

Lehrstuhl für Biologische Chemie

Forschungsdepartment für Biowissenschaftliche Grundlagen

# **Protein-Engineering**

## **für die *In-Vivo*-Bildgebung**

**Diplom-Biochemikerin Claudia Theresa Mendler**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät  
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Bernhard Küster

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Arne Skerra  
2. Prof. Dr. Markus Schwaiger

Die Dissertation wurde am 12.01.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.02.17 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | HER2, CD20 und ED-B als Targets in der Krebstherapie.....                          | 1         |
| 1.1.1    | Der Membranrezeptor HER2 .....   | 1         |
| 1.1.2    | Der Ionenkanal CD20 .....  | 3         |
| 1.1.3    | Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin mit der Extradomäne B (ED-B) .....    | 5         |
| 1.2      | Tumorspezifische Antikörper und alternative Bindeproteine .....                    | 6         |
| 1.2.1    | Antikörper und Fab-Fragmente .....   | 6         |
| 1.2.2    | Anticaline und andere alternative Bindeproteine .....                              | 9         |
| 1.3      | Protein-Engineering für Tumordiagnostik und -therapie.....                         | 12        |
| 1.3.1    | Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften .....                            | 12        |
| 1.3.2    | Funktionelle Markierung von Antikörpern und anderen Bindeproteinen .....           | 14        |
| 1.4      | Radionuklide für die <i>In-Vivo</i> -Bildgebung und Therapie .....                 | 17        |
| 1.4.1    | <sup>124</sup> I und <sup>89</sup> Zr für die Positronen-Emissionstomographie..... | 19        |
| 1.5      | Zielsetzung dieser Arbeit.....   | 20        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>21</b> |
| 2.1      | Material.....  | 21        |
| 2.1.1    | Bakterienstämme und Plasmide .....   | 21        |
| 2.1.2    | Oligodesoxynukleotide .....  | 23        |
| 2.1.3    | Enzyme und sonstige Proteine.....  | 25        |
| 2.1.4    | Chemikalien.....   | 26        |
| 2.1.5    | Standards und Kits .....   | 27        |
| 2.1.6    | Geräte .....   | 28        |
| 2.1.7    | Sonstiges Material.....  | 29        |
| 2.1.8    | Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen .....                                  | 30        |
| 2.2      | Molekularbiologische und gentechnische Methoden .....                              | 34        |
| 2.2.1    | Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....                    | 34        |
| 2.2.2    | Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....                             | 34        |
| 2.2.3    | DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....  | 34        |
| 2.2.4    | Gelelektrophorese und Reinigung von DNA .....                                      | 35        |
| 2.2.5    | <i>In vitro</i> Modifizierung von DNA .....  | 35        |
| 2.2.6    | Sequenzierung doppelsträngiger DNA.....  | 37        |
| 2.2.7    | Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....                          | 38        |
| 2.3      | Proteinchemische Methoden.....   | 41        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.3.1    | Chromatographische Verfahren.....  | 41        |
| 2.3.2    | Ionenaustauschchromatographie .....  | 42        |
| 2.3.3    | SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....   | 43        |
| 2.3.4    | Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....   | 43        |
| 2.3.5    | Konzentrierung von Proteinen .....   | 44        |
| 2.4      | Modifizierung von Proteinen.....   | 44        |
| 2.4.1    | Periodat-Oxidation von Proteinen .....   | 44        |
| 2.4.2    | Kopplung von Anticalinen mit Reportergruppen über das Aldehyd-Tag.....                                   | 44        |
| 2.4.3    | Radioaktive Markierung mit <sup>177</sup> Lu .....   | 45        |
| 2.4.4    | (Radioaktive) Iodierung von Proteinen .....  | 46        |
| 2.4.5    | Kopplung mit Deferoxamin- <i>p</i> -SCN und radioaktive Markierung mit <sup>89</sup> Zr .....            | 46        |
| 2.5      | Immunchemische Methoden .....  | 47        |
| 2.5.1    | Western-Blotting.....  | 47        |
| 2.5.2    | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....  | 48        |
| 2.6      | Biophysikalische Methoden.....   | 50        |
| 2.6.1    | Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) .....   | 50        |
| 2.6.2    | CD-Spektroskopie.....  | 51        |
| 2.6.3    | Massenspektrometrie .....  | 52        |
| 2.7      | Zellkultur und <i>in vivo</i> Experimente.....   | 52        |
| 2.7.1    | <i>In vitro</i> Bindungsstudien mittels FACS-Titrationsanalyse .....                                     | 52        |
| 2.7.2    | Immunfluoreszenz.....  | 53        |
| 2.7.3    | IC <sub>50</sub> -Zelltest mit radioaktiv markierten Proteinen.....                                      | 53        |
| 2.7.4    | Biodistributionsanalyse in Mäusen .....  | 54        |
| 2.7.5    | PET-Bildgebung .....   | 54        |
| 2.8      | Computerprogramme und Datenbanken.....   | 55        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>56</b> |
| 3.1      | Funktionelle Markierung von Anticalinen anhand einer selektiv eingeführten Aldehydfunktion .....         | 56        |
| 3.1.1    | Generierung einer N-terminalen Aldehydfunktion mittels Periodat-Spaltung.....                            | 56        |
| 3.1.2    | Konstruktion von Varianten des αED-B Anticalins N7A mit dem Aldehyd-Tag .....                            | 58        |
| 3.1.3    | Bakterielle Produktion und Reinigung von Anticalinen mit dem Aldehyd-Tag.....                            | 63        |
| 3.1.4    | Verwendung der Aldehydfunktion zur Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff und funktionelle Analyse..... | 65        |
| 3.1.5    | Versuch zur Integration des Aldehyd-Tags in die Sekundärstruktur des Anticalins N7A.....                 | 66        |



