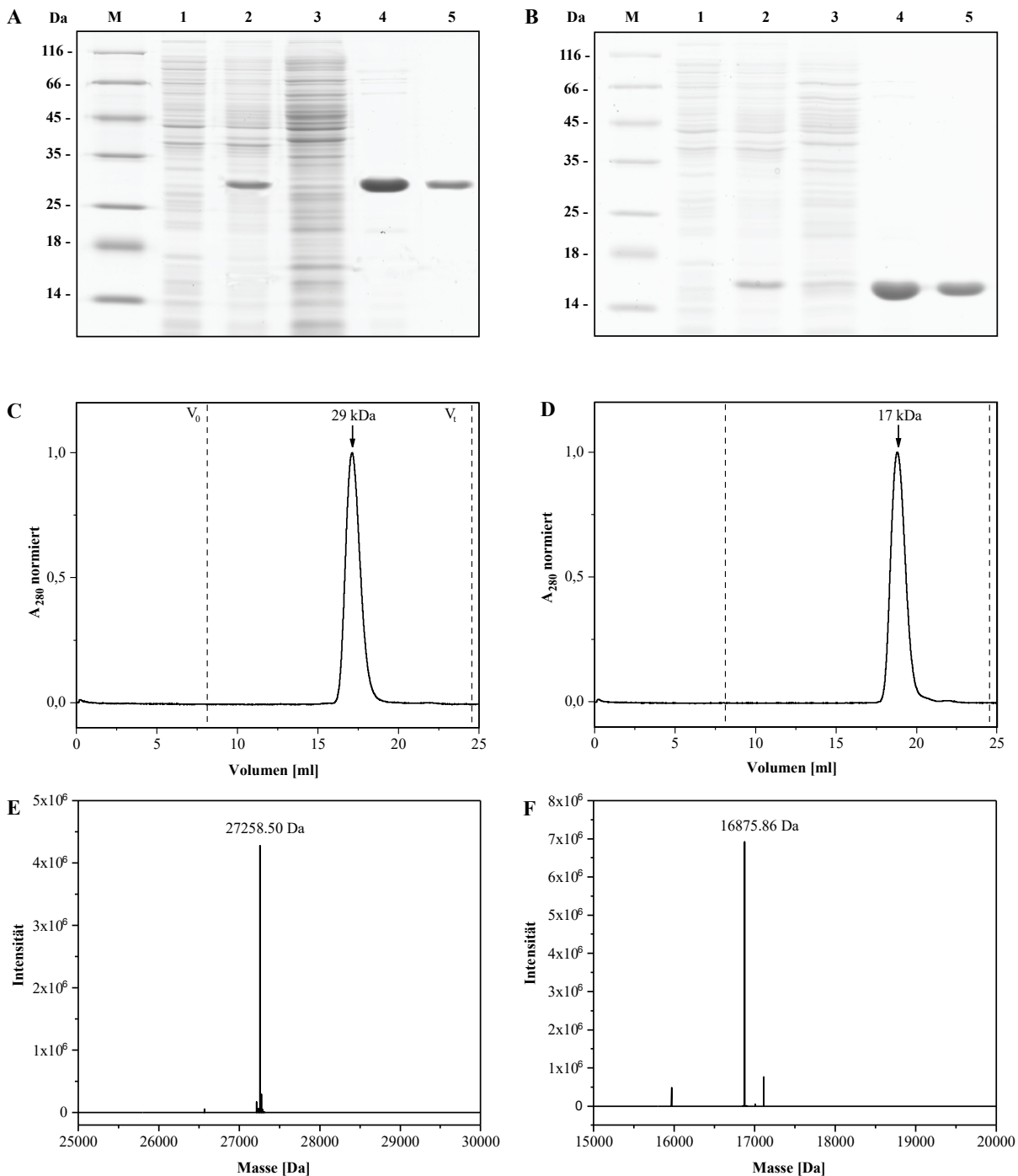


Abbildung 4 Biochemische Charakterisierung von hGal3 und dessen Fragment **A**) SDS-PAGE (reduzierend) zur Analyse der rekombinanten Genexpression für hGal3 erkennbar anhand der Bande von ca. 27 kDa, die im Weiteren als einziges Produkt der Reinigung übrig bleibt. 1. vor Induktion, 2. zum Zeitpunkt der Ernte, 3. lösliche Cytoplasmafraktion, 4. Protein nach Strep-Tactin-Affinitätschromatographie, 5. Proteine nach Größenausschlusschromatographie. **B**) SDS-PAGE (reduzierend) zur Analyse der rekombinanten Genexpression von hGal3_P113, erkennbar anhand der Bande bei ca. 17 kDa, 1. vor Induktion, 2. zum Zeitpunkt der Ernte, 3. lösliche Cytoplasmafraktion, 4. Protein nach Strep-Tactin-Affinitätschromatographie, 5. Protein nach Größenausschlusschromatographie. **C**) Analytische Größenausschlusschromatographie von hGal3. **D**) Analytische Größenausschlusschromatographie von hGal3_P113. **E**) ESI-MS von hGal3. **F**) ESI-MS von hGal3-P113.

3.2. Reinigung des α HGal3-mAK und proteolytische Präparierung des Fab-Fragments

Ein wichtiges Kriterium für die Bewertung des rekombinanten Fab-Fragments ist der direkte Vergleich mit der Affinität des aus dem monoklonalen Antikörper gewonnenen Fab zu seinem Antigen. Hierfür wurde ausgehend von dem Kulturüberstand der Hybridomzelllinie M3/38 der mAK gereinigt und proteolytisch mit Papain gespalten. Aus 150 ml des Kulturüberstandes konnten durch Chromatographie an einer Protein G Agarosesäule, gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie mit einer S200 10/300 GL Säule, 3 mg des mAK gewonnen werden. SDS-PAGE (Abbildung 5) bestätigte die Homogenität des mAK, wobei im reduzierten Zustand zwei Banden mit 47 kDa (schwere Kette) und 27 kDa (leichte Kette) zu sehen sind. In einem nicht reduzierenden SDS-PAGE eluierte der mAK mit einer Bande von ca. 180 kDa, was die Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücken bestätigte, als auch auf ein funktionell gefaltetes Protein hindeutete. Die Präparation des Fab-Fragments erfolgte durch Papain-Verdau. Papain ist eine nicht-spezifische Thiol-Endopeptidase, deren aktive Sulfhydrylgruppe durch Reduktion mit Cystein-HCl aktiviert wird. Durch Spaltung von Immunglobulinen in der Gelenkregion entstehen typischerweise drei Produkte: das Fc-Fragment und zwei Fab-Fragmente (Coulter and Harris, 1983). Eine Abtrennung des Fc-Fragments von dem Fab-Fragment war aufgrund der vergleichbaren Größen von ca. 50 kDa (Fc) gegenüber ca. 55 kDa (Fab) über eine Größenausschlusschromatographie nicht möglich, sodass hier eine Anionenaustauschchromatographie Anwendung fand. SDS-PAGE bestätigte den Erfolg des Papainverdaus wie auch die Abtrennung des Fc-Fragments. Im nicht-reduzierenden SDS-PAGE eluierte das Fab-Fragment als eine Bande bei 50 kDa. Dies lässt darauf schließen, dass trotz Verwendung eines Reduktionsmittels zur Aktivierung des Papains die Disulfidbrücken im Fab-Fragment intakt geblieben sind.

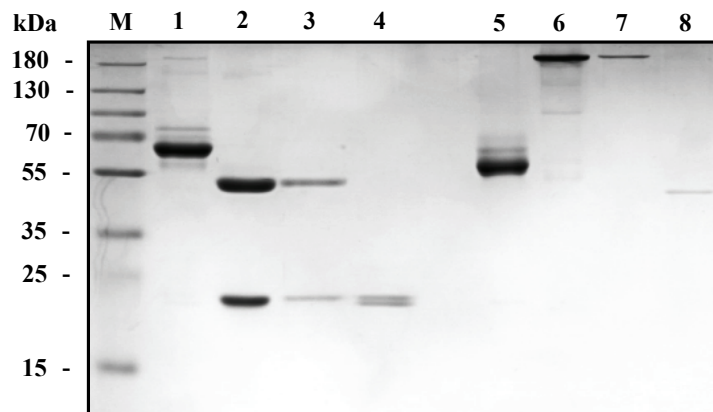


Abbildung 5 SDS-PAGE der proteolytischen Fab-Fragment Produktion **1.** (reduzierend) Kulturüberstand der Hybridomzelllinie M3/38. **2.** (reduzierend) Mit Protein G gereinigter Kulturüberstand der Hybridomzelllinie. **3.** (reduzierend) mAK nach SEC. **4.** (reduzierend) Durch Anionenaustauschchromatographie gereinigtes Fab-Fragment nach Papainverdau. **5.** (nicht reduzierend) Kulturüberstand der Hybridomzelllinie M3/38. **6.** (nicht reduzierend) Mit Protein G gereinigter Kulturüberstand der Hybridomzelllinie. **7.** (nicht reduzierend) mAK nach SEC **8.** (nicht reduzierend) Durch Anionenaustauschchromatographie gereinigtes Fab-Fragment nach Papainverdau.

3.3. Klonierung und Charakterisierung der variablen Immunglobulindomänen des α -hGal3-mAk aus der Hybridomzelllinie M3/38

Wie in der Publikation von Bartolazzi et al. (2008) gezeigt werden konnte, ist eine gezielte immunologische Diagnostik von malignem Schilddrüsengewebe anhand der Überexpression von Gal3 möglich. Basierend auf dem dort beschriebenen α hGal3-mAk sollte ein rekombinantes Fab (α hGal3-Fab) hergestellt werden, das den immunchemischen Ansatz aufgreift und mit den Vorteilen einer rekombinanten Expression verbindet.

Die kodierenden Sequenzen der beiden variablen Domänen (V_H und V_L) des α hGal3-mAk der Ratte waren zu Beginn der Arbeit unbekannt und mussten ausgehend von der den IgG2 κ Antikörper produzierenden Hybridomzelllinie M3/38 (Mabtech, Nacka Strand, Schweden) gewonnen werden. Diese wurde freundlicherweise von Prof. Bartolazzi (Universität La Sapienza) zur Verfügung gestellt, welcher auch die Isotypisierung durchgeführt hat. Die adhärenen Zellen wurden mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, daran anschließend wurde die RNA Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll durchgeführt (Kapitel 2.2.1). Aus 2×10^7 Zellen wurde insgesamt 14 mg RNA gewonnen. Die darauf folgende reverse Transkription in cDNA wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Protokoll (Kapitel 2.2.2) unter Verwendung eines oligo(dT)₁₈-Primers durchgeführt. Das so erhaltene RT-PCR Produkt diente als Templat für die Amplifizierung der IgGV-Domänen des α hGal3-mAk.

Aufgrund des Fehlens von Sequenzinformationen für den mAk wurden für die Amplifizierungsversuche N-terminal mehrere Primer in Verbindung mit je einem Primer verwendet, der spezifisch in der konstanten Region der beiden Ig-Stellen hybridisiert (Loers et al., 2014). Ausgehend von einem beschriebenen Satz an Primern, die in der N-terminalen Kodierungsregion der maturen variablen Immunglobulindomänen hybridisieren und das vollständige IgGV-Repertoire von *Rattus norvegicus* abdecken (Sepulveda and Shoemaker, 2008), wurden jeweils drei Primer für die schwere bzw. die leichte Kette verwendet.

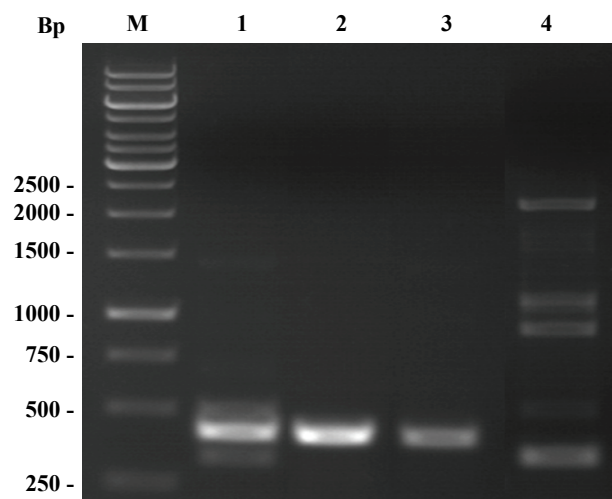


Abbildung 6 Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Amplifizierung mit verschiedenen Primerpaaren zur Klonierung der IgV-Domänen des α hGal3-mAk aus Gesamtzell-cDNA. **1)** Amplifizierung mit dem Primerpaar RatVLF02/RMK. **2)** Amplifizierung mit dem Primerpaar RatVLF13B/RMK. **3)** Amplifizierung mit dem Primerpaar RatVLF18/RMK. **4)** Amplifizierung mit dem Primerpaar RatVHF06/RMG.

Als Auswahlkriterium für diese Primer galt hierbei die höchste Übereinstimmung zum IgGV Repertoire von *Rattus norvegicus* der IMGT Datenbank in einem IgBLAST (Ye et al., 2013). Die besten Ergebnisse lieferten hierbei die Primer RatVHF06, RatVHF17, RatVHF21 für die schwere bzw. RatVLF02, RatVLF13B, RatVLF18 für die leichte Kette. Da die Subklassen des mAK bekannt waren, wurden die C-terminalen Primer so gewählt, dass diese in den konstanten Domänen hybridisierten und somit jeweils nur ein Primer für die Amplifizierung nötig war. Diese Bedingungen erfüllen die von Loers et al. (2014) beschriebenen Primer RMK bzw. RMG, die in einem zwischen Ratte und Maus konservierten Bereich innerhalb der ersten konstanten Domänen ($C_{H1\gamma 1}$ bzw. C_{κ}) binden.

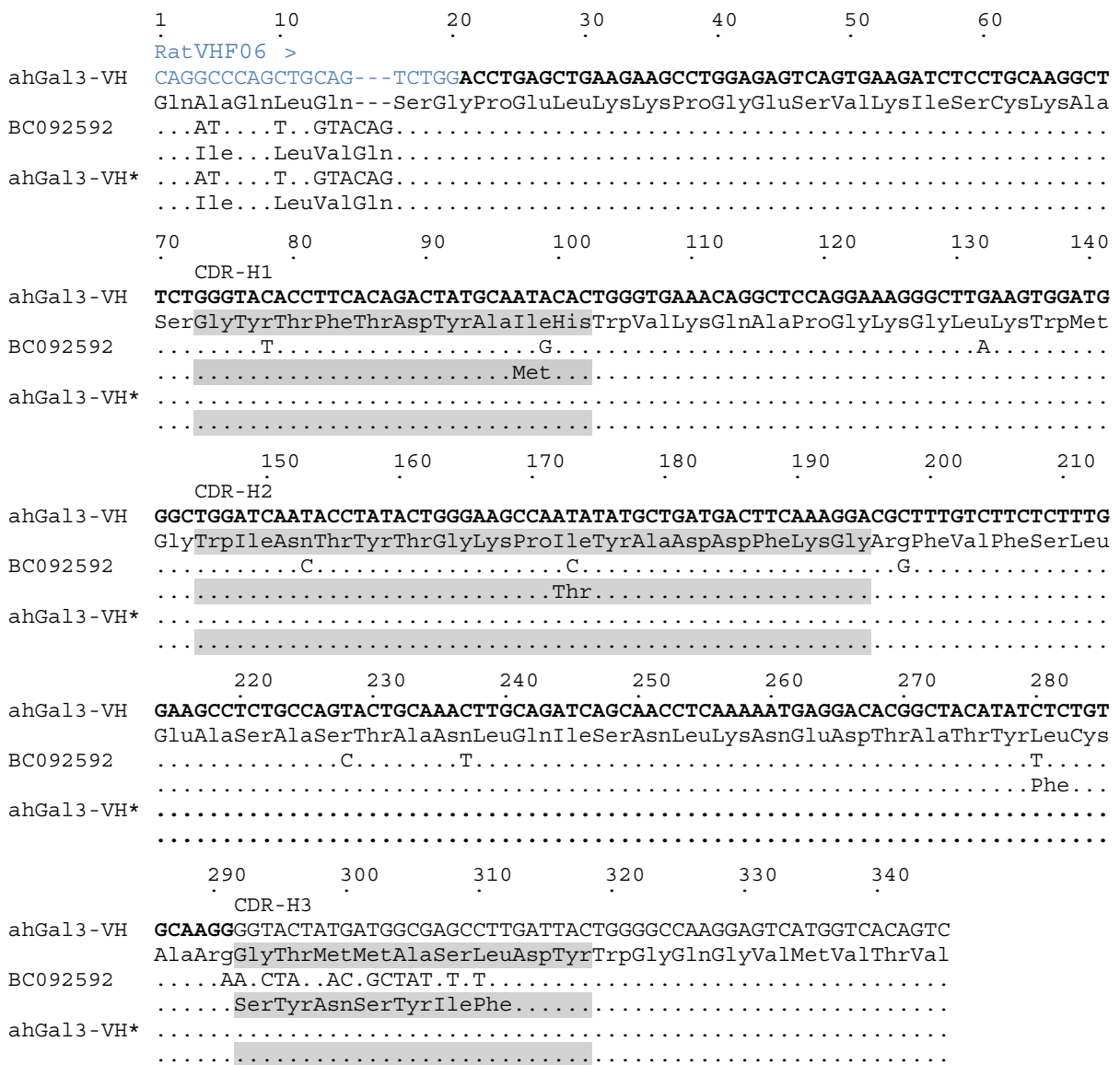


Abbildung 7 Alignment der IgVH Nucleobasensequenz und deren Translation. Die grau hinterlegten Bereiche der Translation geben die CDR-Regionen wieder. **Reihe 1** (ahGal3-VH) gibt das Sequenzierungsergebnis des gereinigten Amplifizierungsproduktes der Primerpaarung RatVHF06/RMG wieder. Die blaue Markierung zeigt die Hybridisierungsstelle des Primers RatVHF06. Der für die Blast-Suche verwendete Sequenzbereich ist in fett formatiert. **Reihe 2** (BC092592) zeigt die Sequenz des nächst homologen IMGT/LIGM-Datenbankeintrags. **Reihe 3** (ahGal3-VH*) zeigt die N-terminal korrigierte Version die für die weitere Analyse verwendet wurde.

```

      1      10      20      30      40      50      60      70
RatVLF13B >
ahGal3-VL GATGTTGTGATGACCAGACTCCAGTGTCTTTGTCGCTTGCCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCGTGCAAG
AspValValMetThrGlnThrProValSerLeuSerLeuAlaIleGlyGlnProAlaSerIleSerCysLys
L22655    .....AG.....A..T.....
          .....Val.....
          80      90      100     110     120     130     140
CDR-L1
ahGal3-VL TCAAGTCAGAGCCTCGTACATAGTGATGGAAAGACATATTTGAGTTGGATATTACAGAGGCCAGGCCAATCT
SerSerGlnSerLeuValHisSerAspGlyLysThrTyrLeuSerTrpIleLeuGlnArgProGlyGlnSer
L22655    .....GG..C.A.....A...T.....C....G...
          .....GlyThrAsn.....Asn...Leu.....
          150     160     170     180     190     200     210
CDR-L2
ahGal3-VL CCAAAGGGCTTAATCTATCTGGTGTCCAAACTGGACTCTGGGGTTCCTGATAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCA
ProLysGlyLeuIleTyrLeuValSerLysLeuAspSerGlyValProAspArgPheSerGlySerGlySer
L22655    .....C.AC.....A.....
          .....Arg.....Ile.....
          220     230     240     250     260     270     280
CDR-L3
ahGal3-VL GAGACAGAATTTACTCTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCTGGCAAGCT
GluThrGluPheThrLeuLysIleSerArgValGluAlaGluAspLeuGlyValTyrTyrCysTrpGlnAla
L22655    .....T.....T.....T.....G.
          .....Asp.....Asp.....Leu...Gly
          290     300     310     320     330
ahGal3-VL ACACATTTTCCGCTCACGTTTCGGTCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
ThrHisPheProLeuThrPheGlySerGlyThrLysValGluIleLys
L22655    .....C.....
          .....Leu.....

```

Abbildung 8 Alignment der IgVL Nucleobasensequenz und deren Translation. Die grau hinterlegten Bereiche der Translation geben die CDR-Regionen wieder. **Reihe 1** (ahGal3-VL) gibt das Sequenzierungsergebnis des gereinigten Amplifizierungsproduktes der Primerpaarung RatVLF13B/RMK wieder. Die blaue Markierung zeigt die Hybridisierungsstelle des Primers RatVLF13B. Der für den Blast verwendete Sequenzbereich ist in fett formatiert. **Reihe 2** (L22655) zeigt die Sequenz des nächst homologen IMGT/LIGM-Datenbankeintrags. **Reihe 3** (ahGal3-VL*) zeigt die N-terminal korrigierte Version, die für die weitere Analyse verwendet wurde.

Die Analyse der Amplifizierungsprodukte über eine Agarose-Gelelektrophorese zeigte im Fall der schweren Kette nur für die Primerkombination RatVHF06 und RMG DNA-Fragmente verschiedener Längen. Unter diesen befand sich auch ein Fragment mit 400 – 500 bp, also der typischen Länge von variablen Ig-Domänen. Die Amplifizierung der leichten Kette führte mit allen drei Primerkombinationen zu Amplifizierung von Gensequenzen mit 400 - 500 bp (Abbildung 6).

In Abbildung 7 und 8 sind die Gensequenzen und die Translation der variablen Domäne für die Amplifizierung mit den Primerpaaren RatVHF06/RMG und RatVLF13B/RMK und direkter Sequenzierung der PCR-Produkte mit den Primern RMG und RMK gezeigt. Durch Annotation der Sequenz nach der Kabat-Nomenklatur (Kabat et al., 1991) konnten die typischen Merkmale von IgV-Domänen mit den CDR-Regionen 1 bis 3 für jede Ig-Kette bestimmt werden. Wie in den Abbildungen 7 und 8 angedeutet, hybridisieren die Vorwärtsprimer am N-terminus der variablen Domänen, sodass die Sequenzierung im Bereich der ersten 6 - 7 Codons nicht exakt der cDNA entsprechen muss. Mit Hilfe einer Blastsuche gegen die IMGT/LIGM Datenbank (Lefranc et al., 1999) gelang es jedoch, die nächst homologen *Rattus norvegicus* V-Gene zu finden und anhand deren die wahrscheinlich korrekten N-termini des mAk zu bestimmen. Für die Blast-Analyse wurden die Sequenzen außerhalb der

Primerhybridisierungsstelle, also stromabwärts der Nukleobase 21 für V_H und 20 für V_L verwendet. Weiterhin wurden die Sequenzen nur bis zur CDR-3, also bis Nukleotid 291 für V_H und 278 für V_L , herangezogen um dem Mechanismus der V(D)J Paarung der Keimbahnsegmente während der somatischen Rekombination Rechnung zu tragen (Murphy and Weaver, 2016). Da das LV-Gensegment auch die N-terminalen Aminosäuren der variablen Domänen kodiert, ist lediglich dieser Bereich als Ergebnis der Blastanalyse von Interesse.

Als nächst homologe Sequenz der schweren Kette wurde der IMGT/LIGM Eintrag BC092592 ermittelt, der sich als *Rattus norvegicus* IGHV mit der Allel-Anordnung aus IGHV9-4*01 F V-Gen, IGHJ2*01 F D-Gen und IGHD1-2*01 F J-Gen ergibt. Die Sequenz des V-Genallels unterscheidet sich N-terminal zur ahGal3-VH Sequenz an den Positionen zwei, vier und fünf, sowie einem Valin, zusätzlich insertiert als sechste Aminosäure. Diese Unterschiede resultieren vermutlich aus einer unspezifischen Hybridisierung der cDNA mit dem Primer RatVHF06, der ursprünglich für die Amplifizierung des Ratnor IGHV1-48*01 V-Gen Allel konstruiert wurde (Sepulveda and Shoemaker, 2008). Die nächst homologe Sequenz der leichten Kette war der IMGT/LIGM Eintrag L22655, der sich als *Rattus norvegicus* IGKV mit der Allel-Anordnung aus IGKV1S18*01 F V-Gen und dem IGKJ5*01 F D-Gen ergibt. In diesem Fall war keine Differenz der N-termini zwischen dem Sequenzierungsergebnis von ahGal3-VL und L22655 vorhanden.

3.4. Produktion funktioneller chimärer Fab-Fragmente (GaletuxiFab) in *E. coli* und deren funktionelle Analyse

Ein großer Unsicherheitsfaktor des translationalen Übergangs stellt die potentielle Toxizität des Biotherapeutikums dar. Häufig enden erfolgsversprechende diagnostische und therapeutische Ansätze an diesem Punkt und sollten deshalb schon während der Entwicklung bedacht und wenn möglich minimiert werden. Für Antikörper nicht-humanen Ursprungs ist bekannt, dass sie eine Immunreaktion im Menschen auslösen können. Der als Human-anti-Maus-Antwort (HAMA) bekannte Effekt kann zu milden Reaktionen wie Ausschlag bis hin zu lebensbedrohlichen Reaktionen wie Organversagen führen und verhindert so eine erfolgreiche Therapie (Azinovic et al., 2006).

Im Hinblick auf eine potentielle Immunogenität stellt ein chimäres Fab-Fragment den besten Kompromiss zwischen einem monoklonalen, aus Nagerantikörper proteolytisch präpariertem Fab und einem humanisierten Fab-Fragment, das lediglich die CDR des ursprünglichen Antikörpers enthält dar. Dieses kann durch einfaches Klonieren der identifizierten variablen Domänen auf einem geeigneten Vektor mit humanen konstanten Regionen realisiert werden. Für die Herstellung des Antikörperfragments im chimären Fab-Format wurde der Fab-Expressionsvektor pASK88 verwendet, dessen Vektorrückgrat konstante IgG₁-Domänen (CH_1 und C_k) humanen Ursprungs kodiert (Schiweck and Skerra, 1995). Die rekombinanten Fab-Fragmente wurden damit auf Grundlage einer bereits etablierten Methode zur Produktion von funktionellen Immunoglobulindomänen in *E. coli* hergestellt (Skerra, 1994a). Diese Methode erlaubt es, die beiden Ketten eines Fab-Fragments in das Periplasma von *E. coli* zu sekretieren. Das hier vorliegende oxidierende Milieu führt zur Ausbildung der intra- sowie interchenaren Disulfidbrücken, sodass funktional aktive, nativ gefaltete Antikörperfragmente gewonnen werden können.

3.4.1. Konstruktion des Expressionsvektors für die bakterielle Fab-Produktion

Der generische Expressionsvektor pASK84 (Skerra, 1994a), wie auch sein Derivat pASK88, besitzen Restriktionsschnittstellen, die die variablen Domänen flankieren, sodass eine standardisierte Klonierung von IgGV-Domänen möglich ist. Die variable Domäne der schweren Kette (V_H) wird hierbei über die Restriktionsschnittstellen PstI und Eco91I flankiert, die leichte Kette (V_L) über eine SacI sowie eine XhoI Restriktionsschnittstelle (Abbildung 10).

Zur Einführung der Restriktionsschnittstellen in die variablen Genfragmente des α Gal3-mAk war ein zusätzlicher PCR-Schritt mit den gereinigten IgV-Domänen (siehe Kap 3.3) notwendig. Für V_H wurden die Primer RatVHF06 und RatVHRef2 verwendet, für V_L die Primer RatVLFow und InFab11, welche jeweils die passenden Erkennungssequenzen trugen. Die resultierende N- und C-terminale Einführung der Restriktionsschnittstellen ist in Abbildung 9 in einem Alignment mit den ursprünglichen Sequenzen des mAk M3/38 gezeigt. Nach Verdau des PCR-Produktes und des Vektors pASK88-hu4D5 (Schlapschy et al., 2005) mit den Restriktionsenzymen PstI und Eco91I sowie SacI und XhoI wurden die Fragmente isoliert und in einer 4-Fragmentligierung die variablen Domänen des α Gal3-mAk in den Vektor inseriert.

	1	10	20	30	320	330	340
VH							
		PstI					
(RatVH06F)	CAGGCC	CAGCTG	---	CAGTCTGG	>		
ahGal3-VH*	CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGAGCTG	TGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTC				
					(RatVHRef2) <	GGAGTCATGGTCACACTC	
						Eco91I	
	GlnIleGlnLeuValGlnSerGlyProGluLeu	TrpGlyGlnGlyValMetValThrVal				
(VHNtermFow)	CAGATCCAGCTTGTACAGTCTGGACCTGAGC	>					
GaletuxiFab-N	G.AG.TA.AC	---	C..
<	GTCTAGGTCGAACATGTCAGACCTGGACTCG						(VHNtermRev)
	GluValLysLeu	---
GaletuxiFab	C..
VL							
		SacI					
(RatVLFow)	GATGTTGAGCTCACCCAGACTCCAGTGTCT	>					
ahGal3-VL	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGTGTCT	GGTTCTGGGACCAAGGTGGAGATCAAA				
					(InFab11) <	GGTTCTGGGACCAAGCTCGAGATCAAA	
						XhoI	
	AspValValMetThrGlnThrProValSer	GlySerGlyThrLysValGluIleLys				
(VLNtermFow)	GACGTTGTCATGACCCAGACTCCAGTG	>					
GaletuxiFab-N	..CA.C.A.C.C	C.C.....
<	CTGCAACAGTACTGGGTCTGAGGTCAC						(VLNtermRev)
	...IleGluLeu	Leu.....
GaletuxiFab	..C.....C	C.C.....
							Leu.....

Abbildung 9 Sequenzausschnitte der N- und C-terminalen Enden der beiden klonierten variablen Domänen von M3/38. **Reihe 1** (α -Gal3-VH*/VL) zeigt die Sequenz des ursprünglichen mAk mit den Primern RatVH06F, RatVHRef2, RatVIFow und InFab11, die zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in das Vektorsystem pASK88 genutzt wurden, **Reihe 2** (GaletuxiFab-N) zeigt die Sequenz des Plasmids pASK88-GaletuxiFab-N mit den neu modifizierten Enden, die aus der Position der Restriktionsschnittstellen resultieren. Weiterhin sind die Hybridisierungsstellen der Primer VHNtermFow, VHNtermRev, VLNtermFow und VHLNtermRev gezeigt, die für die Mutation der N-Termini zur ursprünglichen Sequenz des mAk verwendet wurden. **Reihe 3** (GaletuxiFab) zeigt die Sequenz der N-terminal mutierten variablen Domänen von GaletuxiFab-N.

Das erhaltene Vektorkonstrukt pASK88-GaletuxiFab-N wurde durch Sequenzierung mit den Primern D11 und D12 überprüft. Aufgrund der Lage der Restriktionsschnittstellen sind die ersten Aminosäuren am N-terminus, wie auch die letzten Reste am C-terminus der schweren, bzw. der leichten V-Region vom Vektorrückgrat determiniert und weichen von der Sequenz des α Gal3-mAk teilweise ab. Die schwere Kette unterscheidet sich N-terminal von der vektorkodierten Sequenz EVKL durch die in der Blast-Analyse ermittelte Sequenz QIQLV (siehe Abbildung 7). Die leichte Kette beginnt N-terminal mit DIEL im Vergleich zur Originalsequenz DVVM, C-terminal endet das Vektorkonstrukt mit LEIK und die Originalsequenz mit VEIK. Insbesondere die N-terminalen Abweichungen können aufgrund ihrer lokalen Nähe zu den CDR im nativen IgG einen Einfluss auf die Antigenbindung, bzw. Affinität haben. Aus diesem Grund wurde eine Variante des Plasmids konstruiert, bei dem die N-terminalen Unterschiede mittels Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) behoben wurden (Quan and Tian, 2009). Für diese Methode wurden zwei Primerpaare geplant, die die jeweilige N-terminale Mutation der variablen Domänen enthalten, wobei der Reverse Primer revers komplement zum Vorwärtsprimer ist. Durch Amplifizierung des Plasmids pASK88-GaletuxiFab-N mit den Primern VHNtermFow/VLNtermRev und VLNtermFow/VHNtermRev wurden so zwei Fragmente erzeugt, die doppelsträngige überlappende Sequenzbereiche besitzen. In einem Hybridisierungsschritt der beiden Fragmente wurde das N-terminal reparierte Plasmid pASK88-GaletuxiFab erzeugt (Abbildung 9) Der Erfolg der Ligierung wurde durch Sequenzierung mit den Primern D11 und D12 überprüft.

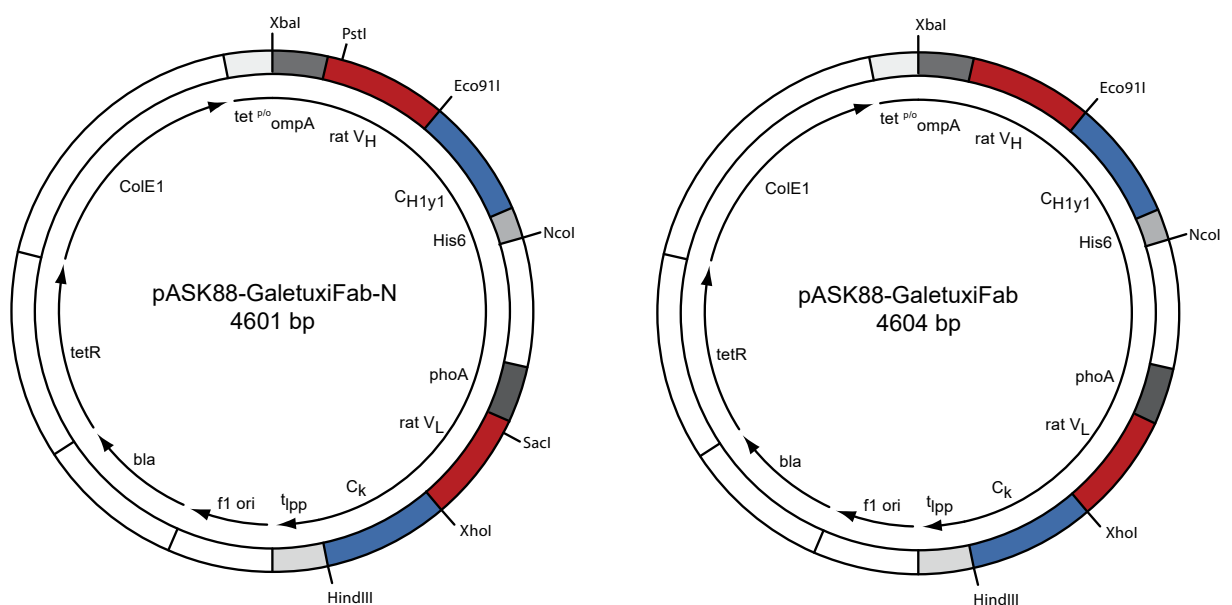


Abbildung 10 Schematische Darstellung des Vektors pASK88-GaletuxiFab-N und pASK88-GaletuxiFab. Flankiert vom Tetracyclin-Promotor/Operator (tet p/o) und dem Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}) kodiert das Plasmid für das chimäre α Gal3-Fab-Fragment. Dies besteht aus den variablen Domänen V_H und V_L des Antikörpers α Gal3-mAk der Ratte, den menschlichen konstanten Domänen C_K sowie C_{H1γ1}. C_{H1γ1} ist C-terminal mit einem Hexahistidin-tag (His₆) versehen. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme PstI, Eco91I, SacI und XhoI wurden zur Klonierung der V-Gene in dem Konstrukt GaletuxiFab-N benutzt. Die Anpassung der N-Termini an die ursprünglichen Sequenzen des mAk führte zur Deletion der dortigen Restriktionsschnittstellen im Konstrukt GaletuxiFab. Des weiteren kodiert der Leserahmen die N-terminale Signalsequenz des Outer Membrane Protein A OmpA (schwere Kette) bzw. der Alkalischen Phosphatase PhoA (leichte Kette). Der verkürzte Replikationsursprung des Plasmids ist durch ColE1 bezeichnet und die intergenische Region des Bakteriophagen durch f1. Die β -Lactamase (bla), welche die Resistenz für Ampicillin vermittelt, und der Tet-Repressor (tetR) werden in einem dicistronischen Gen konstitutiv exprimiert.

Die C-terminalen Unterschiede befanden sich in der Verbindung zwischen den variablen Domänen (V_H und V_L) und den konstanten Domänen (C_{H1} und C_L), der sogenannten Ellbow-Region (Stanfield et al., 1993). Dieser Bereich ist bekannt für seine konformationelle Flexibilität und erlaubt dem Volllängenantikörper mit beiden Fab-Armen Epitope zu binden, die in unterschiedlichen Abständen zu finden sind (Bhat et al., 1990). Aufgrund dieser Flexibilität sollte eine geringfügige Veränderung der Sequenz in diesem Bereich keinen Einfluss auf die Affinität besitzen, sodass von einer Wiederherstellung der ursprünglichen Sequenz abgesehen wurde.

Für die optimierte Expression im 8l Fermenter bei erhöhter Zelldichte wurde ein pASK111 Vektor verwendet. Dieser besitzt anstelle des Ampicillinresistenzgens (Bla) das CAT Chloramphenicolresistenzgen (Vogt and Skerra, 2001). Das Ampicillinresistenzgen führt zu einer konstitutiven Expression der β -Lactamase (Plückthun and Skerra, 1989). Nach Sekretion in das Periplasma von *E. coli* wird Ampicillin durch Spaltung des Lactamrings inaktiviert (Jacoby, 2009). Kommt es zur Zellyse kann die β -Lactamase das im Medium vorhandene Ampicillin abbauen, sodass der selektive Druck zum Erhalt des Plasmids nicht mehr gegeben ist. Insbesondere bei Hochzelldichteexpressionen kann dies zu erheblich niedrigeren Produktausbeuten führen (Fiedler and Skerra, 2001). Chloramphenicol hingegen wird im Cytoplasma durch die Chloramphenicol-acetyltransferase (CAT) unter Verbrauch von Acetyl-CoA acetyliert, wodurch es nicht mehr an das bakterielle Ribosom binden kann (Wolfe and Hahn, 1965, Leslie, 1990). Die Abhängigkeit von Acetyl-CoA limitiert hierbei die Aktivität der CAT auf lebende Zellen und die Zellyse führt somit nicht zum Abbau des im Medium befindlichen Chloramphenicol. Zu diesem Zweck wurde der gesamte für das Fab-Fragment kodierende Bereich zwischen den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme XbaI und HindIII aus pASK88-GaletuxiFab herausgeschnitten und mit dem ebenso geschnittenen Vektorfragment von pASK111 ligiert. Das Plasmid wurde als pASK111-GaletuxiFab bezeichnet.

In den konstruierten Expressionsvektoren steht das Cistron für das Fab-Fragment unter der Transkriptionskontrolle des stringent regulierten tet-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994b). Mit Hilfe dieses Systems wird die Basalsynthese eines Fremdgens im Vergleich zu anderen Promotoren sehr niedrig gehalten, sodass eventuell toxische Effekte minimiert werden. Des Weiteren wird durch das Expressionssystem die Sec-abhängige Sekretion vorgegeben. Hierbei dienen die bakteriellen Signalsequenzen des OmpA bzw. der PhoA der periplasmatischen Sekretion der beiden Antikörperketten. Nach Ausbildung der inter-, sowie intrachainaren Disulfidbindungen im reduzierenden Milieu des Periplasma von *E. coli* liegt das vollständig prozessierte Fab-Fragment vor. Die C-terminale Fusion eines His₆-Tag an die C_{H1} erlaubt eine nahezu vollständige Reinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie (Skerra, 1994a).

3.4.2. Bakterielle Produktion und Reinigung von GaletuxiFab

Die bakterielle Produktion des chimären GaletuxiFab erfolgte im 2l-Maßstab im *E. coli* Stamm W3110 bei 25°C wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Im Fall beider Varianten wurde mit aTc (200 µg/l) bei einer OD₆₀₀ = 5 und für nur 2,5h induziert, da ab diesem Zeitpunkt Zellyse zu beobachten war. Nach Abkühlen der Suspension wurde durch Zentrifugation geerntet und anschließend jeweils die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Isolierung der GaletuxiFab Varianten aus der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gefolgt von einer Größenausschusschromatographie. Die Ausbeute lag bei 340 µg für GaletuxiFab-N, bzw. 360 µg für GaletuxiFab. Die Analyse der Eluatfraktionen (exemplarisch für GaletuxiFab, Abbildung 11 A) zeigte die Homogenität des Fab-Fragments nach dem letzten Reinigungsschritt. In Anwesenheit des

Reduktionsmittels war das Fab anhand von zwei leicht separierten Banden mit einer Größe von ca. 30 kDa zu erkennen. Die Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke war in der SDS-PAGE ohne Zusatz eines Reduktionsmittels erkennbar, wobei das Fab-Fragment eine Bande bei ca. 50 kDa zeigte. Eine analytische Größenausschlusschromatographie an einer S200 10/300 GL Säule zeigte zudem, dass beide Varianten als Monomer vorliegen. Auch aggregiertes Protein konnte effizient durch die verwendete Kombination an Reinigungsschritten entfernt werden. Eine exakte Massenbestimmung mittel ESI-MS bestätigte die theoretischen Molekülmassen von 48140 Da für GaletuxiFab-N und 48226 Da für GaletuxiFab.

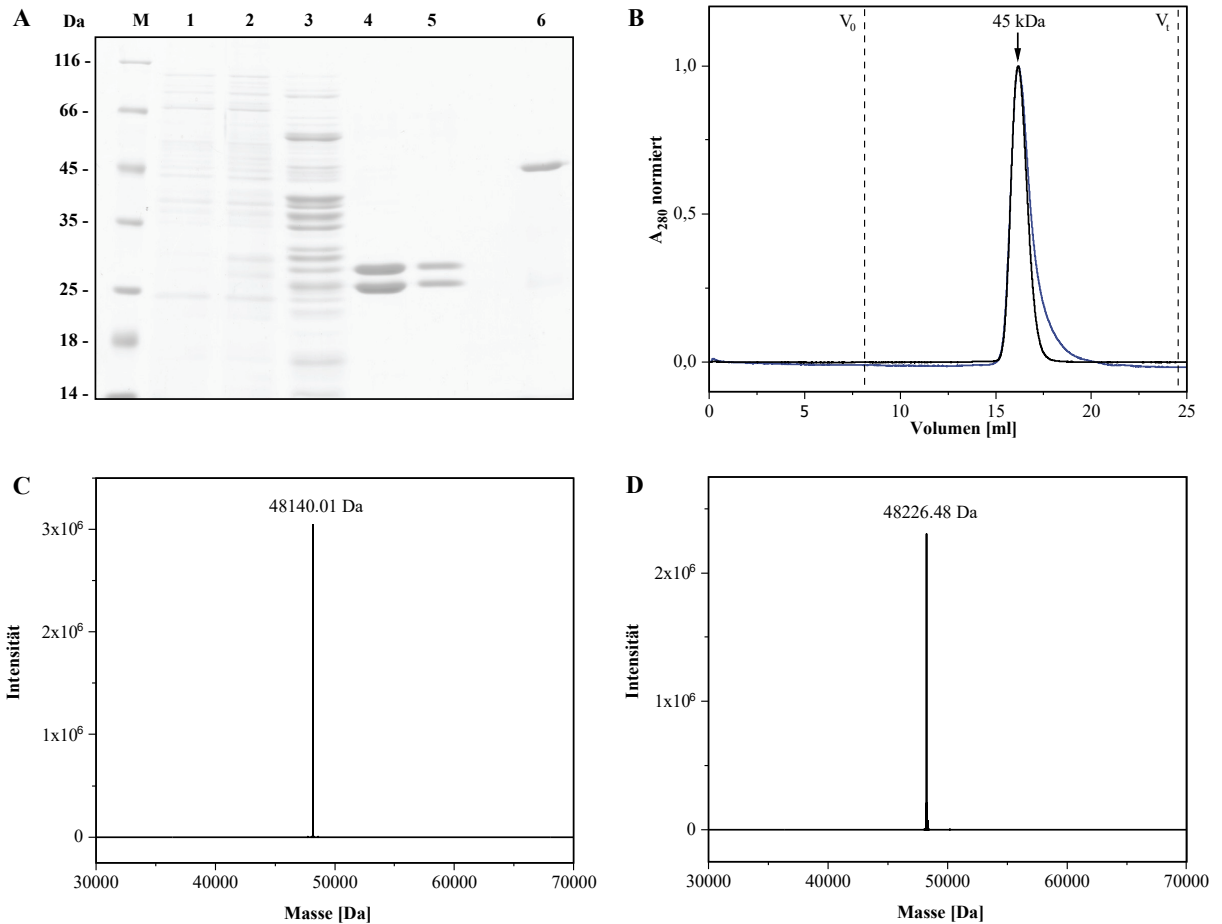


Abbildung 11 **A)** SDS-PAGE (reduzierend) zur Analyse der rekombinanten Expression von GaletuxiFab. 1. Gesamte Probe vor Induktion, 2. Probe zum Zeitpunkt der Ernte, 3. Periplasmatische Fraktion, 4. Protein nach IMAC-Reinigung, 5. Protein nach Größenausschlusschromatographie, 6. (nicht reduzierend) wie 5. **B)** Analytische Größenausschlusschromatographie von GaletuxiFab-N (schwarz) und GaletuxiFab (blau). **E)** ESI-MS von GaletuxiFab-N **F)** ESI-MS von GaletuxiFab.

3.4.3. Untersuchung der Antigenbindung im ELISA und Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie

Die funktionelle Charakterisierung der beiden GaletuxiFab-Varianten im Vergleich zu dem proteolytischen Fab-Fragment des MAK wurde anhand des Bindungsverhaltens gegenüber dem Antigen hGal3 *in vitro* untersucht. In einem ELISA wurde hGal3 immobilisiert und die Fab-Fragmente in einer Konzentrationsreihe eingesetzt (Abbildung 12). Die erhaltenen Sättigungskurven ließen sich wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben durch nicht-lineare Regression an die Gleichung für eine Adsorptionsisotherme anpassen (Voss and Skerra, 1997). Für das proteolytische Fab-Fragment wurde ein K_D -Wert von $2,7 \pm 0,6$ nM bestimmt.

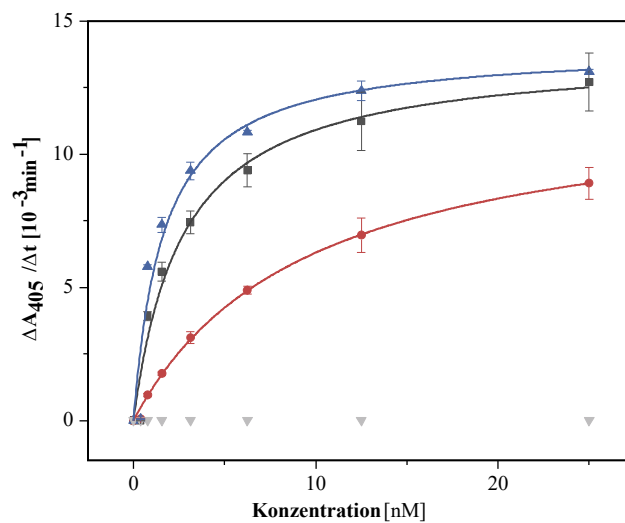


Abbildung 12 ELISA zur Untersuchung der Funktionalität der gentechnisch hergestellten Fab-Fragmente GaletuxiFab (blau) und GaletuxiFab-N (rot) im Vergleich zu dem proteolytisch präparierten Fab-Fragment des hGal3-mAK (schwarz) und Ovalbumin (grau). Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. Für das proteolytische Fab-Fragment wurde ein $K_D = 2,7 \pm 0,6$ nM, für GaletuxiFab-N ein $K_D = 9,5 \pm 0,8$ nM und für GaletuxiFab ein $K_D = 1,7 \pm 0,5$ nM ermittelt.

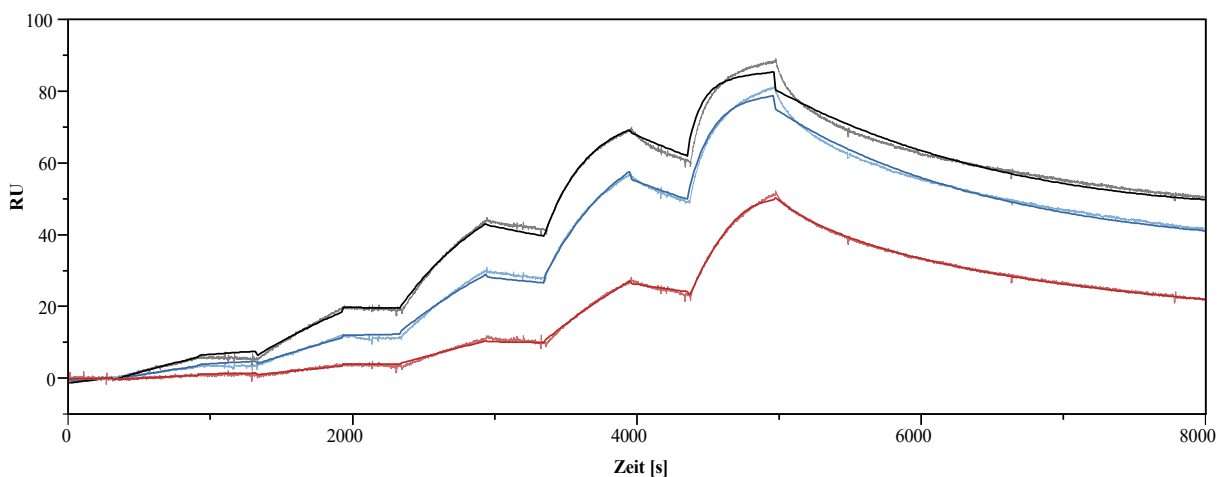


Abbildung 13 SPR – Analyse der immobilisierten Fab-Fragmente GaletuxiFab (blau), GaletuxiFab-N (rot) und dem proteolytischen Fab-Fragment des hGal3-mAK (schwarz) gegenüber hGal3. Für das proteolytische Fab wurde eine $K_D = 0,27 \pm 0,01$ nM, für GaletuxiFab-N ein $K_D = 0,79 \pm 0,01$ nM und für GaletuxiFab eine $K_D = 0,29 \pm 0,02$ nM ermittelt.

Im Vergleich dazu zeigte GaletuxiFab-N mit den N-terminal vektorkodierten Aminosäuren eine höhere K_D von $9,5 \pm 0,8$ nM. Die N-terminal korrigierte Variante GaletuxiFab dagegen ergab eine K_D von $1,7 \pm 0,5$ nM, was innerhalb des Messfehlers, mit dem K_D -Wert des proteolytischen Fab-Fragments übereinstimmt. Offensichtlich sind also die N-terminalen Reste der variablen Domänen an der Bindung des Epitops beteiligt.

Mittels Oberflächenplasmonen-Resonanzspektroskopie wurde zusätzlich die Kinetik der Bindung zwischen hGal3 und den Fab-Fragmenten in Einzelzyklus-Kinetikexperimenten untersucht (Abbildung 13). Aus den ermittelten kinetischen Parametern konnte anschließend die Dissoziationskonstante über ein 1:1 Bindungsmodell (Karlsson et al., 2006) berechnet werden.

Für diese Untersuchungen wurde das jeweilige Fab-Fragment immobilisiert und das rekombinante Antigen hGal3 in einer Messung in ansteigenden Konzentrationen über den Chip geleitet. Durch Pausen von jeweils 600 Sekunden zwischen den einzelnen Antigeninjektionen, sowie einer längeren Dissoziationszeit von 3000 Sekunden am Ende des Zyklus konnten so die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten der unterschiedlichen Konzentrationen ermittelt werden. Dieses als Einzelzykluskinetik (Dougan et al., 1998) bezeichnetes Verfahren ohne Regenerierung zwischen den verschiedenen Antigenkonzentrationen war nötig, da eine vollständige Dissoziation der Bindung zwischen Fab-Fragment und hGal3 nur unter denaturierenden Bedingungen (10 mM Glycin, pH 1) möglich war. Übereinstimmend mit den ELISA Ergebnissen war die aus den kinetischen Parametern bestimmte Gleichgewichts-Dissoziationskonstante für das proteolytische Fab-Fragment ($K_D = 0,27 \pm 0,01$ nM) vergleichbar mit der Dissoziationskonstante der aminoterminal korrigierte Variante GaletuxiFab ($K_D = 0,29 \pm 0,02$ nM). Im Vergleich zu GaletuxiFab-N ($K_D = 0,79 \pm 0,01$ nM) konnte die Affinität um den Faktor 4 verbessert werden. Insgesamt waren die durch SPR ermittelten Dissoziationskonstanten interessanterweise um einen Faktor 10 niedriger als die im ELISA ermittelten.

3.5. Einfluss der PASylierung auf die Ausbeute des rekombinanten Fab-Fragments

In der Regel haben biopharmazeutische Produkte nach intravenöser Applikation aufgrund der schnellen glomerularen Filtration von Proteinen > 70 kDa im Menschen eine relativ kurze Plasmahalbwertszeit von wenigen Stunden. Eine außergewöhnliche Ausnahme aufgrund ihrer Größe von circa 150 kDa und der neonatal Fc Rezeptor (FcRn) vermittelten Wiederverwertung bilden hierbei IgG Antikörper (Schlupschy et al., 2013). Deren lange Plasmahalbwertszeit ist jedoch für ein Radioimmunkonjugat hinderlich, da hierdurch die Strahlenbelastung unnötigerweise erhöht wird. Eine Strategie, um ein Mittelmaß zwischen der optimalen Aufnahme im Tumor bei möglichst kurzer Verweilzeit in der Zirkulation zu finden, ist die Änderung zu kleineren Antikörperformaten wie scFv-, Fab-, Minibody- oder Fab₂-Fragmenten. Zwar besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Größe des Immunkonjugats und der Plasmahalbwertszeit, doch lässt sich dieser nicht exakt vorhersagen (Thurber et al., 2008), sodass für eine Anpassung der Plasmahalbwertszeit alle Formate ausprobiert werden müssten. Eine alternative Strategie ist die Möglichkeit mit dem faltungsstabilen und leicht zu produzierendem 50 kDa Fab-Format zu arbeiten und dieses sukzessive zu vergrößern, bis eine ideale Größe und somit Plasmahalbwertszeit erreicht wird. Hierfür wurde das Fab-Fragment durch die genetische Fusion eines konformationell ungeordneten Polypeptids aus den Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin (PAS) vergrößert. Dies besitzt ähnliche pharmakokinetisch optimierende Effekte, wie ein PEG Polymer ohne den zusätzlichen Schritt der Konjugation (Fee and Van Alstine, 2006, Mandler

et al., 2014). Im Hinblick auf die klinische Translation bietet diese Technologie mehr Kontrolle über das Produkt und eine einfachere Handhabung der Herstellung.

Die genetische Fusion des PAS-Polymers ist theoretisch an vier Positionen möglich, den N-Termini, sowie den C-Termini der beiden Ketten, wobei die Anordnung unterschiedliche Einflüsse auf Expressionsausbeuten und Faltungsverhalten des Fab-Fragments haben kann. Wie bereits gezeigt wurde, scheinen die N-Termini aufgrund ihrer Nähe zu den CDRs einen gewissen Einfluss auf die Affinität zu haben, sodass von einer N-terminalen Fusion des PAS-Polymers abgesehen und lediglich die beiden C-terminalen Fusionsprodukte hergestellt wurden. Gefolgt von der Einführung der PAS Sequenz in den Vektor pASK111-GaletuxiFab an den C-Terminus der schweren oder der leichten Kette des Fab-Fragments wurden der Einfluss auf die Ausbeuten und die Funktionalität überprüft.

3.5.1. Genetische Fusion der PAS-Sequenz mit der schweren Kette von GaletuxiFab, Produktion und funktionelle Analyse

Der im Labor verfügbare Vektor pASK88-4D5-HC-PAS#1(200)-His/LC-PAS#1(200)-StrepII (Schlapschy et al., 2013) wurde als Quelle der PAS-Gensequenz verwendet. Durch Verdau mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII konnte die PAS-Sequenz bereits gekoppelt an die schwere konstante Domäne HC-PAS#1(200) isoliert werden. Die Einführung in den Vektor pASK111-GaletuxiFab gelang durch Verdau mit XhoI und HindIII, gefolgt von einer Ligierung des gereinigten DNA-Fragments HC-PAS#1(200) mit dem Vektorrückgrat von pASK111-GaletuxiFab. Der resultierende Vektor pASK111-GaletuxiFab-HC-PAS#1(200) wurde durch Sequenzierung mit den Primern D11 und D12 überprüft.

Die Expression im 2l Maßstab wurde, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, mit dem *E. coli* Stamm W3110 durchgeführt. Nach Wachstum der Zellen bis zu $OD_{600} = 5$ wurde die Expression durch Induktion mit aTc (200 µg/l) bei den Temperaturen 16°C, 22°C und 30°C für 2,5h untersucht. In allen Fällen konnte weder im löslichen Periplasmaextrakt, noch in den IMAC-Eluatfraktionen rekombinantes Protein im Coomassie-gefärbten SDS-Elektrophoresegelel nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

3.5.2. Genetische Fusion der PAS-Sequenz mit der leichten Kette von GaletuxiFab, Produktion und funktionelle Analyse

Durch Verdau des Vektors pASK88-4D5-HC-PAS#1(200)-His/LC-PAS#1(200)-StrepII (Schlapschy et al., 2013) mit den Restriktionsenzymen BstEII und NcoI wurde das Fragment kodierend für die leichte konstante Domäne und PAS200, LC-PAS#1(200) gewonnen. Nach Verdau des Vektors pASK111-GaletuxiFab mit denselben Enzymen wurde das Insert LC-PAS#1(200) mit dem Vektorrückgrat von pASK111-GaletuxiFab ligiert. Der erhaltene Vektor pASK111-GaletuxiFab-LC-PAS#1(200) wurde durch Sequenzierung mit den Primern D11 und D12 überprüft.

Nach Transformation des *E. coli* Stamms W3110 wurde, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, das PASylierte GaletuxiFab exprimiert. Nach Wachstum der Zellen bis zu $OD_{600} = 5$ wurde die Genexpression durch Induktion mit aTc (200 µg/l) bei 25°C für 2,5h induziert und anschließend die periplasmatische Zellfraktion präpariert.

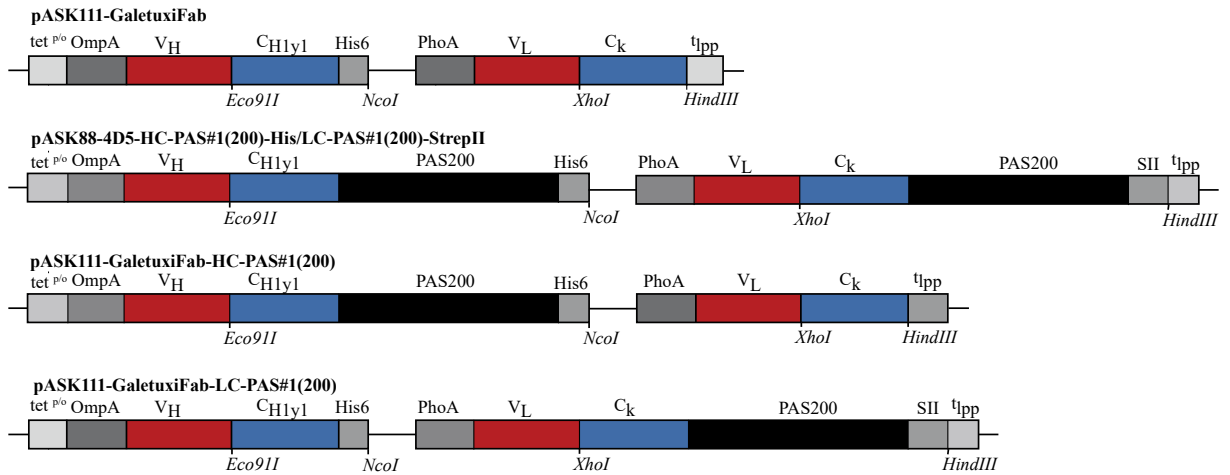


Abbildung 14 Schematische Darstellung der Expressionskassette des Vektors pASK111-GaletuxiFab, den PASylierten Varianten pASK111-GaletuxiFab-HC-PAS#1(200) und pASK111-GaletuxiFab-LC-PAS#1(200), sowie dem als Quelle des PAS#1(200) Fragments dienenden Plasmids pASK88-4D5-HC-PAS#1(200)-His/LC-PAS#1(200)-StrepII (Schlapschy et al., 2013).

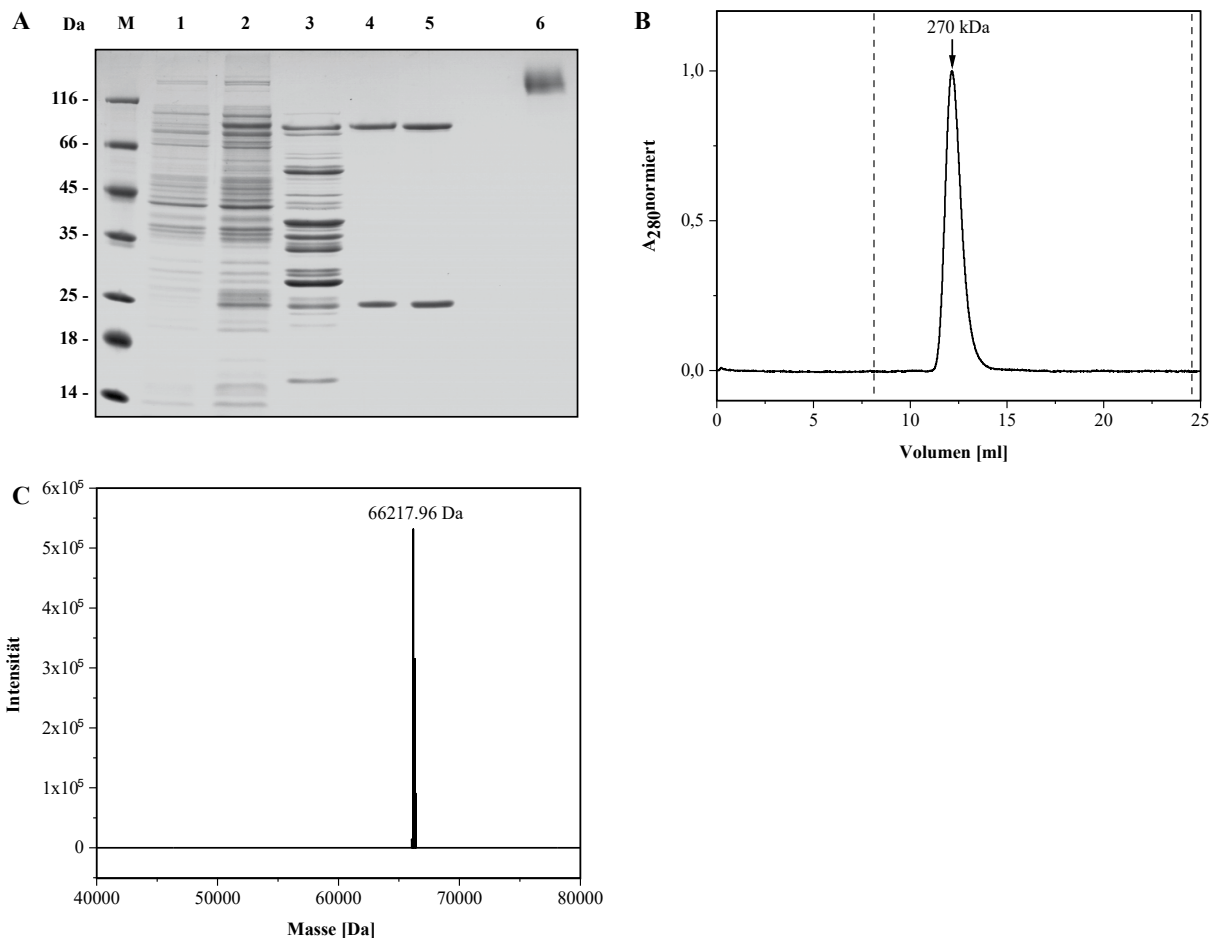


Abbildung 15 Charakterisierung von GaletuxiFab-PAS200 A) SDS-PAGE (reduzierend) zur Analyse der rekombinanten Expression von GaletuxiFab-PAS200. 1. vor Induktion, 2. zum Zeitpunkt der Ernte, 3. periplasmatische Fraktion, 4. Protein nach IMAC-Reinigung, 5. nach Größenausschlusschromatographie, 6. (nicht reduzierend) wie 5. B) Analytische Größenausschlusschromatographie von GaletuxiFab-PAS200 C) ESI-MS von GaletuxiFab-PAS200.

Die Reinigung des Fusionsproteins mit dem PAS200 Polymer an der leichten Kette des Fab-Fragments ließ sich durch Kombination einer Metallchelate-Affinitätschromatographie gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie realisieren. Wie die reduzierende SDS-PAGE (Abbildung 15 A) der gereinigten Fraktionen zeigte, eluierte die schwere Kette des Fab-Fragments mit einer apparenten Masse von 25 kDa und die leichte Kette als Fusion mit PAS200 bei ca. 80 kDa.

Im Gegensatz zur theoretischen Masse des V_L -PAS200 Fragments von 42 kDa konnte eine stark verzögerte Migration beobachtet werden. Dieses Verhalten wurde schon früher für PASylierte Proteine gezeigt (Schlapschy et al., 2013). Durch das Fehlen hydrophober Gruppen in dem PAS Polymer kann Na-Dodecylsulfat (SDS) vermutlich nur schlecht gebunden werden. Da dessen negativ geladene Kopfgruppen der Grund für die Migration des Proteins durch das elektrische Feld sind, führt ein Fehlen von SDS zu der verzögerten Migration.

Im SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen eluiert das PASylierte Fab-Fragment als eine leicht unscharfe Bande über 116 kDa, was also den gleichen Effekt zeigt. Die Ausbildung der interchenaren Disulfidbindung schien durch die PASylierung nicht gestört zu werden. Die Charakterisierung durch eine analytische Größenausschlusschromatographie an einer S200 10/300 GL Säule (Abbildung 15 B) zeigte monodisperses Verhalten des gereinigten Proteins. Mit einer apparenten Masse von 270 kDa führte die PASylierung zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens um den Faktor 4 gegenüber der erwarteten theoretischen Molekülmasse von 66218 Da. Zur Bestätigung der korrekten Masse wurde das PASylierte Protein einer Analyse mittels ESI-MS unterzogen (Abbildung 15 C), die einen Wert von 66217,96 Da ergab.

Die PAS-Sequenz vergrößert aufgrund ihrer Random Coil Struktur das hydrodynamische Volumen des Fusionspartners in einer ähnlichen Weise wie ein PEG-Polymer. Eine Folge der PEGylierung kann eine Abschirmung des Paratops und dadurch ein negativer Einfluss auf die Affinität sein (Selis et al., 2016). Der direkte Vergleich der Affinitäten des unPASylierten Fab K_D (GaletuxiFab) = $1,7 \pm 0,5$ nM sowie des PASylierten Fab K_D (GaletuxiFab-PAS200) = $1,2 \pm 0,1$ nM in einem ELISA (Abbildung 16) zeigte, dass die PASylierung am C-terminus, also strukturell entfernt von der Antigenbindestelle, keinen Einfluss auf die Affinität hat. Die mittels SPR gemessene Affinität (Abbildung 17) zeigte für das PASylierte Fab eine K_D (GaletuxiFab-PAS200) = $0,26 \pm 0,01$ nM. Dies war ebenfalls vergleichbar mit der über SPR gemessenen Affinität des Fab K_D (GaletuxiFab) = $0,29 \pm 0,02$ nM.

Die Ausbeute von 320 μ g im 2l Maßstab für GaletuxiFab-PAS200 war vergleichbar mit dem nicht PASylierten GaletuxiFab, was für nachfolgende *in vivo* Experimente ungenügend war. Auch in diesem Fall konnte durch eine Fermentation im 8l-Fermenter eine ausreichende Ausbeute von 30 mg erzielt werden.

3.6. Chemische Konjugation von GaletuxiFab mit Fluorophoren und Chelatoren über Lysin-Seitenketten

Immunglobuline besitzen keine intrinsische Eigenschaft, die zum jetzigen Zeitpunkt für eine direkte *in vitro*, sowie *in vivo* Detektion verwendet werden kann. Aus diesem Grund ist für die diagnostische Nutzung von immunologisch zugänglichen Zielmolekülen über ein bildgebendes Verfahren eine Fusion des Immunglobulins mit einer geeigneten Reportergruppe notwendig.

Eine gängige und unter geringem Aufwand realisierbare Methode ist die Bildgebung mittels Immun-Fluoreszenz, bei der ein Fluorophor kovalent an einen Antikörper gekoppelt wird. Vor allem die emittierte Strahlung im

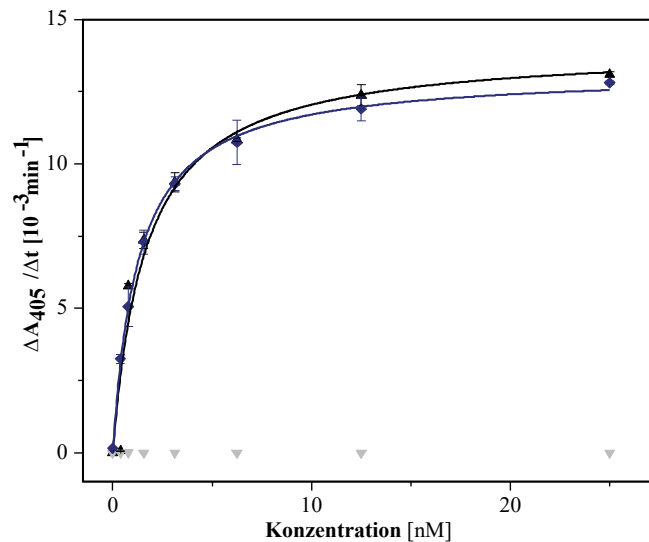


Abbildung 16 ELISA zur Überprüfung des PAS200 Einfluss auf die Funktionalität des Fab-Fragments. Es wurde eine Verdünnungsreihe von GaletuxiFab (schwarz) und GaletuxiFab-PAS200 (blau) angesetzt. Ovalbumin (grau) wurde als Referenz verwendet. Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. Für GaletuxiFab wurde hierbei eine apparente $K_D = 1,7 \pm 0,5$ nM, für GaletuxiFab-PAS200 eine $K_D = 1,2 \pm 0,1$ nM ermittelt.

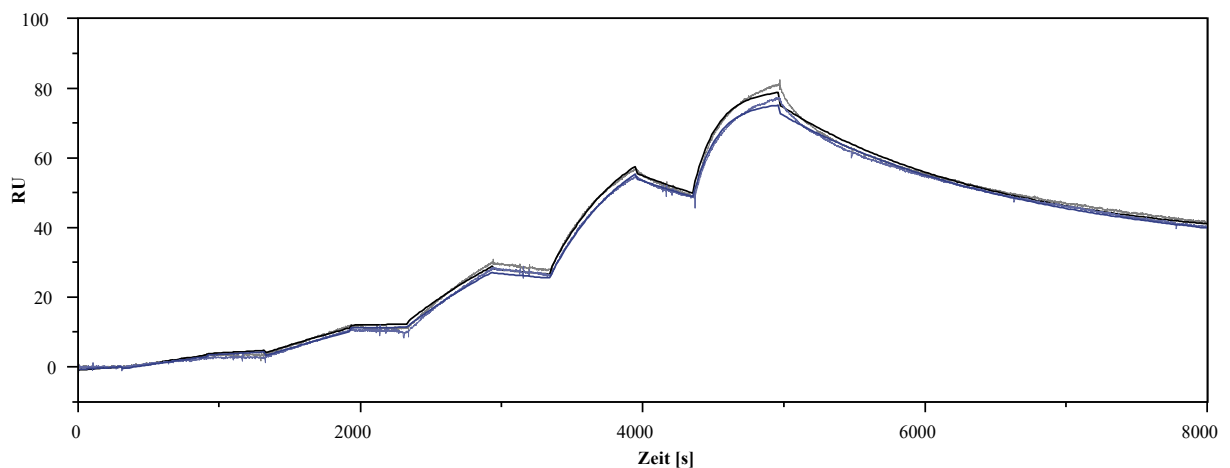


Abbildung 17 SPR-Analyse der immobilisierten Fab-Fragmente GaletuxiFab (schwarz) und GaletuxiFab-PAS200. Für GaletuxiFab wurde hierbei eine $K_D = 0,29 \pm 0,02$ nM und für GaletuxiFab-PAS200 eine $K_D = 0,26 \pm 0,01$ nM.

Wellenlängenbereich von 650 bis 950 nm ist in der Lage Gewebe 1-2 cm zu penetrieren, sodass sich diese Methode besonders für die *in vivo* Diagnostik von nicht-tiefliegendem Gewebe eignet (Gao et al., 2004, Weissleder, 2001). Wenn die kurze Gewebepenetration der Fluoreszenz jedoch nicht ausreichend, ist die Verwendung von höherenergetischer Strahlung mit einer tieferen Gewebepenetration nötig. Insbesondere die Positronen Emissions Tomographie (PET) zeigt in diesem Zusammenhang große Vorteile. Bei der Immun-PET-Bildgebung wird - neben der radioaktiven Iodierung - ein Radionuklid von einem Chelator komplexiert, der wiederum kovalent an einen Antikörper gebunden ist. Die beim radioaktiven Zerfall des Radionuklids entstehende Gammastrahlung durchdringt Gewebe annähernd ungehindert, sodass mit diesem Verfahren auch tiefliegende Gewebeschichten gut dargestellt werden können. Der limitierende Faktor dieser Methode liegt hierbei darin, die richtige Kombination aus Halbwertszeit des Radionuklids zur *in vivo* Halbwertszeit des verwendeten Proteinreagenz zu finden. Bei entsprechender Optimierung kann ein guter Kontrast zwischen Tumor und umliegendem Gewebe ermöglicht und gleichzeitig

die Strahlenbelastung niedrig gehalten werden. In diesem Zusammenhang zeigt das Radionuklid ^{89}Zr mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 78,4$ h interessante Eigenschaften bei der Verwendung von PASylierten Fab-Fragmenten (Verel et al., 2003, Mendler et al., 2014). Für die Komplexierung von Zirkonium eignet sich besonders der Chelatbildner Deferoxamin (DFO), welcher als natürlicher Siderophor Eisenkomplexe ausbildet (Perk et al., 2010).

Der Chelator, sowie der Fluorophor kann mit verschiedenen Methoden an das Protein gekoppelt werden. Eine weit verbreitete Methode ist die Modifizierung von Lysinseitenketten über einen bifunktionalen Chelator bzw. Fluorophor mit reaktiven Gruppen wie Isothiocyanaten oder Succimidyl-Estern. Diese Kopplungsmethode führt zu einer Reaktion aller zugänglichen Lysinseitenketten, sodass die Reaktionsprodukte eine Mischung der möglichen Kopplungsprodukte darstellen (Hermanson, 2013). Hierbei ist die Kopplungseffizienz stark von der Verteilung, Zugänglichkeit und Reaktivität der Lysinseitenketten, wie auch von der stöchiometrischen Verteilung abhängig, sodass eine Etablierung des Kopplungsprotokolls für jedes Protein individuell nötig ist. Ein kritischer Punkt bei der statistischen Kopplung von Lysinseitenketten ist die Möglichkeit eines ungünstigen Einflusses auf die Affinität durch Kopplung in der Nähe oder in der Paratop-Epitop-Interaktionstelle, sodass eine Überprüfung der Affinität im Anschluss an die Kopplung notwendig ist.

3.6.1. Kopplung von GaletuxiFab mit dem Fluorophor Cyanin-5.5

Der verwendete Fluorophor Sulfo-Cy5.5-N-Hydroxysuccinimid-Ester (Cy5.5-NHS) mit einer Extinktion von 649 nm und einer Emission von 675 nm ist der reaktive Ester des sulfonierten Fluorophors Cyanin 5.5. Dieser ist besonders für die Markierung von Proteinen geeignet, da die Sulfongruppen zu einer erhöhten Hydrophilie des Fluorophors führen und damit die Reaktion ohne Zusatz signifikanter Mengen eines Hilfslösungsmittels ermöglichen.

Maßgebliche Einflussfaktoren auf die Kopplung sind pH-Wert, Proteinkonzentration und das molare Fluorophor/Protein Verhältnis. Bei einem pH-Wert von 7,4 und einer konstanten Konzentration von 2,5 mg/ml des gereinigten Fab-Fragments wurden verschiedene Konzentrationen des als NHS-Ester aktivierten Farbstoffs unter sonst gleichbleibenden Bedingungen untersucht (Abschnitt 2.4.5), wobei sich das molare Verhältnis 3/1 für Cy5.5-NHS/GaletuxiFab-PAS200 als ideal erwies. Die Kopplungseffizienz wurde nach Reinigung des gekoppelten Produkts durch ESI-MS (Abbildung 18 A) analysiert.

Wie in diesem Spektrum zu erkennen ist, gab es eine Verteilung von Kopplungsprodukten mit 0 bis 4 DFO-Gruppen pro Fab-Fragment. Ausgehend von diesem Spektrum wurde anhand des Integrals der Kopplungsspezies der jeweilige Anteil ermittelt werden. Aus den normierten Werten (Abbildung 18 B) konnte mit Hilfe der Poisson-Verteilung ein mittleres Kopplungsverhältnis von $0,9 \pm 0,05$ für Cy5.5/GaletuxiFab-PAS200 ermittelt werden. Durch Absorptionmessung bei 280 nm und 675 nm lässt sich das Kopplungsverhältnis mit $0,8 \pm 0,02$ bestätigen (Abbildung 18 C).

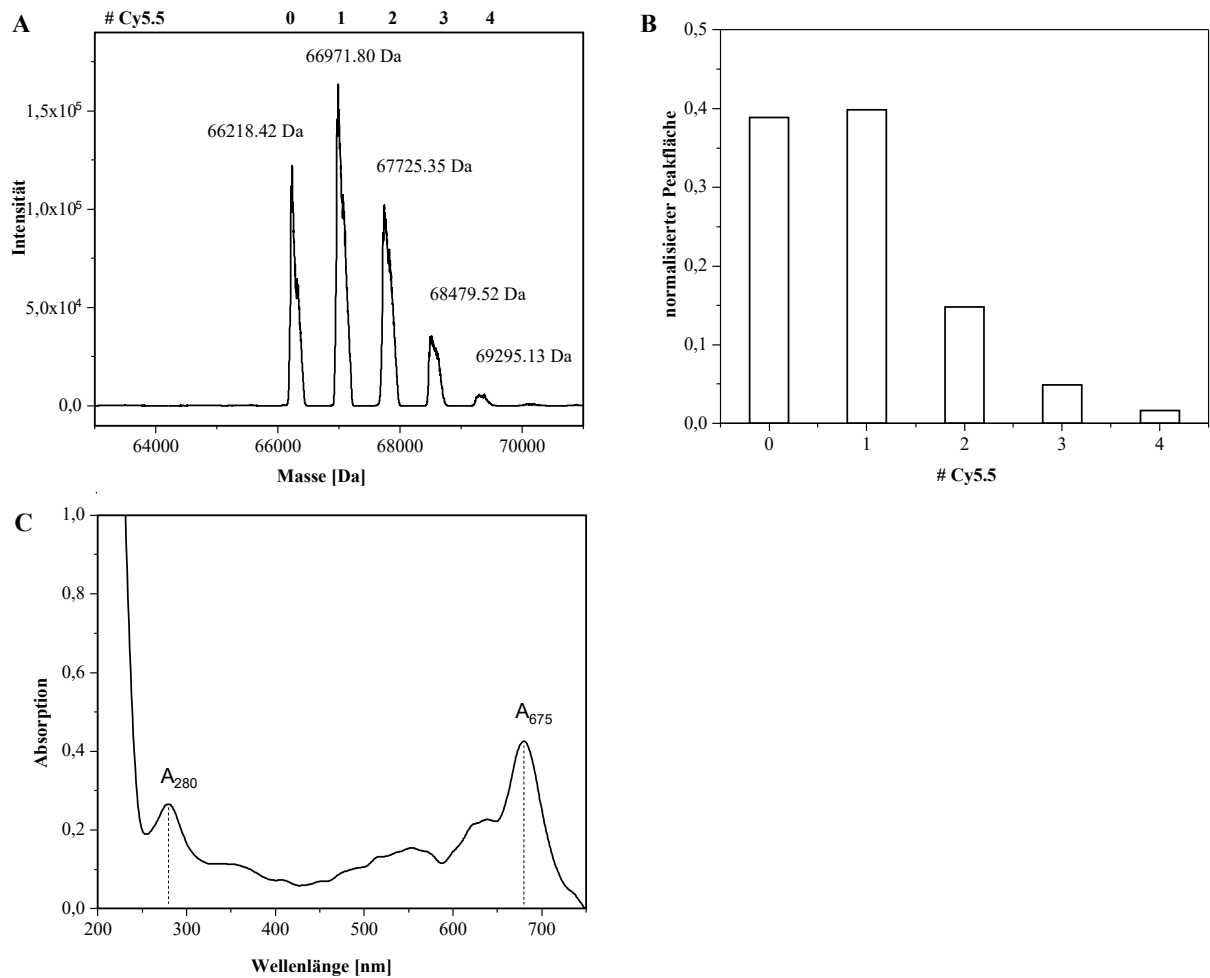


Abbildung 18 Charakterisierung der Kopplung von GaletuxiFab mit Cy5.5 **A**) ESI-MS-Chromatogramm der Kopplungsprodukte von GaletuxiFab-PAS200 mit Cy5.5. In rot ist die berechnete Poisson-Verteilung der Kopplungsspezies gezeigt. Der Erwartungswert liegt bei $0,9 \pm 0,05$, was das Cy5.5/GaletuxiFab-PAS200 Verhältnis wiedergibt. **B**) Absorptionsspektrum des Kopplungsproduktes. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 280 nm und 675 nm lässt sich ein Kopplungsverhältnis von $0,8 \pm 0,02$ errechnen.

3.6.2. Kopplung von GaletuxiFab mit dem Chelator Deferioxamin

Zur Kopplung (siehe Abschnitt 2.4.5) des Chelators mit GaletuxiFab-PAS200 wurde das funktionalisierte para-Isothiocyanatobenzyl-Deferoxamin (pSCN-DFO) verwendet. Isothiocyanate benötigen für die Amin-Kopplung einen höheren pH-Wert als Succinimidyl-Ester (Hermanson, 2013), sodass bei dieser Kopplungsmethode der pH-Wert 9 gewählt wurde. Trotz dieser Maßnahme zeigte sich, dass für eine gute Kopplungseffizienz bei einer Proteinkonzentration von 2,5 mg/ml ein molares Eduktverhältnis von 8/1 für pSCN-DFO/GaletuxiFab-PAS200 nötig war. Für das gereinigte Kopplungsprodukt konnte durch Auswertung der ESI-MS Daten und Berechnung der Poisson-Verteilung ein Kopplungsverhältnis von $1,4 \pm 0,1$ ermittelt werden (Abbildung 19).

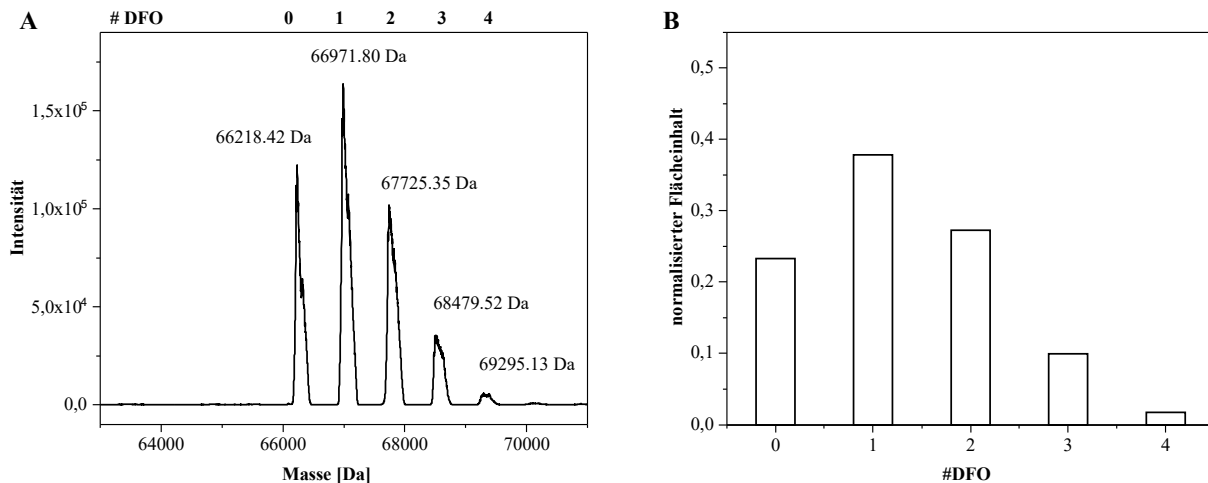


Abbildung 19 ESI-MS-Chromatogramm der Kopplungsprodukte von GaletuxiFab-PAS200 mit DFO. In rot ist die berechnete Poisson-Verteilung der Kopplungsspezies gezeigt. Der Erwartungswert liegt bei $1,4 \pm 0,1$, was das durchschnittliche DFO/GaletuxiFab-PAS200 Verhältnis wiedergibt.

3.6.3. Funktionelle Charakterisierung der Kopplungsprodukte

Die biochemische Integrität der Kopplungsprodukte wurde durch SDS-PAGE (Abbildung 20 A) und analytischen SEC (Abbildung 20 B) überprüft. Es zeigten sich dabei keine Differenzen zwischen dem Edukt GaletuxiFab-PAS200 und den Produkten Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200 sowie DFO-GaletuxiFab-PAS200. Um die Antikörper-Antigen Interaktion zwischen dem Edukt und den Produkten vergleichen zu können, wurde diese mittels ELISA und SPR untersucht. Die gemessenen Affinitäten im ELISA mit K_D (GaletuxiFab-PAS200) = $2,3 \pm 0,6$ nM zu K_D (Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200) = $1,8 \pm 0,6$ nM und K_D (DFO-GaletuxiFab-PAS200) = $1,9 \pm 0,5$ nM (Abbildung 20 C) zeigten genauso wie die K_D -Werte aus den SPR-Messungen mit K_D (GaletuxiFab-PAS200) = $0,257 \pm 0,01$ nM zu K_D (Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200) = $0,255 \pm 0,01$ nM und K_D (DFO-GaletuxiFab-PAS200) = $0,25 \pm 0,01$ nM (Abbildung 20 D) keine wesentliche Differenz zwischen Edukt und Produkten. Eine signifikante Hemmung der Antigenbindung durch eine Kopplung in der Nähe oder in der Paratop-Epitop-Interaktionstelle konnte somit ausgeschlossen werden.