|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.2      | Funktionalisierung von $\alpha$ ED-B Anticalinen für die <i>In-Vivo</i> -Bildgebung.....                | 72         |
| 3.2.1    | Affinitätsmaturierung des Anticalins N7A mittels rationaler Mutagenese .....                            | 72         |
| 3.2.2    | Affinitätsmaturierung des Anticalins N7E durch gerichtete Evolution.....                                | 78         |
| 3.2.3    | Ortsspezifische Markierung der Variante N7E.107 mit Hilfe des Aldehyd-Tags.....                         | 82         |
| 3.3      | Fab-Fragmente mit optimierter Pharmakokinetik für die <i>In-Vivo</i> -Bildgebung .....                  | 84         |
| 3.3.1    | Produktion der PASylierten Fab-Fragmente von Trastuzumab und Ofatumumab<br>in <i>E. coli</i> .....      | 85         |
| 3.3.2    | Radioaktive Markierung und funktionelle Analyse der Fab-Fragmente.....                                  | 88         |
| 3.3.3    | PET-Bildgebung im Maus-Tumormodell und Biodistributionsanalyse .....                                    | 91         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>102</b> |
| 4.1      | Funktionelle Markierung von Anticalinen.....  | 102        |
| 4.1.1    | Einführung einer N-terminalen Aldehydfunktion mittels Periodat-Oxidation .....                          | 102        |
| 4.1.2    | Ortsspezifische Markierung von Anticalinen mittels des Aldehyd-Tags.....                                | 104        |
| 4.1.3    | Einbau der FGE-Erkennungssequenz in die Sekundärstruktur von Anticalinen .....                          | 106        |
| 4.2      | Optimierung ED-B spezifischer Anticaline für die <i>In-Vivo</i> -Bildgebung.....                        | 108        |
| 4.2.1    | Affinitätsmaturierung der Anticaline N7A und N7E.....   | 108        |
| 4.2.2    | Funktionelle Markierung und <i>in vitro</i> Charakterisierung von N7E.107 .....                         | 109        |
| 4.3      | Fab-Fragmente mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit in der <i>In-Vivo</i> -Bildgebung .....             | 110        |
| 4.3.1    | Einfluss der Plasma-Halbwertszeit auf Pharmakokinetik und Tumoraufnahme ....                            | 111        |
| 4.3.2    | Vergleich mit anderen Tracer-Molekülen für HER2 und CD20 .....  | 113        |
| 4.3.3    | Einfluss des Radionuklids auf die <i>in vivo</i> Biodistribution.....                                   | 115        |
| 4.3.4    | Potential von $\alpha$ HER2 und $\alpha$ CD20 Fab-PAS <sub>200</sub> für Tumordiagnostik und Therapie . | 118        |
| <b>5</b> | <b>Zusammenfassung .....</b>  | <b>120</b> |
| <b>6</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>122</b> |



# 1 Einleitung

## 1.1 HER2, CD20 und ED-B als Targets in der Krebstherapie

### 1.1.1 Der Membranrezeptor HER2

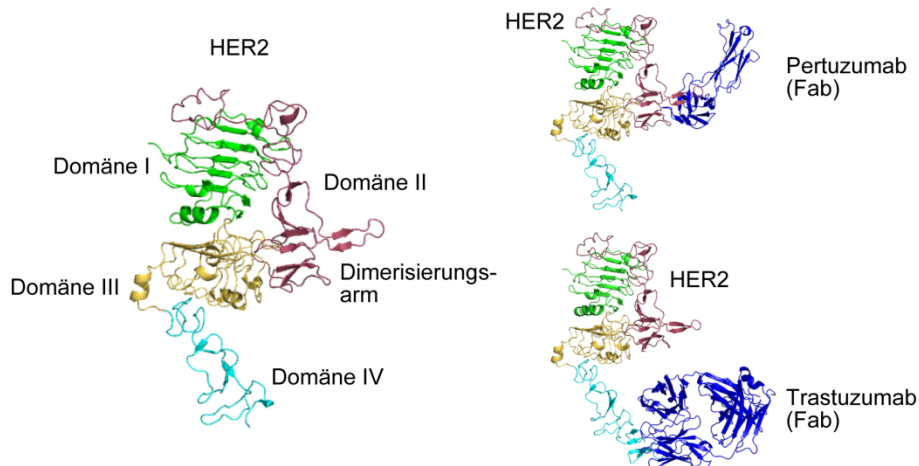
Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2, p185<sup>HER2</sup>, ErbB2) gehört zu einer Familie bestehend aus HER1, HER2, HER3 und HER4. Diese können sowohl Heterodimere als auch Homodimere ausbilden und dadurch wichtige zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Überleben und Differenzierung regulieren. Das für ein Membranprotein mit 185 kDa kodierende Protoonkogen HER2 ist in Mamma- (Ross *et al.*, 2004), Ovarial- (Pils *et al.*, 2007), Magen- (Tanner *et al.*, 2005; Sakai *et al.*, 1986) und Lungenkarzinomen (Onn *et al.*, 2004) häufig stark überexprimiert, was mit einem aggressiven Tumor-Phänotyp und schlechter Überlebensprognose bzw. progressiven Krankheitsverlauf einher geht. Diese Eigenschaften machen HER2 zu einem relevanten Zielmolekül für die Krebstherapie.

HER2 besteht aus einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne, einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne und einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne mit vier Subdomänen. Obgleich für HER2 bisher kein spezifischer Ligand (Wachstumsfaktor) identifiziert werden konnte, ist es der bevorzugte Partner für die selektive Dimerisierung mit anderen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFRs), insbesondere HER3. HER2 verursacht dabei die effektivste Signalweiterleitung, welche nach Autophosphorylierung über *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) und *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K) vermittelt wird (Tai *et al.*, 2010). Kristallographische Analysen haben gezeigt, dass HER2 konstitutiv in einer offenen Konformation vorliegt, in welcher die Dimerisierungsdomäne für andere EGFRs gut zugänglich ist (Garrett *et al.*, 2003), wohingegen die anderen Mitgliedern dieser Rezeptorfamilie erst nach Ligandenbindung in eine offene Konformation übergehen, in welcher der Dimerisierungsarm von Domäne II für die Bildung von Rezeptor-Dimeren zur Verfügung steht (**Abb. 1**).

1998 wurde der humanisierte IgG1/ $\kappa$  Antikörper Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>, Roche/Genentech) für die Behandlung von HER2-positivem invasivem Brustkrebs in Kombination mit Chemotherapie (insbesondere Paclitaxel, Taxol) von der U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen (Baselga, 2001). Trastuzumab wurde durch CDR-Transplantation von dem murinen monoklonalen Antikörper (mAK) 4D5 sowie anschließende Affinitätsmaturierung konstruiert (Carter *et al.*, 1992). Er bindet an die extrazelluläre Domäne von HER2 und ist in der Lage, durch *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity* (ADCC) Apoptose in den Tumorzellen auszulösen (Hudis, 2007).

Darüber hinaus wird HER2 auf der Zelloberfläche nach Bindung des bivalenten Trastuzumab auf unnatürliche Weise quervernetzt und durch Endocytose internalisiert. Dadurch wird einerseits die

Signaltransduktion verhindert und andererseits die Proteolyse der extrazellulären Domäne von HER2 (*Shedding*) und damit die Entstehung des noch aktiveren phosphorylierten Rezeptorteils p95 in der Membran unterdrückt (Molina *et al.*, 2001). Weitere Effekte von Trastuzumab sind die Auslösung eines G1-Arrests durch Induktion des Zellzyklusinhibitors p27 sowie die Hemmung der DNA-Reparatur und Angiogenese (Petit *et al.*, 1997).