3.7. Humanisierung der variablen Immunglobulindomänen durch CDR-Grafting von GaletuxiFab mit Hilfe eines automatischen Algorithmus

Ein Ansatz, um die Immunogenität von tierischen Antikörpern weitgehend zu minimieren, ist die Reduktion des Anteils von nicht-humanen Sequenzbereichen durch CDR (complementarity determining regions) Grafting (Jones et al., 1986). Da in der Regel die Antigen-Antikörper Wechselwirkung durch die CDR des Antikörpers vermittelt wird, werden nur diese Bereiche des ursprünglichen Antikörpers verwendet und auf ein strukturell ähnliches humanes Antikörpergerüst transplantiert. Der erste Schritt einer Humanisierungskampagne ist somit die Suche nach einem homologen humanen Antikörpergerüst, gefolgt von der Transplantation der CDR. In Realität stellt sich dieses Verfahren jedoch als meist nicht ausreichend heraus, da weitere Aminosäurereste mit indirektem Kontakt

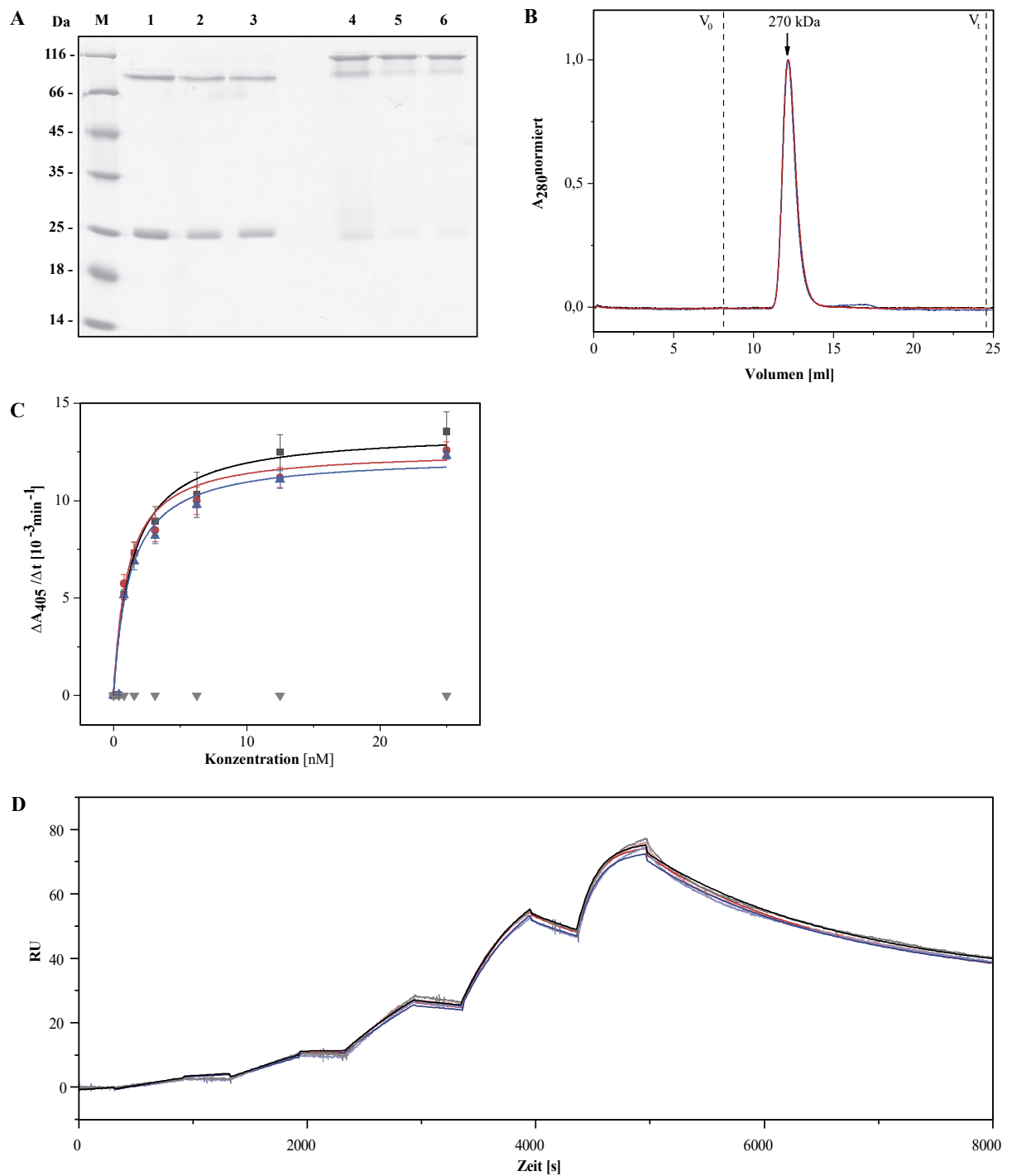


Abbildung 20 Biochemische Charakterisierung der GaltuxiFab-PAS200 Kopplungsprodukte **A)** SDS-PAGE von GaltuxiFab-PAS200. 1. (reduzierend) vor Kopplung, 2. (reduzierend) Cy5.5-GaltuxiFab-PAS200, 3. (reduzierend) DFO-GaltuxiFab-PAS200, 4. (nicht reduzierend) GaltuxiFab-PAS200, 5. (nicht reduzierend) Cy5.5-GaltuxiFab-PAS200, 6. (nicht reduzierend) DFO-GaltuxiFab-PAS200. **B)** Analytische Größenausschlusschromatographie von GaltuxiFab-PAS200 (schwarz), Cy5.5-GaltuxiFab-PAS200 (rot), DFO-GaltuxiFab-PAS200 (blau). **C)** ELISA von GaltuxiFab-PAS200 (schwarz), Cy5.5-GaltuxiFab-PAS200 (rot), DFO-GaltuxiFab-PAS200 (blau) und Ovalbumin (grau). Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. **D)** SPR -Analyse der immobilisierten Fab-Fragmente GaltuxiFab-PAS200 (schwarz), Cy5.5-GaltuxiFab-PAS200 (rot) und DFO-GaltuxiFab-PAS200 (blau) gegen den Analyt hGal3.

zur Antigen-Interaktion, bekannt als Vernier Regionen, große Einflüsse auf den Erhalt der CDR Sekundärstruktur haben können und so die Affinität beeinflussen (Foote and Winter, 1992). Diese relevanten Reste zu identifizieren und *quantum satis* zu mutieren, stellt neben der Auswahl eines geeigneten humanen Ig-Gerüsts die große Herausforderung für eine Antikörperhumanisierung dar.

Der erfolgversprechendste Weg macht sich die 3D-Struktur und Konformation des Antikörpers zunutze. Röntgenkristallographie und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) sind zur Zeit die einzigen Möglichkeiten, um die 3D-Struktur von Proteinen auf atomarer Ebene zugänglich zu machen. Sie sind jedoch technisch, sowie zeitlich sehr aufwendig. Aufgrund der Relevanz antikörperbasierter Therapien ist trotz dieser Hindernisse in den letzten Jahren eine Vielzahl an Antikörperstrukturen in der Protein Datenbank RCSB PDB (Berman et al., 2000) hinterlegt worden. Diese Menge an Daten bietet im Hinblick auf eine *de novo* Antikörper-Strukturvorhersage mittels Homologievergleich der Aminosäuresequenzen ein großes Potential. Aktuelle Antikörperstrukturvorhersageprogramme wie Prediction of Immunoglobulin Structures (PIGS) (Rosi et al., 2008), Web Antibody Modeling (WAM) (Whitelegg and Rees, 2000), Rosetta Antibody Modeling (RAM) (Sircar et al., 2009), sowie kommerziell entwickelte Software wie Accelrys (Discovery Studio), Molecular Operating Environment (MOE), Schrödinger (BioLuminate) haben diese Methode weitgehend automatisiert, sodass eine computergestützte Strukturvorhersage im Prinzip einfach verfügbar ist.

Die Strukturvorhersage von GaletuxiFab wurde ausgehend von der in Kapitel 3.3 ermittelten Aminosäuresequenz mit dem Server PIGS durchgeführt. Hierbei wurde das Fab-Fragment des murinen anti-Kollagen-Typ2 Antikörpers ACC4 mit bekannter Kristallstruktur (PDB ID 2W60) als das Nächsthomologe identifiziert. Ein Alignment der beiden Sequenzen (Abbildung 23) zeigt eine Sequenzidentität der Framework Regionen, also der Reste H1-25, H36-49, H66-94, H103-111, sowie L1-22, L35-49, L57-88, L98-107 (Kabat et al., 1991) von 89 % für die schwere Kette und 86 % für die leichte Kette.

Um ein strukturell möglichst nah verwandtes humanes Gerüst zu finden, wurde basierend auf dem damit generierten Strukturmodell für GaletuxiFab ein Strukturalignment gegen eine Datenbank von Antikörper-Kristallstrukturen durchgeführt. Besonders geeignet für diesen Vergleich war hierbei die AbDB Datenbank (Ferdous and Martin, 2018). Diese aktualisiert automatisch die in der RCSB PDB Datenbank (Berman et al., 2000) verfügbaren Fv (Fragment Variabel) Regionen von Antikörperstrukturen. Im Fall von mehreren Proteinstrukturen in einer PDB-Datei werden diese getrennt, sodass jede Struktur mit einem Antigen assoziiert werden kann, sofern dieses vorhanden ist. Für die vorliegende Arbeit wurde die AbDB Datenbank von Antikörper/Antigen-Komplexen mit Protein-Antigenen vom Juni 2018 mit der Kabat Nummerierung (Kabat et al., 1991) verwendet. Zu diesem Zeitpunkt besaß die Datenbank 866 Einträge, davon 695 als Homo Sapiens gekennzeichnete.

Das Strukturalignment der humanen Fv-Regionen wurde anschließend gegen die mit PIGS modellierte Kristallstruktur von GaletuxiFab durchgeführt. Hierfür wurde das Protein Strukturvergleichs Programm PDBeFold (Krissinel and Henrick, 2004) benutzt. Dieses Programm verwendet ein iteratives dreidimensionales Alignment der α -Atome des Proteinrückgrats, dessen Ergebnis durch den Faktor Q angegeben wird. Dieser Faktor beschreibt die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (M.Q.A.) im Verhältnis zur Anzahl der für das Alignment verwendeten Aminosäurereste (N_{Align}). Durch diese Korrektur der M.Q.A. wird gewährleistet, dass z.B. sehr kurze, aber exakte Strukturüberlagerungen nicht übergewichtet werden. Tabelle 2 zeigt die 20 besten Suchergebnisse, von denen ein Teil allerdings keine originären, sondern humanisierte Antikörper waren (Tabelleneinträge 1, 9, 16, 17, 19) oder deren Quellen keine Auskunft über die Herkunft des Antikörpers gaben (Tabelleneinträge 4, 5, 6, 7,

13). Um zu vermeiden, dass aufgrund dieser Unsicherheiten ein potentiell immunogenes Fab-Fragment erzeugt wird, wurden alle Suchergebnisse, für die nicht explizit ein humaner Ursprung erkennbar war, nicht weiter berücksichtigt. Die dabei erhaltene Auswahl der 10 relevanten Kandidaten ist in Tabelle 2 hervorgehoben.

Eine Betrachtung des Bewertungsfaktors Q zeigt als bestes Ergebnis einen Wert von 0,89 und im ungünstigsten Fall einen Wert von 0,84. Diese enge Verteilung lässt die strukturell nahe Verwandtschaft der humanen Antikörper erkennen, sodass das Strukturalignment und der Q-Faktor als initiale Bewertung von potentiellen Kandidaten zwar hilfreich sein können, jedoch für eine explizite Auswahl von wenigen Kandidaten ungeeignet sind. Speziell im Kontext des CDR-Graftings kann es sein, dass die Position einzelner Reste des humanen Rückgrats mit den neuen CDRs in Konflikt steht, was durch ein globales Strukturalignment nur schlecht vorhersagbar ist. Aus diesem Grund war eine rationale Bewertung der Strukturen für den weiteren Auswahlprozess unumgänglich. Die Überlagerung der Framework Regionen (FR) von den verbliebenen 10 Strukturen mit den FR des Modells von GaletuxiFab ist in Abbildung 21 dargestellt.

Das humane Fab-Fragment 5i1k zeigte bei der Auswertung die geringsten Konflikte zwischen dem humanen FR und den CDR von GaletuxiFab aus der Ratte, sodass es für die Humanisierung ausgewählt wurde. Zusätzlich zu dem Grafting der CDR nach der Definition von Kabat (1991), also der Reste L24-34, L50-56, L89-97, H26-35, H50-65 und H95-102 wurden zwei Reste in der leichten Kette des Fab-Fragments durch die in GaletuxiFab vertretenen Reste in der Sequenz aus der Ratte ausgetauscht. Der Phenylring des Tyrosins an Position L36 in der humanen Sequenz hat im Vergleich zur aliphatischen Seitenkette des Isoleucins in GaletuxiFab eine viel größere Raumanforderung und ragt in Richtung der CDR-H3, was dessen Struktur beeinflussen könnte. Auch der Rest an Position L68 kann durch seine Nähe zur CDR-L1 deren Konformation beeinflussen und wurde von Glycin zu Glutaminsäure entsprechend der Sequenz von GaletuxiFab getauscht.

Tabelle 2 Liste der zu GaletuxiFab modellierten strukturhomologen humanen Fv-Fragmente aus der AbDB Datenbank. Der Faktor Q gewichtet die mittlere quadratische Abweichung M.Q.A. mit der Länge des Alignments, dass durch N_{Align} beschrieben wird. N_{Reste} gibt die Gesamtanzahl an Aminosäuren der jeweiligen Sequenz (V_H und V_L) wieder. Die Sequenzidentität beschreibt die prozentuale Homologie der jeweiligen Aminosäuresequenz zu GaletuxiFab im Bereich der variablen Domänen. Die Herkunft des jeweiligen Antikörpers wurde durch Literaturrecherche der jeweiligen Originalliteratur ermittelt.

#	Q	M.Q.A.	N_{Align}	N_{Reste}	Sequenzidentität [%]	Herkunft	PDB ID
1	0,89	0,92	230	232	57	Humanisiert	1AD9
2	0,87	0,98	225	232	59	Human	5I1K
3	0,87	1,04	227	232	57	Human	4KMT
4	0,86	1,11	227	232	56	Nicht veröffentlicht	3NAB
5	0,86	1,17	227	232	56	Nicht veröffentlicht	3NAC
6	0,86	1,23	227	232	57	Nicht veröffentlicht	3NAA
7	0,86	1,29	227	232	57	Nicht veröffentlicht	3NCJ
8	0,85	1,35	221	232	58	Human	4JPI
9	0,85	1,41	224	232	54	Humanisiert	1T3F
10	0,85	1,47	225	232	58	Human	5I1J
11	0,85	1,53	220	232	49	Human	5CD3
12	0,85	1,59	226	232	58	Human	5I16
13	0,85	1,65	227	232	56	Nicht veröffentlicht	3NA9
14	0,84	1,72	227	232	57	Human	5IBT
15	0,84	1,78	223	232	61	Human	5IFA
16	0,84	1,84	225	232	64	Humanisiert	1WT5
17	0,84	1,90	224	232	56	Humanisiert	3DGG
18	0,84	1,96	226	232	54	Human	2VXV
19	0,84	2,02	230	232	58	Humanisiert	4NM4
20	0,84	2,08	224	232	60	Human	5I1L

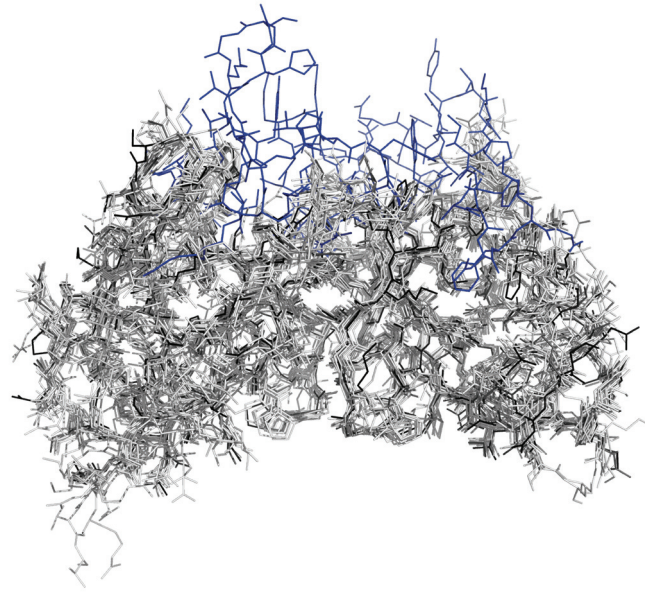


Abbildung 21 Cα-Alignment aus Pymol der Framework-Regionen (Reste L1-23, L35-49, L57-88, L98-107, H1-25, H36-49, H66-94, H103-111 (Kabat et al., 1991)) der modellierten Struktur von GaletuxiFab (schwarz) und den 10 nächst homologen humanen Fv - Fragmenten (grau). Die Position der CDR von GaletuxiFab sind in blau gezeichnet.

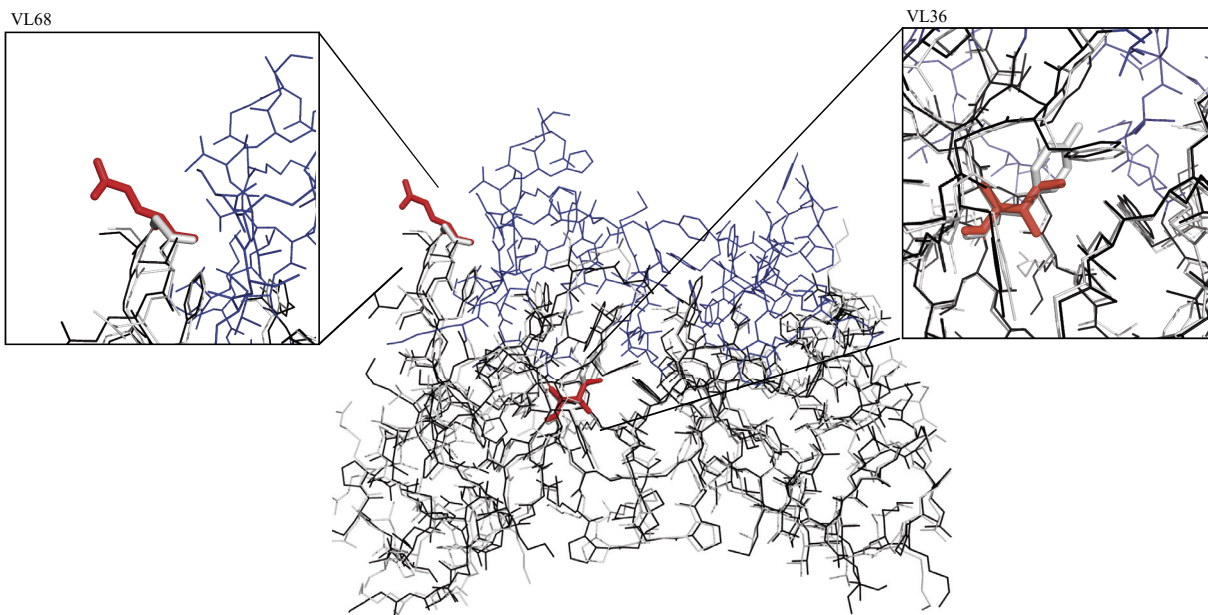


Abbildung 22 Cα-Alignment der Framework-Regionen der modellierten Struktur von GaletuxiFab (schwarz) mit dem humanen Fab-Fragment 5i1k, das für die Humanisierung ausgewählt wurde (grau). Die CDR von GaletuxiFab sind in blau gezeichnet. Die vergrößerten Bereiche zeigen die beiden im Text beschriebenen Positionen, an denen die Aminosäure von GaletuxiFab (rot) in das Framework der humanisierten Varianten übernommen wurde, um strukturelle Konflikte mit den neu integrierten CDR zu vermeiden.

VH	1	10	20	30	40	50	52A	60				
GaletuxiFab	QIQLVQSGP	ELKPKGESVK	ISCKASGY	TFDYAIHW	VVKQAPG	KGLKWMG	WINTYTGK	PIYADDFKGRFV				
2W60T.....S.....E..E..T..T.....A				
5IKL	EV.....	A.V.....	L.....G.....	S..S..W..G..	R..M.....	E.....	I..YPGDS	DTR..SPS..Q..QVT				
5IKL-CDR	EV.....	A.V.....	L.....G.....	R..M.....	E.....QVT				
				CDRH1			CDRH2					
	70	80	82A-C	90	100	110						
GaletuxiFab	FSLEASASTAN	LQISNLK	NEDTATYL	CAR-GTMMAS	LDYWGQ	GVMVTV						
2W60S.....	F...N.....F....	A..TATE..A..	TL...						
5IKL	I..ADK..I..	Y..W..S..	AS...M..Y...	YDGIYGE..	F.....	TL...						
5IKL-CDR	..ADK..I..	Y..W..S..	AS...M..Y...	TL...						
				CDRH3								
VL	1	10	20	27A-E	30	40	50	60				
GaletuxiFab	DVVM	TQTPV	SLSLAIG	QPA	SISCKSSQ	SLVHSDG	KTYLSW	LQRP	QSPKGLIYL	LVSKLDS	GVPDR	FSG
2W60	LT..VT.....	LD.....	N..L.....	R.....	T.
5I1K	EI..L..S..	GT...SP..	ER..TL..	RA...-..	---SSS..	A..YQ..K..	A..RL..	GA..SRAT..	I.....			
5I1K-CDR	EI..L..S..	GT...SP..	ER..TL..	Q..K..	A..RL..	I.....		
				CDRL1			CDRL2					
	70	80	90	100								
GaletuxiFab	SGS	E	TEFTLKISR	VEAEDL	GVYYC	WQATHF	PLTFG	SGTKLEIK				
2W60	G..D.....	G.....	A.....	L..				
5I1K	G..D.....	T...L..P..	FA.....	Q..YGSS...	Q...V...					
5I1K-CDR	D...T...L..P..	FA.....	Q...V...						
				CDRL3								

Abbildung 23 Alignment der Aminosäuresequenzen von GaletuxiFab, dem murinen Fab-Fragment 2W60, dessen Struktur die Basis für die computergestützte Strukturvorhersage war, dem Datensatz 5IKL, das zur modellierten Struktur homologste humane Fv-Fragment und 5IKL-CDR, dem humanen Gerüst von 5IKL mit den transplantierten CDR von GaletuxiFab sowie den eingeführten Rückmutationen, annotiert nach Kabat (Kabat et al., 1991). In blau sind die CDR hervorgehoben, in rot die Positionen, an denen Aminosäuren von GaletuxiFab in das Framework der humanisierten Variante übernommen wurden.

3.7.1. Klonierung und Produktion funktioneller humanisierter Fab-Fragmente in *E. coli* und deren funktionelle Analyse

Für die Produktion des humanisierten Fab-Fragments in *E. coli* mit dem schon zuvor verwendeten Expressionsvektor pASK111 wurden die in Abbildung 24 gezeigten Sequenzen der variablen Domänen von 5IKL-CDR mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen geplant. Für die variable Domäne V_H wurden hierbei die Restriktionsschnittstellen XbaI/Eco91I und für die variable Domäne V_L die Restriktionsschnittstellen NcoI/XhoI verwendet. Die Sequenzen wurden als Gensynthese mit einer für die Expression in *E. coli* optimierten Codonverwendung bezogen (Benson et al., 2013). Stromaufwärts der Zielsequenz befand sich auf dem synthetischen Genfragment eine Bindestelle für den D20 Primer, sowie stromabwärts eine Bindestelle für den PR1 Primer, die zur standardmäßigen Erstamplifizierung des synthetischen Genfragments dienten. Dieses wie auch der Expressionsvektor pASK111-GaletuxiFab, wurden mit den Restriktionsenzymen XbaI und Eco91I sowie NcoI und XhoI verdaut. Danach wurden die Fragmente isoliert und in einer 4-Fragmentligierung die variablen Domänen aus der Gensynthese in den Vektor inseriert.

Die bakterielle Produktion des humanisierten Fab-Fragments erfolgte im 12l-Maßstab im *E. coli* Stamm W3110 bei 25°C wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Die Genexpression der Konstrukte wurde mit aTc (200 µg/l) bei $OD_{600} = 5$ und in Anlehnung an das Expressionsprotokoll von GaletuxiFab für 2,5h induziert.

```

      1      10      20      30      40      50      60
      XbaI
(D20) CCACTCCCTATCAGTGAT >
5I1K-Syn CCACTCCCTATCAGTGATCTAGATAACGAGGGCAAAAATGAAAAGACAGCTATCGCGATTGCAGTG

      70      80      90      100      110      120      130
5I1K-Syn GCACTGGCTGGTTTCGCTACCGTAGCGCAGGCCGAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAA

      140      150      160      170      180      190      200
5I1K-Syn AAACCGGGCGAAAGCCTGAAAATTGAAGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC
      GluValGlnLeuValGlnSerGlyAlaGluValLysLysProGly

      210      220      230      240      250      260      270
5I1K-Syn GAAAGCCTGAAAATTAGCTGCAAAGGCAGCGGCTATACCTTTACCGATTATGCGATTTCATTGGGTGCGC
      GluSerLeuLysIleSerCysLysGlySerGlyTyrThrPheThrAspTyrAlaIleHisTrpValArg
      CDRH1

      280      290      300      310      320      330      340
5I1K-Syn CAGATGCCGGGCAAAGCCTGGAATGGATGGGCTGGATTAACACCTATACCGGCAAACCGATTATGCGC
      GlnMetProGlyLysGlyLeuGluTrpMetGlyTrpIleAsnThrTyrThrGlyLysProIleTyrAla
      CDRH2

      350      360      370      380      390      400      410
5I1K-Syn GATGATTTTTAAAGGCCAGGTGACCTTTAGCGCGGATAAAAGCATTAGCACCGCGTATCTGCAGTGGAGC
      AspAspPheLysGlyGlnValThrPheSerAlaAspLysSerIleSerThrAlaTyrLeuGlnTrpSer

      420      430      440      450      460      470      480
5I1K-Syn AGCCTGAAAGCGAGCGATACCGCGATGTATTATTGCGCGCGGCACCATGATGGCGAGCCTGGATTAT
      SerLeuLysAlaSerAspThrAlaMetTyrTyrCysAlaArgGlyThrMetMetAlaSerLeuAspTyr
      CDRH3

      490      500      510      520      530      540      550
      Eco91I      NcoI
5I1K-Syn TGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCCTCCTCAGCCATGGAGAAAATAAAGTGAACAAAGCACTATTG
      TrpGlyGlnGlyThrLeuValThrVal

      560      570      580      590      600      610
5I1K-Syn CACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCCGAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGG
      GluIleValLeuThrGlnSerProG

      620      630      640      650      660      670      680
5I1K-Syn GCACCCTGAGCCTGAGCCCGGGCGAACCGCGGACCCTGAGCTGCAAAAGCAGCCAGAGCCTGGTGCATA
      lyThrLeuSerLeuSerProGlyGluArgAlaThrLeuSerCysLysSerSerGlnSerLeuValHisS
      CDRL1

      690      700      710      720      730      740      750
5I1K-Syn GCGATGGCAAACCTATCTGAGCTGGATTGAGCAGAAAACCGGGCCAGGCGCCGCGCCTGCTGATTTATC
      erAspGlyLysThrTyrLeuSerTrpIleGlnGlnLysProGlyGlnAlaProArgLeuLeuIleTyrL

      760      770      780      790      800      810      820
5I1K-Syn TGGTGAGCAAACCTGGATAGCGGCATTCCGGATCGCTTTAGCGGCAGCGGAGCGAAACCGATTTTACCC
      euValSerLysLeuAspSerGlyIleProAspArgPheSerGlySerGlySerGluThrAspPheThrL
      CDRL2

      830      840      850      860      870      880      890
5I1K-Syn TGACCATTAGCCGCTGGAACCGGAAGATTTTGGCGTGTATTATTGCTGGCAGGCGACCCATTTTCCGC
      euThrIleSerArgLeuGluProGluAspPheAlaValTyrTyrCysTrpGlnAlaThrHisPheProL
      CDRL3

      900      910      920      930      940
      XhoI
5I1K-Syn TGACCTTTGGCCAGCTCGAGAAAGTGGAAATTAACGTTTACCGCTACTGCG
      < GCAAATGGCGATGACG (PR1)
      euThrPheGlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArgLeuProLeuLeu

```

Abbildung 24 Nucleotidsequenz des synthetischen Gen-Strings der humanisierten IgV-Domänen mit den FR-Regionen des humanen Fab-Fragments 5IK1 und den CDR (blau) von GaletuxiFab. Es wurde eine für *E. coli* optimierte Codonnutzung verwendet. Die zur Klonierung auf pASK111 verwendeten Restriktionsschnittstellen sind rot markiert.

Nach Abkühlen der Suspension wurden die Bakterien mittels Zentrifugation geerntet und anschließend jeweils die periplasmatische Proteinfraction präpariert. Die Isolierung der humanisierten Variante aus der periplasmatischen Proteinfraction erfolgte mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gefolgt von einer Größenausschlusschromatographie. Wie das reduzierende SDS-PAGE zeigt (Abbildung 25 A), wies das Fab-Fragment zwei charakteristische Banden mit ca. 25 kDa auf, die im nicht reduzierenden SDS-PAGE als eine Bande mit ca. 50 kDa eluieren.

Aufgrund der äußerst niedrigen Ausbeute von 20 µg aus 12 l Kulturmedium war eine Ermittlung der Masse nicht möglich. Das Bindungsverhalten der Varianten gegen das Antigen hGal3 wurde in direktem Vergleich zu GaletuxiFab mit Hilfe des beschriebenen ELISA (Abschn. 2.5.1) untersucht. Für GaletuxiFab wurde in diesem ELISA $K_D = 1,2 \pm 0,1$ nM ermittelt (Abbildung 25 B). Im Vergleich hierzu zeigte das humanisierte Konstrukt eine Affinität von $K_D = 1300 \pm 100$ nM, was einem Affinitätsverlust um den Faktor 1000 entspricht (Abbildung 25 C). Dieser große Verlust deutet auf ein grundlegendes Problem bei der Auswahl des humanen Gerüsts hin und lässt eine falsch modellierte 3D-Struktur von GaletuxiFab vermuten. Aus diesem Grund wurde von einer weiteren Humanisierung basierend auf dem PIGS-Strukturmodell von GaletuxiFab abgesehen und eine röntgenkristallographische Strukturbestimmung durchgeführt.

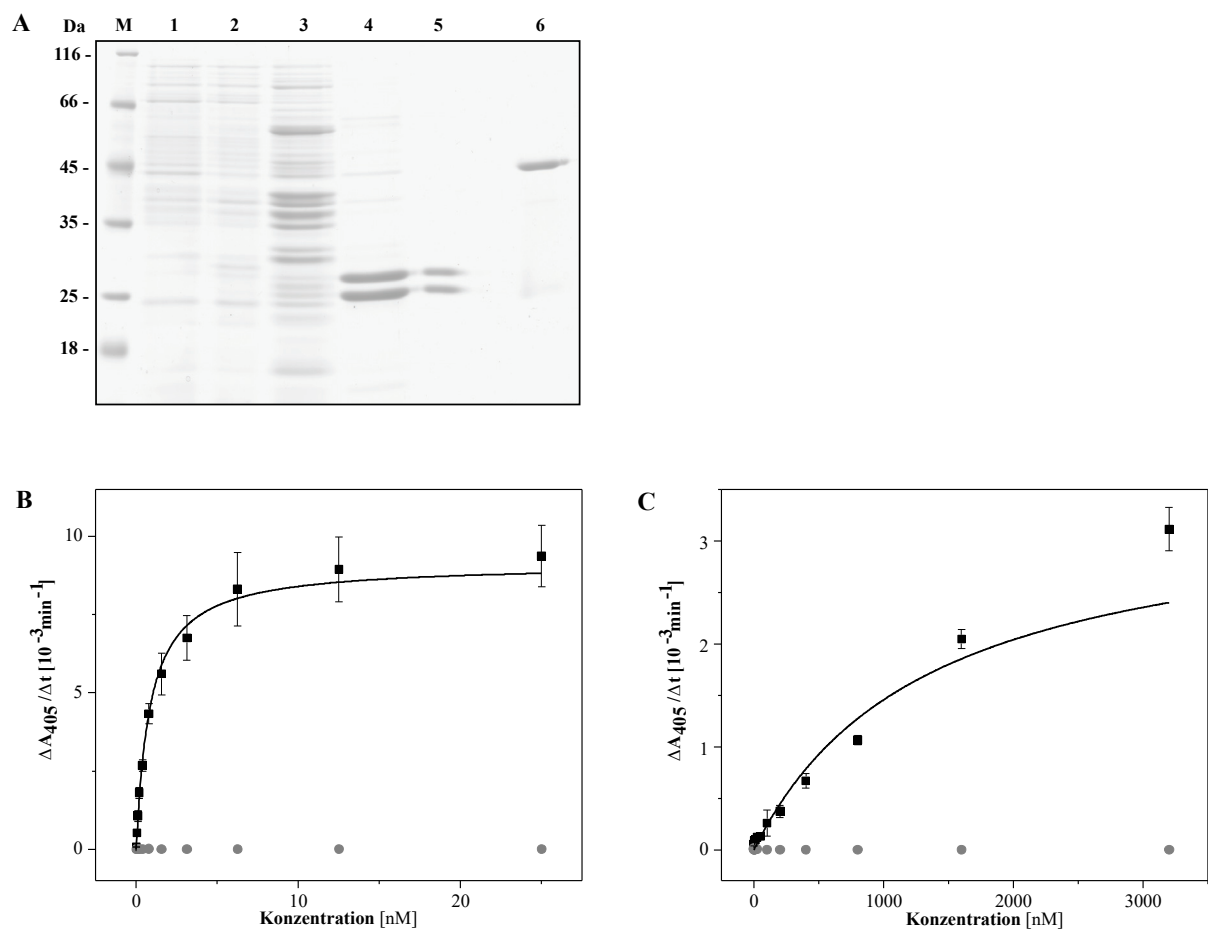


Abbildung 25 Biochemische Charakterisierung der humanisierten Variante des hGal3-Fab 511K-CDR. **A)** SDS-PAGE (reduzierend) zur Analyse der bakteriellen Produktion. 1. vor Induktion, 2. zum Zeitpunkt der Ernte, 3. periplasmatische Fraktion, 4. Protein nach IMAC-Reinigung, 5. nach Größenausschlusschromatographie, 6. (nicht reduzierend) wie 5. **B)** ELISA von GaletuxiFab. **C)** ELISA der humanisierten Variante des hGal3-Fab 511K-CDR.

3.8. Ermittlung des durch GaletuxiFab erkannten Epitops in hGal 3

Wie in Kapitel 3.1 näher beschrieben, besteht das Antigen Gal3 aus der Kohlenhydratbindedomäne, die über einen strukturell ungeordneten Linker mit der aminoterminalen Oligomerisierungsdomäne verbunden ist. Der Versuch, das komplette Gal3 mit GaletuxiFab als Komplex zu kristallisieren, zeigte vermutlich aufgrund des flexiblen Linkers keinen Erfolg. Als Alternative wurde die Möglichkeit einer Co-Kristallisation von GaletuxiFab mit der verkürzten Antigenvariante hGal3-P113 in Betracht gezogen. Dies erscheint jedoch nur sinnvoll, wenn sich das Epitop in der globulären CRD-Domäne von Gal3 befindet. Zur Überprüfung wurde ein Western-Blot mit den Gal3-Varianten hGal3 und hGal3-P113 nach Abschnitt 2.5.2 durchgeführt (Abbildung 26).

Der Nachweis mit Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200 ergab, dass nur die Vollängenvariante von Gal3 erkannt wird. Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich das Epitop auf den Bereich der Aminosäure 1 – 112 eingrenzen. Deshalb wurde von einer Co-Kristallisation mit der verkürzten Variante hGal3-P113 abgesehen.

Bei einem Western-Blot liegt das nachgewiesene Protein in denaturierter Form vor, sodass mit dieser Methode nur kontinuierliche (sequentielle) Epitope nachgewiesen werden. Diese offensichtliche Eigenschaft des hGal3-Epitops ermöglichte eine weitere Untersuchung anhand eines Peptid-Arrays von Gal3, das im SPOT-Verfahren auf einer Zellulosemembran synthetisiert wurde (Frank, 2002). Die synthetisierten, kurzen Polypeptidfragmente können anschließend immunchemisch nachgewiesen werden und so lässt sich die Interaktion des Bindeproteins auf einen Sequenzabschnitt des Zielproteins eingrenzen. Durch die hohe lokale Konzentration der Peptide innerhalb eines Spots ist dies eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung von linearen, also diskontinuierlichen Epitopen. Anhand des Western-Blot konnte das Epitop auf den Bereich der Aminosäuren 1-113 eingegrenzt werden. Dementsprechend wurde ein Peptid-Array dieses Bereichs synthetisiert.

Eine Metaanalyse über die durchschnittliche Epitoplänge von Antikörpern zeigte, dass diese bei 18 Aminosäuren liegt (Stave and Lindpaintner, 2013). In diesem Bereich liegt auch die Maximallänge der Peptide, die mit dem SPOT-Verfahren fehlerfrei synthetisiert werden können (Frank and Döring, 1988). Basierend auf diesen Informationen wurden Peptide mit einer Länge von 18, 12 und 8 Aminosäuren synthetisiert. Durch die Verschiebung des Synthesestartpunktes um je zwei Aminosäuren zwischen zwei aufeinander folgenden Peptiden lässt sich das Minimalepitop bis auf theoretische 6 Aminosäuren eingrenzen.

Die densitometrisch ausgewerteten Bindungssignale des fluoreszenzmarkierten Cy5.5-GaletuxiFab-PAS200 an die 8-mer Peptide sind in Abbildung 26 C gezeigt. Hierbei treten deutlich zwei Bereiche hervor, die dieselbe Sequenzabfolge enthalten: APPGAY. Auffällig ist die viel höhere Intensität des längeren Peptids: QAPPGAYP, dass aufgrund der Sequenzverschiebung bei der Peptidsynthese um je zwei Aminosäuren nur einmal vorkommt. Diese ausgeprägte Intensitätserhöhung zeigt die Relevanz der beiden flankierenden Aminosäuren, die einen wichtigen Teil zu der Wechselwirkung beizutragen scheinen. Ausgehend von dieser Beobachtung lässt sich also schließen, dass es sich bei dem Gal3-Epitop um die Sequenz QAPPGAYP handelt. Das Bindungsmuster der 8-mer Peptide zeigte sich mit vergleichbarer Absorptionsintensität ebenso für die entsprechenden 12- und die 18-mer Peptide (ohne Abbildung).

Ein Alignment des Sequenzbereichs von Aminosäure 1 - 113 des hGal3 mit dem homologen murinen Gal3 (mGal3) ergab, dass das von GaletuxiFab erkannte Epitop zwischen beiden Sequenzen konserviert ist. Insbesondere für die *in vivo* Experimente in Mäusen stellt dies eine wichtige Information dar, da so eine Kreuzreaktivität des Fab-Fragments mit dem in diesem Tiermodell natürlich vorkommenden Gal3 bestehen kann.

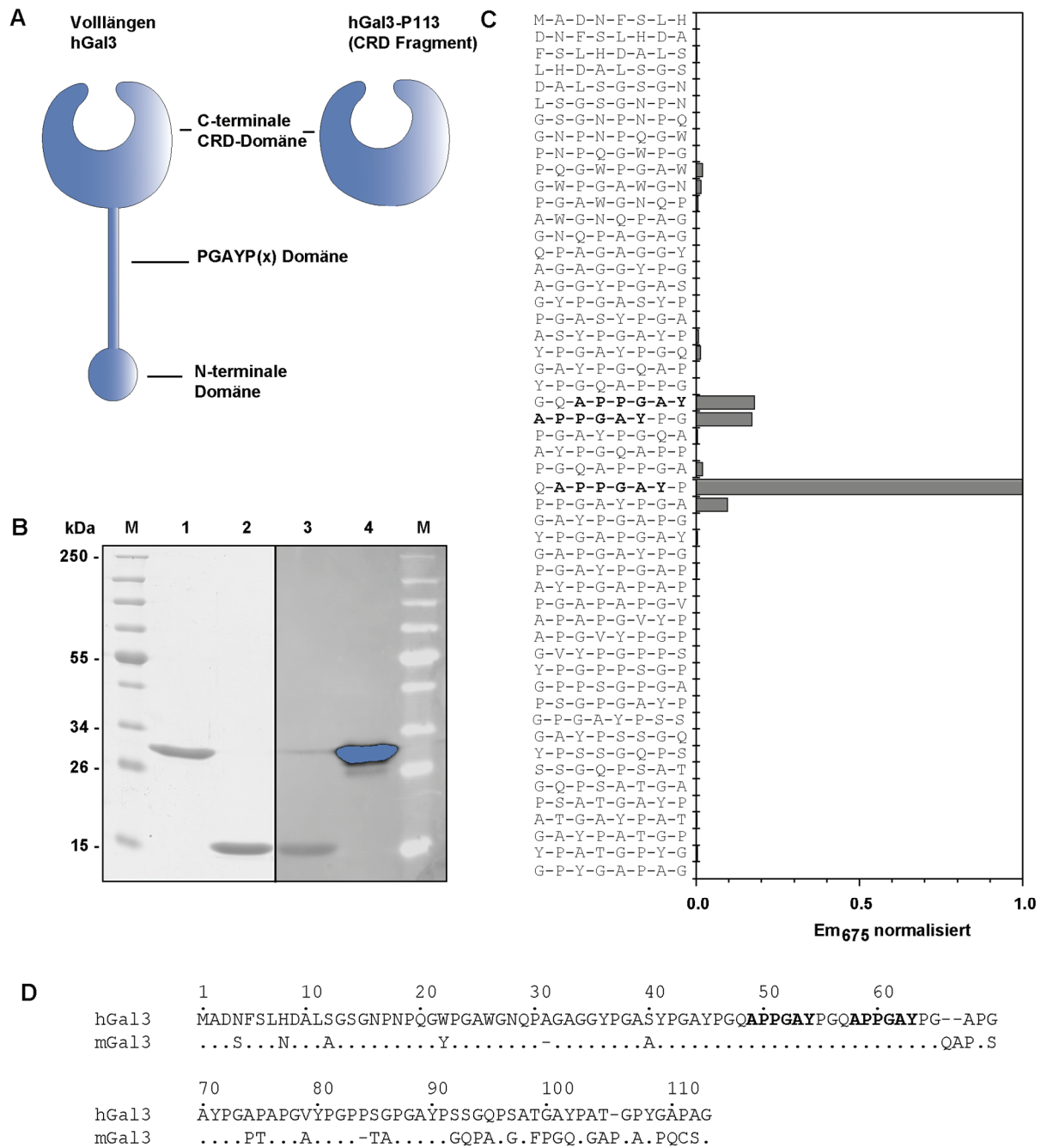


Abbildung 26 Erläuterung des hGal3 Epitops **A**) Schematische Darstellung des Volllängen hGal3 (27 kDa) und der verkürzten CRD hGal3-P113 (Reste 113-252; 14 kDa) **B**) Western-Blot Analyse der auf die Membran übertragenen Galectin 3 Konstrukte hGal3 und hGal3-P113 mit Cy5.5-GalectuxiFab-PAS200, Links: SDS-PAGE von hGal3 (Bande 1) und hGal3-P113 (Bande 2), Rechts: Western-Blot von hGal3-P113 (Bande 3) und hGal3 (Bande 4). Epitopkartierung von GalectuxiFab. **C**) Die in **D** gezeigte N-terminale Sequenz von Gal3, Aminosäuren 1 – 113, wurde in Form von 8-mer Peptiden mit einem Versatz von jeweils zwei Aminosäuren auf Membranen synthetisiert (SPOT-Synthese). Der Nachweis einer Bindung erfolgte mit dem Cy5.5-GalectuxiFab-PAS200 Konjugat anhand der Fluoreszenzemission bei 675 nm (normiert auf 1) **D**) Alignment der N-terminalen Sequenz, Aminosäure 1 – 113, des humanen Galectin 3 (UniProt: P17931) mit dem murinen Homologen (UniProt P16110). Die Sequenznummerierung ist die des humanen Proteins. Das Minimalepitop APPGAY ist fett markiert.

Tabelle 3 Kristallographische Analyse und Verfeinerungsstatistik

Kristalldaten:	
Raumgruppe	C2
Dimensionen Elementarzelle	
a, b, c [Å]	94,1; 61,3; 80,9
α, β, γ [°]	90,0; 103,4; 90,0
Moleküle pro asymmetrischer Einheit	1
Datenaufnahme:	
Wellenlänge [Å]	0,91840
Auflösungsbereich [Å] ^a	78,72 – 1,90 (2,00 – 1,90)
I/σ[I] ^a	5,7 (1,8)
R [%] ^{a, b}	8,8 (41,1)
Reflexionen	34354
Multiplizität ^a	5,7 (5,9)
Vollständigkeit ^a	97,0 (97,9)
Verfeinerung:	
R _{cryst} / R _{free} ^c	20,3/24,3
Proteinatome	3367
Lösungsmittelatome	64
Mittlerer B-Faktor [Å ²]	
Protein	27,3
Peptid	35,9
Wasser	32,2
Geometrie:	
R.m.s.d. bond lengths, angles [Å, °]	0.007, 1,519
Ramachandran Analyse ^d :	98,0; 9,9; 0,8; 0,3
core, allowed, generously allowed, disallowed [%]	

a Werte in runden Klammern zeigen die höchste Auflösungsschale.

$$B \quad R_{\text{merge}} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h)} \quad R_{\text{cryst}} = \frac{\sum_h \|F_o(h) - |F_d(h)|\|}{\sum_h |F_o(h)|}$$

c R_{free} ist R_{cryst} abzüglich 5 % der Reflexe die zufällig ausgewählt und von der Verfeinerung ausgeschlossen wurde (Brünger, 1997).

D berechnet mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993)

Tabelle 4 Reste von GaletuxiFab, die van der Waals Kontakte zu dem Peptid haben.

Rest	Begrabene Oberfläche [Å ²]	Rest	Begrabene Oberfläche [Å ²]	Rest	Begrabene Oberfläche [Å ²]
Thr(H30)	3,81	Tyr(H53)	4,69	Tyr(L32)	26,41
Asp(H31)	13,36	Ile(H58)	49,48	Trp(L89)	2,50
Tyr(L32)	2,74	Tyr(H59)	2,19	Ala(L91)	26,30
Ala(H33)	20,07	Lys(H64)	3,68	Thr(L92)	9,73
His(H35)	18,66	Thr(H96)	17,29	His(L93)	2,38
Trp(H47)	19,60	Met(H97)	59,49	Phe(L94)	86,08
Trp(H50)	60,78	Ala(H99)	21,03	Leu(L196)	30,53
Asn(H52)	19,65	His(L27D)	21,65		
Thr(H52A)	2,85	Asp(L28)	5,89		

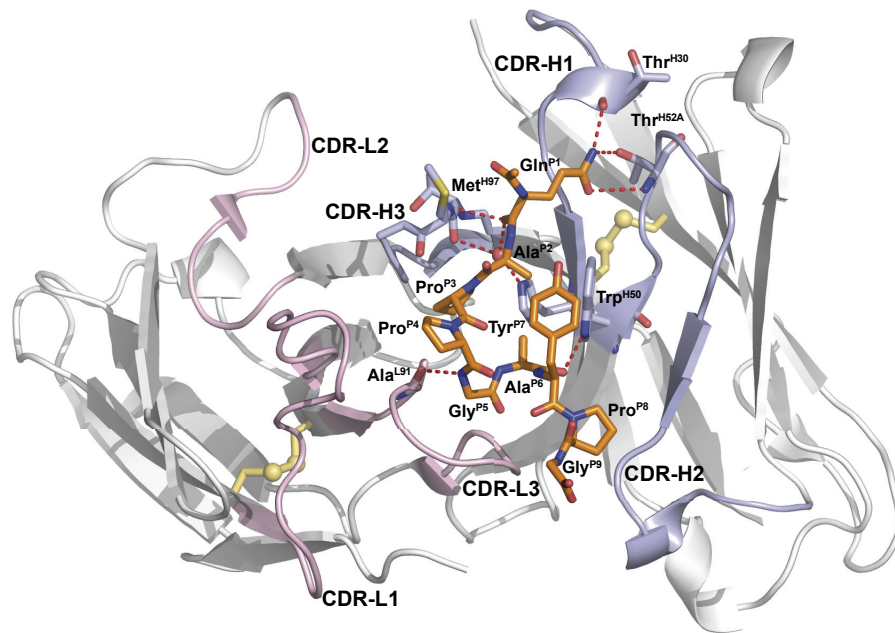


Abbildung 28 Struktur von GaletuxiFab im Komplex mit dem Gal3-Epitop. Die konstanten Domänen sind hellgrau, die variablen Domänen sind in pink (VL) und blau (VH) gezeigt. Das Peptid ist orange dargestellt und van der Waals Kontakte sind rot gestrichelt hervorgehoben. In gelb sind die Disulfidbindungen des Fab-Fragments markiert.

3.10. Humanisierung der variablen Immunglobulindomänen der Ratte durch CDR Grafting von GaletuxiFab mit Hilfe von rationalem Protein-Design

Der Erfolg einer Antikörper-Humanisierung hängt zum größten Teil von der Auswahl eines strukturell homologen Immunglobulingerüsts ab. Zwar lassen sich die strukturellen Eigenschaften der CDR und damit die Affinität durch die Einführung von Rückmutationen optimieren, doch nur in einem begrenzten Maß (Kim and Hong, 2012). Außerdem steht die Einführung von Rückmutationen zur Sequenz des monoklonalen Antikörpers aus einem Nagetier oder gar zusätzlichen Mutationen konträr zum Ziel des Projektes: einem möglichst dem natürlichen menschlichen Repertoire entsprechenden Antikörper. Durch die Nutzung der Kristallstruktur von GaletuxiFab konnte gewährleistet werden, dass die Suche nach homologen humanen Gerüsten nicht durch ein artefaktbehaftetes Strukturmodell beeinflusst wird. So zeigt auch das Struktur-Alignment der Kristallstruktur gegen die humanen Einträge der AbDB (Ferdous and Martin, 2018) im Vergleich zum Alignment mit der modellierten Struktur (Tab. 2) ein ganz anderes Resultat (Tab. 5) und bestätigt damit auch einen Unterschied zwischen der theoretischen und der experimentellen Struktur.

Die Literaturrecherche über die Herkunft der 20 besten Suchergebnisse in dem Alignment ergab, dass auch in diesem Fall ein Teil der Einträge ihrerseits humanisierte Antikörper waren (Tabelleneinträge 1, 7, 12, 18) oder die Herkunft nicht dokumentiert war (Tabelleneinträge 5, 8, 10). Nach Abzug von einem redundanten Ergebnis (Tabelleneintrag 14 redundant zu 11) wurde die Auswahl auf 12 relevante Kandidaten reduziert (in Tabelle 2 fett hervorgehoben). Durch die Überlagerung und den Vergleich der verbliebenen Strukturen mit der von GaletuxiFab (Abbildung 29) konnte letztendlich eine Auswahl an Kandidaten getroffen werden, die nur geringe Konflikte zwischen den humanen FR und den CDR von GaletuxiFab aufwiesen.

Tabelle 5. Liste der zur Kristallstruktur von GaletuxiFab homologen humanen Fv-Fragmente aus der AbDB. Der Faktor Q gewichtet die mittlere quadratische Abweichung M.Q.A. mit der Länge des Alignments, das durch N_{Align} beschrieben wird. N_{Reste} gibt die Gesamtanzahl an Aminosäuren der jeweiligen Sequenz in der Datenbank wieder. Die Sequenzidentität beschreibt die prozentuale Homologie der jeweiligen Aminosäuresequenz zu GaletuxiFab. Die Herkunft des jeweiligen Antikörpers wurde durch Literaturrecherche PDB ID ermittelt.

#	Q	M.Q.A.	N_{Align}	N_{Reste}	Sequenzidentität [%]	Herkunft	PDB ID
1	0.85	0.89	220	229	53	Humanisiert	1L7I
2	0.85	1.00	222	230	54	Human	5ILC
3	0.84	1.01	222	232	50	Human	5I8C
4	0.84	0.99	218	225	54	Human	4KQ3
5	0.83	1.07	222	231	57	Nicht veröffentlicht	3NCJ
6	0.83	1.03	220	229	54	Human	3KYM
7	0.83	1.07	218	223	52	Humanisiert	5TDO
8	0.83	1.08	222	231	57	Nicht veröffentlicht	3NAA
9	0.83	1.03	220	229	57	Human	5V7R
10	0.82	1.10	222	231	56	Nicht veröffentlicht	3NAB
11	0.82	1.09	222	232	54	Human	4NRY
12	0.82	1.17	221	226	53	Humanisiert	1T3F
13	0.82	1.07	223	235	60	Human	5ILL
14	0.82	1.13	223	232	54	Human	4NRY
15	0.82	1.07	217	223	51	Human	5TDN
16	0.82	1.18	222	228	57	Human	5IL6
17	0.82	1.07	222	234	56	Human	5IT2
18	0.82	1.12	221	230	50	Humanisiert	1AD0
19	0.82	1.15	221	229	53	Human	4LLU
20	0.81	1.22	221	226	48	Human	2JIX

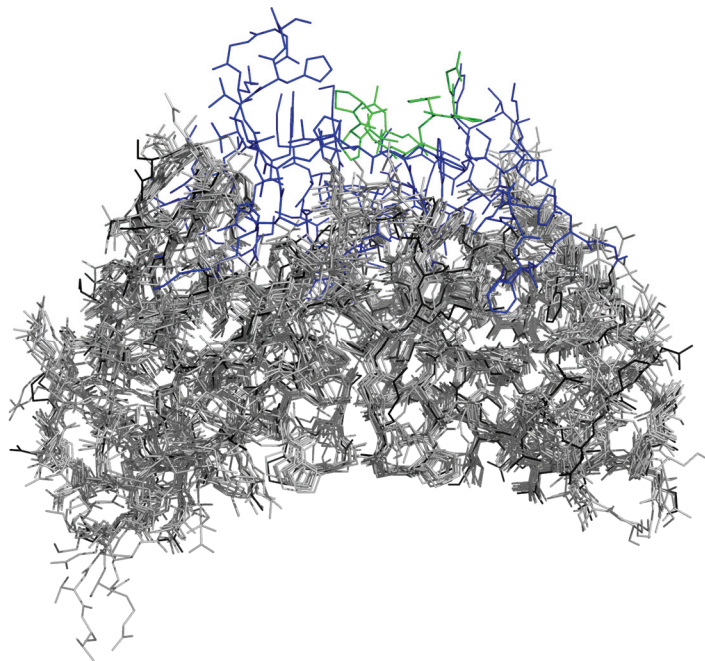


Abbildung 29 α -Alignment der Framework-Regionen (Reste L1-23, L35-49, L57-88, L98-107, H1-25, H36-49, H66-94, H103-111; Kabat et al., 1991) von GaletuxiFab (schwarz) und den 12 nächst homologen humanen Fv-Fragmenten (grau) aus Tab. 5 erzeugt mit Pymol. Die Positionen der CDR von GaletuxiFab sind in blau gezeigt, das Epitop-Peptid QAPPGAYPG in grün.

Die vier Kandidaten 3KYM, 4KQ3, 4NRY und 5I8C zeigten im Vergleich zu den restlichen Strukturen die geringsten Konflikte zwischen den einzuführenden CDR und der Gerüststruktur, weshalb sie für das Grafting der CDR nach Definition von Kabat (Kabat et al., 1991), also der Reste L24-34, L50-56, L89-97, H26-35, H50-65 und H95-102 (siehe Abbildung 31), ausgewählt wurden. Strukturelle Konflikte zwischen den transplantierten CDR und den FR gab es bei diesen 4 Gerüsten an 5 Positionen, 2 in der schweren und 3 in der leichten Kette (Abbildung 30).

In der schweren Kette ist an Position H71 in den Fab-Fragmenten 3KYM und 5I8C ein Arginin zu finden, die Fragmente 4NRY und 4KQ3 besitzen an dieser Stelle ein Alanin. In GaletuxiFab ist hingegen ein Leucin vertreten. Die Aminosäure an dieser Position liegt direkt unterhalb der CDR-H2 und spielt eine Rolle für dessen kanonische Struktur (Chothia and Lesk, 1987). Besonders Arginin mit seiner positiv geladenen Guanidiumgruppe, das sehr nah am Threonin H52A der CDR-H2 liegt, kann dessen Konformation beeinflussen. Weiterhin findet man an Position H78 in dem Fragment 3KYM ein Leucin, aber in allen anderen Fragmenten inklusive GaletuxiFab ein Alanin. Durch die längere hydrophobe Seitenkette des Leucins im Vergleich zum Alanin kann diese die Position des Isoleucin H34 in der CDR-H1 beeinflussen. In der leichten Kette an Position L36 hat das Tyrosin in den humanen Antikörperfragmenten im Vergleich zu Isoleucin in GaletuxiFab einen viel größeren Raumbedarf.

Im Gegensatz zur aliphatischen Seitenkette des Isoleucins ragt das Tyrosin mit seinem Phenylring in Richtung der CDR-H3. Auch das Leucin an Position L46 der humanen Antikörper hat im Vergleich zum Glycin in GaletuxiFab durch seine aliphatische Seitenkette einen größeren Raumbedarf und kann durch seine Position zwischen L54 der CDR-L2 und H100 der CDR-H3 beide beeinflussen. An Position L68 ist in den humanen Antikörperfragmenten ein Glycin zu finden, wohingegen in GaletuxiFab eine Glutaminsäure an dieser Position steht. Durch die Nähe des Serin an Position L27A zur CDR-L1 kann auch hier ein wesentlicher Einfluss auf die Konformation der CDR stattfinden. An allen fünf Positionen wurde deshalb die in GaletuxiFab vertretene Aminosäure des Antikörpers aus der Ratte in die FR der 4 humanen Immunglobulingerüste übernommen.

Wie in Abschnitt 3.4.3 gezeigt, sind die N-terminalen Reste von GaletuxiFab durch ihre Nähe zu den CDR offenbar an der Antigenbindung beteiligt. Aus diesem Grund wurden bei der Planung des humanisierten Fab-Fragments die ersten 3 Reste des N-terminus von GaletuxiFab übernommen und die FR der humanen Gerüste entsprechend angepasst (Abb 32). Für die leichte Kette wurden hierfür jeweils die Reste L2 und L3 durch Valin getauscht. Der N-terminus der schweren Kette unterschied sich an den Positionen H1-3, sodass Glutamin an den Positionen H1 und H3, sowie Isoleucin an Position H2 von GaletuxiFab übernommen wurden.

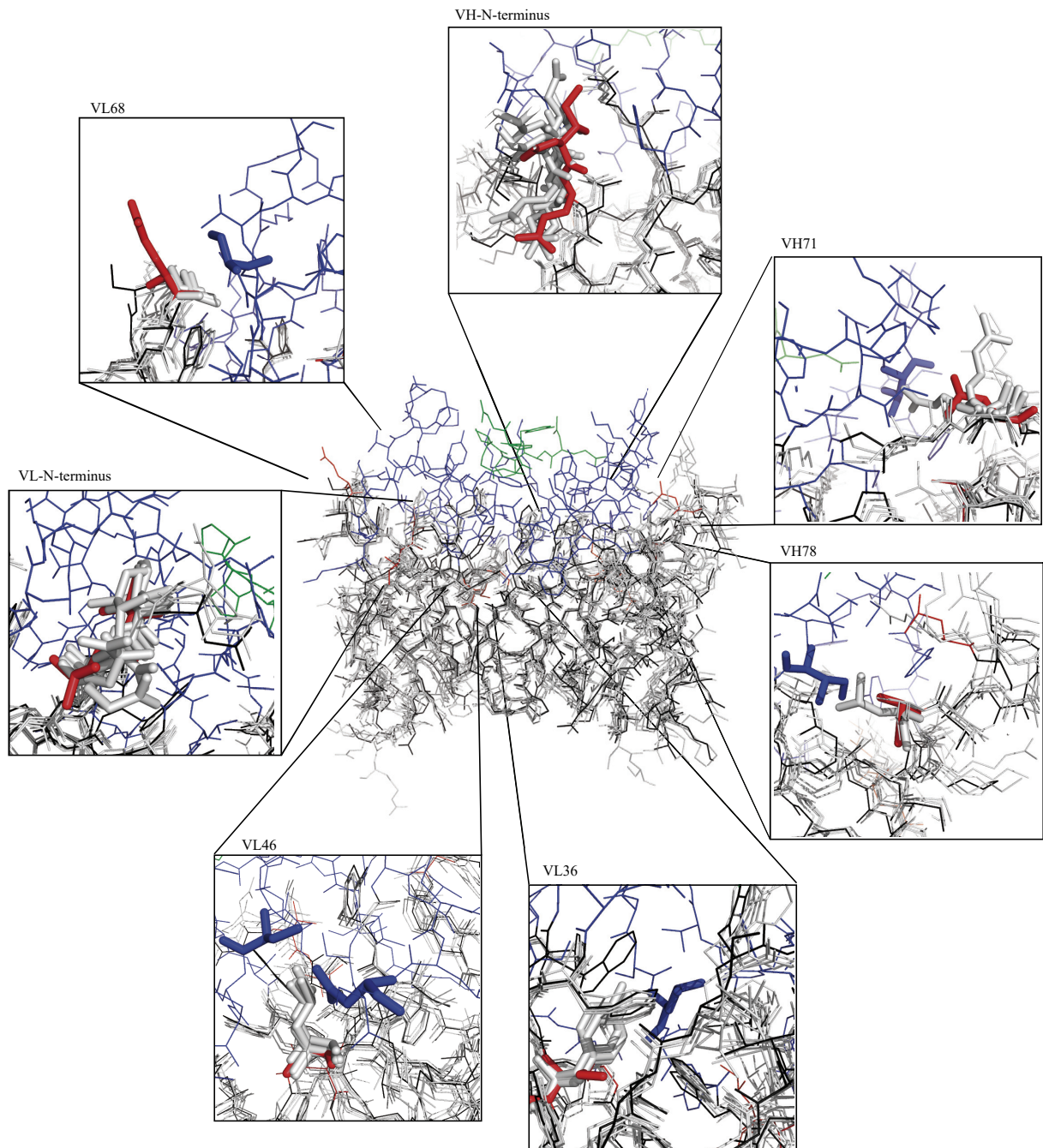


Abbildung 30 Ca-Alignment der Framework-Regionen (analog zu Abbildung 29) von GaletuxiFab (schwarz) und den vier humanen Fv-Fragmenten, die für die Humanisierung ausgewählt wurden (grau). Die CDR von GaletuxiFab sind blau gefärbt, das Epitop-Peptid QAPPGAYPG grün. Die vergrößerten Bereiche zeigen die im Text beschriebenen Positionen, an denen Aminosäuren von GaletuxiFab (Ratte) in das Framework der humanisierten Varianten übernommen wurden, um strukturelle Konflikte mit den transplantierten CDR zu vermeiden. Der jeweils relevante Rest von GaletuxiFab ist rot hervorgehoben.

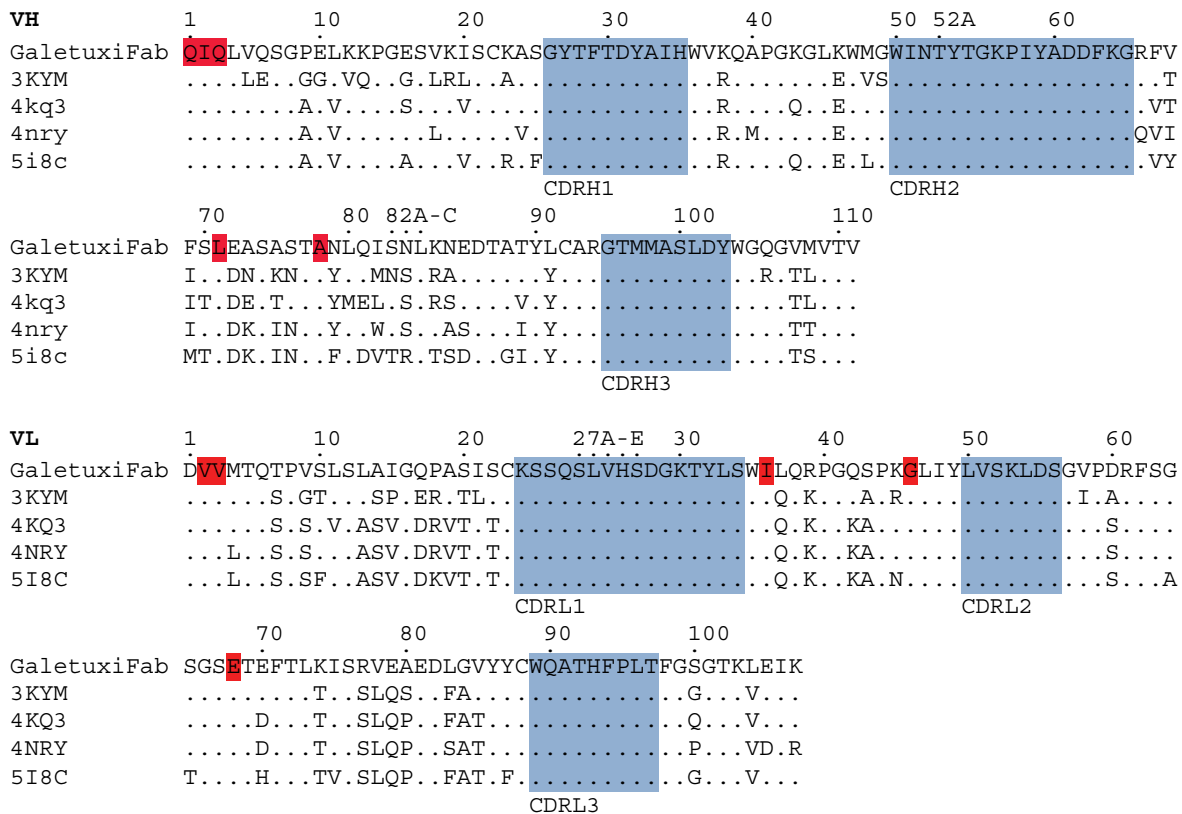


Abbildung 31 Alignment der Aminosäuresequenzen von GaletuxiFab und den vier humanisierten Kandidaten, annotiert nach Kabat (Kabat et al., 1991). In blau sind die CDR gezeigt. Rot eingefärbt sind die Positionen an denen Aminosäuren von GaletuxiFab (Ig der Ratte) in das Framework der humanisierten Varianten übernommen wurden. Punkte zeigen konservierte Reste.

3.10.1. Klonierung und Produktion humanisierter Fab-Fragmente in *E. coli* und deren funktionelle Analyse

Die Produktion der humanisierten Fab-Fragmente wurde in *E. coli* mit dem Expressionsvektor pASK111 (Schlapschy et al., 2005) wie zuvor durchgeführt. Hierfür wurden die in Abbildung 31 gezeigten Aminosäuresequenzen der variablen Domänen mit den Restriktionsschnittstellen XbaI/Eco9II und NcoI/XhoI, entsprechend dem Vorgehen für die humanisierten IgV-Domänen von 5ILK-CDR (Abschn. 3.7.1) als Gensynthese geplant.

Nach Klonierung der synthetischen Gene auf dem Expressionsvektor, sowie des Expressionsvektors pASK111-GaletuxiFab mit Hilfe der Restriktionsenzyme XbaI und Eco9II bzw. NcoI und XhoI in einer 4-Fragmentligierung, erfolgte die bakterielle Produktion im 2l-Maßstab in dem *E. coli* Stamm W3110 bei 25°C wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Die Genexpression wurde dabei mit aTc (200 µg/l) bei einer OD₆₀₀ = 5 für 2,5h induziert. Nach Präparation der periplasmatischen Proteinfraction konnten die humanisierten Fab-Fragmente durch eine Kombination aus IMAC gefolgt von einer SEC isoliert werden. Zur Bestätigung der Identität wurde eine Massenanalyse durchgeführt, wobei die theoretischen Massen von 48209,27 Da für 3KYM, 48289,36 Da für 4NRY, 48248,11 Da für 4KQ3 und 48309,3 Da für 5I8C bestätigt wurden (Abbildung 32 A-D). Die Ausbeuten von 420 µg für das Konstrukt 3KYM und 290 µg für die Konstrukte 4NRY, sowie 4KQ3 waren hierbei vergleichbar zu den 360 µg für GaletuxiFab (s. Abschnitt 3.7.1). Lediglich die Ausbeute des Konstruktes 5I8C lag mit 50 µg weit unter der des chimären Fab-Fragments.

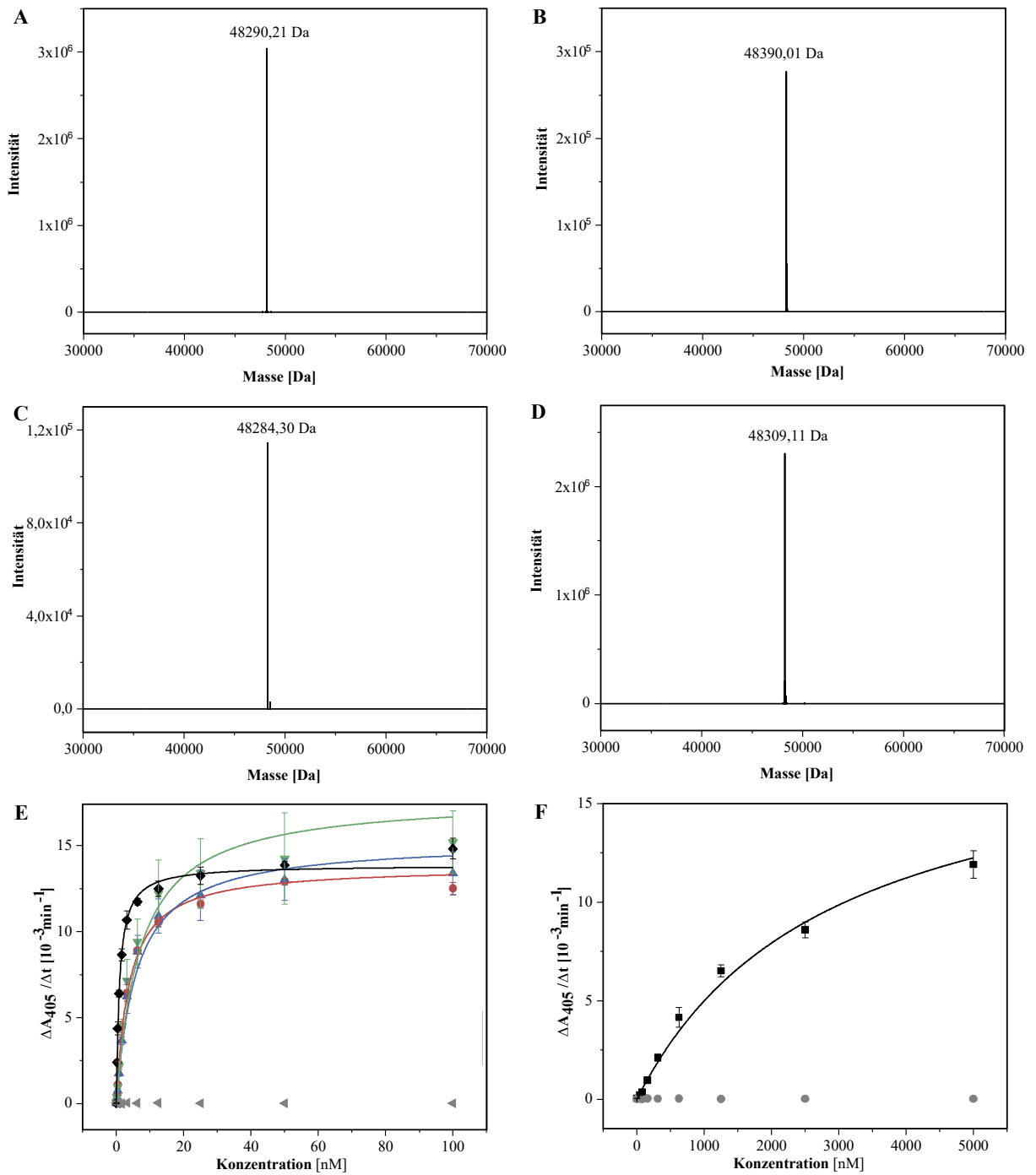


Abbildung 32 (A) ESI-MS der humanisierten Variante 3KYM. (B) ESI-MS der humanisierten Variante 4NRY. (C) ESI-MS der humanisierten Variante 4KQ3. (D) ESI-MS der humanisierten Variante 5I8C. (E) ELISA zur Überprüfung der Funktionalität der humanisierten Fab-Fragmente. Es wurde eine Verdünnungsreihe von GaletuxiFab (schwarz), 4NRY (rot), 4KQ3 (blau) und 5I8C (grün) angesetzt. Ovalbumin (grau) wurde als Referenz verwendet. Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. (F) ELISA mit der humanisierten Variante 3KYM.

Das Bindungsverhalten der Varianten gegen das Antigen hGal3 im direkten Vergleich zu GaletuxiFab wurde mit Hilfe des beschriebenen ELISA (Abschn. 2.5.1) untersucht. Für GaletuxiFab wurde in diesem Experiment ein K_D -Wert von $0,9 \pm 0,1$ nM ermittelt. Im Vergleich hierzu zeigten die Varianten 4NRY mit einem K_D von $3,8 \pm 0,3$ nM, 4KQ3 mit einem K_D von $5,9 \pm 1,9$ nM und 5I8C mit einem K_D $6,9 \pm 1,3$ nM Affinitäten, die sich dem des chimären Fab gut näherten. Lediglich bei der Variante 3KYM mit einem $K_D = 2800 \pm 600$ nM schien das CDR-Grafting keinen Erfolg gehabt zu haben. Da das Fragment 4NRY die höchste Affinität mit gleichzeitig akzeptabler Ausbeute bei der Produktion in *E. coli* zeigte, wurde es für eine weitere Affinitätsmaturierung ausgewählt.

3.10.2. Affinitätsmaturierung durch Einführung von konservativen Mutationen im humanisierten Rückgrat der variablen Domänen

Trotz des vollständigen Austauschs der CDR und einiger offensichtlich CDR-Struktur unterstützenden Reste der Vernier-Regionen zeigt sich (wie eben beschrieben) bei dem direkten Vergleich der besten Variante 4NRY mit GaletuxiFab ein Affinitätsverlust um den Faktor 4. Dies ist ein gutes Beispiel für den nicht immer offensichtlichen und indirekten Einfluss von Resten der Vernier-Region auf die Struktur der CDR und damit der Antigen-Affinität. Aus diesem Grund lässt sich eine Vorhersage über Korrelationen zwischen einer Strukturänderung der CDR aufgrund eines Aminosäureaustauschs in der FR nur bedingt treffen. Lediglich potentielle Einflüsse können vorhergesehen und nach der heuristischen Methode „Versuch und Irrtum“ überprüft werden. Diese Art der Untersuchung erfolgte parallel mit Einzelmutanten, um so vielversprechende Mutationen zu erkennen und unnötige ausschließen zu können. Die Einführung der im folgenden beschriebenen Mutationen in die humanisierte Fab-Variante 4NRY erfolgte über Quik Change Mutagenese basierend auf dem Plasmid pASK111-4NRY.

Als Grundlage für die Ermittlung von Einflüssen wurde die in Abschnitt 3.10 beschriebene Überlagerung der original PDB-Koordinaten der FR von 4NRY mit der Röntgenkristallstruktur von GaletuxiFab verwendet. Die Reste der V_L -Domäne zeigten keine weiteren potentiellen Konfliktpunkte zwischen dem FR und den CDR von GaletuxiFab. Wie bereits beschrieben, war jedoch bekannt, dass die N-Termini einen Einfluss auf die Antigen-Affinität besitzen. In der Röntgenkristallstruktur von GaletuxiFab mit dem Epitop-Peptid ist in dieser Region der V_L -Domäne keine Wechselwirkung mit dem Antigen zu erkennen. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei dem Peptid um das Minimalepitop handelt und die Interaktion mit hGal3 komplexer sein kann als hier gezeigt. Für die V_L -Domänen unterscheidet sich der N-Terminus noch an Position L4 mit Leucin in 4NRY und Methionin in GaletuxiFab, welches mit dem Primerpaar 4NRY_VL_L4MFor und 4NRY_VL_L4MRev mutiert wurde (4NRY(L4M)). Die Betrachtung der Kristallstruktur zeigt außerdem, dass gegenüber dem Rest L4 in der V_H -Domäne ein Unterschied zwischen 4NRY und GaletuxiFab an Position H46 vorliegt, mit Glutaminsäure in 4NRY und Lysin in GaletuxiFab. Dieser Rest kann ebenfalls an einer Wechselwirkung mit hGal3 beteiligt sein und wurde mit dem Primerpaar 4NRY_VH_E46KFow und 4NRY_VH_E46KRev ebenfalls ausgetauscht (4NRY(E46K)). Weitere Reste, die für den Rücktausch ausgewählt wurden, befanden sich unterhalb der CDR-H2. Hier zeigte das $C\alpha$ -Alignment der FR-Region von Rest H66 bis H74 größere Abweichungen als in der restlichen Überlagerung, und auch die Aminosäuresequenz ist nur an den Positionen H70, H71 und H74 identisch zwischen 4NRY und GaletuxiFab (Abbildung 34). Es wurden drei Varianten erzeugt, die Rückmutationen in diesem Bereich enthalten. In der ersten Variante wurde an Position H69 Isoleucin durch Phenylalanin mit dem Primerpaar 4NRY_I69FFow

und 4NRY_I69FRev ausgetauscht (4NRY(I69F)), in der zweiten Variante an Position H73 Lysin durch Alanin (4NRY(K73A)) mit dem Primerpaar 4NRY-K73AFow und 4NRY-K73ARev. Die dritte Variante war eine Kombination von Rückmutationen an den Positionen H66, H67 und H69 (4NRY(66.67.69)). Die Positionen H66 und H67 bilden den N-terminalen Abschnitt eines β -Strangs und spielen eine Rolle für dessen weiteren Verlauf (Abbildung 33). Um den Einfluss dieser beiden Reste zu untersuchen, wurden sie gemeinsam mit dem Rest H69 ausgetauscht, der in direktem Kontakt zu CDR-H2 steht. Dies wurde durch Verwendung des Primerpaars 4NRY(66.67.69)Fow und 4NRY(66.67.69)Rev realisiert. Die bakterielle Produktion und Reinigung der verschiedenen Fab-Varianten erfolgte in gleicher Weise wie bei der Ausgangsvariante 4NRY (Abschn. 3.10.1). Um den Einfluss der Rückmutationen auf die Affinität zu überprüfen, wurden die rekombinanten Fabs in einem ELISA (Abschn. 2.5.1) verglichen. Insgesamt wurde ein signifikant positiver Effekt durch die Einführung der Mutationen erreicht (Abbildung 35). Insbesondere die N-terminale Mutation in der V_L -Domäne bei 4NRY(L4M) und die gegenüberliegende Mutation in der V_H -Domäne 4NRY(E46K) zeigen den größten Effekt. Dies bestärkt die Vermutung, dass es zu einer komplexeren Epitop/Paratop-Interaktion kommt, als in der Röntgenstruktur zu erkennen ist.

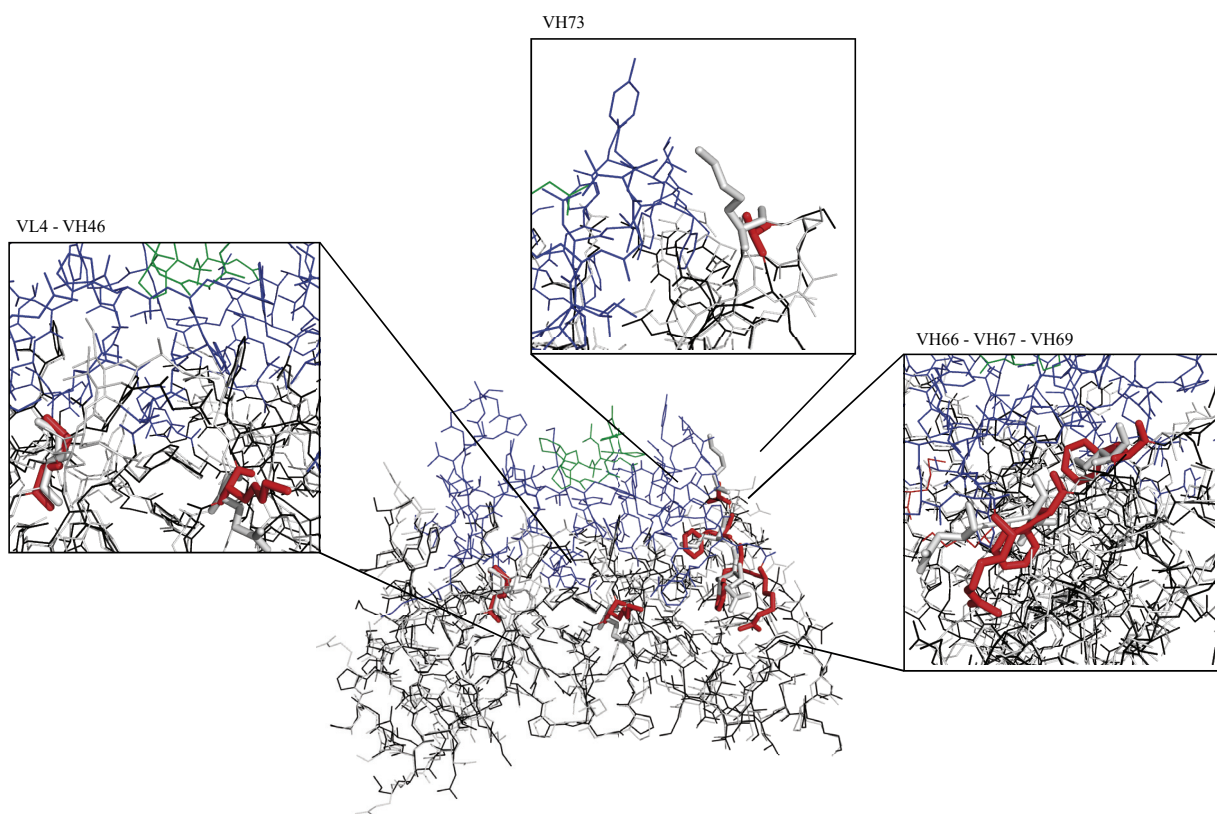


Abbildung 33 α -Alignment der Framework-Regionen von GaletuxiFab (schwarz) und dem humanen Fv-Fragment 4NRY (grau). Die CDRs von GaletuxiFab sind blau gefärbt. Das synthetische Epitop-Peptid QAPPGAYPG grün. Die vergrößerten Bereiche zeigen die im Text beschriebenen Positionen, an denen die Aminosäuren von GaletuxiFab in das Framework der humanisierten Varianten übernommen wurden, um die ursprüngliche Antigen-Affinität wieder herzustellen.

VH 1 10 20 30 40 50 52A 60
 GaletuxiFab QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAIHWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGKPIYADDFKGRFV
 4NRYA.V.....L.....V.....R.M.....I

CDRH1 CDRH2

70 80 82A-C 90 100 110
 GaletuxiFab FSLEASASTANLQISNLKNEATATYLCARGTMMASLDYWGQGVMTV
 4NRYD..IN..Y..W.S..AS...I.Y.....TT...

CDRH3

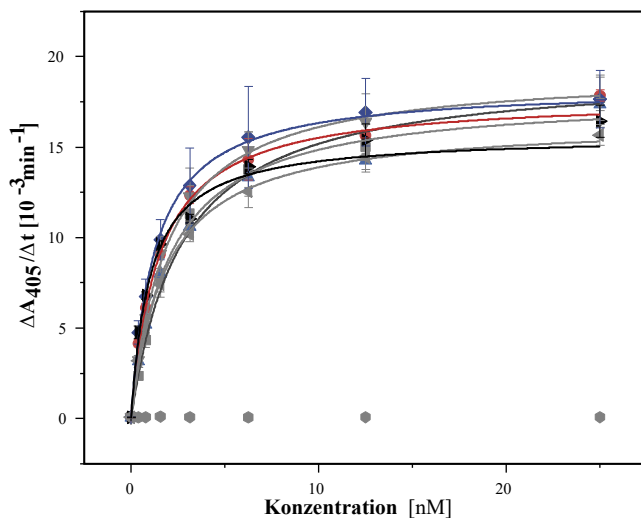
VL 1 10 20 27A-E 30 40 50 60
 GaletuxiFab DVVMTQTPVSLSLAIGQPASISCKSSQSLVHSDGKTYLSWILQRPQSPKGLIYLVSKLDSGVPDRFSG
 4NRYS.S...ASV.DRVT.T.....Q.K..KA.....S....

CDRL1 CDRL2

70 80 90 100
 GaletuxiFab SGSETÉFTLTKISRVEAEDLGVYYCQATHFPLTFGSGTKLEIK
 4NRYD...T..SLQP..SAT.....P...VD.R

CDRL3

Abbildung 34 Alignment zwischen der Aminosäuresequenz von GaletuxiFab und dem humanisierten Fv-Fragment 4NRY nummeriert nach Kabat (Kabat et al., 1991). Blau eingefärbt sind die CDRs, rot die Positionen, an denen Aminosäuren von GaletuxiFab in das Framework der humanisierten Varianten übernommen wurden.



Fab-Fragment	K _D [nM]
GaletuxiFab	1,2 ± 0,1
4NRY	2,3 ± 0,2
4NRY(L4M)	1,5 ± 0,1
4NRY(E46K)	1,3 ± 0,1
4NRY(I70F)	1,7 ± 0,1
4NRY(K73A)	2,0 ± 0,2
4NRY(66.67.69)	1,9 ± 0,1

Abbildung 35 ELISA zur Überprüfung der Funktionalität der eingeführten Rückmutationen in das humane Gerüst des α hGal3-Fab 4NRY. Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. Es wurde eine Verdünnungsreihe von GaletuxiFab (schwarz), 4NRY(L4M) (rot), 4NRY(E46K) (blau), 4NRY(I70F) (grau), 4NRY(K73A) (grau) und 4NRY(66.67.69) (grau) angesetzt. Ovalbumin (grau) wurde als Referenz verwendet.

3.10.3. Synergistische Effekte von Mutationen auf die Affinität

Natürlich könnte man die Anzahl der Rückmutationen in das humane Gerüst stetig weiter erhöhen und dadurch weiter der CDR-Spendersequenz anpassen, bis die Affinität voll wiederhergestellt ist. Jedoch würde dies dem eigentlichen Sinn der Humanisierung widersprechen (Hurle and Gross, 1994). Im vorliegenden Fall zeigte sich, dass eine selektive Kombination der Mutanten 4NRY(L4M) und 4NRY(E46K) sinnvoll sein könnte. Da die beiden Mutationen Einfluss auf denselben Bereich des Epitops zu besitzen scheinen, ist es möglich das deren Kombination über den eines rein additiven Effektes hinausgehen. Hierzu wurde das Gen für die schwere Kette aus dem Konstrukt pASK111-4NRY(E46K) mit den Restriktionsenzymen XbaI und NcoI ausgeschnitten und mit dem analog

verdauten Vektorrückgrat von pASK111-4NRY(L4M) ligiert. Die Expression und Reinigung des Fab erfolgten wie in Kap. 3.9.3 beschrieben.