**Abb. 1. Strukturen der extrazellulären Domäne von HER2 in Komplex mit den Fab-Fragmenten der therapeutischen Antikörper Pertuzumab und Trastuzumab, modifiziert nach Tai *et al.* (2010).** Die HER2 Domäne I ist in grün, Domäne II in rot, Domäne III in gelb und Domäne IV in cyanblau dargestellt. Der Dimerisierungsarm in Domäne II ist eingezeichnet. Die Koordinaten wurden von der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (PDB Eintrag 1S78 für Pertuzumab Fab und 1N8Z für Trastuzumab Fab) entnommen und mit der Software PyMOL (Schrödinger, 2015) bearbeitet.

Allerdings ist Trastuzumab nicht in der Lage, die Hetero-Dimerisierung von HER2 mit anderen EGFRs und damit die intrazelluläre Signalweiterleitung effektiv zu blockieren (Tai *et al.*, 2010). Dieser Umstand kann möglicherweise die Beobachtung erklären, dass nicht alle HER2-positiven Patienten auf eine Behandlung mit Trastuzumab ansprechen und deshalb meist eine Kombinationstherapie angewandt wird (Tai *et al.*, 2010). Der humanisierte mAK Pertuzumab (Perjeta, Roche/Genentech) hingegen bindet direkt die Dimerisierungsdomäne von HER2 und wurde speziell dafür entwickelt, die Assoziation zu verhindern (**Abb. 1**) (Adams *et al.*, 2006). Klinische Studien der Phasen I, II und III zeigten die sichere Verwendung und ein vielversprechendes Wirkungsprofil von Pertuzumab (Hodeib *et al.*, 2015). Außerdem wird die Kombination der beiden mAK mit ihrer unterschiedlichen Epitop-Erkennung untersucht. In Maus-Xenograft-Modellen konnte dabei eine stark verbesserte Wirkung im Vergleich mit der jeweiligen Einzeltherapie beobachtet werden (Scheuer *et al.*, 2009). Seit Juni 2012 ist Pertuzumab in Kombination mit Trastuzumab und Docetaxel für die Erstlinien-Therapie des metastasierten HER2-positiven Mammakarzinoms zugelassen (Blumenthal *et al.*, 2013).

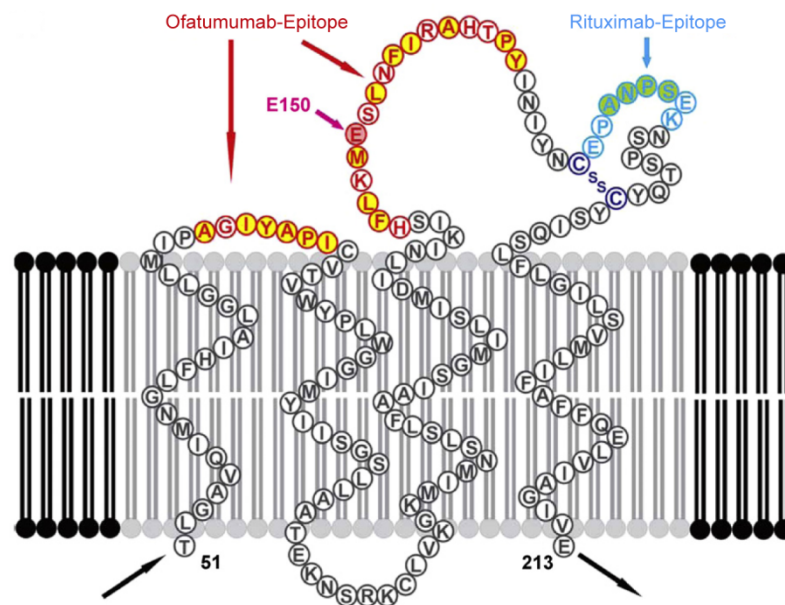
Da die Mehrzahl der Patienten im Verlauf der Therapie Resistenz gegen Trastuzumab entwickelt, besteht Bedarf an weiteren zielgerichteten Behandlungsformen. (Ado)-Trastuzumab (Kadcyla, T-

DM1, Roche/Genentech) ist mit dem Cytotoxin Mertansin über einen bifunktionellen Succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexan-1-carboxylat Linker (SMCC) durch stabile Thioether-Bindung konjugiert und seit Februar 2013 für Patienten mit vorangegangener Therapie mit Trastuzumab und Taxan zugelassen (Dirix *et al.*, 2013; Lewis Phillips *et al.*, 2008). Mertansin inhibiert die Polymerisierung von Tubulin und damit die Reorganisation des Cytoskeletts während der Zellteilung.

### 1.1.2 Der Ionenkanal CD20

Das 33-36 kDa große Transmembranprotein CD20 mit Calcium-Kanalaktivität wird auf der Zelloberfläche von 95 % aller B-Zell-Lymphozyten im Verlauf ihrer Entwicklung von der prä-B-Zelle bis hin zur reifen B-Zelle exprimiert (Tedder & Schlossman, 1988). CD20 ist außerdem auf 80 % aller B-Zell-Lymphome und bei einigen Leukämietypen wie chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (Hoelzer, 2011) zu finden, wohingegen hämatopoetische Stammzellen und die antikörperproduzierenden Plasmazellen keine Expression von CD20 zeigen (Stashenko *et al.*, 1980).

Zahlreiche für CD20 spezifische mAK sind gegenwärtig zur Behandlung von verschiedenen B-Zell-Lymphomen zugelassen oder werden in klinischen Studien evaluiert. Der chimäre IgG1/κ Antikörper Rituximab (MabThera, Rituxan, Roche/Genentech/Biogen IDEC) erhielt bereits 1997 von der FDA die Marktzulassung zur Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) (Keating, 2010). Ofatumumab (Arzerra, 2F2, HuMax-CD20, Genmab/GlaxoSmithKline), ein humaner IgG1/κ Antikörper, ist für die Behandlung von CLL lizenziert (Lemery *et al.*, 2010) (**Abb. 2**).



**Abb. 2. Schematische Darstellung der extrazellulären Schleifenregion sowie der Transmembranbereiche von CD20.** Die Erkennungssequenz von Rituximab mit dem zentralen ANPS-Motiv in der großen Schleife ist blau, das diskontinuierliche Ofatumumab-Epitope rot dargestellt (Du *et al.*, 2009).

Hergestellt wurde Ofatumumab, der ein anderes Epitop als Rituximab erkennt, unter Verwendung einer Ig-transgenen Mauslinie (HMab-Maus) (Dickson *et al.*, 1977).