Die Affinitätsbestimmung im ELISA (Abbildung 36 A) ergab für die neue Version 4NRY(L4M-E46K), im folgenden als GaletuzuFab bezeichnet, einen K_D -Wert von $1,3 \pm 0,1$ nM. Demgegenüber zeigte das Ausgangskonstrukt 4NRY in diesem ELISA eine K_D von $3,6 \pm 0,1$ nM und GaletuxiFab eine K_D von $1,3 \pm 0,2$ nM. Die Affinität des Ratten-Antikörpers konnte also vollständig wieder hergestellt werden. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde die Affinität dieser Fab-Mutante mittels SPR untersucht. Die gemessene Affinität (Abbildung 36 B) belief sich auf $0,34 \pm 0,02$ nM. Dieser Wert ist ebenfalls vergleichbar mit der mittels SPR gemessenen Affinität für das chimäre Fab-Fragment der Ratte mit K_D $0,29 \pm 0,02$ nM. Damit wurde die Humanisierung des α hGal-Fab-Fragments erfolgreich abgeschlossen.

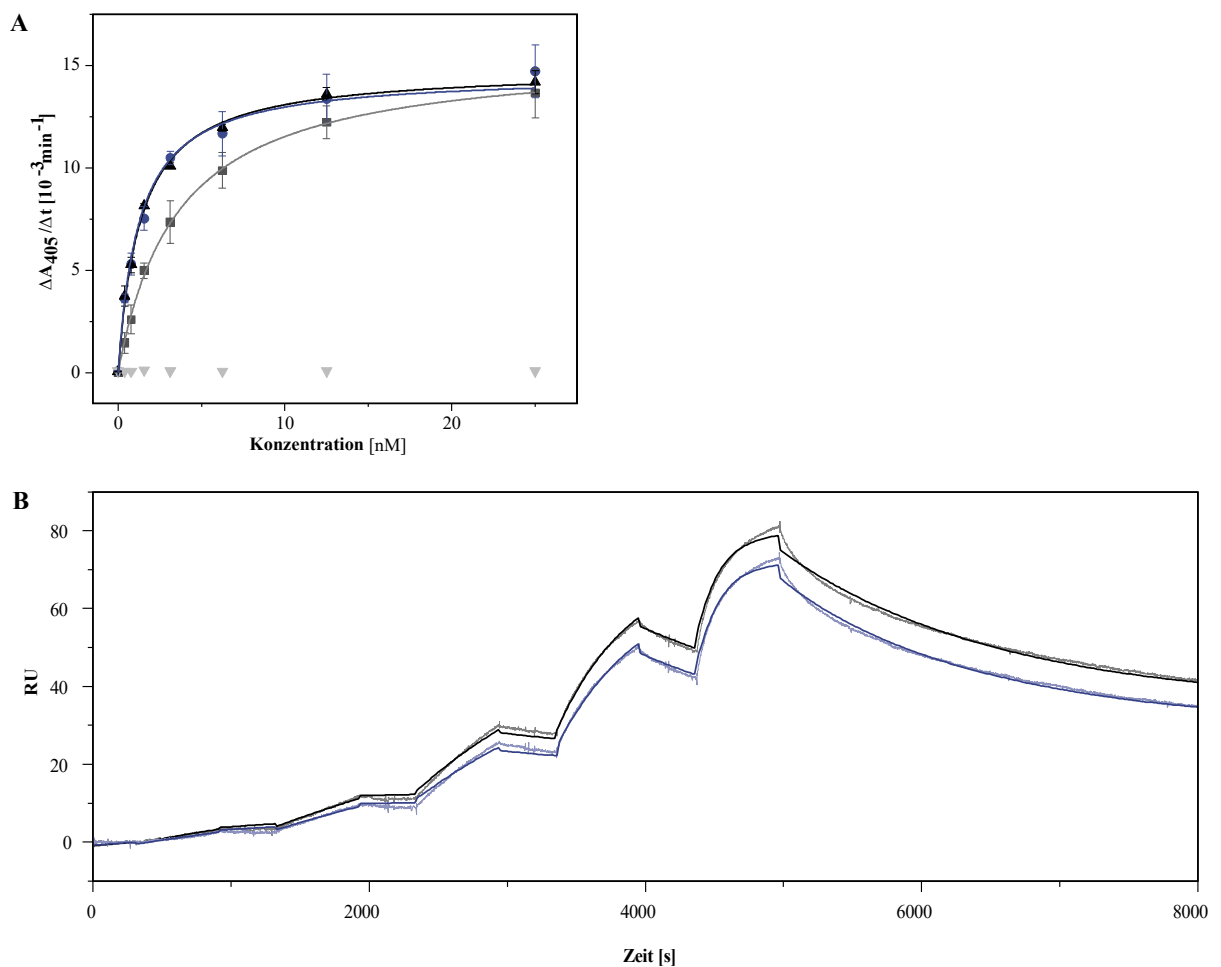


Abbildung 36 A) ELISA zur Überprüfung der eingeführten Rückmutationen in das humane Gerüst 4NRY. Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. Darauffolgend wurde eine Verdünnungsreihe von GaletuxiFab (schwarz), GaletuzuFab (blau), 4NRY (grau) appliziert. Ovalbumin (grau) wurde als Referenz verwendet. **B)** SPR-Analyse der immobilisierten Fab-Fragmente GaletuxiFab (schwarz) und GaletuzuFab (blau) zu dem Analyt hGal3.

3.10.4. Klonierung des PASylierten GaletuzuFab (GaletuzuFab-PAS200)

Die PASylierung von GaletuxiFab zeigte, dass die Positionierung des PAS-Polymers am Fab-Fragment einen entscheidenden Einfluss auf die Expressionsausbeute haben kann (Abschn. 3.5). Basierend auf den Erkenntnissen wurde lediglich die C-terminale PASylierung der leichten Kette konstruiert, die auch bei GaletuxiFab Erfolg gezeigt hatte. Für die nahtlose Klonierung der PAS-Genkassette wurden C-terminal zur C_κ von GaletuzuFab zwei SapI-Restriktionsschnittstellen auf dem Plasmid pASK111-GaletuzuFab eingeführt (Abbildung 38). Über diese Restriktionsschnittstellen kann die standardisierte Klonierung der PAS-Polymer kodierenden Gensequenzen auf dem pXL1 Vektor (XL-protein GmbH) angewendet werden (Schlapschy et al., 2013) und es können ohne großen Aufwand PAS-Polymere unterschiedlicher Länge mit dem Zielprotein fusioniert werden.

Praktisch wurde die Einführung der SapI-Schnittstellen C-terminal zu C_κ über ein synthetisches Genfragment realisiert, welches für die in pASK111 vorhandene C_κ DNA-Sequenz mit den begrenzenden Restriktionsschnittstellen XhoI und HindIII kodiert und um die SapI-Schnittstellen erweitert wurde. Nach Verdau des synthetischen Genfragments mit XhoI und HindIII wurde dieses mit dem Rückgrat des Vektors pASK111-GaletuzuFab ligiert, sodass das Konstrukt pASK111-Galetuzumb-SapI für die nachfolgende Einführung von PAS-Sequenzen unterschiedlicher Länge entstand. Die hierbei integrierten SapI-Schnittstellen sind in entgegengesetzter Weise auf dem Sense-Strang (N-terminale SapI Schnittstelle) und auf dem Antisense-Strang (C-terminale SapI Schnittstelle) kodiert. Bei Verdau mit SapI führt dies zu zwei 5'-Überhängen mit drei überlappenden komplementären Basen, die für Alanin kodieren (Abbildung 37). Die Ligierung mit der PAS-Genkassette aus dem mit SapI verdauten Plasmid pXL1-PAS1.2(200) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Uli Binder, XL-protein GmbH) führt schließlich zu einer Fusion der PAS-Sequenz über das beschriebene Alanin-Kodon. Zur Überprüfung des korrekten Einbaus wurde das Plasmid mit dem Primer D12 sequenziert.

```
1640      1650      1660      1670      1680
Cκ          SapI          SapI          HindIII
...GGAGAGTGT'GCCAGAAGAGCTAGAAGCGGCTCTTCT'GCCTAAGCTTGAC...
...CCTTCACACGG'TCTTCTCGATCTTCGCCGAGAAGACGG'ATTCGAACTG...
...GlyGlyCys AlaArgArgAlaArgSerGlySerSer Ala *
```

Abbildung 37 Nucleobasensequenzausschnitt des Plasmids pASK111-GaletuzuFab mit den beiden eingeführten SapI-Schnittstellen. Rot eingefärbt sind die Schnittstellen, die außerhalb der Erkennungssequenz des Typ IIa-Restriktionsenzym liegen, sodass eine nahtlose Ligierung des PAS-Fragments möglich ist.

3.11. Chemische Konjugation von funktionellen Gruppen mit GaletuzuFab durch Einführung eines Cysteinrests

Durch die Vielzahl an funktionellen Gruppen in Proteinen besitzen diese eine hohe Wahrscheinlichkeit von ungewünschten Modifizierungen und haben deshalb aus regulatorischer Perspektive einen entscheidenden Nachteil, da jede Modifizierung zu einer Veränderung der Pharmakokinetik und Effizienz führen kann. Für Mischungen mehrerer Modifizierungen ergibt sich dadurch häufig ein ungenaues und nicht vorhersehbares pharmakokinetisches Verhalten. Besonders bei einer Funktionalisierung mit einem Toxin, wie es bei gerichteten Therapien mit Antikörper-Toxin-Konjugaten der Fall ist oder für diagnostische Zwecke, bei dem die diagnostisch zugängliche Einheit an das Protein gekoppelt wird, ist dies ein wichtiger Punkt.

Eine selektive Kopplungsmethode, die zu nur einem Produkt führt, lässt sich durch die Einführung eines Cysteinrest realisieren. Freie Cysteinreste kommen in den meisten Proteinen unterdurchschnittlich häufig vor und können deshalb mit thiolreaktiven Proben, wie Maleimiden ortsspezifisch markiert werden (Hermanson, 2013). Dagegen haben natürlich vorkommende Cysteinreste durch ihre Fähigkeit Disulfidbrücken zu bilden meist eine strukturelle Funktion und die Einführung weiterer unverbrückter Cysteinreste kann deshalb einen Einfluss auf die Struktur und Faltungseffizienz des Proteins haben. Ein Fab-Fragment, wie GaletuzuFab, besitzt zehn Cysteinreste, von denen acht intramolekulare Disulfidbrücken bilden, sowie zwei für die kovalente Verbrückung der beiden Ketten verantwortlich sind. Somit hat auch in diesem Fall die Position des neu eingeführten freien Cysteins einen Einfluss auf die Bildung der nativen Disulfidbindungen (Junutula et al., 2008a). Um mögliche Wechselwirkungen bei deren Ausbildung zu minimieren, wurde das PAS-Polymer als Spacer zwischen Fab-Fragment und dem Fluoreszenzmarker bzw. Chelator verwendet. Der Cysteinrest wurde daher am carboxyterminalen Ende der C_L-PAS200-Kette eingeführt (Abbildung 38). Ein weiterer Vorteil dieser Konstruktion war, dass sterische Hinderungen bei der Kopplung des freien Cysteinrests praktisch keine Rolle spielten (Junutula et al., 2008b).

3.11.1. Klonierung und Produktion des GaletuzuFab-PAS200 mit freiem Cysteinrest

Basierend auf dem Vektor pASK111-GaletuzuFab-PAS200 wurde am 3'-Ende der PAS-Kassette über eine Quick Change Mutagenese mit den Primern FowSapICys und RevSapICys ein Cysteinkodon eingeführt. Der *E. coli* Stamm W3110 wurde mit dem neu konstruierten Plasmid pASK111-GaletuzuFab-PAS200-Cys transformiert. Die periplasmatische Produktion von GaletuzuFab-PAS200-Cys erfolgte im 8l-Fermenter unter Hochzelldichte. Das rekombinante Protein konnte mit einer IMAC gefolgt von einer SEC gereinigt werden, wobei die Ausbeute bei 30 mg lag. Die Analyse mittels ESI-MS zeigte eine monodisperse Spezies des Proteins mit 65185 Da (Abbildung 39 A), was 178 Da über der theoretischen Masse von 65007 Da lag. Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Differenz war die Ausbildung eines gemischten Disulfids mit einer Thiolkomponente aus dem Kulturmedium oder dem Wirtsmetabolismus (Eser et al., 2009, Gadgil et al., 2006).

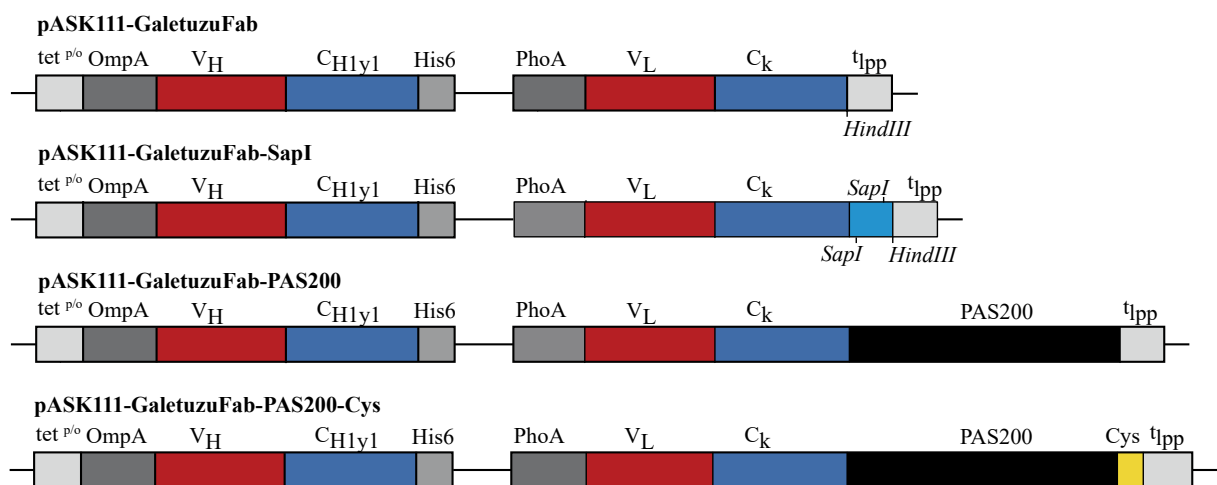


Abbildung 38 GaletuzuFab-Plasmidkonstrukte: schematische Darstellung des Leserahmen **1)** von pASK111-GaletuzuFab, **2)** des Konstrukts mit den eingeführten SapI-Schnittstellen pASK111-GaletuzuFab-SapI, **3)** des PASyliertes Proteins kodiert auf pASK111-GaletuzuFab-PAS200 und **4)** des Konstrukts mit freiem Cysteinrest pASK111-GaletuzuFab-PAS200-Cys.

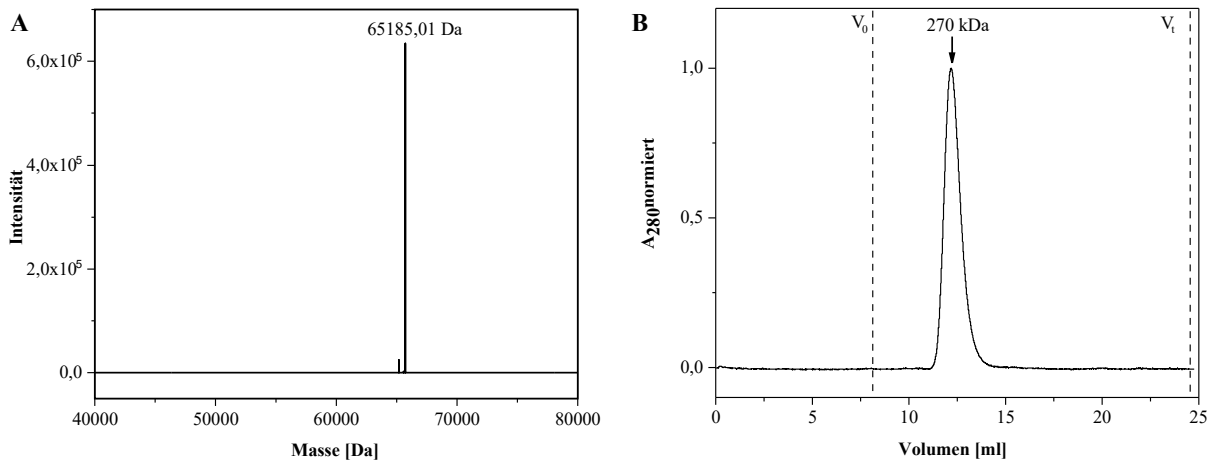


Abbildung 39 Biochemische Charakterisierung des rekombinanten PASylierten GaletuzuFab mit freiem Cysteinrest **A**) ESI-MS von GaletuzuFab-PAS200-Cys **B**) Analytische Größenausschlusschromatographie von GaletuzuFab-PAS200-Cys.

Eine Modifikation mit dem N-Acetylcystein-Methylester (177 Da) könnte diese Differenz exakt erklären, ist aber in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Es ist bekannt, dass gemischte Disulfide sekretierter Proteine bei der Fermentation auftreten können. Diese lassen sich jedoch durch eine partielle Reduktion des Antikörperfragments vor der Kopplung (siehe Abschn. 2.4.5.2) auflösen und stellen somit kein Hindernis dar (Junutula et al., 2008b).

Das SDS-PAGE (Abbildung 41 B) zeigte passend zu dem Ergebnis der Masseanalyse eine homogene Proteinpräparation. Im komplett reduzierten Zustand sind die typischen Banden eines PASylierten Fab-Fragments mit der schweren Kette von ca. 26 kDa und der langsam migrierenden PASylierten leichten Kette bei ca. 90 kDa zu erkennen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte das Gel eine Bande mit ca. 120 kDa sowie einen minimalen Anteil von zwei kleineren separaten Banden, entsprechend den nicht verbrückten Ketten. Dies deutet auf eine annähernd vollständige Ausbildung der interchenaren Disulfidbrücke hin. Auch die Analyse mittels SEC bestätigte dessen Homogenität mit einem monodispersen Elutionsprofil (Abbildung 39 B), welches zudem die für PASylierte Proteine charakteristische Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens mit einer apparenten Größe von 270 kDa anzeigte.

3.11.2. Kopplung von GaletuzuFab mit dem Fluorophor Cyanin-7

Wie die Massenanalyse von GaletuzuFab-PAS200-Cys ergab, lag das eingeführte Cystein als gemischtes Disulfid vor, sodass eine direkte Kopplung mit einer thiol-reaktiven Substanz nicht möglich war. Daher wurde das rekombinante Protein in einem ersten Schritt mit 10-fach molarem Verhältnis an Dithioeritol (DTT) partiell reduziert und anschließend durch Gelfiltration isoliert. Da diese Art der Reduktion auch zur Auflösung der natürlichen Disulfidbrücken führen kann, wurde das Fab-Fragment anschließend mit einer 20-fach molaren Menge des milden Oxidationsmittels Dehydroascorbinsäure (dhAA) versetzt (Junutula et al., 2008b). Nach dieser Behandlung konnte das Fab-Fragment für die Kopplung verwendet werden.

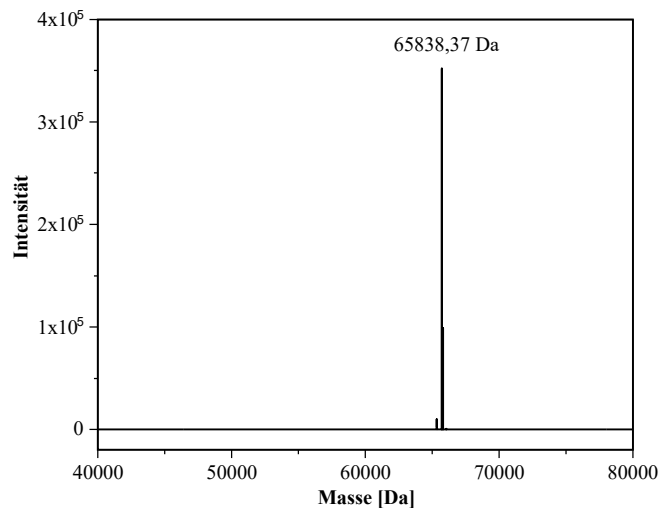


Abbildung 40 ESI-MS des Kopplungsproduktes von GaletuzuFab-PAS200-Cys mit dem funktionalisierten Fluorophor Sulfo-Cy7-Maleimid

Im Unterschied zur Markierung von GaletuxiFab wurde für GaletuzuFab der Fluorophor Cy7 verwendet. Cy7 hat im Vergleich zu Cy5.5 eine bathochrome Verschiebung des Absorptions- sowie Emissionsspektrums mit einem Maximum von 750 bzw. 773 nm. Dies führt zu einer besseren Gewebedurchlässigkeit der Strahlung und somit zu einer höheren Auflösung beim Imaging (Smith et al., 2009). Für die Kopplung wurde der aktivierte Fluorophor Sulfo-Cy7-Maleimid (Cy7-MI) in einem molaren Verhältnis von 3:1 gegenüber GaletuzuFab-PAS200-Cys eingesetzt.

Wie in der ESI-MS Analyse (Abbildung 40) des Kopplungsprodukts zu sehen ist, führt das Verfahren der selektiven Reduktion mit anschließender Kopplung zu einem nahezu einheitlichen Produkt mit 65838,37 Da, was im Fall einer Michael-Addition eines Thiols an ein Maleimid erwartungsgemäß der Summe der theoretischen Massen von GaletuzuFab-PAS200-Cys (65007 Da) und Cy7-MI (830,09 Da) entspricht. Eine genauere Aussage über die Lokalisierung des Fluorophors lässt sich aus dem SDS-PAGE treffen, bei dem vor der Färbung mit Coomassie die Fluoreszenzemission bei 775 nm gemessen wurde (Anregung bei 750 nm, Abbildung 41 B). Bei Färbung mit Brilliantblau waren die zwei typischen Banden mit ca. 26 kDa für die schwere Kette und ca. 90 kDa für die PASylierte leichte Kette sichtbar. Im Vergleich dazu zeigte die Fluoreszenzmessung mit einer Anregung bei 750 nm und einer Emissionsmessung bei 775 nm lediglich eine Bande für die PASylierte leichte Kette, was für die gewünschte Kopplung mit dem am C-terminus eingeführten Cysteins spricht.

3.11.3. Kopplung von GaletuzuFab mit dem Chelator Deferioxamin

Die Kopplung des Chelators mit dem engineernten Fab-Fragment gelang ähnlich wie für den Fluorophor mit dem bifunktionellen Reagenz DFO-Maleimid (DFO-MI) über das oben beschriebene selektive Reduktions/Oxidations-Verfahren (Abschn. 2.4.5.2). Hierbei wurde das molare Eduktverhältnis ebenfalls mit 3:1 gegenüber GaletuzuFab-PAS200-Cys gewählt.

Das ESI-MS des gereinigten Kopplungsproduktes (Abbildung 41 A) zeigte auch hier nur eine Spezies, deren Masse mit 65719,44 Da der Summe der theoretischen Massen von GaletuzuFab-PAS200-Cys (65007 Da) und DFO-MI (711,8 Da) entsprach. Vergleicht man das Migrationsverhalten der Proben im SDS-PAGE vor und nach der Kopplung, so lässt sich ein leichter Laufunterschied der Bande mit 90 kDa für LC-PAS200-Cys im reduzierten

Zustand wie auch der einzigen prominenten Bande im nicht-reduzierten Zustand bei 120 kDa erkennen. Dieser Laufunterschied ist durch die Ladungsdifferenz von DFO und Sulfo-Cy7 zu erklären.

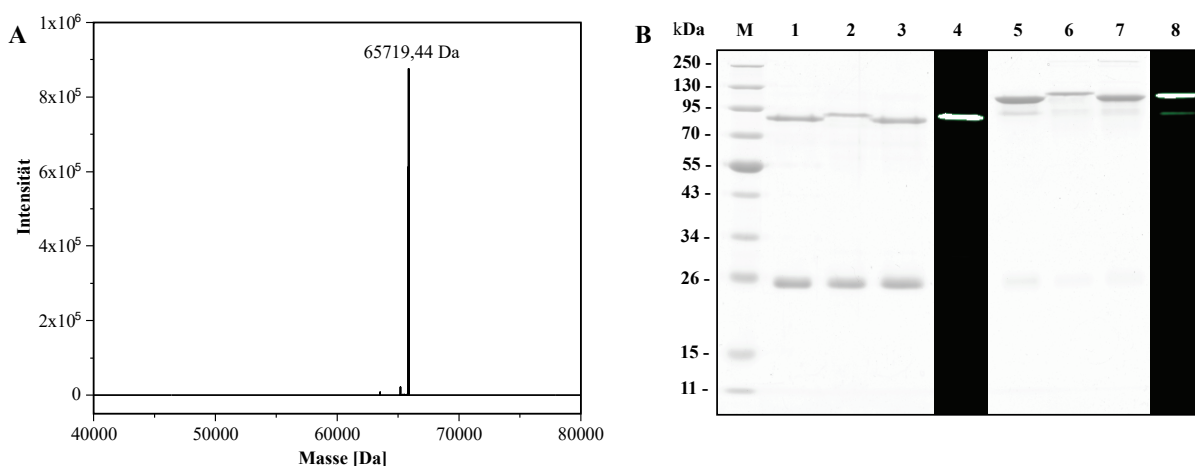


Abbildung 41 A) ESI-MS des Kopplungsproduktes von GaletuzuFab-PAS200-Cys mit dem aktivierten Chelator DFO-Maleimid. **B)** SDS-PAGE von GaletuzuFab-PAS200 mit freiem Cystein sowie der entstehenden Kopplungsprodukte. 1. Gereinigte Präparation von GaletuzuFab-PAS200-Cys (reduzierend), 2. Kopplungsprodukt von GaletuzuFab-PAS200-Cys und DFO-Maleimid (reduzierend), 3. Kopplungsprodukt von GaletuzuFab-PAS200-Cys und Sulfo-Cy7-Maleimid (reduzierend), 4. Fluoreszenzspektroskopische Auswertung der SDS-PAGE (Ex. 750 nm / Em. 775 nm) des Kopplungsproduktes von GaletuzuFab-PAS200-Cys und Sulfo-Cy7-Maleimid (reduzierend), 5. Gereinigte Präparation von GaletuzuFab-PAS200-Cys (nicht reduzierend), 6. Kopplungsprodukt von GaletuzuFab-PAS200-Cys und DFO-Maleimid (nicht reduzierend), 7. Kopplungsprodukt von GaletuzuFab-PAS200-Cys und Sulfo-Cy7-Maleimid (nicht reduzierend), 8. Fluoreszenzspektroskopische Auswertung der SDS-PAGE (Ex. 750 nm / Em. 775 nm) des Kopplungsproduktes von GaletuzuFab-PAS200-Cys und Sulfo-Cy7-Maleimid (nicht reduzierend).

3.11.4. Funktionelle Analyse der Kopplungsprodukte

Auch wenn die selektive Reduktion bzw. Oxidation zum Entfernen des gemischten Disulfids unter milden Bedingungen durchgeführt wurde, bestand die Gefahr, dass die insgesamt fünf nativen Disulfidbindungen angegriffen werden oder es zu einer Dimerisierung von Fab-Fragmenten mit freiem Cystein kommt. Eine analytische SEC sollte Aufschluss über die Bildung unerwünschter Spezies liefern. Abbildung 42 A zeigt für die ungekoppelte, wie auch für die mit dem Fluorophor und dem Chelator gekoppelte Spezies ein monodisperses Elutionsprofil mit einer apparenten Molmasse von 270 Da, sodass von einer korrekten Ausbildung der nativen Disulfidbindungen und auch des Thioethers in den Kopplungsprodukten ausgegangen werden kann.

Die Bindungsaktivität der Kopplungsprodukte wurde im ELISA und mittels SPR untersucht. Der direkte Vergleich der Affinitäten im ELISA zeigt K_D -Werte für GaletuzuFab-PAS200-Cys von $1,5 \pm 0,1$ nM, für Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys von $1,6 \pm 0,2$ nM und für DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys von $1,9 \pm 0,1$ nM (Abbildung 42 B). Die mittels SPR gemessene Affinität (Abbildung 42 C) mit K_D -Werten für GaletuzuFab-PAS200-Cys von $0,31 \pm 0,02$ nM, für Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys von $0,24 \pm 0,03$ nM und für DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys von $0,26 \pm 0,02$ nM bestätigen, dass die Affinität des Fab-Fragments weder durch die Einführung des zusätzlichen Cysteins noch durch die folgende Kopplung signifikant beeinträchtigt wurde.

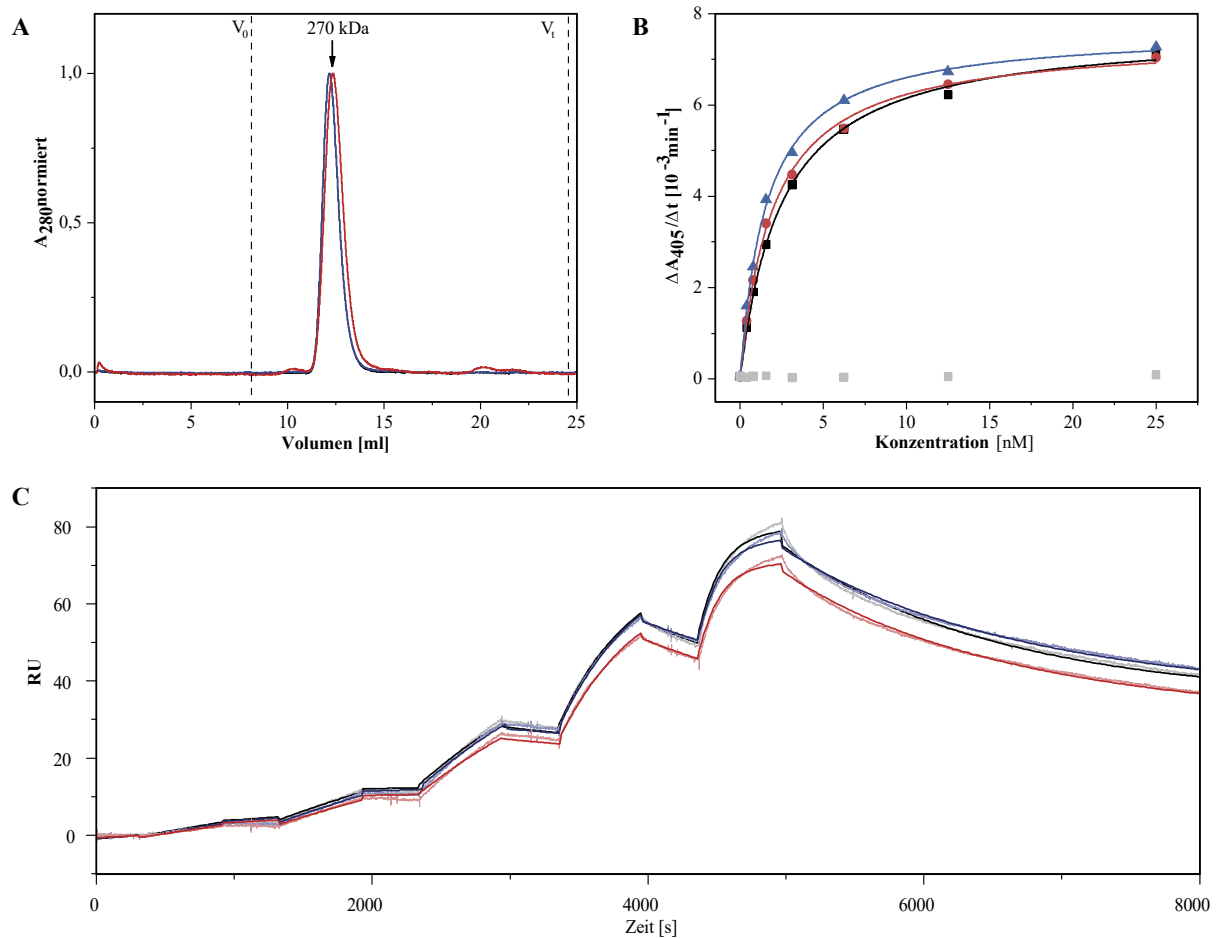


Abbildung 42 Vergleich der biochemischen Eigenschaften zwischen GaletuzuFab-PAS200-Cys (schwarz) im Vergleich zu den Kopplungsprodukten Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys (rot) und DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys (blau) **A**) Analytische Größenausschlusschromatographie. **B**) ELISA-Experimente zur Überprüfung der Funktionalität der Kopplungsprodukte. Es wurde eine Verdünnungsreihe von GaletuzuFab-PAS200-Cys (schwarz), Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys (rot), DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys (blau) angesetzt. Ovalbumin (grau) wurde als Referenz verwendet. Auf der Mikrotiterplatte wurde rekombinantes hGal3 immobilisiert. **C**) SPR-Analyse der immobilisierten Fab-Fragmente GaletuzuFab-PAS200-Cys (schwarz), Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys (rot) und DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys (blau) zu dem Analyt hGal3.

3.12. Immunologische Diagnostik von Schilddrüsenkrebs

Hinsichtlich der künftigen Anwendung des humanisierten Fab-Fragments im Menschen ist ein wichtiger Aspekt die Überprüfung der Affinität zu Gal3 in seiner physiologischen Umgebung. Hierfür wurden humane Gewebeschnitte von bös- und gutartigem Schilddrüsenengewebe immunhistochemisch mit dem Fab-Fragment behandelt und verglichen. Dies lieferte Einsichten in die lokale Verteilung des Tumorantigens und dessen Bindung durch das Fab-Fragment. Des Weiteren wurde die Eignung des Fab-Fragments für die diagnostische Immun PET-Bildgebung in Tumor-Xenograft-Mäusen untersucht.

3.12.1. Histochemische Untersuchungen mit GaletuzuFab an humanen Gewebeschnitten

Für die histochemische Untersuchung wurden mit Formalin fixierte Gewebeschnitte von Patientenproben eines papillären Schilddrüsenkarzinoms sowie von normalem Schilddrüsenengewebe verwendet, wobei eine Demaskierung des Antigens nötig war (Abschn. 2.5.3). Anschließend wurden die Schnitte mit dem Gal3 bindenden Antikörper inkubiert. Wie bereits von Bartolazzi et al. (2008) gezeigt, ist die histochemische Detektion von Gal3 mit dem mAk M3/38, auf dem das humanisierte GaletuzuFab basiert, möglich, sodass dieser als Referenz verwendet werden konnte.

Die Negativkontrolle mit normalem Schilddrüsenengewebe, das mit GaletuzuFab inkubiert wurde (Abbildung 43 A), zeigt die typisch kolloidale Struktur der Epithelzellen, deren Inneres durch eine leichte Hintergrundfärbung mit dem DAB-Farbstoff hervortritt. Begrenzt werden diese durch die parafollikularen C-Zellen, die nur die blaue Färbung der Zellkerne zeigen. Im Vergleich dazu ließ sich für das maligne Gewebe, das ebenfalls mit GaletuzuFab inkubiert wurde, eine deutliche DAB-Färbung der papillären Strukturen erkennen (Abbildung 43 B). Insbesondere das Cytoplasma der malignen Zellen wurde hierbei angefärbt, was für eine hohe Gal3 Expression in diesen Regionen spricht. Ein ähnliches Bild ergab sich für das Kontrollexperiment mit dem mAk (Abbildung 43 C). Auch hier wurden die cytoplasmatischen Kompartimente mit dem DAB-Farbstoff in ähnlichem Maß angefärbt, was für die Funktionalität von GaletuzuFab auf humanen Gewebeproben spricht.

Die Überexpression von Gal3 als phänotypisches Merkmal von Krebs ist nicht auf Karzinome der Schilddrüse beschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass auch das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, welches eine der häufigsten Krebsarten ist (Chirieac and Attanoos, 2018), eine erhöhte Gal3 Expression aufweist (Kosacka et al., 2011). Die Untersuchung eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms mit GaletuzuFab zeigt ähnlich dem Ergebnis für das papilläre Schilddrüsenkarzinom eine starke cytoplasmatische Expression von hGal3 des malignen Gewebes, wodurch es sich von den umliegenden Stromazellen abgrenzt (Abbildung 43 D).

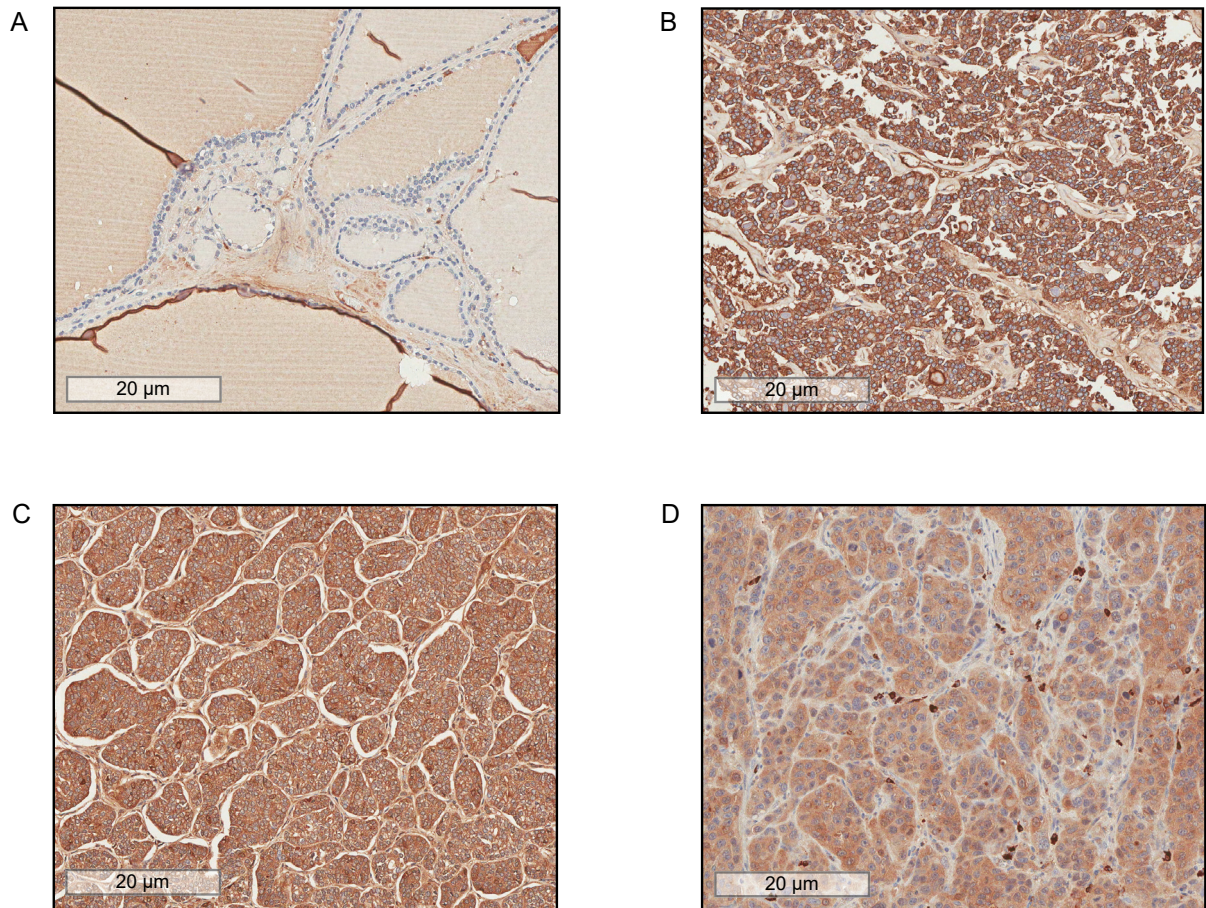


Abbildung 43 Histochemische Untersuchungen mit dem humanisierten und PASylierten Fab-Fragment GaletuzuFab-PAS200-Cys an humanen Gewebeschnitten. Detektion des Fab-Fragments über eine Kombination aus einem Ig-kappa-Kette bindenden Sekundäantikörpers welcher wiederum durch ein Antikörper-HRP-Konjugat erkannt wird und eine colorimetrische Detektion mit DAB erlaubte. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit Hematoxylin erreicht. Die Aufnahmen sind in 100-facher Vergrößerung gezeigt. **A)** Negativkontrolle an normalem Schilddrüsengewebe, inkubiert mit GaletuzuFab-PAS200-Cys. **B)** Gewebe von einem papillären Schilddrüsenkarzinom, inkubiert mit GaletuzuFab-PAS200-Cys. **C)** Gewebe von einem papillären Schilddrüsenkarzinom, inkubiert mit dem monoklonalen α Gal3-Antikörper aus der Hybridomazelllinie M3/38. **D)** Gewebe eines nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms, inkubiert mit GaletuzuFab-PAS200-Cys.

3.12.2. Untersuchung der Biodistribution mit α Gal3-Immunglobulin basierten Tracern in Xenograft-Mausmodellen

Wie die Untersuchungen von Bartolazzi et. al (2008) zeigen, führt der monoklonale α Gal3-Antikörper in seiner intakten Form zu einer guten Anreicherung in den Tumoren der Xenograft-Mäuse. Darauf aufbauend stellte sich die Frage, ob ähnliche Effekte auch nach der sukzessiven Veränderung des α Gal3-Binders vom intakten IgG über das PASylierte chimäre Fab-Fragment GaletuxiFab-PAS200 hin zu der humanisierten Variante GaletuzuFab-PAS200 erreicht werden können. Um die pharmakokinetischen und bildgebenden Eigenschaften dieser neuartigen Proteintracern untersuchen zu können, wurden *in vivo* PET-Messungen mit athymischen weiblichen Foxn1^{nu/nu}-Mäusen durchgeführt, die Tumore der Schilddrüsenkrebszelllinie FRO82-1 im linken Schilddrüsenlappen aufwiesen (in Kooperation mit Dr. Calogero D'Alessandria und Francesco de Rose).

Die Konjugate DFO-GaletuxiFab-PAS200 und DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys wurden mit dem β^+ -emittierenden Radionuklid Zirkonium-89 beladen. Die radiochemische Reinheit der mittels Gelfiltration gereinigten Proteinkonjugate wurde dünn-schichtchromatographisch bestimmt und betrug in allen Fällen über 95 %. Für die PET-Studie wurde den Mäusen durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene das ^{89}Zr -beladene Konjugat mit einer Dosis von 3 MBq appliziert. Für den Vergleich der Fab-Fragmente wurden repräsentative MIP (Maximum Imaging Projection) PET-Bilder 24 h p.i. aufgenommen, d.h. zum Zeitpunkt des höchsten Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnisses. Der orthotope Schilddrüsentumor FRO-82-1 war in diesen Experimenten klar zu erkennen und zeigte die spezifische Anreicherung der PASylierten Fab-Fragmentkonjugate im linken Schilddrüsenlappen mit einem hohen Tumor-zu-Hintergrundverhältnis (Abbildung 44). Die Quantifizierung der maximalen Signalstärke im Bereich des Tumors betrug für die dargestellte mit ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 behandelte Maus 5,9 % ID/g. Für das humanisierte ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys konnte eine maximale Signalstärke von 4,3 % ID/g erreicht werden.

Zur quantitativen Erfassung der Biodistribution wurden je fünf Tumor-xenotransplantierte Versuchstiere nach der Messung 24 h p.i. sezziert, die entnommenen Organe sowie die Tumore gewogen und die aufgenommene Menge des injizierten Radiokonjugats durch γ -Szintillationszählung bestimmt (Abbildung 45, Tab. 7). Für die mit ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200-behandelten Mäuse wurde hierbei eine erhöhte Aufnahme im Tumor von $5,7 \pm 3,0$ % ID/g und für das humanisierte ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys von $4,0 \pm 2,2$ % ID/g ermittelt.