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Effekte nach Antigenbindung werden die für CD20-spezifischen mAKs in Typ I und II eingestuft. Die biologische Wirkung von Typ I mAK (insbesondere Rituximab und Ofatumumab) beruht vor allem auf komplement-vermittelter Cytolyse, wohingegen Antikörper vom Typ II (wie Obinutuzumab und Tositumomab) verstärkt den direkten Zelltod mittels intrazellulärer Signalweiterleitung auslösen (Beers *et al.*, 2010). ADCC wird darüber hinaus von beiden Typen induziert. Neben der Tumortherapie wird der Einsatz CD20-spezifischer mAK für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (Scher, 2012), Multiple Sklerose (Hauser *et al.*, 2008) und systemischer Lupus erythematoses (Looney *et al.*, 2004) evaluiert.

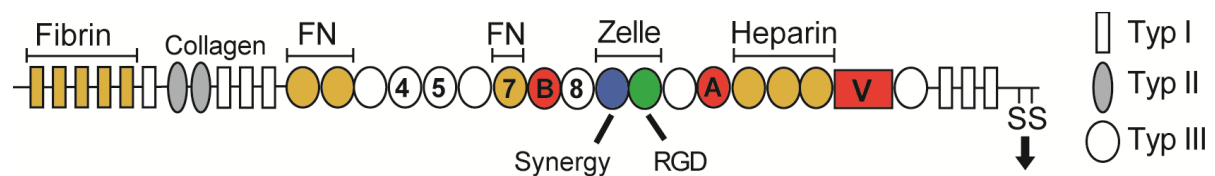
CD20 besteht aus vier Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen sowie intrazellulären N- und C-Termini, welche zahlreiche Serin- und Threonin-Phosphorylierungsstellen aufweisen. Letztere werden nach Aktivierung durch den B-Zellrezeptor wie auch durch Bindung von CD20-spezifischen Antikörpern phosphoryliert, wodurch nachfolgende Signalweiterung ausgelöst wird (Cragg *et al.*, 2005). Die biologische Funktion von CD20 wurde bisher kaum untersucht, da einerseits kein physiologischer Ligand bekannt ist und andererseits der Knockout des homologen Gens in der Maus keinen starken Phänotyp hervorruft (O'Keefe *et al.*, 1998). Auf der Zelloberfläche bildet CD20 Tetramere, welche mit *Lipid Rafts* und dem B-Zellrezeptor assoziiert sind (Deans *et al.*, 1998). CD20 fungiert vermutlich als Calciumkanal, welcher den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle nach Aktivierung des B-Zellrezeptors reguliert. Die Bindung von Typ I mAK an CD20 führt zu einem akuten Calciumeinstrom sowie zu einer Assoziation von CD20 mit *Lipid Rafts* auf der Zelloberfläche und ist infolgedessen nicht mehr mit Triton-X-100 solubilisierbar (Cragg *et al.*, 2003). *Lipid Rafts* sind hochgeordnete Domänen der Zellmembran, reich an Glycosphingolipiden und Cholesterin und sind an Signaltransduktion- und Zelladhäsionsprozessen beteiligt. Es wird angenommen, dass die Umverteilung von CD20 in *Lipid Raft*-Kompartments der Zellmembran zur Aktivierung verschiedene Proteine für die Signaltransduktion führt (Cragg *et al.*, 2005). Typ II mAK hingegen verursachen einen langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg und beeinflussen die CD20-Verteilung in der Membran nicht (Bubien *et al.*, 1993), was teilweise die funktionellen Unterschiede beider Antikörper Typen erklärt.

Mehrere Faktoren machen CD20 zu einem idealen Target für die Krebstherapie: **(a)** ausgeprägte Tumorspezifität, **(b)** hohe Expression (100.000 - 200.000 Kopien auf einer Zelle), **(c)** geringe Internalisierung, **(d)** seltener Verlust des Antigens infolge der Behandlung und **(e)** keine Abspaltung von der Zelloberfläche. Da weder Plasmazellen noch hämatopoetische Stammzellen angegriffen werden, ist die Neubildung von CD20-positiven Zellen nach Therapieende gewährleistet (Cragg *et al.*, 2005). Allerdings wurden in Plasmaproben von Patienten mit CLL größere Mengen an zirkulierendem

CD20 nachgewiesen, wobei es sich vermutlich um Membranfragmente von apoptotischen Tumorzellen handelt. Diese können die Pharmakokinetik der CD20-spezifischen mAK beeinflussen (Manshoury *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin mit der Extradomäne B (ED-B)

Das Glykoprotein Fibronektin (FN) ist eine der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix (EZM). Dieses große Multidomänenprotein besteht aus zwei weitgehend identischen Polypeptidketten von ca. 220 kDa, welche C-terminal durch Disulfidbrücken verknüpft sind. FN spielt eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion und Migration (White *et al.*, 2008). Der modulare Aufbau aus drei Klassen sich wiederholender Domänen, welche als Typ I, II und III bezeichnet werden, bietet verschiedene Bindestellen für andere Proteine der EZM, wie Heparin, Fibrin, Collagen und Integrine (**Abb. 3**). Eine bedeutende Isoform von FN ist auch als onkofetales Fibronektin bekannt und trägt – durch alternatives Spleißen – eine weitere Typ III Domäne, die sogenannte Extra-Domäne B (ED-B) (Pujuguet *et al.*, 1996).



**Abb. 3. Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Fibronektin (FN).** Typ I Domänen sind als Rechtecke, Typ II als Ellipsen und Typ III Domänen als Ovale dargestellt. Die alternativen Spleißdomänen A, B und V sind gelb eingefärbt. Die Dimerisierungsdomänen und Fibrinbindedomänen sind orange dargestellt. Integrine binden an die sogenannte RGD- und Synergy-Sequenz und vermitteln Zell-Zell Adhäsion. Die Bindedomänen für Collagen und Heparin sind ebenfalls markiert. Die beiden C-terminal angeordneten Cysteinreste (SS) vermitteln die Dimerisierung mit einer weiteren FN-Kette (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer, 2003).

Diese Isoform wird ausschließlich während der Embryonalentwicklung und, im erwachsenen Organismus, bei neo-angiogenen Prozessen wie der Wundheilung und in den weiblichen Reproduktionsorganen exprimiert. Darüber hinaus ist ED-B insbesondere bei der Neoangiogenese von soliden Tumoren, sowie auch auf einigen Tumorzelllinien zu finden (Castellani *et al.*, 1994). Tumor-Neoangiogenese setzt typischerweise ab einer kritischen Größe oberhalb von 1 mm<sup>3</sup> ein, da hier die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff über Diffusion nicht mehr gewährleistet ist (Folkman, 1971). Durch niedrigen Sauerstoffgehalt im Tumorgewebe wird zunächst die Aktivität von *Prolyl Hydroxylase Domain* Proteinen (PHD1-3), welche als Sauerstoffsensoren fungieren, reduziert. Dadurch wird die Ubiquitylierung und somit der proteosomale Abbau der *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF) 1 $\alpha$  und HIF 2 $\alpha$  Transkriptionsfaktoren verhindert. Infolgedessen wird die Transkription von Wachstumsfaktoren wie z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)-A

induziert. Nach Bindung an VEGF-Rezeptoren wird schließlich das Wachstum beziehungsweise Aussprossen von vaskulären Endothelzellen (Neoangiogenese) in Richtung Tumor induziert. Die derzeit populäre anti-angiogene Tumorthherapie richtet sich gegen Zielmoleküle auf dem Gefäßendothel oder den löslichen Faktor VEGF und stellt gegenüber der direkten Adressierung von Tumor Zelloberflächenmolekülen eine vielversprechende Alternative dar (Vasudev & Reynolds, 2014). Die generell gute Zugänglichkeit der Tumorgefäße und die geringe Gefahr eines Antigenverlusts ermöglichen eine effiziente Tumorthherapie.

Neben dem zellulären FN der EZM existiert auch eine lösliche Form von FN, welche keine alternativen Spleißsequenzen enthält und von Hepatozyten ins Blutplasma sekretiert wird (White *et al.*, 2008). Immunhistochemische Analysen haben verbreitete Expression von ED-B auf verschiedenen Tumoren, wie Lungen-, Kolorektal-, Hirn- und Kopf-Hals-Karzinomen gezeigt (Santimaria *et al.*, 2003; Birchler *et al.*, 2007). Außerdem korreliert das Auftreten von ED-B mit dem Schweregrad der Malignität. Obwohl die biologische Funktion von ED-B nicht vollständig bekannt ist, gibt es strukturelle Hinweise, dass dessen Einbau eine Rolle bei der Bildung von Integrin-Clustern spielt und zur Entstehung von FN-Fibrillen beiträgt, welche nicht spontan *in vivo* gebildet werden können (Schiefner *et al.*, 2012).

Die Abwesenheit von ED-B in gesundem Gewebe, die gute Zugänglichkeit sowie die Konservierung der Aminosäuresequenz zwischen Mensch, Affe, Kaninchen, Ratte und Maus machen ED-B zu einem vielversprechenden Zielmolekül für die Krebsdiagnostik und -therapie. Der rekombinante Antikörper L19 (Pini *et al.*, 1998), welcher ursprünglich als *Single-Chain Variable Fragment* (scFv) aus einer Phage-Display-Bibliothek selektiert wurde, wurde in klinischen Studien als Fusionsprotein mit Interleukin-2 in Patienten mit Nierenzellkarzinom (Johannsen *et al.*, 2010) sowie als *Small Immunoprotein* (SIP) markiert mit <sup>131</sup>I für die Radioimmuntherapie (RIT) von Hodgkin-Lymphomen untersucht (Sauer *et al.*, 2009).

Zudem wurden durch Phage-Display sogenannte Anticaline (s. Abschnitt 1.2.2) selektiert, welche ED-B spezifisch im Kontext ihrer Nachbardomänen erkennen und mit hoher Affinität binden (Gebauer *et al.*, 2013). Diese zeigen sowohl spezifische Färbung mittels Immunfluoreszenz auf ED-B positiven Tumorzelllinien als auch bei histologischen Untersuchungen der Neovaskulatur von humanen Glioblastomen (Albrecht *et al.*, 2016).

## **1.2 Tumorspezifische Antikörper und alternative Bindeproteine**

### **1.2.1 Antikörper und Fab-Fragmente**

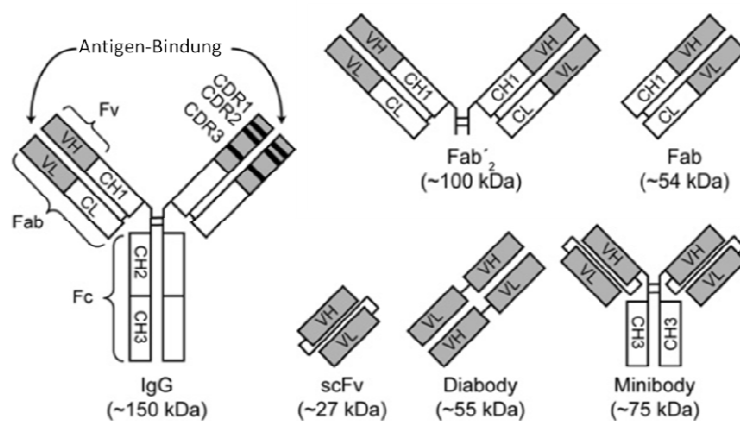
Durch die gezielte Ansteuerung von tumorassoziierten Antigenen können die Spezifität der Krebstherapie erhöht und toxische Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie deutlich reduziert werden. Dieses Konzept, in dem Antikörper als sogenannte „*Magic Bullets*“ ein spezifisches Zielmolekül ansteuern, wurde bereits zu Beginn des 20.



Jahrhunderts von Paul Ehrlich entworfen (Bosch & Rosich, 2008). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind mehr als 30 mAK für klinische Applikationen im Bereich der Onkologie wie auch für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen zugelassen (Reichert, 2012; Reichert, 2016). Sie bilden heute eine gut etablierte Klasse von biologischen Medikamenten mit hoher Erfolgsrate in der Entwicklung und guter Verträglichkeit.

Ein IgG-Molekül besteht aus zwei identischen leichten (25 kDa) und zwei identischen schweren (50 kDa) Polypeptidketten, welche im Scharnierbereich (*Hinge*) über Disulfidbrücken verbunden sind (**Abb. 4**). Die einzelnen Ketten sind aus wiederholten Ig-Domänen aufgebaut, die ihrerseits jeweils durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert sind (Padlan, 1994). Die Antigenbindestelle wird von bestimmten Abschnitten der variablen Domänen beider Ketten ausgebildet und besteht aus insgesamt sechs hypervariablen Schleifen, den sogenannten *Complementary Determining Regions* (CDRs). Durch proteolytischen Verdau mit Papain wird der Antikörper in das antigenbindende Fab-Fragment (*Fragment Antigen-Binding*) und den Fc-Teil (*Crystallisable Fragment*) des Antikörpers gespalten. Verdaut man Antikörper hingegen mit Pepsin, bleiben die beiden Fab-Fragmente verbunden und es entsteht das bivalente F(ab)<sub>2</sub> Fragment (**Abb. 4**).

Der Fc-Teil ermöglicht die Rezeptor-vermittelte Rekrutierung von zytotoxischen Effektorzellen, die Aktivierung des Komplementsystems, und er ist zudem für die lange Serumhalbwertszeit von Antikörpern durch Bindung an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) verantwortlich (Roopenian & Akilesh, 2007). Stetige Fortschritte in der molekularen Biotechnologie haben weiterhin die rekombinante Herstellung von verschiedenen Antikörperfragmenten ermöglicht, wie die monovalenten scFvs, bivalenten *Diabodies* und *Minibodies* oder die isolierten *Variable Domains* (V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>) (Holliger & Hudson, 2005) (**Abb. 4**).