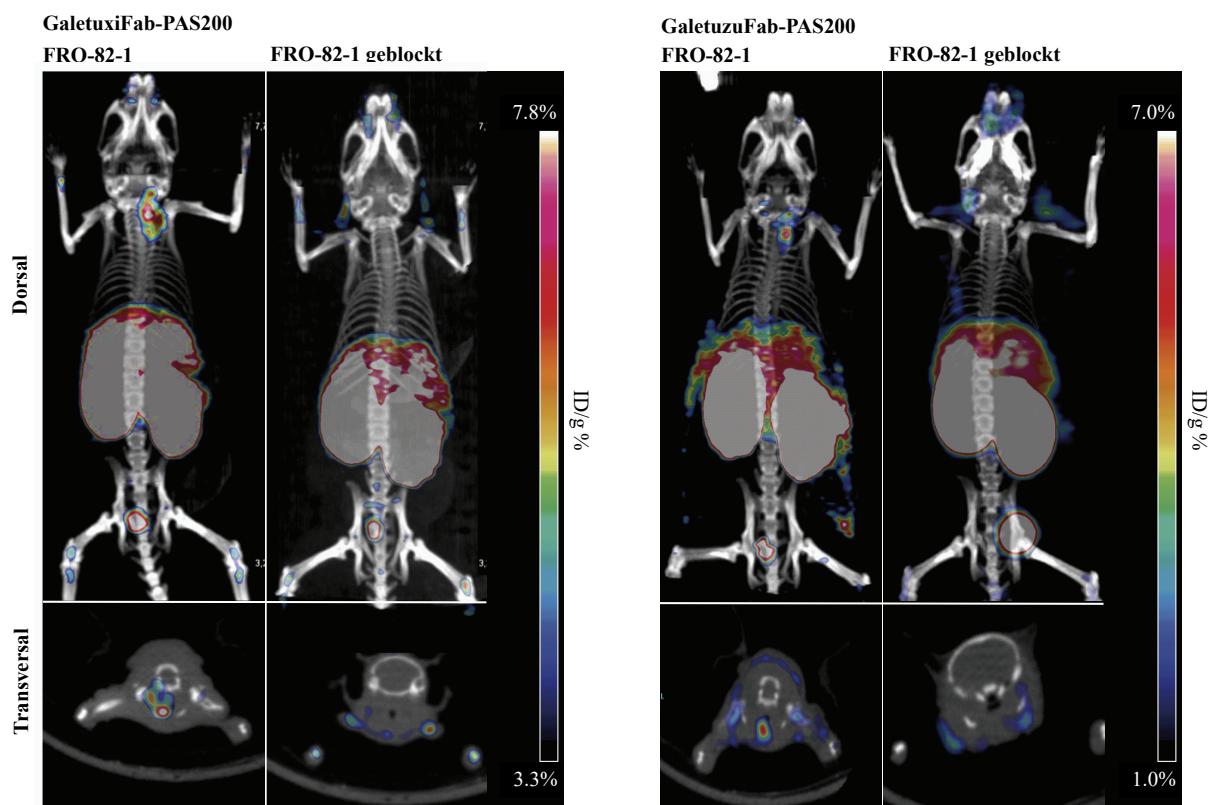


Abbildung 44 Charakterisierung der unterschiedlichen Versionen des αhGal3 -Fab-Fragments als Biomarker bei der *in vivo* Tumorbildgebung. Repräsentative PET/CT-Aufnahmen von Mäusen mit Tumor-Xenotransplantaten der FRO-82-1 Zelllinie 24 h nach Injektion von ^{89}Zr -markiertem DFO-GaletuxiFab-PAS200 (links) bzw. markiertem DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys (rechts).

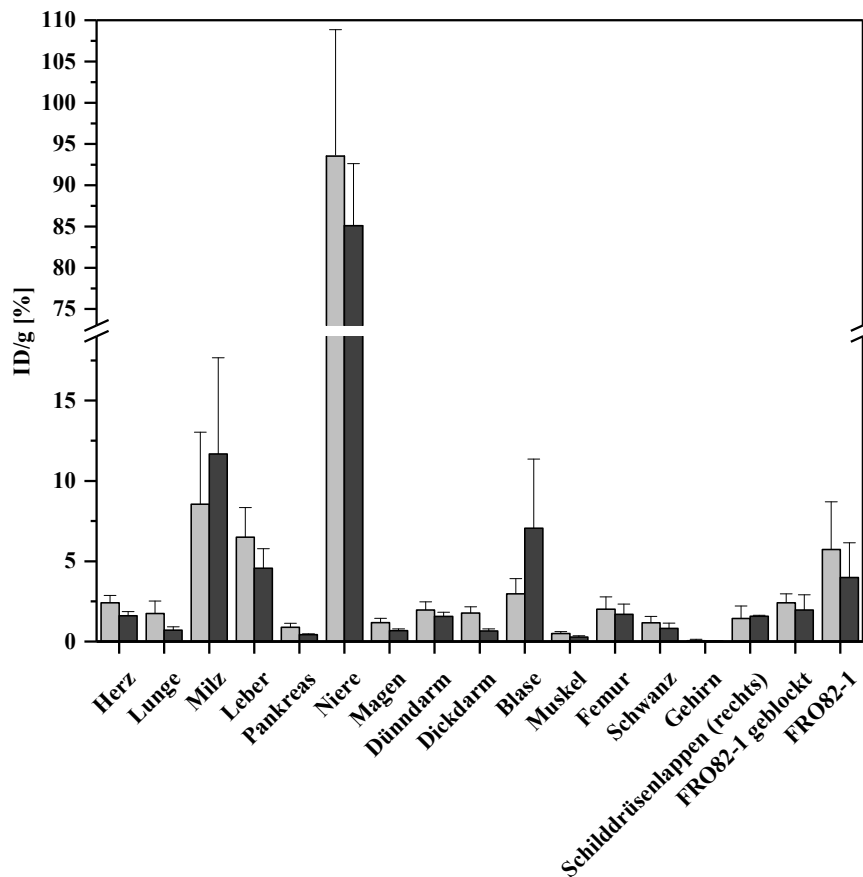


Abbildung 45 Biodistribution von ^{89}Zr -markiertem DFO-GaletuxiFab-PAS200 (hellgrau) im Vergleich zu markiertem DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys (dunkelgrau) 24 h nach Injektion in Mäusen mit FRO82-1-Xenotransplantaten. Je Fab-Variante wurde für fünf Tiere die Radioaktivität der entnommenen und gewogenen Organe durch γ -Szintillationszählung bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der organspezifischen Aktivitäten bezogen auf die injizierte Dosis.

Das Tumor-zu-Hintergrundverhältnis ließ sich in diesem Mausmodell gut durch den Vergleich mit der Signalstärke im rechten Schilddrüsenlappen bestimmen, der als interne Kontrolle verwendet wurde. Mit einer Signalstärke im rechten Schilddrüsenlappen von $1,4 \pm 0,8$ %ID/g für ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 und $1,6 \pm 0,1$ %ID/g für ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys, resultieren Tumor-zu-Hintergrundverhältnisse von 4,0:1, bzw. 2,5:1. Mäuse, die mit einem 1000-fachen Überschuss von nicht konjugiertem Fab-Fragment in Blockexperimenten untersucht wurden, zeigten einen starken Abfall der Signalstärke im linken Schilddrüsenlappen, dem Injektionsort der Krebszellen ($2,4 \pm 0,6$ %ID/g für ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 und $2,0 \pm 0,9$ %ID/g für ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys). Im Vergleich zum rechten Schilddrüsenlappen zeigte sich ein Signalverhältnis von annähernd 1:1 für beide Fab-Fragmente, was die hohe Spezifität und Selektivität gegenüber hGal3 *in vivo* beweist. Dafür sprach auch das hohe Signalverhältnis von Tumor-zu-Muskel mit 11,5:1 für ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 und 14,8:1 für das humanisierte ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys.

Eine erhöhte Anreicherung der Proteintracer wurde außerdem in der Milz ($8,8 \pm 4,4$ %ID/g, bzw. $11,7 \pm 6,0$ %ID/g) und in der Leber ($6,5 \pm 1,8$ %ID/g, bzw. $4,6 \pm 1,2$ %ID/g) nachgewiesen. Beachtet man den Katabolismus von $^{89}\text{Zr(IV)}$ Konjugaten, entsprechen diese Werte den Erwartungen (Abou et al., 2011). Die höchste Anreicherung wurde in den Nieren gefunden ($93,5 \pm 15,5$ %ID/g, bzw. $85,1 \pm 7,5$ %ID/g). Diese hohe Strahlendosis entsteht, da

die meist hydrophilen Radionuklidkonjugate hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden und teilweise wieder von den proximalen Tubuluszellen reabsorbiert werden, wo sich das Radiometall schließlich einlagert (Vegt et al., 2010). Zusätzlich zu der radionuklidbasierten PET wurden mit GaletuzuFab-PAS200-Cys fluoreszenzmolekulartomographische (FMT) Messungen durchgeführt (Abbildung 46). Für die Studie wurde den Mäusen durch intravenöse Injektion in die Schwanzvene das Nah-Infrarot-Fluoreszenzkonjugat Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys mit einer Dosis von 2 nmol verabreicht. Der Tumor der Zelllinie FRO-81-1, im linken Schilddrüsenlappen war klar zu erkennen und erreichte eine maximale Signalstärke, die einer Farbstoffkonzentration im Gewebe von 10 nM entsprach. Der Vergleich zu den Mäusen, die mit einem 1000-fachen Überschuss von nicht-konjugiertem Fab-Fragment in Blockierungsexperimenten untersucht wurden und kein detektierbares Signal zeigten, bestätigten das Ergebnis der PET-Messungen: Die Anreicherung im Tumor ist spezifisch auf hGal3.

Tabelle 7 ⁸⁹Zr-Biodistribution von DFO-GaletuxiFab-PAS200 und DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys [% ID/g] 24 h nach Injektion der radioaktiv markierten Varianten in Mäusen mit FRO82-1-Xenotransplantaten (N=5).

	GaletuxiFab-PAS200	GaletuzuFab-PAS200
Herz	2,41 ± 0,46	1,61 ± 0,26
Lunge	1,75 ± 0,77	0,71 ± 0,21
Milz	8,55 ± 4,48	11,69 ± 5,98
Leber	6,50 ± 1,84	4,57 ± 1,22
Pankreas	0,89 ± 0,25	0,43 ± 0,06
Niere	93,53 ± 15,33	85,09 ± 7,53
Magen	1,18 ± 0,27	0,67 ± 0,11
Dünndarm	1,97 ± 0,50	1,57 ± 0,26
Dickdarm	1,77 ± 0,39	0,66 ± 0,13
Blase	2,97 ± 0,95	7,05 ± 4,31
Muskel	0,50 ± 0,13	0,28 ± 0,08
Femur	2,01 ± 0,76	1,70 ± 0,63
Schwanz	1,17 ± 0,40	0,82 ± 0,33
Gehirn	0,06 ± 0,08	0,02 ± 0,01
Schilddrüsenlappen (rechts)	1,43 ± 0,78	1,58 ± 0,06
FRO82-1 geblockt	2,42 ± 0,55	1,97 ± 0,94
FRO82-1	5,73 ± 2,96	3,99 ± 2,15

Cy7- GaletuzuFab-PAS200

FRO-82-1

FRO-82-1 geblockt

nM

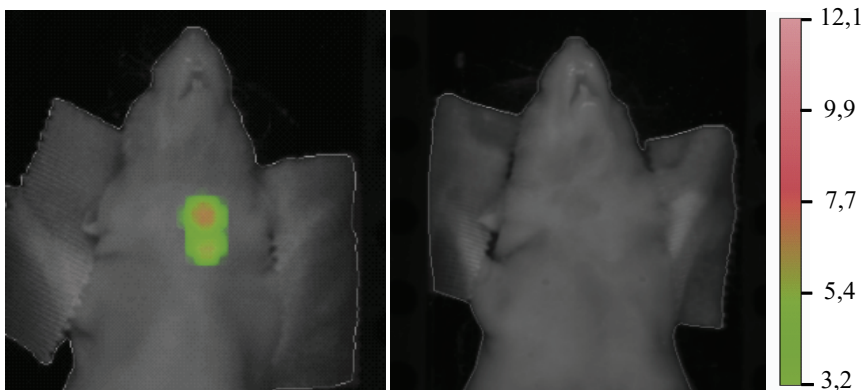


Abbildung 46 Charakterisierung von Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys als Biomarker für die *in vivo* Bildgebung. Repräsentative FMT-Aufnahmen von Mäusen mit Tumor-Xenotransplantaten der FRO-82-1 Zelllinie 24 h nach Injektion von Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys (links) bzw. dem Kontrollexperiment mit einem 1000-fachen Überschuss von unmarkiertem GaletuzuFab-PAS200-Cys (rechts).

4. Diskussion

4.1. Das Fab als ideales Antikörperfragment für die bildgebende Immundiagnostik

Intakte Antikörper sind hochspezifische, hochaffine und multivalente Reagenzien. Durch ihre Struktur bestehend aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten, die über nicht kovalente Wechselwirkungen und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, können zwei benachbarte Antigene auf einer Tumorzelle gebunden werden. Dies verstärkt die Interaktion durch den Aviditätseffekt und führt zu längeren Retentionszeiten. Eine weitere wichtige Eigenschaft von intakten Antikörpern betrifft die Fc-Region. Diese ist in der Lage zytotoxische Effektorfunktionen zu vermitteln. Hierbei kann zum einen durch Moleküle mit einer Affinität zum Fc-Rezeptor das Komplementsystem aktiviert werden oder es kommt zu einer direkten Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems. Des Weiteren hat die Fc-Region einen wichtigen Einfluss auf die Plasmahalbwertszeit von Antikörpern, die mit 1 - 3 Wochen im Menschen und 6 - 8 Tagen in Mäusen ungewöhnlich lang ist (Spiegelberg and Weigle, 1965). Normalerweise steht die Plasmahalbwertszeit in einem proportionalen Verhältnis zur Größe des Proteins. Der Grund hierfür liegt in der Filtration des Plasmas durch die Nieren, die der Exkretion von löslichen Metaboliten dient. Um den Verlust von Serumproteinen aus dem Blut in den Urin zu begrenzen, besitzen die Nieren Gefäßknäule (*Glomeruli*), deren Epithelzellen (*Podozyten*) eine kammartige Struktur aufweisen. Dieses Strukturmerkmal dient als gröbenselektive Barriere für Makromoleküle die über 70 kDa groß sind. Mit einer Größe von 150 kDa wird ein IgG durch diese Barriere vom Primärfiltrat effizient zurückgehalten. Auf der Oberfläche der Podozyten werden jedoch auch Fc-Rezeptoren (FcRn) exprimiert, die eine teilweise Transzytose der IgG von der basolateralen Oberfläche in den Primärharn erlaubt (Akilesh et al., 2008). Der genaue Grund für den indirekten Weg der Transzytose und Reabsorption der IgG Moleküle ist nicht abschließend geklärt. Eine mögliche Erklärung für diesen ungewöhnlichen Mechanismus ist, dass es aufgrund der großen zurückgehaltenen Menge an IgG zu einer Verstopfung der Podozyten kommen kann. Nach der glomerulären Filtration geht der Primärharn in den proximalen Tubulus und daraufhin in die Henlesche Schleife über, wo er nach dem Gegenstromprinzip aufkonzentriert wird. Dabei werden Glucose und Aminosäuren zurückgewonnen. Gleichzeitig kann hier IgG über eine durch FcRn vermittelte Transzytose zurück in den systemischen Kreislauf gelangen (Kobayashi et al., 2002).

Ein weiterer Grund für die lange Plasmahalbwertszeit von Antikörpern resultiert ebenfalls aus einem FcRn vermittelten Schutzmechanismus während der Pinozytose. Die Pinozytose ist eine relativ unspezifische Form der Endozytose, bei der Makromoleküle in die Endothelzellen aufgenommen werden und nach Ausbildung von Endosomen entweder der Wiederverwertung oder dem Abbau zugeführt werden. Aufgrund der großen Oberfläche von Endothelzellen im Körper ($>1000 \text{ m}^2$) führt dies zu einer effizienten Eliminierung von Proteinen und würde auch IgG Moleküle betreffen. Die im endosomalen Lumen vorhandenen FcRn interagieren aufgrund des dort vorherrschenden sauren Milieus mit dem Fc-Teil der Immunglobuline und werden in Recycling Endosome transportiert was den Abbau im Lysosom verhindert. Verschmilzt das Endosom wieder mit der Zellmembran wird die Interaktion des FcRn mit dem IgG-Molekül aufgrund des neutralen pH-Wertes im Blut geschwächt und führt erneut zur Freisetzung des Immunglobulins (Pyzik et al., 2015).

Durch die hohe Avidität, cytotoxische Wirkung und lange Zirkulationsdauer besitzen intakte Antikörper ein breites therapeutisches Spektrum. Auch wenn der Erfolg des IgG-Formats zum Teil auf historisch gewachsenen Erfahrungen beruht, ist es doch interessant zu sehen, dass immer noch 10 der 12 im Jahr 2018 zugelassenen Antikörperbasierten Therapeutika klassische mAk sind (Kaplon and Reichert, 2019). Trotzdem kann man nicht von einer

“Universallösung” für alle therapeutischen oder diagnostischen Anwendungen sprechen. Beispielweise muss für radiomarkierte Proben die Pharmakokinetik an das verwendete Radionuklid angepasst werden. Die ideale therapeutische bzw. diagnostische Wirkung erfordert eine Balance zwischen der Anreicherung und Dissoziation am Zielgewebe sowie der Plasmahalbwertszeit, was den Signalhintergrund entscheidend beeinflusst. Andernfalls kommt es zur Anreicherung in der Leber und einer unnötigen Strahlenbelastung des gesunden Gewebes. Ein guter Radiomarker führt dementsprechend zu einer schnellen Tumorpenetration bei langen Retentionszeiten und kurzer Plasmahalbwertszeit. Dies wird durch ein komplexes Zusammenspiel aus Affinität, Valenz und Proteingröße beeinflusst.

Biodistributionsstudien an soliden Tumoren mit radiomarkierten intakten mAk zeigen, dass diese zu groß für eine schnelle Tumorpenetration sind (Yazaki et al., 2001). Der Grund für die größenabhängige Tumorpenetration liegt in den morphologischen Unterschieden von Neoplasien zu gesundem Gewebe. In gesundem Gewebe werden über das ausdifferenzierte Gefäßsystem Makromoleküle durch Konvektion, Transzytose und Diffusion mit dem Plasma im Gleichgewicht ausgetauscht (Jain, 1999). In Neoplasien hingegen ist das lymphatische System nur schlecht ausgebildet (Swartz and Skobe, 2001), was zu einem erhöhten hydrostatischen Druck des Interstitiums führt und dadurch den Stoffaustausch behindert (Jain and Baxter, 1988). Als Folge dessen findet der Austausch primär über eine Diffusion durch Poren statt. Die Geschwindigkeit der makromolekularen Extravasation ist dabei abhängig von dem kapillaren Oberflächen-zu-Tumor Verhältnis und der Permeabilisationsrate des Moleküls. Für kleine Moleküle mit schnellen Diffusionsraten spielt dies eine geringere Rolle, für Makromoleküle wie Antikörper ist die Extravasation jedoch stark vermindert (Thurber et al., 2007). Das Resultat ist eine vielfach geringere Antikörperkonzentration im Tumor verglichen mit dem Plasma zu frühen Zeitpunkten nach der Injektion, so dass erst nach Eliminierung aus der Zirkulation eine diagnostisch nutzbare Anreicherung beobachtet werden kann. Insbesondere für die Behandlung von soliden Tumoren spielt dies eine entscheidende Rolle, da durch diesen Effekt eine schlechte Penetration von voluminösen Tumoren gegeben ist (Minchinton and Tannock, 2006).

Die Verkleinerung des IgG-Formats ist ein Ansatzpunkt, um eine bessere Tumorpenetration zu ermöglichen. Da für die Immun-PET Bildgebung die durch die Fc-Region vermittelte Effektorfunktion keine Rolle spielt und die dadurch vermittelte lange Plasmahalbwertszeit zudem hinderlich ist, sind Antikörperfragmente für diese Anwendung interessanter. Das kleinste verfügbare Ig-Format, das ohne Veränderung der konventionellen Epitop/Paratop-Interaktion auskommt, ist das scFv (*single chain variable Fragment*). Dieses besteht lediglich aus dem variablen Bereich der leichten Kette, welches über einen Peptidlinker mit dem variablen Bereich der schweren Kette fusioniert ist (Bird et al., 1988). Durch die geringe Größe von circa 25 kDa penetriert das scFv Tumore mit einer sechsfach schnelleren Geschwindigkeit (Graff and Wittrup, 2003). Durch die Fusion der beiden Ketten wird in der Regel der C-Terminus der leichten Kette mit dem N-Terminus der schweren Kette verbunden. Da im nativen scFv der N-terminus in der Nähe der CDR lokalisiert ist, kann hierdurch die Epitop/Paratop-Interaktion beeinflusst werden.

Wie in Abschnitt 3.4.3 gezeigt werden konnte, führt der Austausch der N-terminalen Aminosäuren in GaletuxiFab zu einem Affinitätsverlust um den Faktor 4, was die Bedeutung dieser Regionen für die Gal3-Bindung aufzeigt. Abschließend kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht geklärt werden, ob beide N-Termini oder nur einer für die Interaktion mit Gal3 verantwortlich ist und eine Verkleinerung des Formats zum scFv einen Affinitätsverlust zur Folge hätte. Jedoch zeigt dieses Beispiel deutlich die Nachteile der Kettenfusion im scFv-Format. Außerdem hat das scFv einen weiteren Nachteil im Vergleich zum intakten IgG: Durch hydrophobe Interaktionen zwischen

den konstanten Domänen, wobei insbesondere die Domänen C_{H1} und C_{κ} bzw. C_{λ} zu nennen sind, wird die Flexibilität der Struktur stark eingeschränkt, was entscheidende Auswirkung auf die Faltungstabilität hat.

In diesem Zusammenhang besitzt das Fab-Format interessante Eigenschaften. Es besteht aus dem Arm eines intakten IgG: also der C_{H1} und V_H Domäne der schweren Kette sowie der vollständigen leichten Kette, bestehend aus C_{κ} bzw. C_{λ} und V_L . Beide Ketten sind über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Mit einer Größe von circa 50 kDa ist das Fab-Format noch klein genug, um eine ausreichende Gewebepenetration zu ermöglichen. Aufgrund der hydrophoben Interaktion der konstanten Domänen zeigt es jedoch eine Faltungstabilität vergleichbar zum intakten IgG.

Ein Ziel dieser Arbeit war die gentechnische Herstellung des Gal3 bindenden Fab, ausgehend von dem monoklonalen Antikörper α -hGal3-mAk. Die Produktion disulfidverbrückter Immunglobulinfragmente in *E. coli* ist beschrieben (Skerra and Pluckthun, 1988) und wird auch im industriellen Maßstab angewendet. Doch zeigte sich, dass mit dieser Methode nicht jedes Immunglobulin erfolgreich hergestellt werden kann. Der natürliche Ort der IgG-Biosynthese, das endoplasmatische Retikulum (ER) von eukaryotischen Zellen ist auf die Faltung von derart komplexen Proteinen optimiert. Das Lumen des ER hat ein oxidatives Milieu, das für die Ausbildung der Disulfidbrücken essentiell ist. Im ER katalysieren spezielle Disulfidisomerasen die Disulfidausbildung. Zudem sind weitere Chaperone an der Faltung der IgG beteiligt. Besonders die schwere Kette neigt in ihrer monomeren Form zu Missfaltung und Aggregation. Nur durch die Interaktion mit dem Faltungshelferprotein BiP aus der Hsp70-Superfamilie kann das Monomer so lange stabilisiert werden, bis sich ein Komplex mit der leichten Kette bildet (Feige et al., 2010). In *E. coli* sind diese Chaperone jedoch nicht vorhanden und im Cytoplasma, dem primären Ort der Proteinbiosynthese, herrscht ein stark reduzierendes Milieu. Bei dem von Skerra und Plückthun (1988) beschriebenen System wird das Protein genetisch mit bakteriellen Signalpeptiden fusioniert, was die Translokation über die innere Zellmembran durch das *E. coli* eigene Typ II-Sekretionssystem erlaubt. Im oxidierenden Milieu des Periplasmas können sich nach der Translokation die Disulfidbindungen ausbilden, sodass Proteine mit strukturell essentiellen Disulfidbrücken mit dieser Methode produziert werden können. Durch das Fehlen passender Chaperone ist diese Methode jedoch auf die Produktion von faltungstabilen IgG-Fragmenten beschränkt.

Das Fab-Fragment bietet im Vergleich zum scFv aufgrund seiner Faltungstabilität einerseits und dem potentiell nachteiligen Einfluss der Linker auf die Affinität der Antikörperfragmente andererseits einen besseren Ausgangspunkt für die translationale Entwicklung eines rekombinanten IgG. Hierbei ist es für den Erhalt der Affinität nicht notwendig die ursprünglichen konstanten Domänen aus der Ratte zu verwenden. Zwischen den beiden Domänenpaaren C_{H1} / C_{κ} und V_H / V_L gibt es wenig strukturelle Wechselwirkungen. Die kovalente Verbindung von variabler und konstanter Domäne ist durch einen flexiblen Linker realisiert, der eine große Variation in der relativen Anordnung (*Elbowangle*) erlaubt (Stanfield et al., 2006). Diese Unabhängigkeit ist ein wichtiges Detail, das zum Erfolg der Antikörpertherapie beigetragen hat.

Anfängliche Therapieversuche mit monoklonalen Antikörpern aus Nagetieren scheiterten häufig an einer Immunreaktion gegen die fremden Proteine bekannt als Human-anti-Maus-Antwort (HAMA), was von milden Reaktionen wie Ausschlag bis hin zu lebensbedrohlichen Reaktionen wie Organversagen führen kann (Azinovic et al., 2006). Generell führt die Gabe von hohen Dosen therapeutischer Proteine nicht humanen Ursprungs zu einer stabilen Immunantwort innerhalb von 2 - 3 Wochen (Tjandra et al., 1990). Interessanterweise scheint es jedoch Personen zu geben, die schon vor der Therapie eine Immunreaktivität gegen murine Antikörper besitzen (Klee, 2000), sodass schon bei der initialen Verabreichung eines therapeutischen Proteins mit einer Immunreaktion gerechnet

werden muss. Durch die Entwicklung von chimären Antikörpern, bei denen die variablen Domänen nicht-humanen Ursprungs mit konstanten Domänen humanen Ursprung kombiniert werden, lässt sich der Anteil potentiell immunogener Epitope minimieren, sodass die Reaktion weitgehend unterbunden werden kann (Morrison et al., 1984). Durch die Einführung der Genabschnitte für die variablen Domänen des α -hGal3-mAk in den Vektor pASK88 konnte das chimäre Gal3 bindende Fab-Fragment GaletuxiFab im Periplasma von *E. coli* produziert werden. Hierbei zeigten sich die Vorteile des vergleichsweise stabilen Fab-Formats. So war das Aggregationsverhalten von GaletuxiFab vernachlässigbar und es konnte durch die angewendete Reinigungsstrategie in seiner monodispersen Form isoliert werden. Allerdings lag die Ausbeute mit 180 μ g pro Liter Kulturmedium unterhalb üblicher Erfahrungswerte. Unter Optimalbedingungen kann diese bis zu 10 mg pro Liter Kulturmedium betragen. Häufig führt die Expression von Fremdgenen zu toxischen Effekten im bakteriellen Expressionsorganismus, was negative Auswirkungen auf die Expressionsausbeute haben kann (Plückthun and Skerra, 1989). Dies zeigte sich durch eintretende Zellyse auch bei der Expression von GaletuxiFab, sodass die Expressionsdauer auf 2 h beschränkt werden musste. Um trotzdem für die *in vivo* Studien ausreichende Mengen des Fab-Fragments zu produzieren, wurde eine Hochzelldichtefermentation etabliert. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte, eignen sich Selektionssysteme basierend auf der β -Lactamase, wie im Fall von pASK88 nur bedingt unter diesen Bedingungen. Die äußere Bakterienmembran wird im Verlauf der Sekretion des Fremdproteins schneller permeabel als die Cytoplasmamembran, was zu einer Freisetzung der im periplasmatischen Raum vorkommenden β -Lactamase führen kann. Diese wiederum zersetzt das im Medium präsente Ampicillin, was den Selektionsdruck beeinträchtigt (Plückthun and Skerra, 1989). Um dies zu umgehen, wurde für die Fermentation das Expressionsplasmid pASK111 verwendet, dessen Selektionssystem auf der cytoplasmatischen Chloramphenicol-Acetyltransferase beruht. Durch diese Maßnahme konnte die Zellyse verringert werden.

4.2. Charakterisierung der Epitop/Paratop-Interaktion zwischen Gal3 und GaletuxiFab

Die Affinität zwischen zwei Interaktionspartnern ist charakterisiert durch das dynamische Gleichgewicht zwischen der Assoziation und der Dissoziation des Komplexes. Für die Interaktion von intakten IgG ist im Fall oberflächenassoziierter Antigene zudem der Aviditätseffekt entscheidend. Durch die multivalente Bindung führt hierbei die transiente Dissoziation einer Bindungsstelle nicht sofort zur Diffusion des Antikörpers und eine erneute Assoziation ist aufgrund der gegebenen Nähe zu diesem Antigen wahrscheinlich. Die Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) des Komplexes ist daher bei multivalenten Liganden von geringerer Bedeutung (Vauquelin and Charlton, 2013). Für Anwendungen, bei denen das intakte IgG verwendet werden soll, hat dies in der Regel keine Auswirkungen, da eine spezifische Anreicherung im Zielgewebe aufgrund der Avidität möglich ist. Für alternative Ig-Formate, bzw. Fragmente ohne bivalente Bindungsmodi ist eine langsame Dissoziationsrate jedoch essentiell. Tatsächlich ist die Umwandlung eines bivalenten intakten IgG in das kleinere Fab-Format häufig mit dramatischen Affinitätsverlusten verbunden.

Für die funktionelle Charakterisierung als Antigen waren aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften von Gal3 einige Besonderheiten zu beachten. Ein wichtiger Aspekt hierbei war die natürliche Bindungsfunktion von Gal3 gegenüber glycolysierten Proteinen. Erste ELISA Experimente, bei denen Gal3 immobilisiert und die Bindung von GaletuxiFab mit Hilfe des HRP-Fusions-Sekundärantikörper nachgewiesen wurden, zeigten kein konzentrationsabhängiges Bindungsverhalten (nicht gezeigt). Weitere Experimente ließen darauf schließen, dass es zu einer direkten Bindung zwischen Gal3 und dem glykosylierten Sekundärantikörper kommt. Unter Nutzung der

moderaten Affinität von Gal3 zu Lactose mit $K_D = 0,6 \mu\text{M}$ (Hsu et al., 1992), konnte durch Verwendung einer hohen Lactosekonzentration (100 mM) im Inkubationspuffer die Interaktion mit dem Sekundärantikörper unterdrückt werden. Im direkten Vergleich konnte mit diesem ELISA für das chimäre Fab-Fragment GaletuxiFab mit 1,7 nM eine ähnlich hohe Affinität wie für das proteolytische Fab nachgewiesen werden.

Unabhängig vom IgG-Format scheint es ein ideales Affinitätsspektrum von 1 - 10 nM zu geben, bei dem eine maximale Tumorpenetration beobachtet wird (Zhou et al., 2012). Dies lässt sich mit dem als „Binding Site Barrier“ beschriebenen Effekt erklären: Sehr hohe Affinitäten führen nach einer ersten Bindungswechselwirkung an der Tumoroberfläche zu einer stabilen Komplexbildung mit nur langsamer Dissoziation. Dies ist jedoch notwendig, um auch in tieferliegenden Gewebeschichten vorkommende Epitope erreichen zu können. Durch das Ausbleiben dieses Transfers kommt es zu einer regelrechten Abschirmung des Tumorerinneren, die in einer stark heterogenen Verteilung des Antikörpers resultiert. Insbesondere für eine diagnostische Anwendung ist dieser Effekt hinderlich (Fujimori et al., 1990). Demnach kann die Affinität von GaletuxiFab für einen diagnostischen Nutzen als ideal eingestuft werden.

Die parallel durchgeführten SPR-Analysen zeigen ein ähnliches Bild. Auch hier konnte für GaletuxiFab und das proteolytische Fab-Fragment eine vergleichbare Affinität ermittelt werden. Diese lag mit 0,29 nM für GaletuxiFab annähernd um einen Faktor 10 unter der im ELISA gemessenen Affinitäten. Bei einer genaueren Betrachtung der Epitop/Paratop-Interaktion lässt sich dieser Unterschied erklären. Das mit dem Peptid-SPOT-Array bestimmte Epitop APPGAY ist zweimal in der Sequenz von Gal3 präsent, wobei jeweils die benachbarten Aminosäuren variieren und die Auswertung des Peptid-SPOT-Array unterschiedliche Bindungsintensitäten für beide Sequenzabschnitte anzeigte. Weiterhin lässt sich aus der in dieser Arbeit aufgeführten Kristallstruktur erkennen, dass das Epitop-Peptid nicht die vollständige Antigen-Bindestelle bedeckt, sondern es hauptsächlich zu einer Interaktion der CDRH1-3, CDRL1 und CDRL3 kommt. Typischerweise haben Antigene eine mittlere Länge von 20 Aminosäuren (Stave and Lindpaintner, 2013), was dafür spricht, dass das Minimalepitop nicht alleine für die Interaktion verantwortlich sein kann und ein Einfluss der benachbarten Aminosäuren besteht. Dies zeigt sich auch an dem Einfluss der N-Termini der Ig-Ketten, der bei den Bindungsanalysen des zuerst klonierten Fab-Fragments beobachtet wurde, jedoch in der Co-Kristallstruktur nicht zu erkennen war. Für die Interaktion von GaletuxiFab und Gal3 bedeutet dies, dass es vermutlich zwei Paratop-Epitop-Interaktionen gibt, die jedoch aufgrund der unterschiedlichen Nachbaraminosäuren des Minimalepitops unterschiedliche Affinitäten aufweisen. Dieses als biphasische Bindungsverhalten bekannte Phänomen konnte auch bei der Etablierung der SPR-Messungen beobachtet werden. Anfängliche Versuche, bei denen hohe Konzentrationen des Analyt Gal3 (265 nM) eingesetzt wurden, folgten dem typischen Verhalten von biphasischen Bindungsmodi, mit einer zunächst sehr schnellen Dissoziation die im Verlauf der Messung von einer langsamen Dissoziation überlagert wurde (nicht gezeigt). Biphasische Interaktionen sind komplexe Prozesse, die sich gleichermaßen durch eine Vielzahl an Modellen beschreiben lassen. Ausgehend von den Messungen ist es so gut wie unmöglich auf das richtige Modell zu schließen, sodass die beste Option eine Optimierung der experimentellen Bedingungen ist (Rich and Myszka, 2008). Eine Verbesserung der Simulation zeigte sich durch Verringerung der Analytkonzentration auf maximal 4,05 nM. Durch die Verringerung wird vermutlich bevorzugt das höheraffine Epitop gebunden, sodass die Interaktion annähernd durch ein 1 zu 1 Bindungsmodell beschrieben werden kann. Die gemessene Affinität von 0,29 nM gibt somit die Affinität des höheraffinen Epitops an, wohingegen das Ergebnis des ELISA die mittlere Affinität beider Epitope darstellt. Aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit ist es ungewiss, welche Situation *in vivo* gegeben ist. Doch lässt sich mit

beiden Methoden zeigen, dass trotz Verlust des Aviditätseffekts in dem Fab-Fragment eine ausreichend hohe Affinität vorhanden ist.

Eine weitere für die klinische Translation der Methode wichtige Fragestellung ist die Vergleichbarkeit des Modellorganismus Maus zu Mensch. Speziell auf molekularer Ebene ist es relevant, ob die Bindung von GaletuxiFab sich auf das humane Gal3 beschränkt oder eine Kreuzreaktivität gegenüber dem murinen Gal3 besteht. So kann die exklusive Expression von hGal3 in den Xenografttumoren zu einer hohen Akkumulation bei geringer Anreicherung in anderen Organen ein Ergebnis vortäuschen, das im Menschen nicht repliziert werden kann. Die sich wiederholende Abfolge der Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly-X-X-X Linkersequenz unterscheidet sich zwar innerhalb der einzelnen Säugetierarten, ist jedoch zwischen Maus und Mensch stark konserviert. Das Minimalepitop kommt genau wie beim Menschen zweimal vor, wobei in einem Fall die benachbarten Aminosäuren variieren (Abbildung 26 D).

4.3. PASylierung als innovative Technologie zur Optimierung der Plasmahalbwertszeit von Proteinen

Auch wenn kleine IgG Formate, wie das Fab-Fragment, vorteilhafte Eigenschaften hinsichtlich Tumorenpenetration bieten, ist die sehr kurze Halbwertszeit von wenigen Stunden hinderlich, um eine hohe Anreicherung zu erreichen. Der Schwellwert von 70 kDa wird allgemein als kritische Größe angesehen, um die schnelle renale Filtration effizient zu verhindern. Wie Mendler et al. (2014) zeigen konnten, lässt sich durch genetische Fusion von PAS-Polymeren variabler Länge die Halbwertszeit von Fab-Fragmenten soweit verändern, dass die Akkumulation im Tumor auf ein Optimum angepasst werden kann. Interessanterweise können selbst solche Fusionsproteine mit einer Größe vergleichbar zu einem intakten Antikörper das Tumorgewebe homolog und effizient penetrieren. Begründen lässt sich dies mit der flexiblen Random Coil Konformation, die im Vergleich zu den globulären IgG-Molekülen dem linearen PAS-Polypeptid gute Diffusionseigenschaften verleiht (Schlapschy et al., 2013). Insbesondere das PAS200-Polypeptid zeigt hierbei für die Immun-PET Bildgebung interessante Eigenschaften. So konnte durch die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens eines CD20 bindenden Fab-Fragments eine 12-fach verbesserte Aufnahme im Tumorgewebe erreicht und das Tumor-zu-Blut Verhältnis um das 2 - 4-fache verbessert werden (Mendler et al., 2014).

Um GaletuxiFab als Fusionsprotein mit dem PAS200-Polypeptid zu produzieren, wurde eine genetische Fusion an den C-Termini der beiden Ketten durchgeführt. Im Gegensatz zu früher beschriebenen Konstrukten wie α -Her2-Fab-PAS200 (Schlapschy et al., 2013) oder α -CD20-Fab-PAS200 (Mendler et al., 2014) führten die Versuche einer Fusion mit der leichten Kette hier zu dramatischen Ausbeuteverlusten. Zwar konnte mittels Western-Blot-Analyse kleinsten Mengen des Fab-Fragments im Gesamtzellaufschluss sowie in der periplasmatischen Fraktion detektiert werden, doch ließ sich die Ausbeute durch veränderte Expressionsdauer und unterschiedliche Expressionstemperaturen nicht steigern. Im Gegensatz dazu konnte das Fusionskonstrukt mit dem PAS200-Polymer an der schweren Kette des Fab-Fragments ohne Ausbeuteverluste gegenüber dem einfachen Fab-Fragment produziert und gereinigt werden. Dieser Unterschied wirft Fragen auf.

Vergleicht man beide Konstrukte, so wurde dieselbe codierende Region mit identischem Codon Bias verwendet, sodass eine verminderte Translation aufgrund von seltenen tRNA ausgeschlossen werden kann. Auch zelltoxische Effekte des überexprimierten Proteins sind unwahrscheinlich. Falls das PAS-Polymer einen biologischen Effekt besitzt, sollte dieser unabhängig von den strukturell sehr ähnlichen Fusionskonstrukten gegeben sein. Ein Grund

für den großen Unterschied könnte die Sekretion der ungefalteten Einzelketten in das Periplasma von *E. coli* zur Ausbildung der Disulfidbrücken sein. Wie schon oben erwähnt, besitzt *E. coli* keine Faltungshelferproteine, die Faltungsintermediate stabilisieren, sodass nur Fab-Fragmente mit stabilen Faltungsintermediaten auf Ebene der beiden getrennten Ketten produziert werden können. In diesem Zusammenhang kann der abschirmende Effekt des PAS-Polymers durchaus auch negative Auswirkungen auf die Dimerisierung der beiden Ketten haben. Der Einfluss von lokalen Wechselwirkungen lässt sich hierbei jedoch so gut wie nicht vorhersagen und auch minimale Änderungen können die Proteinfaltung stören, sodass es zur Aggregation der Einzelketten kommen kann.

4.4. Humanisierung von Immunglobulinen im Hinblick auf verringerte Immunogenität

Obwohl für die Reduktion der Immunogenität von Antikörpern verschiedene Methoden entwickelt wurden, ist das CDR Grafting, das von Sir Greg Winter und Kollegen entwickelt wurde immer noch die verbreitetste Methode (Safdari et al., 2013). Transgene Mäuse (Xenomaus- oder UltiMab-Technologie) tragen einen großen Teil des humanen Immunglobulin-Lokus und können alternativ dazu verwendet werden, „humane“ Antikörper zu erzeugen (Brüggemann et al., 2015). Bis heute fehlt jedoch der Beweis, dass diese ein geringeres Risiko in Bezug auf Immunogenität bieten. Humane Antikörper aus Bakteriophagen-Bibliotheken von humanen variablen Domänen müssen ebenfalls nicht humanisiert werden, benötigen jedoch in der Regel etliche zusätzliche Mutationen um eine hohe Affinität zu erzeugen (Frenzel et al., 2016), sodass kaum ein Vorteil gegenüber der Humanisierung von Antikörpern durch CDR-Grafting im Hinblick auf Immunogenität besteht. Durch den hohen initialen Aufwand der beiden zuletzt genannten Technologien, wie Einlizenzierungskosten oder Erstellung einer eigenen Bibliothek, stellt die Immunisierung von Nagetieren aktuell immer noch den einfachsten Weg zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern dar. Die Gerüststruktur der variablen Domänen von Antikörpern aus Nagetieren und Menschen haben eine ähnliche Tertiärstruktur und die kanonischen Strukturen der CDR sind trotz Sequenzunterschieden ähnlich (Jones et al., 1986). In der Regel können daher strukturell ähnliche humane Gerüste gefunden werden, die für ein effektives CDR-Grafting geeignet sind. Jedoch muss hierfür die Struktur des zu humanisierenden Antikörpers bekannt sein. Die Struktur eines Antikörpers lässt sich zwar basierend auf der Aminosäuresequenz über Homologievergleiche wie in Abschnitt 3.7 gezeigt modellieren, doch ist dies ein relativ schwieriges und unsicheres Unterfangen, das stark von den initial verwendeten Strukturdaten abhängig ist. Insbesondere die Bestimmung der CDR-3D-Konformation, die zum einen stark von der Epitop/Paratop-Interaktion abhängt und zum anderen hohe strukturelle Variationen aufweist, stellt eine große Herausforderung dar und ließ sich zumindest im vorliegenden Fall nicht ausreichend genug durch einen Homologievergleich ermitteln. Ein Vergleich der modellierten mit der später röntgenkristallographisch gewonnenen Struktur (Abbildung 47) zeigt insbesondere für die schwere Kette Abweichungen der α -Atome der CDR von bis zu 2 Å, die für die folgende Suche nach homologen humanen Strukturen gravierende Nachteile hat. Die Ergebnisse der Datenbankanalyse zeigen dementsprechend keinerlei Übereinstimmung zwischen den Suchen der modellierten (Tab. 2) und der röntgenkristallographisch (Tab. 5) ermittelten Struktur. Dass ein erfolgreiches CDR-Grafting jedoch mit einer korrekten Struktur realisierbar ist, lässt sich eindrucksvoll an den Affinitätsmessungen der entsprechenden humanisierten Kandidaten zeigen (siehe Abschn. 3.10). Tatsächlich konnte ausgehend von der kristallographisch ermittelten Struktur in 3 von 4 Fällen die Affinität annähernd vollständig hergestellt werden, wohingegen die Affinität des humanisierten Fab anhand der modellierten Struktur um den Faktor 1000 geringer war.