**Abb. 4.** Schematische Darstellung eines IgG und verschiedener Antikörperfragmente, modifiziert nach Friedman & Stahl (2009).

Während das konventionelle Fv-Fragment, bestehend aus den gepaarten variablen Regionen beider Ig-Ketten, durch nicht kovalente Kräfte zusammengehalten wird, sind die beiden variablen Domänen von scFv-Fragmenten durch flexible Peptid-Linker verbunden (Bird & Walker, 1991). Nachteile dieser Strategie sind jedoch die reduzierte Antigenbindung durch die Fusion eines N-Terminus mit dem Peptid-Linker. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung der Proteinstruktur und sterischen Hinderung während der Antigenbindung.

Im Vergleich zu den scFv-Fragmenten stellt das Fab-Fragment ein robustes, strukturell gut-definiertes Protein-Format mit hoher Stabilität dar. Es besteht aus der gesamten leichten Kette sowie der variablen Domäne und ersten konstanten Domäne der schweren Kette. Beide Ketten werden dabei noch durch eine Disulfidbrücke nahe dem C-Terminus und die dichte Packung der konstanten Domänen beider Ketten stabilisiert.

Die Eindomänen-Antikörperfragmente V<sub>H</sub>H und V-NAR leiten sich von den besonderen Antikörpern der Kamelide und Knorpelfische ab, welche nur aus zwei schweren Ketten bestehen, ohne die Beteiligung einer leichten Kette. Im Gegensatz zu den V<sub>H</sub>-Domänen des Menschen oder der Maus zeigen V<sub>H</sub>H und V-NAR im allgemeinen gute Löslichkeit und Stabilität.

Die V<sub>H</sub>-Domänen der Kamelide bestehen aus nur einer isolierten variablen Domäne mit einer Bindestelle aus nur drei CDRs. Durch erhöhte Oberflächen-Hydrophilie der V<sub>H</sub>-Domänen aus Kameliden wird eine gute Löslichkeit dieser Domäne erreicht und die Bildung von Hetero- oder Homodimeren verhindert. Ungepaarte V<sub>H</sub>-Domänen aus normalen Igs hingegen exponieren eine hydrophobe Oberfläche, welche ansonsten mit der zweiten variablen Domäne assoziiert ist (Gebauer & Skerra, 2015). Die mittels Protein Design optimierten V<sub>H</sub>H-Domänen der Kamelide werden derzeit als Nanobodies® unter anderem für Tumordiagnostik und -Therapie evaluiert (Ablynx, [www.ablynx.com](http://www.ablynx.com)).

Ein Vorteil von Antikörperfragmenten ist ihre schnelle kostengünstige Herstellung und der einfache genetische Umgang mit dem Wirtsorganismus *E. coli* im Vergleich zur Produktion von mAK in Säugerzellen (Friedman & Stahl, 2009). Insbesondere für Fc-unabhängige Anwendungen sind Fab-Fragmente aufgrund ihrer hohen proteinbiochemischen Stabilität, beschleunigten Ausscheidung und der verbesserten Gewebepenetration den mAK überlegen. Gleichzeitig werden Fc-vermittelte Nebenwirkungen vermieden. Zudem ist die Fusion mit Toxinen oder anderen biologischen Effektormolekülen für die Tumorthherapie möglich.

Inzwischen sind einzelne therapeutische Antikörperfragmente zugelassen (Nelson, 2010), (<http://www.immunologylink.com/FDA-APP-Abs.html>). Abciximab (chimär, ReoPro®) wird in Säugerzellen exprimiert, er bindet den Glykoprotein-Rezeptor GPIIb/IIIa auf Thrombozyten und verhindert die Thrombozyten-Aggregation und Thrombose. Die Fab-Fragmente Ranibizumab

(Lucentis®, humanisiert, gegen VEGF-A) und Certolizumab Pegol (Cimzia®, PEGyliert, gegen Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) werden in *E. coli* produziert und sind für die Behandlung der Makuladegeneration (Hemmung der Neovaskularisierung) bzw. der Rheumatoiden Arthritis zugelassen (Rosenfeld *et al.*, 2006; Goel & Stephens, 2010). Für die szintigraphische Tumordiagnostik wird das mit <sup>99m</sup>Tc-markierte Fab-Fragment Sulesomab, welches gegen das Carcinoembryonale Antigen (CEA) gerichtet ist, bei Verdacht auf Osteomyelitis eingesetzt (Vollmar *et al.*, 2013). Als Antidote gegen das Gift der Klapperschlange oder das Herzglycosid Digitalis, ein Pflanzentoxin, werden die Fab-Fragmente CroFab® und DigiFab® verabreicht. Weitere vielversprechende Antikörperfragmente befinden sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt in der klinischen und präklinischen Entwicklung (Gebauer & Skerra, 2015).

### 1.2.2 Anticaline und andere alternative Bindeproteine

Neben den Antikörpern und deren Fragmenten bieten die alternativen nicht-Ig Proteinstrukturgerüste eine neue Klasse von tumorspezifischen Bindeproteinen. Eine stabile natürliche Proteinstruktur dient hier als Grundlage für die Generierung einer neuen Bindestelle für ein vorgegebenes Zielmolekül. Als Strukturgerüst dienen meist kleine, robuste, lösliche Proteine wie die Lipocaline (Anticaline) (Mendler & Skerra, 2013) oder die stabilen Domänen eines extrazellulären Rezeptors, wie beispielsweise die Z-Domäne von *Staphylococcal* Protein A (Affibodies) (Nygren, 2008), die FN3-Domäne von Fibronectin (Monobodies, Adnectins) (Koide *et al.*, 2012) oder Konsensus-Ankyrin-Repeat-Domänen (DARPin) (Stumpp *et al.*, 2008).