Wie Foote und Winter (1992) zeigen konnten, ist es möglich, die ursprüngliche Affinität eines Antikörpers nach einem CDR-Grafting durch gezielte Mutationen wiederherzustellen. Einige Aminosäuren des Gerüsts, die als Verankerungs-Region bezeichnet werden (VH: 2, 27, 28, 29, 30, 47, 48, 49, 67, 69, 71, 73, 78, 93, 94, 103 und VL: 2, 4, 35, 36, 46, 47, 48, 49, 64, 66, 68, 69, 71, 98), bilden hierbei eine Art strukturelle Plattform für die 6 CDR-Schleifen und haben darüber hinaus großen Einfluss auf deren Konformation und die gegenseitige Ausrichtung.

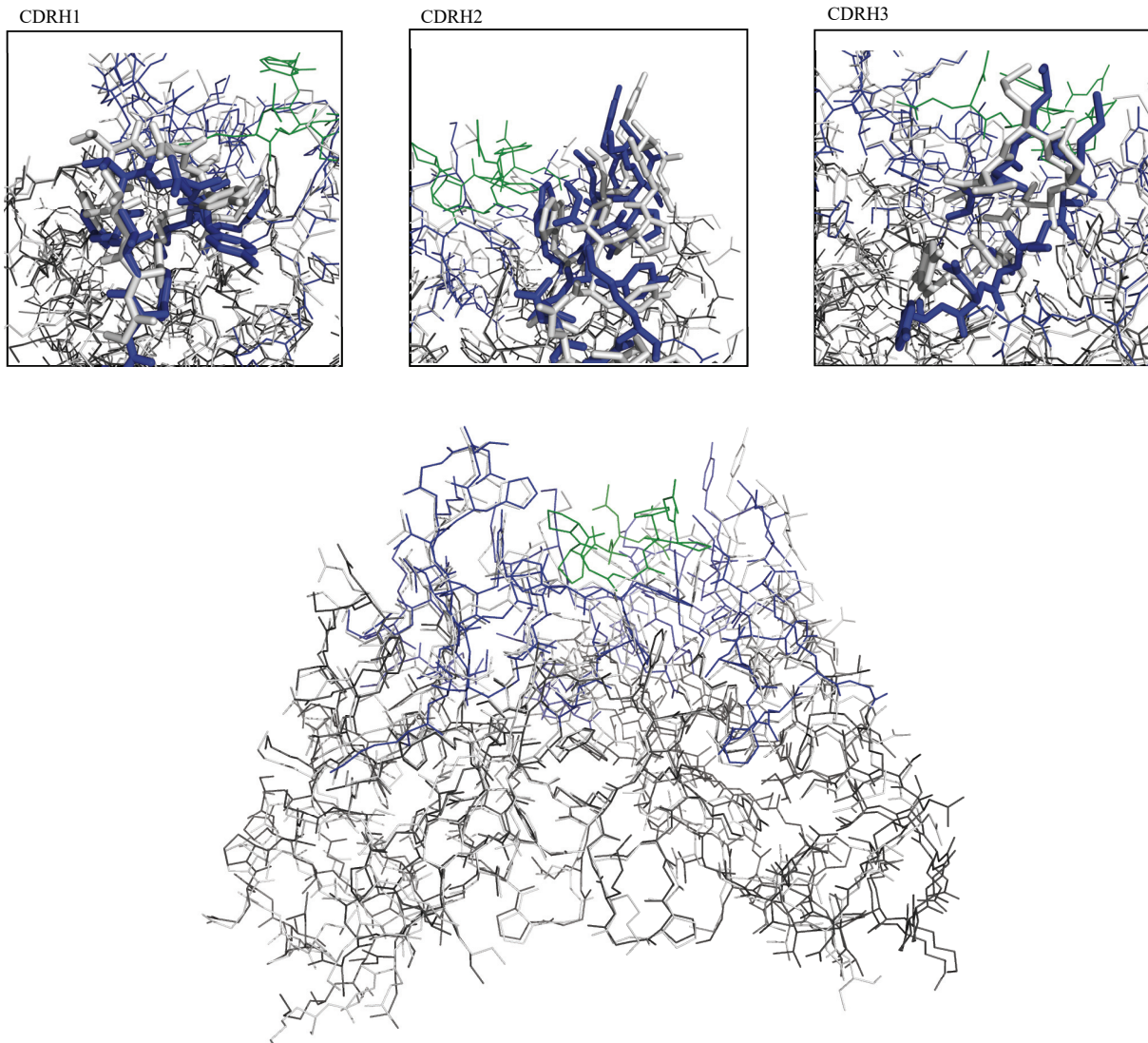


Abbildung 47 Strukturelles Ca -Alignment der Modellstruktur (grau) mit der Kristallstruktur (schwarz) von GaletuxiFab. Die CDR der Kristallstruktur ist in Blau gezeigt, das synthetische Peptid QAPPGAYPG in Grün. Die vergrößerten Bereiche zeigen die Abweichung der CDR, wobei diese hervorgehoben sind.

Aufgrund der hohen Strukturhomologie zwischen dem humanen Gerüst 4NRY und GaletuxiFab konnte die volle Affinität durch lediglich elf Rückmutationen wieder hergestellt werden (Abbildung 48). Im Fall der schweren Kette wurden vor allem Rückmutationen im Bereich des N-Terminus eingeführt. In diesem Bereich ist insbesondere der Rest H2 relevant, da eine direkte Interaktion mit H104, am C-Terminus der CDRH3 besteht. Im Gegensatz zu den anderen CDR-Regionen lässt sich für die CDRH3 keine strukturelle Einteilung in kanonische Klassen vornehmen (Regep et al., 2017). In der Regel ist die CDRH3 strukturell durch eine Haarnadelschleife charakterisiert, die jedoch aufgrund großer Längenvariation von 2 – 26 Aminosäuren eine Vielzahl an Konformationen einnimmt (Wu et al., 1993). Hierbei sind insbesondere Interaktionen endständiger Reste entscheidend für die Ausrichtung der Haarnadelschleife, sodass der Position H2 aufgrund des Kontaktes zu H104 eine besondere Rolle zukommt (Chothia and Lesk, 1987). Dabei können auch die benachbarten Aminosäuren an Position H1 und H3 einen Einfluss auf die wichtige CDRH3 haben. Mit der konservativen Mutation des N-Terminus zu Beginn der Humanisierung lässt sich rückwirkend nicht klären, ob die Mutation des postulierten Rests H2 ausgereicht hätte. Eine weitere Rückmutation, die interessanterweise keinen Vernier-Rest betrifft, befindet sich an Position H46, unmittelbar benachbart zu den relevanten Resten H47, H48 und H49. Diese Region bildet die Plattform für die CDRH2 (Chothia and Lesk, 1987). Dem Lysin-Rest H46 scheint in diesem Fall eine Sonderrolle zuzukommen. Die Aminogruppe des Lysins liegt mit einem Abstand von 2,5 Å in der Nähe der Reste H62 und H63, die die Haarnadelschleife der CDRH2 bilden. Gleichzeitig liegt die funktionelle Gruppe des Lysins an der Proteinoberfläche in einer Furche, die aus der schweren und leichten Kette gebildet wird. Dadurch hätte sie die Möglichkeit mit einem langgestreckten Epitop zu interagieren, das in dieser Furche liegt. In der Tat zeigte die Rückmutation an Position H46 den größten Einfluss. Da die Affinität des ursprünglichen monoklonalen Antikörpers durch Kombination der Rückmutationen H46 mit der des in der Furche gegenüberliegenden Rests L4 vollständig wiederhergestellt werden konnte, scheint die native Bindung eines längeren Epitops gegenüber dem Minimalepitop wahrscheinlich. In diesem Zusammenhang könnten Kristallisationsexperimente mit einem C-terminal verlängerten Peptid weitere Einsicht geben.

Für die Position H71, die schon beim ersten Design des Antikörpers ausgetauscht wurde, ist bekannt, dass diese die Konformation der hypervariablen Schleifen CDRH2 und CDRH3 entscheidend beeinflussen kann (Chothia and Lesk, 1987). In Abhängigkeit zu der Aminosäure an dieser Position kann sich die CDRH2 in unterschiedlichen Konformationen an die CDRH3 anlagern. Hierbei können große Seitenketten an Position H71 die CDR separieren und kleine die CDR annähern (Tramontano et al., 1990). Durch den systemischen Einfluss, den diese Position in früheren Untersuchungen zeigte, wurde der Rest von Beginn an eingefügt, sodass ein konkreter Nachweis über einen positiven Effekt des Austauschs fehlt.

In Anlehnung an den in frühen ELISA-Experimenten beobachteten Einfluss den die N-Termini des mAk auf die Antigen-Affinität zeigten (Abschn. 3.4.3), wurden die Reste L2-3 bei der Humanisierung von vorneherein ausgetauscht. Diese dienen als Plattform der CDRL1, wobei insbesondere L2 als Vernier Rest beschrieben ist (Chothia and Lesk, 1987). Bemerkenswert ist der Einfluss der nachträglich eingeführten Rückmutation an Position L4, der in Kombination mit H46 zur vollständigen Wiederherstellung der Affinität führte. Dieser hat ähnlich wie H46 vermutlich eine doppelte Funktion. Durch seine Position in einem β -Faltblatt an der Furche zwischen schwerer und leichter Kette, interagiert der Rest zum einen mit CDRL3 (Chothia and Lesk, 1987) und hat zum anderen die Möglichkeit mit dem Peptid-Epitop zu wechselwirken. Dies erklärt den positiven Effekt des Austauschs auf die Affinität.

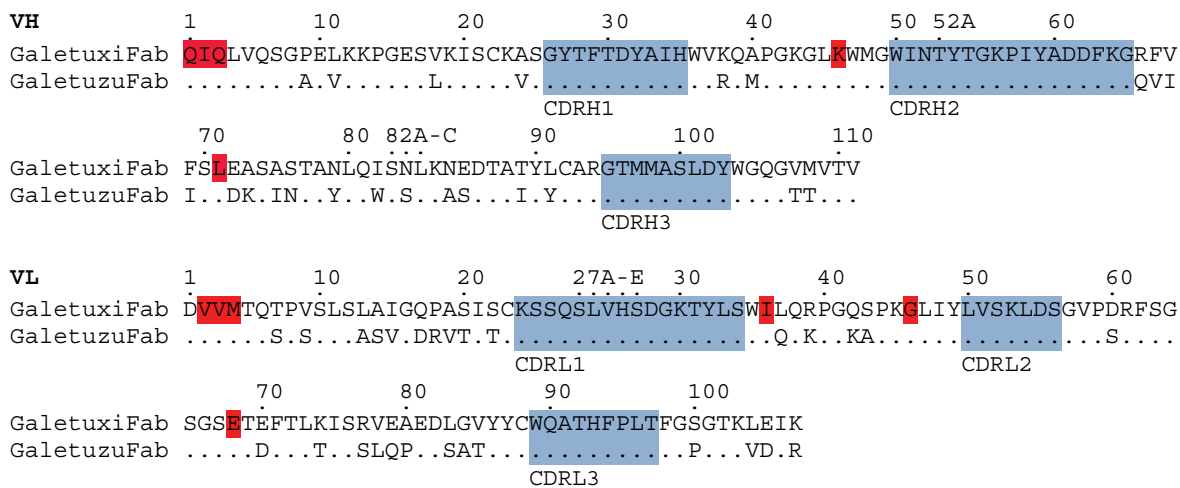


Abbildung 48 Alignment der Aminosäuresequenz von GaletuxiFab mit der humanisierten Variante GaletuzuFab annotiert nach Kabat et al. (1991). In blau sind die CDR gezeigt. Rot eingefärbt sind die Positionen, an denen die Aminosäure von GaletuxiFab in das Framework der humanisierten Varianten übernommen wurde.

Die Positionen L36 und L46 befinden sich an der V_H/V_L Grenzfläche, die hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen gekennzeichnet ist. Beide Reste haben die Möglichkeit mit der CDRH3 zu interagieren, wobei die Raumforderung der jeweiligen Seitenkette eine entscheidende Rolle spielt. Durch unterschiedlich große Reste kann die relative Anordnung der V_H und der V_L Domäne beeinflusst werden, was wiederum die Form des Paratops beeinflusst (Dunbar et al., 2013). Hierbei konnte für beide Positionen schon bei dem Vergleich der Strukturen des humanen Ig-Gerüst und GaletuxiFab große Unterschiede in der Größe der Seitenkette festgestellt werden, sodass diese gleich zu Beginn ausgetauscht wurden.

Betrachtet man allein die Frameworkregionen der variablen Domänen der Fragmente GaletuxiFab und GaletuzuFab in einem Alignment (Abbildung 48), zeigt sich, dass trotz der eingeführten Rückmutationen für die schwere Kette eine Identität zwischen beiden Sequenzen von lediglich 72% (58 von insgesamt 81 Resten) und für die leichte Kette eine Identität von 69% (55 von insgesamt 80 Resten) vorhanden ist. Diese Differenz spiegelt sich auch im Effekt auf den „Degree of Humanness“ wieder, welcher einen Indikator für die Immunogenität von humanisierten Antikörpern darstellt (Abhinandan and Martin, 2007). Hierbei wird die prozentuale Sequenzidentität eines Antikörpers in Relation zum natürlich vorkommenden humanen oder murinen Repertoire der Kabat Datenbank (Johnson and Wu, 2001) gesetzt. Basierend auf der durchschnittlichen Sequenzidentität und deren Standardabweichung kann die Sequenzidentität des Antikörpers in Form eines Z-Werts beschrieben werden. Um bei dieser Berechnung den Einfluss der CDR mit zu berücksichtigen, wurden die vollständigen variablen Domänen von GaletuxiFab und GaletuzuFab verglichen. Abbildung 49 zeigt die Verteilung des humanen und murinen Repertoires, sowie die Ergebnisse für die schwere und die leichte Kette der Fab-Fragmente. In beiden Fällen konnte eine erhebliche Anpassung an das humane Repertoire von $Z(\text{GaletuxiFab-}V_H) = -1,7$ zu $Z(\text{GaletuzuFab-}V_H) = -0,7$ und $Z(\text{GaletuxiFab-}V_L) = -2,2$ zu $Z(\text{GaletuzuFab-}V_L) = -0,5$ erreicht werden.

Auch wenn diese Analyse die Reduktion des nicht-humanen Anteils bestätigt, sollten diese Ergebnisse nicht überbewertet werden. Eine Sequenzidentität, die dem humanen Repertoire entspricht, ist nicht gleichzusetzen mit der vollständigen Abwesenheit von Epitopen, die in einem MHC-Komplex präsentiert werden und damit eine Immunreaktion auslösen können. Weiterhin muss bewusst sein, dass selbst ein natürlicher humaner Antikörper einen einzigartigen Idiotypus aufgrund seiner hypervariablen CDRH3 Region darstellt und damit eine Immunantwort

auslösen kann. Diese Human-anti-human-Antikörper (HAHA) Antwort ist bekannt im Rahmen der Netzwerk-Hypothese, bei der ein Antikörper die Bildung eines anti-idiotypischen Antikörpers auslöst, um die Immunantwort zu regulieren (Macias et al., 1999). Aus diesem Grund ist eine experimentelle Untersuchung der Immunogenität mit humanen Blutproben nach Applikation des Wirkstoffes unumgänglich (Joubert et al., 2016).

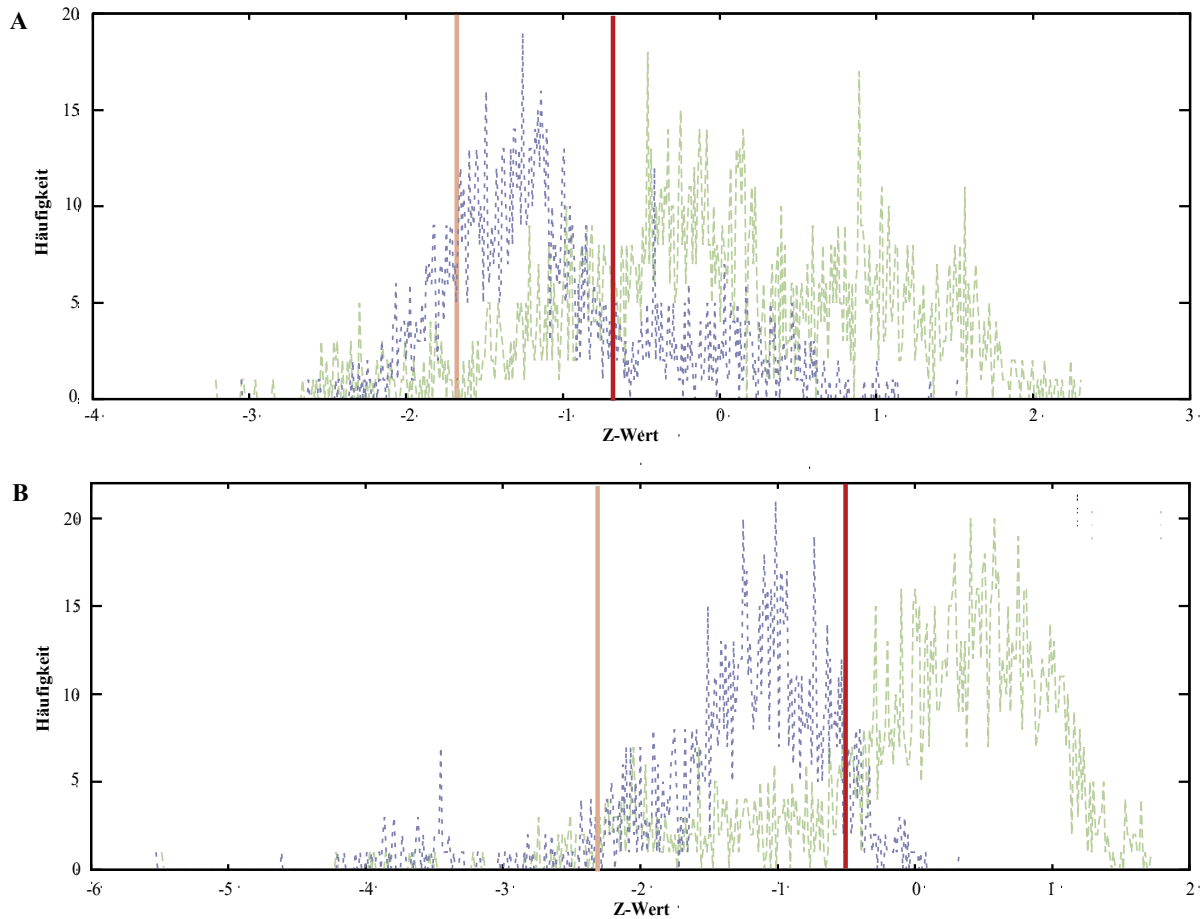


Abbildung 49 Vergleich der Sequenzidentität von GaletuzuFab (rot) und GaletuxiFab (rosé) gegen das humane (grün) und das murine (blau) IgG-Repertoire der Kabat Datenbank. **A)** Auswertung für die schwere Kette. **B)** Auswertung für die leichte Kette.

4.5. Vergleich der Methoden zur selektiven chemischen Konjugation von Proteinen mit funktionellen Gruppen

Die Kopplung von Proteinen mit NHS-Estern ist vermutlich die am meisten verbreiteste Methode, um kovalente Modifizierungen zu erzeugen. Durch die hohe Praktikabilität wurde diese Methode seit ihrer ersten Anwendung, als homobifunktionelles Kopplungsreagenz (Bragg and Hou, 1975, Lomant and Fairbanks, 1976) stetig weiterentwickelt. Ein Großteil der heute verfügbaren aminreaktiven Kopplungsreagenzien beruht auf NHS-Estern, wie dem hier verwendeten Cy5.5-NHS. Die Reaktion mit primären oder sekundären Aminen führt hierbei zu stabilen Amid bzw. Imid-Bindungen. Für den Radionuklidchelator DFO war allerdings kein Kopplungsreagenz auf NHS-Basis verfügbar, sodass das Isothiocyanatreagenz pSCN-DFO verwendet wurde. Diese Gruppe reagiert mit Nucleophilen wie Aminen, Sulfhydrylen und dem Phenolation des Tyrosins. Jedoch ist das einzig stabile Produkt die

Thioureabindung zwischen dem Isothiocyanat und den Aminen, was zur Selektivität gegenüber diesen führt. Aufgrund der Stabilität der ausgebildeten Bindungen sind beide Methoden für Anwendungen geeignet, bei denen eine Freisetzung der funktionellen Gruppe unerwünscht ist. Die unspezifische Kopplung der ϵ -Amine aller verfügbaren, d.h. oberflächlichen Lysinreste, kann bei geeigneter Stöchiometrie als generelle Methodik zur Kopplung von Proteinen verwendet werden, da ohne Kenntnis der strukturellen Details und mit relativ wenig Aufwand Proteine funktionalisiert werden können.

Zwar wird ein Großteil der zugelassenen Antikörper-Toxin-Konjugate heutzutage über solche unspezifischen Kopplungsmethoden erzeugt und erfolgreich eingesetzt, doch führt diese Methode zu einem großen Unsicherheitsfaktor in der klinischen Translation. Aus diesem Grund sollte die Kopplung über ϵ -Amine mehr als einfach zugängige Methode für erste Untersuchungen in präklinischen Studien gesehen werden. Durch die Optimierung eines Protokolls für das jeweilige Reagenz konnte zwar ein mittleres Kopplungsverhältnis von nahezu 1:1 erreicht werden, doch bedeutet dies nicht, dass es nur ein Produkt gibt. In einem Gedankenexperiment mit dem Extrembeispiel von zwei gleich reaktiven Lysinen in einem Protein kann dies einfach verdeutlicht werden: Die Reaktion der Edukte erzeugt hierbei zwei Produkte, die im gleichen Verhältnis entstehen, sich aber nur schwer unterscheiden und trennen lassen. Eine weitere Möglichkeit ist die Reaktion von beiden Lysinen in einem Protein, während es bei einem zweiten Protein zu keiner Reaktion kommt. Auch dieser Fall führt zu einem statistischen Mittel von eins und eine Unterscheidung bzw. Trennung der Spezies ist ebenfalls schwer möglich. Allein bei diesem simplen Fall gibt es vier gleich wahrscheinliche, doch schwer zu unterscheidende Spezies. Da jedes der individuellen Kopplungsprodukte aber eine eigene Pharmakokinetik, ein eigenes Effizienz- und Sicherheitsprofil *in vivo* besitzt, bedeutet dies im Hinblick auf eine diagnostische Anwendung im Patienten aus regulatorischer Sicht einen erheblichen Aufwand und sollte, wenn möglich, umgangen werden (Hamblett et al., 2004). In der Tat zeigte die Kopplung von GaletuxiFab mit Cy5.5-NHS und pSCN-DFO molekulare Heterogenität, wie anhand der massenspektrometrischen Charakterisierung der Kopplungsprodukte deutlich wurde. Dabei konnten individuelle Stöchiometrien von 0 - 4 Cy5.5- bzw. DFO-Gruppen pro GaletuxiFab beobachtet.

Demgegenüber verspricht die zweite untersuchte Kopplungsmethode durch Einführung eines freien Cysteins Vorteile. Wie das zugelassene ADC Brentuximab-Vedotin zeigt, können auch die nativen Cysteinreste von Antikörpern und Fab-Fragmenten für eine Kopplung verwendet werden. Da diese jedoch in Proteinen häufig als strukturstabilisierende Disulfide vorliegen, müssen sie durch Reduktion zugänglich gemacht werden. Hierbei ist eine selektive Reduktion eines bestimmten Cysteinrests nicht möglich und die anschließende Kopplung führt zu molekularer Heterogenität (Senter and Sievers, 2012). Ein neu eingeführter freier Cysteinrest kann dagegen meist selektiv funktionalisiert werden. Diese Methode stellt zwar höhere Ansprüche an Design, Produktion und Aufarbeitung des ADC, ist jedoch aufgrund der geringeren toxikologischen, sowie pharmakokinetischen Unsicherheiten eine interessante Alternative zu unspezifischen Kopplungsmethoden. Der erste seiten-selektive Ansatz zur Kopplung von Antikörpern von Junutula et al. (2008) nutzte die Einführung von Cysteinen im Gerüst der variablen Domänen eines Fab-Fragments durch seiten-spezifische Mutagenese. Dieser gängige Ansatz zur Modifikation von Proteinen (Chalker et al., 2009) ist jedoch durch die nativen Cysteine in Antikörpern ungleich komplizierter und eine Einführung an unpassenden Positionen kann zu Ausbildung falscher Disulfidbindungen und damit zu Fehlfaltungen führen. Auch die Kopplungseffizienz des eingeführten Cysteinrests steht in Abhängigkeit zu dessen Umgebung, da die Zugänglichkeit verhindert wird oder die Ladung benachbarter Reste einen negativen Einfluss haben kann. Für bestimmte Regionen im Gerüst der Fab-Fragmente, wie zum Beispiel den *Elbowangle* konnte zwar gezeigt

werden, dass diese sich besser für eine seitenselektive Kopplung über den Einbau von Cysteinresten eignen (Junutula et al., 2008a). Eine generelle Aussage darüber, dass sich diese Regionen bei jedem Fab-Fragment eignen, lässt sich hieraus jedoch nicht treffen. Die Einführung eines reaktiven Cysteinrests muss folglich für jedes Fab-Fragment neu etabliert werden.

Die Verwendung des PAS-Polypeptids als Linker zwischen dem freien Cystein und dem Fab-Fragment zeigte besonders im Kontext zu diesen Untersuchungen ein bemerkenswertes Ergebnis. Eine Ausbildung von unerwünschten Disulfidbindungen konnte aufgrund der räumlichen Trennung von Fab-Fragment vermieden werden, ohne dass Mutationen im Gerüst des Fab-Fragments eingeführt werden mussten. Speziell für Proteine mit nativen Disulfidbindungen stellt diese Methode daher ein interessantes Funktionalisierungskonzept dar, das ohne genaue strukturelle Analyse des Zielproteins auskommt.

Wegen des aufwändigen Reduktions- und Oxidationsprozesses zur Freisetzung des zusätzlichen Cysteinrests ist die Skalierbarkeit der Methode ein wichtiger Aspekt. Zumindest für die Produktion von 10 mg in einem Reaktionsansatz konnte die Kopplung erfolgreich etabliert werden. Jedoch zeigten sich hierbei auch Grenzen der Methode. Die Kopplung mit Maleimiden wird idealerweise bei einer Konzentration von 2 - 10 mg/ml Protein durchgeführt (Junutula et al., 2008b). Durch die Reduktions- bzw. Oxidationsschritte waren jedoch mehrere Abtrennungsschritte von Reaktionsnebenprodukten notwendig. Um hierbei eine zügige Herstellung gewährleisten zu können, wurden dazu PD10 Gelfiltrationssäulen verwendet. Ein Schritt der zur Verdünnung der Proben führte, sodass initial hohe Konzentrationen des Fab-Fragments eingesetzt werden mussten. Gleichzeitig führten hohe Proteinkonzentrationen zu Aggregationsverhalten bei Einsatz des Reduktionsmittels DTT was weitere Skalierbarkeit verhinderte.

Im Vergleich zur Kopplung über freie Lysinreste zeigt die massenspektrometrische Charakterisierung der Kopplung über den C-terminal eingeführten Cysteinrest, dass lediglich ein Produkt mit genau einer konjugierten Cy7- bzw. DFO-Gruppe an GaletuzuFab entstand. Mit dieser Analysemethode lässt sich zwar keine Aussage darüber treffen, welcher Cysteinrest der insgesamt 5 gekoppelt wurde, doch zeigte die reduzierte SDS-PAGE von Cy7-GaletuzuFab nur eine Kopplung an der schweren Kette von GaletuzuFab im Einklang mit der Position des PAS200-Cys Fusionspartners.

4.6. *In vivo* Bildgebung der α -hGal3-Immunglobulinvarianten

Bei der Humanisierung durch ein CDR-Grafting, werden die CDR in ein humanes Immunglobulin-Gerüst integriert und ein neuer Antikörper entsteht. Im Gegensatz zu den negativen Selektionsmechanismen während der natürlichen Rekombination von Immunglobulinen in B-Zellen gibt es bei diesen *in vitro* generierten Antikörpern keine Kontrolle über das Auftreten von unspezifischen Bindungen *in vivo*. Um trotzdem eine potentielle Autoreaktivität zu untersuchen bieten sich Mausmodelle an, die eine Abschätzung zur Spezifität des neuen Antikörpers erlauben.

Die PET-Bildgebung orthotoper Tumormodelle für das Schilddrüsenkarzinom in Mäusen mit der chimären und humanisierten α -hGal3-Fab-PAS-Variante zeigte hohe und tumorspezifische Anreicherungen mit beiden α -hGal3-Immunglobulinvarianten. Die Signale waren auf den linken Schilddrüsenlappen beschränkt, der das Tumorgewebe enthielt und es zeigte sich keine unspezifische Bindung an das normale Schilddrüsenewebe. Die Spezifität wurde weiterhin durch das Ausbleiben eines Signals im Bereich des Tumors gezeigt, sofern Mäuse gleichzeitig mit einem

hohen Überschuss von nicht konjugiertem α -hGal3-Fab-Fragment behandelt wurden. Beim Vergleich der Anreicherungen des chimären ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 (6 %ID/g) mit dem humanisierten ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys (4 %ID/g) im Tumor zeigen sich zwar Unterschiede der Signalwerte, doch konnte mit beiden Varianten ein hohes Tumor-zu-Muskel-Verhältnis 24 h p.i. erreicht werden (11,5:1 für ^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 und 14,8:1 für ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys). Die Humanisierung des α -hGal3-Fab-Fragmentes hatte somit nur einen geringen Einfluss auf die Biodistribution und eine erhöhte unspezifische Bindung an andere Gewebe oder Organe war nur für die Nieren erkennbar (94 %ID/g, bzw. 85 %ID/g).

Vergleicht man die Eigenschaften der rekombinanten α -hGal3-Fab-Fragmente mit Untersuchungen des Vollängen-IgG α -hGal3-mAk (D'Alessandria et al., 2016) lassen sich die Kapitel 4.1 und 4.3 beschriebenen pharmakokinetischen Vorteile des PASylierten Fab-Formates zeigen. Bei den Experimenten mit dem Xenograft Modell der gleichen Zelllinie (FRO-81-1, Tumor im Hüftbereich) konnte zwar eine leicht höhere Anreicherung von 7 %ID/g und ein besseres Tumor-zu-Muskel-Verhältnis mit 24,9:1 für den α -hGal3-mAk erreicht werden, jedoch wurden die Aufnahmen erst 48 h p.i. erstellt. Typisch für intakte mAk ist auch eine erhöhte Aufnahme in der Leber (11 %ID/g), welche mit dem Fab-Fragment Format verringert werden konnte (^{89}Zr -DFO-GaletuxiFab-PAS200 7 %ID/g, ^{89}Zr -DFO-GaletuzuFab-PAS200-Cys 5 %ID/g). Mit Muskeln und Haut ist die Leber das Organ mit der höchsten FcRn Expressionsrate (Latvala et al., 2017). Zusammen mit ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel und der daraus resultierenden hohen katabolischen Funktion ist sie in der Regel das Organ mit den größten unspezifischen Anreicherungen von therapeutischen Antikörpern und verhindert so eine frühzeitige Lokalisierung im Tumor (Eigenmann et al., 2017, Wahl et al., 1983). Diesen Effekt bestätigen auch Untersuchungen mit dem F(ab')₂ Konstrukt des α -hGal3-mAk, bei dem die Fc-Region proteolytisch abgespalten wurde (De Rose et al., 2019). Im Gegensatz zu dem mAk zeigte das F(ab')₂ Konstrukt eine schnellere Anreicherung, die bereits nach 24 h p.i. gute Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse erreichte. Interessanterweise lagen diese ähnlich wie für die PASylierten Konstrukte GaletuxiFab und GaletuzuFab. Auch die Anreicherung in der Leber war niedriger als für den mAk und lag ebenfalls in einem ähnlichen Bereich wie für die beiden PASylierten Fab-Fragmente. Ausgehend von den hier vorliegenden Daten für die rekombinanten Fab-Fragmente lässt sich behaupten, dass der Wechsel des Ig-Formats und die Fusion mit dem PAS-Polypeptid eine erfolgreiche Strategie darstellt, um rekombinante Tracer zu erzeugen, die eine verbesserte Biodistribution zeigen. Lediglich die hohe Aufnahme der mit Zirkonium markierten Fragmente in den Nieren kann hierbei eine Beschränkung bei der Anwendung bedeuten, wobei zu beachten ist, dass die gezeigten Daten nur den Zeitpunkt der Bildgebung widerspiegeln. Die Strahlendosis hängt jedoch nicht nur von der Speicherung zu einem bestimmten Zeitpunkt ab sondern auch davon, wie schnell die Aktivität die Niere wieder verlässt. Wenn dies schneller geschieht als im Tumor, kann die Nierendosis trotz anfänglich hoher Speicherung vertretbar sein. Um diesen Effekt besser einschätzen zu können, sollten zusätzliche Distributionsstudien erfolgen.

Weiterhin stehen aktuell einige Methoden zur Verfügung, um die Aufnahme in die Nieren zu verringern. So konnte z. B. durch die Verwendung von Markierungsansätzen mit metabolisierbaren Radiokataboliten wie der Radioiodierung (Vorobyeva et al., 2018, Deyev et al., 2019) oder der Verwendung peptidbasierter Chelatoren (Ekblad et al., 2008, Tran et al., 2008, Altai et al., 2014) die Retention der Aktivität in den Nieren um ein Vielfaches verringert und das Verhältnis von Tumor zu Niere verbessert werden. Auch bei der Verwendung von schwer metabolisierbaren Radiometall-Chelatkomplexen, wie dem hier verwendeten ^{89}Zr -Dfo gibt es praktikable Lösungen, um die Aufnahme in den Nieren zu verringern. Allgemein zeigen basische Verbindungen eine Tendenz, die

tubuläre Rückresorption von Proteinen zu hemmen und damit die renale Aufnahme von Antikörperfragmenten zu senken. Auf molekularer Ebene scheint der Effekt im Wesentlichen auf dem Vorhandensein von positiv geladenen Aminogruppen zu beruhen und kann durch die Gabe von kationischen Aminosäuren oder basischen Polypeptiden wie Polylysin erreicht werden (Behr et al., 1998).

Parallel durchgeführte FMT-Bildgebung mit fluoreszenzmarkierten Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys in dem orthotopen Tumormodell zeigte eine ähnlich gute Darstellung des Tumors wie mit dem PET-Verfahren. Im Gegensatz zur PET-Bildgebung ist dieses Verfahren nicht mit den Nachteilen verbunden wie den hohen Kosten, der limitierten Verfügbarkeit, einer kurzen Halbwertszeit des Radionuklids sowie Sicherheitsauflagen für das Arbeiten mit Radioaktivität und deren Toxizität (Boellaard et al., 2015). Fluoreszenzbasierte Methoden sind in der Regel jedoch für die Diagnostik im Menschen weniger geeignet als die PET-Bildgebung, da die Gewebepenetration der NIR-Strahlung nicht ausreicht um tief liegende Gewebeschichten darzustellen (Smith et al., 2009). Die anatomische Lage der Schilddrüse unterhalb des Kehlkopfes vor der Luftröhre erfordert allerdings eine Gewebepenetration von nur wenigen Zentimetern, sodass es mit dieser Methode möglich sein könnte, auch im Menschen das Tumorgewebe gut darzustellen. Fluoreszenz begleitete Ektomien stellen eine weitere interessante Anwendung dar. Ähnlich den aktuellen Möglichkeiten der präoperativen Diagnoseverfahren bei Schilddrüsenkrebs, wie dem Ultraschall oder der FNAB, können diese Methoden auch während der Operation verwendet werden, um Tumore zu finden, jedoch ist es damit nicht möglich einen tumorspezifischen Kontrast zu erzeugen und sie erfordern einen direkten Kontakt mit dem Körper (Zheng et al., 2019). Die operationsbegleitende Bildgebung mit NIR-Markern ist hingegen in der Lage diesen Kontrast zu erzeugen. Durch die stetige Entwicklung der letzten Jahre auf diesem Gebiet wurde es möglich, mit dieser Methode auch Tumore zu visualisieren (Weissleder et al., 1999, Choi et al., 2013, Olson et al., 2010). Weitere Untersuchungen mit dem fluoreszenzmarkierten Cy7-GaletuzuFab-PAS200-Cys könnten hierbei interessante Möglichkeiten liefern.

Der neuartige Tracer GaletuzuFab kann also die derzeitige Diagnostik von Schilddrüsenkrebs unterstützen und stellt insbesondere in Fällen, die mit konventionellen Methoden nicht oder nur schwer zugänglich sind, eine echte Alternative dar. Insbesondere bei multiplen Schilddrüsenknoten, bei denen normalerweise nicht alle Knoten mit FNAB cytologisch untersucht werden können, beispielsweise bei: Knoten in mediastinalen Positionen oder in der Nähe von vaskulären Strukturen, die schwer zu erreichen sind und bei denen die FNAB ein hohes Risiko bedeutet, sowie Knoten kleiner als 1 cm (okkulten Schilddrüsenkrebs), die aktuell präoperativ nicht erkennbar sind. Teilweise zeigen Schilddrüsentumore, wie z.B. 50 % der ATC, keine Aufnahme von Iod, wohingegen die Expression von Gal3 erhöht ist (Bartolazzi et al., 2001). Gerade in diesen Fällen kann mit dem Gal3-selektiven Ansatz der Verlauf von Schilddrüsenkrebs verfolgt werden, was vorher nicht möglich war (De Rose et al., 2019). Auch eine therapeutische Anwendung erscheint in solchen Fällen vielversprechend, da aktuell keine effiziente Therapieform existiert. Durch den Austausch des Radionuklids ^{89}Zr gegen die cytotoxischen, α -Strahlung emittierenden Radionuklid ^{225}Ac ist eine Radioimmuntherapie (Scheinberg and McDevitt, 2011) mit GaletuzuFab ohne große Veränderung des Herstellprozesses möglich. Im Hinblick auf ein theranostisches Konzept für die Behandlung von Schilddrüsenkrebs eröffnet GaletuzuFab hierbei viele neue Möglichkeiten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Arbeit ein neuer hoch-spezifischer Ansatz zur Diagnostik des Schilddrüsentumormarkers Gal3 entwickelt werden konnte. Die guten funktionellen Eigenschaften, der einfache Herstellungsprozess, die molekulare Homogenität und die geringe zu erwartende Immunogenität des humanisierten GaletuzuFab sind erfolgsversprechende Voraussetzungen für ein neues Reagenz zur

Schilddrüsenkrebsdiagnostik. Die klinische Translation dieses neuartigen Ansatzes kann helfen, gutartige von bösartigen Schilddrüsenknoten besser zu unterscheiden und könnte in Zukunft auch bei anderen aggressiven Tumorarten wie dem Melanom, Prostata- und Brustkrebs, bei denen Gal3 eine pathophysiologische Rolle spielt, anwendbar sein (Capalbo et al., 2019, Farhad et al., 2018).

5. Zusammenfassung

Die Translation von potentiellen Tumorbiomarkern aus der Grundlagenforschung in die klinische Praxis ist eine der großen Herausforderungen bei der Entwicklung von innovativen diagnostischen und therapeutischen Verfahren. Häufig können Effekte, die *in vitro* mit Zellen validiert wurden, nicht auf Mäuse oder Menschen übertragen werden. Das steht oft mit den molekularen Eigenschaften der antigenbindenden Wirkstoffe in Zusammenhang. Merkmale wie Zirkulationsdauer, Affinität und Toxizität können *in vivo* zu Effekten führen, die eine erfolgreiche klinische Anwendung verhindern. Das kohlenhydratbindende Protein Galectin 3 (Gal3) zeigte in ersten Untersuchungen vielversprechende Eigenschaften für die Diagnostik von Schilddrüsenkrebs, da es in den häufigsten Schilddrüsentumoren stark überexprimiert wird, in normalem Schilddrüsengewebe jedoch nicht. Die *in vivo* Immun-PET Bildgebung mit einem monoklonalen Antikörper (mAk) der Ratte gegen Gal3 bestätigte dessen Potential als Biomarker.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von diesem monoklonalen Antikörper ein besser geeignetes Bindungsreagenz zu entwickeln, das eine optimierte Plasmahalbwertszeit und eine geringere Immunogenität zeigt. Als Basis für die weitere Entwicklung wurde das humane Antigen Gal3 und ein chimäres Fab-Fragment ausgehend von dem α -Gal3-mAk gentechnisch hergestellt. Durch PASylierung wurde die Plasmahalbwertszeit des rekombinanten Fab-Fragments moderat verlängert.

Nach Amplifizierung der variablen Immunglobulin-Genabschnitte aus der mRNA der Hybridomzelllinie M3/38 und Sequenzanalyse wurde ein Plasmid konstruiert, das die periplasmatische Expression des funktionellen Fab-Fragments und seiner PASylierten Variante in *E. coli* ermöglichte. Die anfangs geringen Ausbeuten (180 μ g je Liter Zellkultur) wurden durch Etablierung einer Hochzelldichtefermentation auf 4 mg je Liter Zellkultur gesteigert.

Die Bindungsaktivität des chimären Fab-Fragments wurde in ELISA- und SPR-Experimenten untersucht und zeigte unabhängig von der PASylierung ein ähnlich gutes Bindungsverhalten gegenüber Gal3 wie ein proteolytisch aus dem mAk erzeugtes Fab-Fragment. Mit dem Ziel der Gal3-basierten Tumorbildgebung wurde das Fab-Fragment mit dem Infrarotfarbstoff Cy5.5 sowie dem Chelator DFO über Lysinseitenketten mit einem mittleren Kopplungsverhältnis von ca. 1:1 pro Fab konjugiert. Durch anschließende Beladung mit dem PET-Radioisotop Zirkonium-89 konnten FRO82-1 Xenograft Tumore in PET/CT-Aufnahmen spezifisch visualisiert werden. Die PASylierte Variante zeigte hierbei sehr gute Eigenschaften hinsichtlich Akkumulation im Tumor mit einem Tumor-zu-Muskel-Verhältnis von 11,5:1.

Daraufhin wurde die potentielle Immunogenität des chimären Fab-Fragments durch strukturbasierte Humanisierung der variablen Domänen weiter reduziert. Eine Epitopkartierung von Gal3 gestattete die Bestimmung des linearen Minimalepitops, sodass ein synthetisches Peptid für die Co-Kristallisation mit dem Fab-Fragment verwendet werden und die Kristallstruktur des Komplexes aufgeklärt werden konnte. Ein Strukturabgleich der gewonnenen Röntgen-Kristallstruktur mit einer Datenbank von humanen Fv-Fragmenten lieferte geeignete Akzeptor-Gerüststruktur-Kandidaten für das CDR-Grafting. Durch Einführung weniger zusätzlicher Mutationen in der Vernierzone des humanen Gerüsts gelang es, das humanisierte Fab-Fragment Galectin3-Fab mit einer vergleichbaren Antigen-Affinität gegenüber seiner chimären Ursprungsvariante zu konstruieren.

Zur Verbesserung der molekularen Heterogenität gegenüber der zuvor praktizierten Kopplung über Lysinseitenketten wurde für das humanisierte PASylierte Fab-Fragment eine ortsgerichtete Konjugation nach Einführung

eines einzelnen reaktiven Cysteinrests C-terminal zum PAS-Polypeptid etabliert. Über diesen Cysteinrest konnte ein homogenes Kopplungsprodukt mit dem Infrarotfarbstoff Cy7 wie auch dem Chelator DFO mit einer Stöchiometrie von jeweils exakt 1:1 erzeugt werden.