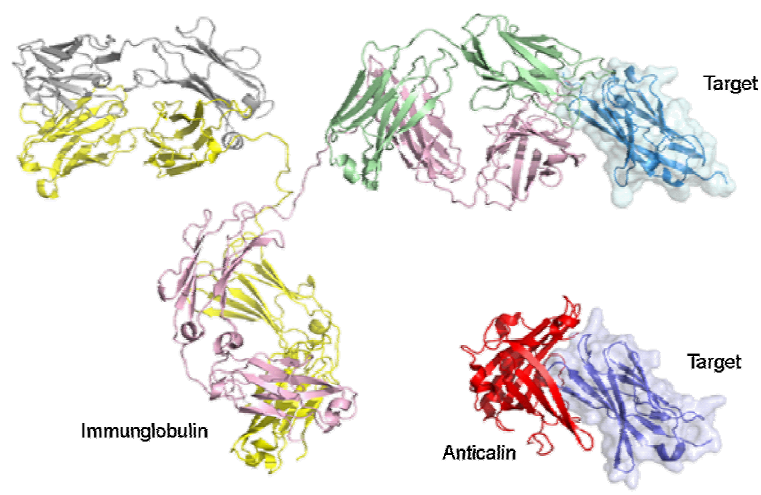
Anticaline basieren auf den Lipocalinen, einer Familie unterschiedlicher Proteine, welche aus einer einzelnen Polypeptidkette von 160-180 Aminosäuren bestehen. Lipocaline dienen dem Transport oder der Speicherung von empfindlichen biochemischen Verbindungen wie Vitaminen, Steroiden, Lipiden und anderen Sekundärmetaboliten (Flower, 1995). Mitglieder der Lipocalin-Familie findet man in Vertebraten, Insekten, Pflanzen, Bakterien und dem Menschen, wo bisher etwa 12 verschiedene Lipocaline als lösliche Proteine im Blutplasma und anderen Gewebsflüssigkeiten identifiziert wurden und in hohen Konzentrationen von über 1 mg/ml vorkommen (Schiefner & Skerra, 2015).

Neben endogenen humanen Lipocalinen und natürlichen Lipocalinen von blutsaugenden Insekten zeigen Lipocaline mit künstlich veränderten Bindungsstellen (Anticaline) Potential für therapeutische Anwendungen (Richter *et al.*, 2014). Das humane *Neutrophil Gelatinase-Associated* Lipocalin (NGAL, auch als Siderocalin oder Lipocalin-2, Lcn2 bekannt) und das Tränen-Lipocalin (Tlc, auch Lipocalin-1, Lcn1) spielen eine wichtige Rolle für die angeborene Immunabwehr, da sie Siderophore von Bakterien und Pilzen binden und so mikrobielles Wachstum hemmen (Holmes *et al.*, 2005; Fluckinger *et al.*, 2004). Das natürliche Histamin-Bindeprotein aus dem Speichel der Zecke *Rhipicephalus*

*appendiculatus* (HBP, rEV-131; Evlutec Group plc.) und der Komplement-Inhibitor der Lederzecke *Ornithodoros moubata* (OmCI, rEV-576; Coversin; Akari plc.) sind gegenwärtig in klinischen Phase I/II Studien zur Behandlung von allergischen Reaktionen und von Autoimmunerkrankungen wie Myasthenia gravis evaluiert worden (Soltys *et al.*, 2009; Romay-Penabad *et al.*, 2014; Weston-Davies *et al.*, 2013).

Das zentrale Faltungsmotiv der Lipocaline ist ein strukturell konserviertes  $\beta$ -Fass ( $\beta$ -Barrel), welches aus acht um eine zentrale Achse gewundenen antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen geformt wird (**Abb. 5**). Der Boden dieser becherförmigen Struktur wird durch kurze Schleifen geschlossen, und dabei wird ein hydrophober Kern von dicht gepackten Aminosäureseitenketten gebildet. Die großen Unterschiede in Sequenz, Länge und Rückgrat-Konformation der vier Schleifen, welche am oberen Ende der  $\beta$ -Barrels den Eingang zur Ligandenbindestelle bilden, bedingen die unterschiedlichen Spezifitäten der Lipocalin-Familienmitglieder (Skerra, 2000).

Die einfache molekulare Architektur der Lipocaline mit einer einzigen Polypeptidkette ermöglicht die kostengünstige biotechnologische Produktion in *E. coli* unter GMP-Bedingungen. Als typische sekretorische Proteine tragen Lipocaline eine konservierte Disulfidbrücke, welche den C-Terminus an das  $\beta$ -Barrel fixiert. Im Vergleich zu mAKs ist die Disulfidbrücke der Anticaline für Faltung und biologische Aktivität nicht essentiell und kann durch Protein-Design ohne Funktionsverlust entfernt werden (Mendler & Skerra, 2013). Die verschiedenen Familienmitglieder zeigen unterschiedliche oder keine Glykosylierung. Da Lipocaline effizient als lösliche, funktionelle Proteine in *E. coli* produziert werden können, kann die Glykosylierung generell als vernachlässigbar betrachtet werden (Breustedt *et al.*, 2006).



**Abb. 5. Struktureller Vergleich zwischen einem Immunglobulin und einem maßgeschneiderten Lipocalin (Anticalin), nach Mendler & Skerra (2013).** Die leichten Ketten des Antikörpers sind in grau und grün, die schweren Ketten in gelb und rosa dargestellt. Das Anticalin ist rot, beide Targets sind in Blauschattierungen abgebildet.

Prinzipiell zeichnet sich die Ligandenbindestelle der Lipocaline durch hohe strukturelle Plastizität aus, vergleichbar mit der hypervariablen Schleifenregion der Antikörper. Diese Besonderheit ermöglicht die Selektion von neuen antigenbindenden Proteinen mit antikörperähnlichen Eigenschaften, welche als Anticaline bezeichnet werden (Skerra, 2001). Mittels kombinatorischem Protein-Designs können die vier hypervariablen Schleifenregionen am Eingang zur Bindungstasche verändert werden, um neue Zielmoleküle zu erkennen.

Zunächst wurden Anticaline gegen kleinere exogene Liganden wie Fluorescein (Beste *et al.*, 1999) und Digitalis (Schlehuber *et al.*, 2000) auf der Grundlage des Bilin-Bindeproteins (BBP) (Schmidt & Skerra, 1994) aus dem Insekt *Pieris brassicae* mit Hilfe der Phage-Display-Methode selektiert. Später wurden Anticaline auch gegen Protein-Targets wie Zelloberflächenrezeptoren, Wachstums- und Signalfaktoren mit Hilfe neuer Anticalin-Bibliotheken basierend auf humanen Lipocalinen wie dem Apolipoprotein D (ApoD) (Vogt & Skerra, 2004), NGAL (Schönfeld *et al.*, 2009) und Tlc (Breustedt *et al.*, 2009) gewonnen. Für die Selektion des Anticalins Angiocal<sup>®</sup> (PRS-050; Pieris AG) mit antagonistischer Wirkung gegen VEGF-A wurde beispielsweise Tlc als Strukturgerüst verwendet (Gille *et al.*, 2016), während die gegen onkofetales Fibronectin (ED-B) selektierten Anticaline N7A, N7E und N9B auf einer verbesserten NGAL-Bibliothek beruhen (Gebauer *et al.*, 2013).