Die daraufhin mit Zr(89) markierte PASylierte Variante des humanisierten Fab-Fragments GaletuzuFab wurde in dem FRO82-1 Xenograft Tumormodell mit PET/CT-Aufnahmen untersucht. Es zeigte vergleichbare Eigenschaften zu dem chimären Fab-Fragment (Tumor-zu-Muskel-Verhältnis von 14:1). In dieser Arbeit konnte also ein Gal3-spezifischer Protein-Tracer für die medizinische Bildgebung entwickelt werden, der mit seiner hohen Biomarker-Spezifität, der ausgeprägten molekularen Homogenität und der hohen Ähnlichkeit zu humanen Immunglobulinen die besten Voraussetzungen besitzt, um die Anforderungen einer klinischen Translation zu bestehen.

6. Summary

The translation of potential tumor biomarkers from basic research into clinical practice is one of the major challenges in the development of innovative, diagnostic and therapeutic measures. Often, effects that have been validated *in vitro* with cells cannot be transferred to mice or humans, due to the molecular properties of the antigen-binding agent. Features such as plasma half-life, affinity and toxicity may lead to effects that prevent successful clinical application. The carbohydrate-binding protein galectin 3 (Gal3) has shown promising properties for the diagnosis of thyroid cancer in initial studies, as it is highly overexpressed in the most common thyroid tumors but not in normal thyroid tissue. *In vivo* Immuno-PET imaging with a rat monoclonal antibody (mAb) against Gal3 confirmed its potential as a biomarker.

The aim of this work was to develop a more suitable binding reagent derived from the monoclonal antibody that has an optimized plasma half-life and a lower immunogenicity. As a basis for further development, the human antigen Gal3 and a chimeric Fab fragment of the α -Gal3-mAb were produced as recombinant proteins. The circulation of the Fab fragment was moderately prolonged by PASylation.

After amplification of the variable immunoglobulin gene regions from the mRNA of the hybridoma cell line M3/38 and their sequence analysis, a plasmid was constructed which allowed the periplasmic expression of the functional Fab fragment as well as its PASylated variant in *E. coli*. The initially low yields (180 μ g from 1 l shake flask culture) were increased to 4 mg per liter culture volume by establishing a high cell density fermentation.

The binding activity of the chimeric Fab fragment was investigated in ELISA and SPR experiments and showed, independent of the PASylation, a similarly good binding behaviour towards Gal3 as a Fab fragment proteolytically produced from the mAb. With the aim of Gal3-based tumor imaging, the chimeric Fab fragment was conjugated with the infrared dye Cy5.5 and the chelator DFO via lysine side chains with an average coupling ratio of about 1:1 per Fab. Subsequent labelling with the PET radioisotope zirconium-89 allowed the specific visualization of FRO82-1 xenograft tumors in PET/CT images. The PASylated variant showed very good tumor accumulation, with a tumor-to-muscle ratio of 11.5:1.

Subsequently, the potential immunogenicity of the chimeric Fab fragment was further reduced by structure-based humanization of the variable domains. Epitope mapping of Gal3 allowed the determination of the linear minimal epitope, such that a synthetic peptide could be used for co-crystallization with the Fab fragment and a crystal structure of the complex could be elucidated. A structural comparison of the X-ray crystal structure with a database of human Fab fragments suggested suitable acceptor framework candidates for CDR grafting. By introducing few additional mutations into the Vernier zone of the human scaffold, the humanized Fab fragment GaletuzuFab was constructed, showing a comparable antigen affinity as its chimeric predecessor.

To reduce the molecular heterogeneity in comparison with the previously employed coupling via lysine side chains, a site-directed conjugation method was established for the humanized PASylated Fab fragment after introduction of a single reactive cysteine residue C-terminal to the PAS polypeptide. This cysteine residue was used to generate a homogeneous conjugation product with the infrared dye Cy7 and the chelator DFO with a stoichiometry of precisely 1:1. After radiolabeling with Zr(89), the PASylated variant of the humanized Fab fragment GaletuzuFab was investigated in the FRO82-1 xenograft tumor model via PET/CT imaging, revealing comparable characteristics to the chimeric Fab fragment (tumor-to-muscle ratio of 14:1).

In this work a Gal3-specific protein tracer suitable for tumor imaging could be developed whose high biomarker specificity, the pronounced molecular homogeneity and the high similarity to human immunoglobulins offers an ideal starting point to meet the requirements of clinical translation.

7. Abkürzungen

APC	Antigen-präsentierende Zellen
CAT	Chloramphenicol acetyltransferase
CPEC	Zirkulare Amplifizierungsreaktion
CRD	Kohlenhydratbindedomäne
Cy5.5-NHS	Sulfo-Cy5.5-N-Hydroxysuccinimid-Ester
Cy7-MI	Sulfo-Cy7-Maleimid
DTT	Dithiothreitol
DFO-MI	DFO-Maleimid
ELISA	Enzym Linked Immunsorbent Assay
FcRn	neonataler Fc Rezeptor
FDA	Food and Drug Administration
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
FR	Framework Regionen
Fv	Fragment Variabel
GaletuxiFab	chimäre Variante des Galectin 3 bindenden Fab-Fragments
GaletuzuFab	humanisierte Variante des Galectin 3 bindenden Fab-Fragments
hGal3	Humanes Galectin 3
hGal3_P106	Verkürzte Variante von humanem Galectin 3
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IgG	Immunglobulin G
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen Emissions Tomographie
SDS	Na-Dodecylsulfat
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Thyroxin
V _H	variabler Domäne der schweren Kette des Fab-Fragments
V _L	variabler Domäne der leichten Kette des Fab-Fragments
VLP	Verhältnis von Label/Protein
WHO	Weltgesundheitsorganisation

8. Literatur

- ABHINANDAN, K. R. & MARTIN, A. C. R. 2007. Analyzing the “Degree of Humanness” of Antibody Sequences. *J Mol Biol*, 369, 852-862.
- ABOU, D. S., KU, T. & SMITH-JONES, P. M. 2011. In vivo biodistribution and accumulation of ⁸⁹Zr in mice. *Nucl Med Biol*, 38, 675-81.
- AKAHANI, S., NANGIA-MAKKER, P., INOHARA, H., KIM, H.-R. C. & RAZ, A. 1997. Galectin-3: A Novel Antiapoptotic Molecule with A Functional BH1 (NWGR) Domain of Bcl-2 Family. *Cancer Res*, 57, 5272.
- AKILESH, S., HUBER, T. B., WU, H., WANG, G., HARTLEBEN, B., KOPP, J. B., MINER, J. H., ROOPENIAN, D. C., UNANUE, E. R. & SHAW, A. S. 2008. Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 967.
- ALESSANDRIA, C., BRAESCH-ANDERSEN, S., BEJO, K., REDER, S., BLECHERT, B., SCHWAIGER, M. & BARTOLAZZI, A. 2016. Noninvasive In vivo Imaging and Biologic Characterization of Thyroid Tumors by ImmunoPET Targeting of Galectin-3. *Cancer Res*, 76, 3583.
- ALTAI, M., HONARVAR, H., WÅLLBERG, H., STRAND, J., VARASTEHE, Z., ROSESTEDT, M., ORLOVA, A., DUNÅS, F., SANDSTRÖM, M., LÖFBLUM, J., TOLMACHEV, V. & STÅHL, S. 2014. Selection of an optimal cysteine-containing peptide-based chelator for labeling of affibody molecules with (¹⁸⁸)Re. *Eur J Med Chem*, 87, 519-28.
- ARNESEN, T. 2011. Towards a functional understanding of protein N-terminal acetylation. *PLoS Biol*, 9, e1001074-e1001074.
- BARONDES, S. H., COOPER, D. N., GITT, M. A. & LEFFLER, H. 1994. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, 269, 20807-10.
- BARTOLAZZI, A., GASBARRI, A., PAPOTTI, M., BUSSOLATI, G., LUCANTE, T., KHAN, A., INOHARA, H., MARANDINO, F., ORLANDI, F., NARDI, F., VECCHIONE, A., TECCE, R. & LARSSON, O. 2001. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet*, 357, 1644-1650.
- BARTOLAZZI, A., ORLANDI, F., SAGGIORATO, E., VOLANTE, M., ARECCO, F., ROSSETTO, R., PALESTINI, N., GHIGO, E., PAPOTTI, M., BUSSOLATI, G., MARTEGANI, M. P., PANTELLINI, F., CARPI, A., GIOVAGNOLI, M. R., MONTI, S., TOSCANO, V., SCIACCHITANO, S., PENNELLI, G. M., MIAN, C., PELIZZO, M. R., RUGGE, M., TRONCONE, G., PALOMBINI, L., CHIAPPETTA, G., BOTTI, G., VECCHIONE, A. & BELLOCCO, R. 2008. Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol*, 9, 543-549.
- BEER, A. 1852. Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann Phys*, 162, 78-88.
- BEHR, T. M., GOLDENBERG, D. M. & BECKER, W. 1998. Reducing the renal uptake of radiolabeled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur J Nucl Med*, 25, 201-12.
- BENSON, D. A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D. J., OSTELL, J. & SAYERS, E. W. 2013. GenBank. *Nucl Acids Res*, 41, D36-42.
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N. & BOURNE, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucl Acids Res*, 28, 235-242.
- BEUTLING, U., STÄDING, K., STRADAL, T. & FRANK, R. 2008. Large-Scale Analysis of Protein-Protein Interactions Using Cellulose-Bound Peptide Arrays. In: WERTHER, M. & SEITZ, H. (eds.) *Protein – Protein Interaction*.
- BHAT, T. N., BENTLEY, G. A., FISCHMANN, T. O., BOULOT, G. & POLJAK, R. J. 1990. Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of antibody D1.3 on antigen binding. *Nature*, 347, 483-5.
- BIRD, R. E., HARDMAN, K. D., JACOBSON, J. W., JOHNSON, S., KAUFMAN, B. M., LEE, S. M., LEE, T., POPE, S. H., RIORDAN, G. S. & WHITLOW, M. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, 242, 423-6.

- BOELLAARD, R., DELGADO-BOLTON, R., OYEN, W. J. G., GIAMMARILE, F., TATSCH, K., ESCHNER, W., VERZIJBBERGEN, F. J., BARRINGTON, S. F., PIKE, L. C., WEBER, W. A., STROOBANTS, S., DELBEKE, D., DONOHOE, K. J., HOLBROOK, S., GRAHAM, M. M., TESTANERA, G., HOEKSTRA, O. S., ZIJLSTRA, J., VISSER, E., HOEKSTRA, C. J., PRUIM, J., WILLEMSSEN, A., ARENDS, B., KOTZERKE, J., BOCKISCH, A., BEYER, T., CHITI, A. & KRAUSE, B. J. 2015. FDG PET/CT: EANM procedure guidelines for tumour imaging: version 2.0. *Eur J Nucl Med Mol I*, 42, 328-354.
- BRAGG, P. D. & HOU, C. 1975. Subunit composition, function, and spatial arrangement in the Ca²⁺- and Mg²⁺-activated adenosine triphosphatases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Arch Biochem Biophys*, 167, 311-21.
- BRANDER, A., VIKINKOSKI, P., NICKELS, J. & KIVISAARI, L. 1991. Thyroid gland: US screening in a random adult population. *Radiology*, 181, 683-687.
- BRÜGGEMANN, M., OSBORN, M. J., MA, B., HAYRE, J., AVIS, S., LUNDSTROM, B. & BUELOW, R. 2015. Human antibody production in transgenic animals. *Arch Immunol Ther Exp*, 63, 101-108.
- BRÜNGER, A. T. 1997. Free R value: Cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol*.
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M. & J.M., S. 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques*, 5, 376-379.
- CABANILLAS, M. E., RYDER, M. & JIMENEZ, C. 2019. Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and Beyond. *Endocr. Rev.*, 40, 1573-1604.
- CAPALBO, C., SCAFETTA, G., FILETTI, M., MARCHETTI, P. & BARTOLAZZI, A. 2019. Predictive Biomarkers for Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy: The Galectin-3 Signature in NSCLCs. *Int J Mol Sci*, 20, 1607.
- CASTRO, M. R. & GHARIB, H. 2003. Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls. *Endocr Pract*, 9, 128-36.
- CHALKER, J. M., BERNARDES, G. J., LIN, Y. A. & DAVIS, B. G. 2009. Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology. *Chem Asian J*, 4, 630-40.
- CHIRIEAC, L. R. & ATTANOOS, R. L. 2018. 26 - Usual Lung Cancers. In: ZANDER, D. S. & FARVER, C. F. (eds.) *Pulmonary Pathology (Second Edition)*.
- CHOI, H. S., GIBBS, S. L., LEE, J. H., KIM, S. H., ASHITATE, Y., LIU, F., HYUN, H., PARK, G., XIE, Y., BAE, S., HENARY, M. & FRANGIONI, J. V. 2013. Targeted zwitterionic near-infrared fluorophores for improved optical imaging. *Nat Biotechnol*, 31, 148-53.
- CHOTHIA, C. & LESK, A. M. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Bio*, 196, 901-917.
- CLARK, M. C., PANG, M., HSU, D. K., LIU, F. T., DE VOS, S., GASCOYNE, R. D., SAID, J. & BAUM, L. G. 2012. Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death. *Blood*, 120, 4635-44.
- COOPER, D. S., DOHERTY, G. M., HAUGEN, B. R., KLOOS, R. T., LEE, S. L., MANDEL, S. J., MAZZAFERRI, E. L., MCIVER, B., PACINI, F., SCHLUMBERGER, M., SHERMAN, S. I., STEWARD, D. L. & TUTTLE, R. M. 2009. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 19, 1167-214.
- COULTER, A. & HARRIS, R. 1983. Simplified preparation of rabbit Fab fragments. *J Immunol Methods*, 59, 199-203.
- CUMMINGS, R. D., LIU, F. T. & VASTA, G. R. 2015. Galectins. In: RD, VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., STANLEY, P., HART, G. W., AEBI, M., DARVILL, A. G., KINOSHITA, T., PACKER, N. H., PRESTEGARD, J. H., SCHNAAR, R. L. & SEEBERGER, P. H. (eds.) *Essentials of Glycobiology*.
- D'ALESSANDRIA, C., BRAESCH-ANDERSEN, S., BEJO, K., REDER, S., BLECHERT, B., SCHWAIGER, M. & BARTOLAZZI, A. 2016. Noninvasive In Vivo Imaging and Biologic Characterization of Thyroid Tumors by ImmunoPET Targeting of Galectin-3. *Cancer Res*, 76, 3583-92.
- DE BENOIST, B. 2008. Iodine Deficiency in 2007: Global progress since 1993. *Food Nutr Bull*, 29, 195 - 202.

- DE ROSE, F., BRAEUER, M., BRAESCH-ANDERSEN, S., OTTO, A. M., STEIGER, K., REDER, S., MALL, S., NEKOLLA, S., SCHWAIGER, M., WEBER, W. A., BARTOLAZZI, A. & D'ALESSANDRIA, C. 2019. Galectin-3 Targeting in Thyroid Orthotopic Tumors Opens New Ways to Characterize Thyroid Cancer. *J Nucl Med*, 60, 770-776.
- DELANO, W. 2002. *The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA*. <http://www.pymol.org>.
- DEYEV, S., VOROBYEVA, A., SCHULGA, A., PROSHKINA, G., GÜLER, R., LÖFBLUM, J., MITRAN, B., GAROUSI, J., ALTAI, M., BUIJS, J., CHERNOV, V., ORLOVA, A. & TOLMACHEV, V. 2019. Comparative Evaluation of Two DARPin Variants: Effect of Affinity, Size, and Label on Tumor Targeting Properties. *Molecular Pharmaceutics*, 16, 995-1008.
- DIETLEIN, M., ESCHNER, W., GRÜNWALD, F., LASSMANN, M., VERBURG, F. A. & LUSTE, M. 2015. Radioiodtherapie beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom. *Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin e.V.*
- DOUGAN, D. A., MALBY, R. L., GRUEN, L. C., KORTT, A. A. & HUDSON, P. J. 1998. Effects of substitutions in the binding surface of an antibody on antigen affinity. *Protein Eng Des Sel*, 11, 65-74.
- DRATMAN, M. B. 1974. On the mechanism of action of thyroxine, an amino acid analog of tyrosine. *J Theor Biol*, 46, 255-270.
- DUNBAR, J., FUCHS, A., SHI, J. & DEANE, C. M. 2013. ABangle: characterising the VH-VL orientation in antibodies. *Protein Eng Des Sel*, 26, 611-20.
- EIGENMANN, M. J., FRONTON, L., GRIMM, H. P., OTTENEDER, M. B. & KRIPPENDORFF, B.-F. 2017. Quantification of IgG monoclonal antibody clearance in tissues. *mAbs*, 9, 1007-1015.
- EKBLAD, T., TRAN, T., ORLOVA, A., WIDSTRÖM, C., FELDWISCH, J., ABRAHMSÉN, L., WENNBORG, A., KARLSTRÖM, A. E. & TOLMACHEV, V. 2008. Development and preclinical characterisation of ^{99m}Tc-labelled Affibody molecules with reduced renal uptake. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35, 2245-55.
- ESER, M., MASIP, L., KADOKURA, H., GEORGIU, G. & BECKWITH, J. 2009. Disulfide bond formation by exported glutaredoxin indicates glutathione's presence in the E. coli periplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1572-7.
- FARHAD, M., ROLIG, A. S. & REDMOND, W. L. 2018. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 7, e1434467-e1434467.
- FEE, C. J. & VAN ALSTINE, J. M. 2006. PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues. *Chem Eng Sci*, 61, 924-939.
- FEIGE, M. J., HENDERSHOT, L. M. & BUCHNER, J. 2010. How antibodies fold. *Trends Biochem Sci*, 35, 189-98.
- FERDOUS, S. & MARTIN, A. C. R. 2018. AbDb: antibody structure database—a database of PDB-derived antibody structures. *Database*, 2018.
- FIEDLER, M. & SKERRA, A. 2001. proBA complementation of an auxotrophic E. coli strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. *Gene*, 274, 111-118.
- FOOTE, J. & WINTER, G. 1992. Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol*, 224, 487-499.
- FRANK, R. 2002. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J Immunol Methods*, 267, 13-26.
- FRANK, R. & DÖRING, R. 1988. Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports. *Tetrahedron*, 44, 6031-6040.
- FRENZEL, A., SCHIRRMANN, T. & HUST, M. 2016. Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *mAbs*, 8, 1177-1194.
- FUJIMORI, K., COVELL, D. G., FLETCHER, J. E. & WEINSTEIN, J. N. 1990. A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. *J Nucl Med*, 31, 1191-8.
- GADGIL, H. S., BONDARENKO, P. V., PIPES, G. D., DILLON, T. M., BANKS, D., ABEL, J., KLEEMANN, G. R. & TREUHEIT, M. J. 2006. Identification of cysteinylolation of a free

- cysteine in the Fab region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody using Lys-C limited proteolysis coupled with LC/MS analysis. *Anal Biochem*, 355, 165-174.
- GAO, X., CUI, Y., LEVENSON, R. M., CHUNG, L. W. & NIE, S. 2004. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 22, 969-76.
- GASTEIGER, E., GATTIKER, A., HOOGLAND, C., IVANYI, I., APPEL, R. D. & BAIROCH, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids res*, 31, 3784-3788.
- GONG, H. C., HONJO, Y., NANGIA-MAKKER, P., HOGAN, V., MAZURAK, N., BRESALIER, R. S. & RAZ, A. 1999. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. *Cancer Res*, 59, 6239-45.
- GRAFF, C. P. & WITTRUP, K. D. 2003. Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: importance of dosage for penetration, and affinity for retention. *Cancer Res*, 63, 1288-96.
- HAIGHT, F. A. 1967. Handbook of the Poisson Distribution. *John Wiley & Sons*.
- HALL, T. L., LAYFIELD, L. J., PHILIPPE, A. & ROSENTHAL, D. L. 1989. Sources of diagnostic error in fine needle aspiration of the thyroid. *Cancer*, 63, 718-725.
- HAMBLETT, K. J., SENTER, P. D., CHACE, D. F., SUN, M. M., LENOX, J., CERVENY, C. G., KISSLER, K. M., BERNHARDT, S. X., KOPCHA, A. K., ZABINSKI, R. F., MEYER, D. L. & FRANCISCO, J. A. 2004. Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. *Clin Cancer Res*, 10, 7063-70.
- HAUGEN, B. R. 2017. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed? *Cancer*, 123, 372-381.
- HAYASHI, K., MOROOKA, N., YAMAMOTO, Y., FUJITA, K., ISONO, K., CHOI, S., OHTSUBO, E., BABA, T., WANNER, B. L., MORI, H. & HORIUCHI, T. 2006. Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol*, 2, 2006.0007.
- HEINRICH, P. C., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. 2014. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Link*.
- HERMANSON, G. T. 2013. Bioconjugate Techniques (Third Edition). In: HERMANSON, G. T. (ed.) *Bioconjugate Techniques (Third Edition)*. Boston: Academic Press.
- HSU, D. K., ZUBERI, R. I. & LIU, F. T. 1992. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem*, 267, 14167-74.
- HURLE, M. R. & GROSS, M. 1994. Protein engineering techniques for antibody humanization. *Curr Opin Biotechnol*, 5, 428-433.
- IWASAKI, H., YAMAZAKI, H., TAKASAKI, H., SUGANUMA, N., SAKAI, R., NAKAYAMA, H., HATORI, S., TODA, S. & MASUDO, K. 2019. Treatment outcomes of differentiated thyroid cancer with distant metastasis improve by tyrosine kinase inhibitors. *Oncol lett.*, 17, 5292-5300.
- JACOBY, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22, 161-82, Table of Contents.
- JAIN, R. K. 1999. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng*, 1, 241-63.
- JAIN, R. K. & BAXTER, L. T. 1988. Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure. *Cancer Res*, 48, 7022-32.
- JANCARIK, J., SCOTT, W. G., MILLIGAN, D. L., KOSHLAND, D. E. & KIM, S.-H. 1991. Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of Salmonella typhimurium. *J Mol Biol*, 221, 31-34.
- JARASCH, A., RICHTER, A., EGGENSTEIN, E., KOPP, M., GEBAUER, M. & SKERRA, A. 2016. ANTICALiGN: visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering. *Protein Eng Des Sel*, 29, 263-270.
- JOHANNES, L., JACOB, R. & LEFFLER, H. 2018. Galectins at a glance. *J Cell Sci*, 131.
- JOHNSON, G. & WU, T. T. 2001. Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Res*, 29, 205-206.
- JONES, P. T., DEAR, P. H., FOOTE, J., NEUBERGER, M. S. & WINTER, G. 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 321, 522-525.

- JOUBERT, M. K., DESHPANDE, M., YANG, J., REYNOLDS, H., BRYSON, C., FOGG, M., BAKER, M. P., HERSKOVITZ, J., GOLETZ, T. J., ZHOU, L., MOXNESS, M., FLYNN, G. C., NARHI, L. O. & JAWA, V. 2016. Use of In Vitro Assays to Assess Immunogenicity Risk of Antibody-Based Biotherapeutics. *PLoS One*, 11, e0159328-e0159328.
- JUNUTULA, J. R., BHAKTA, S., RAAB, H., ERVIN, K. E., EIGENBROT, C., VANDLEN, R., SCHELLER, R. H. & LOWMAN, H. B. 2008a. Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. *J Immunol Methods*, 332, 41-52.
- JUNUTULA, J. R., RAAB, H., CLARK, S., BHAKTA, S., LEIPOLD, D. D., WEIR, S., CHEN, Y., SIMPSON, M., TSAI, S. P., DENNIS, M. S., LU, Y., MENG, Y. G., NG, C., YANG, J., LEE, C. C., DUENAS, E., GORRELL, J., KATTA, V., KIM, A., MCDORMAN, K., FLAGELLA, K., VENOOK, R., ROSS, S., SPENCER, S. D., LEE WONG, W., LOWMAN, H. B., VANDLEN, R., SLIWKOWSKI, M. X., SCHELLER, R. H., POLAKIS, P. & MALLETT, W. 2008b. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*, 26, 925-32.
- KABAT, E. A., WU, T. T., PERRY, H. M., GOTTESMAN, K. S. & FOELLER, C. 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. *National Institute of Health, Bethesda*.
- KAPLON, H. & REICHERT, J. M. 2019. Antibodies to watch in 2019. *mAbs*, 11, 219-238.
- KARLSSON, R., KATSAMBA, P. S., NORDIN, H., POL, E. & MYSZKA, D. G. 2006. Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem*, 349, 136-147.
- KIM, B. W., HONG, S. B., KIM, J. H., KWON, D. H. & SONG, H. K. 2013. Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat Commun*, 4, 1613.
- KIM, J. H. & HONG, H. J. 2012. Humanization by CDR grafting and specificity-determining residue grafting. *Methods Mol Biol*, 907, 237-45.
- KLEE, G. G. 2000. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*, 124, 921-3.
- KOBAYASHI, N., SUZUKI, Y., TSUGE, T., OKUMURA, K., RA, C. & TOMINO, Y. 2002. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, F358-65.
- KOSACKA, M., PIESIAK, P., KOWAL, A., GOŁECKI, M. & JANKOWSKA, R. 2011. Galectin-3 and cyclin D1 expression in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Oncol*, 30, 101-101.
- KRISSINEL, E. & HENRICK, K. 2004. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D*, 60, 2256-2268.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LASKOWSKI, R. A., MACARTHUR, M. W., MOSS, D. S. & THORNTON, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal Appl Cryst*, 26, 283-291.
- LATVALA, S., JACOBSEN, B., OTTENEDER, M. B., HERRMANN, A. & KRONENBERG, S. 2017. Distribution of FcRn Across Species and Tissues. *J Histochem Cytochem*, 65, 321-333.
- LEFRANC, M.-P., GIUDICELLI, V., GINESTOUX, C., BODMER, J., MÜLLER, W., BONTROP, R., LEMAITRE, M., MALIK, A., BARBIÉ, V. & CHAUME, D. 1999. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 27, 209-212.
- LEFRANC, M. P., GIUDICELLI, V., DUROUX, P., JABADO-MICHALOUD, J., FOLCH, G., AOUINTI, S., CARILLON, E., DUVERGEY, H., HOULES, A., PAYSAN-LAFOSSE, T., HADI-SALJOQI, S., SASORITH, S., LEFRANC, G. & KOSSIDA, S. 2015. IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R) 25 years on. *Nucleic Acids Res*, 43, D413-22.
- LESLIE, A. G. W. 1990. Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution. *J Mol Biol*, 213, 167-186.
- LINDHOLM, J. & LAURBERG, P. 2011. Hypothyroidism and thyroid substitution: historical aspects. *J Thyroid Res*, 2011, 809341-809341.
- LINDING, R., JENSEN, L. J., DIELLA, F., BORK, P., GIBSON, T. J. & RUSSELL, R. B. 2003. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*, 11, 1453-9.
- LIU, F. T. & RABINOVICH, G. A. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 5, 29-41.

- LOERS, G., CUI, Y.-F., NEUMAIER, I., SCHACHNER, M. & SKERRA, A. 2014. A Fab fragment directed against the neural cell adhesion molecule L1 enhances functional recovery after injury of the adult mouse spinal cord. *Biochem J*, 460, 437.
- LOMANT, A. J. & FAIRBANKS, G. 1976. Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J Mol Biol*, 104, 243-61.
- MACIAS, A., ARCE, S., LEON, J., MUSTELIER, G., BOMBINO, G., DOMARCO, A., PEREZ, R. & LAGE, A. 1999. Novel cross-reactive anti-idiotypic antibodies with properties close to the human intravenous immunoglobulin (IVIg). *Hybridoma*, 18, 263-72.
- MANZONI, F., WALLERSTEIN, J., SCHRADER, T. E., OSTERMANN, A., COATES, L., AKKE, M., BLAKELEY, M. P., OKSANEN, E. & LOGAN, D. T. 2018. Elucidation of Hydrogen Bonding Patterns in Ligand-Free, Lactose- and Glycerol-Bound Galectin-3C by Neutron Crystallography to Guide Drug Design. *J Med Chem*, 61, 4412-4420.
- MARCATILI, P., ROSI, A. & TRAMONTANO, A. 2008. PIGS: automatic prediction of antibody structures. *Bioinformatics*, 24, 1953-4.
- MENDEZ-HUERGO, S. P., BLIDNER, A. G. & RABINOVICH, G. A. 2017. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. *Curr Opin Immunol*, 45, 8-15.
- MENDLER, C. T., FRIEDRICH, L., LAITINEN, I., SCHLAPSCHY, M., SCHWAIGER, M., WESTER, H.-J. & SKERRA, A. 2014. High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *mAbs*, 7, 96-109.
- MINCHINTON, A. I. & TANNOCK, I. F. 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*, 6, 583-92.
- MORRISON, S. L., JOHNSON, M. J., HERZENBERG, L. A. & OI, V. T. 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *P Natl Acad Sci USA*, 81, 6851.
- MORTENSEN, J. D., WOOLNER, L. B. & BENNETT, W. A. 1955. GROSS AND MICROSCOPIC FINDINGS IN CLINICALLY NORMAL THYROID GLANDS*. *J. Clin. Endocri. Metabol.*, 15, 1270-1280.
- MURATLI, A., ERDOGAN, N., SEVIM, S., UNAL, I. & AKYUZ, S. 2014. Diagnostic efficacy and importance of fine-needle aspiration cytology of thyroid nodules. *J Cytol*, 31, 73-78.
- MURPHY, K. P. & WEAVER, C. 2016. Janeway's Immunobiology.
- NABI, I. R., SHANKAR, J. & DENNIS, J. W. 2015. The galectin lattice at a glance. *J Cell Sci*, 128, 2213.
- NGUYEN, J. T., EVANS, D. P., GALVAN, M., PACE, K. E., LEITENBERG, D., BUI, T. N. & BAUM, L. G. 2001. CD45 Modulates Galectin-1-Induced T Cell Death: Regulation by Expression of Core 2 & O-Glycans. *J Immunol*, 167, 5697.
- NGUYEN, Q. T., LEE, E. J., HUANG, M. G., PARK, Y. I., KHULLAR, A. & PLODKOWSKI, R. A. 2015. Diagnosis and treatment of patients with thyroid cancer. *Am Hlt Drug Ben*, 8, 30-40.
- OLSON, E. S., JIANG, T., AGUILERA, T. A., NGUYEN, Q. T., ELLIES, L. G., SCADENG, M. & TSIEN, R. Y. 2010. Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 4311.
- PAPOTTI, M., RODRIGUEZ, J., POMPA, R. D., BARTOLAZZI, A. & ROSAI, J. 2004. Galectin-3 and HBME-1 expression in well-differentiated thyroid tumors with follicular architecture of uncertain malignant potential. *Modern Pathol*, 18, 541.
- PEAT, T. S., CHRISTOPHER, J. A. & NEWMAN, J. 2005. Tapping the Protein Data Bank for crystallization information. *Acta Crystallogr D*, 61, 1662-1669.
- PERK, L. R., VOSJAN, M. J. W. D., VISSER, G. W. M., BUDDE, M., JUREK, P., KIEFER, G. E. & VAN DONGEN, G. A. M. S. 2010. p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol I*, 37, 250-259.
- PLÜCKTHUN, A. & SKERRA, A. 1989. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Method Enzymol*. Academic Press.

- PYZIK, M., RATH, T., LENCER, W. I., BAKER, K. & BLUMBERG, R. S. 2015. FcRn: The Architect Behind the Immune and Nonimmune Functions of IgG and Albumin. *J Immunol*, 194, 4595-603.
- QUAN, J. & TIAN, J. 2009. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS One*, 4, e6441-e6441.
- RAZ, A., PAZERINI, G. & CARMI, P. 1989. Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res*, 49, 3489-93.
- REGEP, C., GEORGES, G., SHI, J., POPOVIC, B. & DEANE, C. M. 2017. The H3 loop of antibodies shows unique structural characteristics. *Proteins*, 85, 1311-1318.
- REINERS, C., WEGSCHEIDER, K., SCHICHA, H., THEISSEN, P., VAUPEL, R., WRBITZKY, R. & SCHUMM-DRAEGER, P.-M. 2004. Prevalence of Thyroid Disorders in the Working Population of Germany: Ultrasonography Screening in 96,278 Unselected Employees. *Thyroid*, 14, 926-932.
- RICH, R. L. & MYSZKA, D. G. 2008. Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit*, 21, 355-400.
- ROSI, A., TRAMONTANO, A. & MARCATILI, P. 2008. PIGS: automatic prediction of antibody structures. *Bioinformatics*, 24, 1953-1954.
- SAFDARI, Y., FARAJNIA, S., ASGHARZADEH, M. & KHALILI, M. 2013. Antibody humanization methods – a review and update. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 29, 175-186.
- SAGGIORATO, E., CAPPIA, S., DE GIULI, P., MUSSA, A., PANCANI, G., CARACI, P., ANGELI, A. & ORLANDI, F. 2001. Galectin-3 as a presurgical immunocytodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 5152-8.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SCHEINBERG, D. A. & MCDEVITT, M. R. 2011. Actinium-225 in targeted alpha-particle therapeutic applications. *Curr Radiopharm*, 4, 306-320.
- SCHIWECK, W. & SKERRA, A. 1995. Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins*, 23, 561-565.
- SCHLAPSCHY, M., BINDER, U., BÖRGER, C., THEOBALD, I., WACHINGER, K., KISLING, S., HALLER, D. & SKERRA, A. 2013. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel*, 26, 489-501.
- SCHLAPSCHY, M., GRUBER, H., GRESCH, O., SCHÄFER, C., RENNER, C., PFREUNDSCHUH, M. & SKERRA, A. 2005. Functional humanization of an anti-CD30 Fab fragment for the immunotherapy of Hodgkin's lymphoma using an in vitro evolution approach. *Protein Eng Des Sel*, 17, 847-860.
- SCHLUMBERGER, M., TAHARA, M., WIRTH, L. J., ROBINSON, B., BROSE, M. S., ELISEI, R., HABRA, M. A., NEWBOLD, K., SHAH, M. H., HOFF, A. O., GIANOUKAKIS, A. G., KIYOTA, N., TAYLOR, M. H., KIM, S., KRZYZANOWSKA, M. K., DUTCUS, C. E., DE LAS HERAS, B., ZHU, J. & SHERMAN, S. I. 2015. Lenvatinib versus Placebo in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer. *N Engl J Med*, 372, 621-630.
- SCHMIDT, T. G. M. & SKERRA, A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc*, 2, 1528.
- SEETHARAMAN, J., KANIGSBERG, A., SLAABY, R., LEFFLER, H., BARONDES, S. H. & RINI, J. M. 1998. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem*, 273, 13047-52.
- SELIS, F., FOCÀ, G., SANDOMENICO, A., MARRA, C., DI MAURO, C., SACCANI JOTTI, G., SCARAMUZZA, S., POLITANO, A., SANNA, R., RUVO, M. & TONON, G. 2016. Pegylated Trastuzumab Fragments Acquire an Increased in Vivo Stability but Show a Largely Reduced Affinity for the Target Antigen. *Int J Mol Sci*, 17, 491-491.
- SEETER, 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. *Nat Biotechnol*, 30, 631.

- SEPULVEDA, J. & SHOEMAKER, C. B. 2008. Design and testing of PCR primers for the construction of scFv libraries representing the immunoglobulin repertoire of rats. *J Immunol Met*, 332, 92-102.
- SIRCAR, A., KIM, E. T. & GRAY, J. J. 2009. RosettaAntibody: antibody variable region homology modeling server. *Nucleic Acids Res*, 37, W474-W479.
- SKERRA, A. 1994a. A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene*, 141, 79-84.
- SKERRA, A. 1994b. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene*, 151, 131-135.
- SKERRA, A., MACK, H., THEOBALD, I., SCHLAPSCHY, M., WESTER, H.-J. & SCHOTTELIUS, M. 2007. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. *Protein Eng Des Sel*, 20, 273-284.
- SKERRA, A. & PLUCKTHUN, A. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240, 1038.
- SMITH, A. M., MANCINI, M. C. & NIE, S. 2009. Bioimaging: second window for in vivo imaging. *Nat Nanotechnol*, 4, 710-711.
- SPIEGELBERG, H. L. & WEIGLE, W. O. 1965. Studies on the catabolism of gamma- G subunits and chains. *J Immunol*, 95, 1034-40.
- STANFIELD, R. L., TAKIMOTO-KAMIMURA, M., RINI, J. M., PROFY, A. T. & WILSON, I. A. 1993. Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure*, 1, 83-93.
- STANFIELD, R. L., ZEMLA, A., WILSON, I. A. & RUPP, B. 2006. Antibody Elbow Angles are Influenced by their Light Chain Class. *J Mol Biol*, 357, 1566-1574.
- STAVE, J. W. & LINDPAINNER, K. 2013. Antibody and antigen contact residues define epitope and paratope size and structure. *J Immunol*, 191, 1428-35.
- STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, 189, 113-30.
- SWARTZ, M. A. & SKOBE, M. 2001. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech*, 55, 92-9.
- TAKENAKA, Y., INOHARA, H., YOSHII, T., OSHIMA, K., NAKAHARA, S., AKAHANI, S., HONJO, Y., YAMAMOTO, Y., RAZ, A. & KUBO, T. 2003. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett*, 195, 111-9.
- THIJSSSEN, V. L., HEUSSCHEN, R., CAERS, J. & GRIFFIOEN, A. W. 2015. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *BBA - Rev Cancer*, 1855, 235-247.
- THURBER, G. M., SCHMIDT, M. M. & WITTRUP, K. D. 2008. Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 57-61.
- THURBER, G. M., ZAJIC, S. C. & WITTRUP, K. D. 2007. Theoretic criteria for antibody penetration into solid tumors and micrometastases. *J Nucl Med*, 48, 995-9.
- TJANDRA, J. J., RAMADI, L. & MCKENZIE, I. F. 1990. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol*, 68 (Pt 6), 367-76.
- TRAMONTANO, A., CHOTHIA, C. & LESK, A. M. 1990. Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 215, 175-82.
- TRAN, T. A., EKBLAD, T., ORLOVA, A., SANDSTRÖM, M., FELDWISCH, J., WENNBORG, A., ABRAHMSÉN, L., TOLMACHEV, V. & ERIKSSON KARLSTRÖM, A. 2008. Effects of lysine-containing mercaptoacetyl-based chelators on the biodistribution of ^{99m}Tc-labeled anti-HER2 Affibody molecules. *Bioconjug Chem*, 19, 2568-76.
- VAUQUELIN, G. & CHARLTON, S. J. 2013. Exploring avidity: understanding the potential gains in functional affinity and target residence time of bivalent and heterobivalent ligands. *Brit J Pharmacol*, 168, 1771-1785.
- VEGT, E., DE JONG, M., WETZELS, J. F., MASEREEUW, R., MELIS, M., OYEN, W. J., GOTTHARDT, M. & BOERMAN, O. C. 2010. Renal toxicity of radiolabeled peptides and antibody fragments: mechanisms, impact on radionuclide therapy, and strategies for prevention. *J Nucl Med*, 51, 1049-58.

- VEREL, I., VISSER, G. W., BOELLAARD, R., STIGTER-VAN WALSUM, M., SNOW, G. B. & VAN DONGEN, G. A. 2003. ⁸⁹Zr immuno-PET: comprehensive procedures for the production of ⁸⁹Zr-labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med*, 44, 1271-81.
- VOGT, M. & SKERRA, A. 2001. Bacterially produced apolipoprotein D binds progesterone and arachidonic acid, but not bilirubin or E-3M2H. *J Mol Recognit*, 14, 79-86.
- VOROBYEVA, A., BRAGINA, O., ALTAI, M., MITRAN, B., ORLOVA, A., SHULGA, A., PROSHKINA, G., CHERNOV, V., TOLMACHEV, V. & DEYEV, S. 2018. Comparative Evaluation of Radioiodine and Technetium-Labeled DARPIn 9_29 for Radionuclide Molecular Imaging of HER2 Expression in Malignant Tumors. *Contrast Media Mol Imaging*, 2018, 6930425.
- VOSS, S. & SKERRA, A. 1997. Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng Des Sel*, 10, 975-982.
- WAGLE, N., GRABINER, B. C., VAN ALLEN, E. M., AMIN-MANSOUR, A., TAYLOR-WEINER, A., ROSENBERG, M., GRAY, N., BARLETTA, J. A., GUO, Y., SWANSON, S. J., RUAN, D. T., HANNA, G. J., HADDAD, R. I., GETZ, G., KWIATKOWSKI, D. J., CARTER, S. L., SABATINI, D. M., JÄNNE, P. A., GARRAWAY, L. A. & LORCH, J. H. 2014. Response and Acquired Resistance to Everolimus in Anaplastic Thyroid Cancer. *N Engl J Med*, 371, 1426-1433.
- WAHL, R. L., PARKER, C. W. & PHILPOTT, G. W. 1983. Improved radioimaging and tumor localization with monoclonal F(ab')₂. *J Nucl Med*, 24, 316-25.
- WALLACH, S., FARLEY, J. R., BAYLINK, D. J. & BRENNER-GATI, L. 1993. Effects of calcitonin on bone quality and osteoblastic function. *Calcif Tissue Int*, 52, 335-9.
- WEISSLEDER, R. 2001. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol*, 19, 316-7.
- WEISSLEDER, R., TUNG, C.-H., MAHMOOD, U. & BOGDANOV, A. 1999. In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol*, 17, 375-378.
- WHITELEGG, N. R. J. & REES, A. R. 2000. WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein Eng Des Sel*, 13, 819-824.
- WILKINS, M. R., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., SANCHEZ, J. C., WILLIAMS, K. L., APPEL, R. D. & HOCHSTRASSER, D. F. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. *Methods Mol Biol*, 112, 531-52.
- WOLFE, A. D. & HAHN, F. E. 1965. Mode of action of chloramphenicol IX. Effects of chloramphenicol upon a ribosomal amino acid polymerization system and its binding to bacterial ribosome. *BBA - Nucleic Acids Protein Synth*, 95, 146-155.
- WOO, H. J., LOTZ, M. M., JUNG, J. U. & MERCURIO, A. M. 1991. Carbohydrate-binding protein 35 (Mac-2), a laminin-binding lectin, forms functional dimers using cysteine 186. *J Biol Chem*, 266, 18419-22.
- WU, T. T., JOHNSON, G. & KABAT, E. A. 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins*, 16, 1-7.
- YANG, R. Y., RABINOVICH, G. A. & LIU, F. T. 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*, 10, e17.
- YAZAKI, P. J., WU, A. M., TSAI, S.-W., WILLIAMS, L. E., IKLE, D. N., WONG, J. Y. C., SHIVELY, J. E. & RAUBITSCHKEK, A. A. 2001. Tumor Targeting of Radiometal Labeled Anti-CEA Recombinant T84.66 Diabody and T84.66 Minibody: Comparison to Radioiodinated Fragments. *Bioconjugate Chem*, 12, 220-228.
- YE, J., MA, N., MADDEN, T. L. & OSTELL, J. M. 2013. IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool. *Nucleic Acids Res*, 41, W34-40.
- ZHENG, Y., YANG, H., WANG, H., KANG, K., ZHANG, W., MA, G. & DU, S. 2019. Fluorescence-guided surgery in cancer treatment: current status and future perspectives. *Ann transl med*, 7, S6-S6.
- ZHOU, Y., GOENAGA, A.-L., HARMS, B. D., ZOU, H., LOU, J., CONRAD, F., ADAMS, G. P., SCHOEBERL, B., NIELSEN, U. B. & MARKS, J. D. 2012. Impact of Intrinsic Affinity on Functional Binding and Biological Activity of EGFR Antibodies. *Mol Cancer Ther*, 11, 1467.