Allgemein werden 16-24 randomisierte Positionen in der Liganden-Bindestelle, ein Kompromiss zwischen der benötigten strukturellen Variation und Abdeckung des kombinatorischen Sequenzraums, als optimal für die Herstellung einer Anticalin-Bibliothek erachtet (Richter *et al.*, 2014). Neben der Auswahl der randomisierten Positionen spielt auch die Qualität der Bibliothek eine wichtige Rolle. Oligodesoxynukleotide mit degenerierten NNS/NNK-Codons an den vorbestimmten Aminosäurepositionen oder mit definierten Mischungen aus Nukleotidtriplets (Van den Brulle *et al.*, 2008) werden zur Mutagenese eingesetzt und mittels PCR amplifiziert (Gebauer & Skerra, 2012).

Strukturelle Analysen der auf dem NGAL-Strukturgerüst basierenden gegen ED-B und CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) gerichteten Anticaline haben den Erhalt des  $\beta$ -Barrels und die hohe Flexibilität der Schleifenregionen bestätigt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die natürliche Vielfalt der Ligandenbindestelle innerhalb der Lipocalin-Familie mittels kombinatorischem Protein-Design deutlich erweitert werden kann (Gebauer *et al.*, 2013). Interessanterweise wurde beim Vergleich der Struktur mit und ohne Ligand für das  $\alpha$ CTLA-4 Anticalin ein *Induced Fit* Mechanismus der Ligandenbindung beobachtet (Schönfeld *et al.*, 2009). Diese Besonderheit zeigt einmal mehr die Ähnlichkeit der Lipocaline zu den Immunglobulinen (**Abb. 5**) und den Vorteil der Anticaline gegenüber anderen nicht-Ig Proteinstrukturgerüsten, welche meist aus starren Sekundärstrukturelementen bestehen (Gebauer & Skerra, 2015).

## 1.3 Protein-Engineering für Tumordiagnostik und -therapie

### 1.3.1 Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften

Antikörper werden seit vielen Jahren erfolgreich in der Krebstherapie und Diagnostik eingesetzt. Ihre lange Plasma-Halbwertszeit aufgrund der ausgedehnten Moleküldimensionen (jenseits der Filtrationsgrenze der Niere) sowie des Recyclings mittels des neonatale Fc-Rezeptors (FcRn) erlaubt eine verlängerte Kontaktzeit mit dem Tumorantigen auf der Zelloberfläche (Binder & Skerra, 2015). Der *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) Effekt begünstigt zudem die Anreicherung der Antikörper im Tumorgewebe (Iyer *et al.*, 2006; Wester & Kessler, 2005). Dieses Phänomen beschreibt den Ausstrom von Blutplasma-Komponenten, insbesondere von großen Proteinen und anderen Makromolekülen >40 kDa, in das Tumorgewebe und deren unspezifische Akkumulation dort. Tumore sind durch abnorme Blutgefäße und Endothel charakterisiert, was sehr wahrscheinlich durch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Signalen hervorgerufen wird. Andererseits garantiert der EPR-Effekt nicht die homogene Distribution der mAK im Tumorgewebe nach ihrem Austritt aus den Kapillargefäßen. So ist die Wirksamkeit von mAK mit konjugierten Toxinen (Dirix *et al.*, 2013) oder therapeutischen Radionukliden (Gordon *et al.*, 2004) oft durch den Umstand limitiert, dass mAK aufgrund ihrer Größe meist heterogene Tumorverteilung zeigen, wobei einige Bereiche überhaupt nicht erreicht werden (Dreher *et al.*, 2006).

Zudem resultiert aus der langen Verweildauer der mAb-Konjugate im Blut — typischerweise im Bereich von zwei bis drei Wochen (Lobo *et al.*, 2004) — ein hoher Signal-Hintergrund und gegebenenfalls die Exposition von gesundem Gewebe. Dies ist generell problematisch für die hochauflösende Bildgebung und verursacht Nebenwirkungen, insbesondere ist diese dosislimitierend bei der RIT (Wu & Senter, 2005). Gerade für diagnostische Anwendungen *in vivo*, welche ein hohes Signal-zu-Hintergrundverhältnis verlangen, sind kleinere Formate wie Fab-Fragmente oder Anticaline daher grundsätzlich besser geeignet. Eine schnellere Ausscheidung aus dem Blutkreislauf, keine Bindung an FcRn und bessere Gewebepenetration werden durch ihre geringe Größe von 48 bzw. 21 kDa – unterhalb der Ausschlussgrenze für die Nierenfiltration – und des fehlenden Fc-Teils erreicht (Holliger & Hudson, 2005). Andererseits verhindert eine rasche Ausscheidung — von Minuten bis zu wenigen Stunden im Menschen — eine effiziente Tumoranreicherung und ist für das schnelle Auswaschen der Protein-Tracer aus dem Tumorgewebe verantwortlich (Dennis *et al.*, 2007). Der Eliminierungsweg über die Niere führt zudem auch zu einer hohen Aufnahme von Tracern im Nierengewebe, wo das Radiometall in den Zellen des proximalen Tubulus nach Absorption verbleibt (Vegt *et al.*, 2010; Dennis *et al.*, 2007). Mit zunehmender Molekülgröße des Protein-Tracers nimmt der Siebkoeffizient ab, und die Zirkulationsdauer wird verlängert, wobei die Ausschlussgrenze bei etwa 70 kDa liegt. Negativ geladene Proteine zeigen zusätzlich verringerte Filtration aufgrund der

anionischen Ladung der Basalmembran. Serumalbumin mit einer Molekülgröße von 69 kDa und einem isoelektrischen Punkt (IEP) von ca. 5 besitzt beispielsweise einen Siebkoeffizienten  $<0,001$ , woraus eine Plasma-Halbwertszeit von ca. 19 Tagen im Menschen resultiert (Peter Jr, 1996).

Die Analyse von Literaturdaten aus verschiedenen Studien mit Proteinreagenzien unterschiedlicher Größe und Affinität zeigte den starken Einfluss pharmakokinetischer Parameter auf Tumoraufnahme und Biodistribution (Schmidt & Wittrup, 2009; Wittrup *et al.*, 2012). Die Affinität eines Protein-Tracers korreliert dabei direkt mit der Tumoraufnahme, wohingegen die Molekülgröße auf Plasma-Halbwertszeit und Transportparameter wie kapillare Permeabilität, Diffusion und das zugängliche Verteilungsvolumen von Einfluss ist. Eine Möglichkeit, die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Protein-Tracers zu verbessern ist daher die Optimierung seiner Plasma-Halbwertszeit.

Dementsprechend wurden verschiedene Versuche unternommen, um die Plasma-Halbwertszeit zu verlängern und die Biodistribution von Protein-basierten Tracern zu kontrollieren:

**(a)** Die Fusion mit einem Fc-Teil kann die Plasma-Halbwertszeit eines Proteins verlängern. Die Verweildauer der Fusionsproteine im Blut erfolgt dabei analog zu den Antikörpern durch endosomales Recycling über FcRn. Die Bindung des Antikörpers an FcRn erfolgt unter sauren Bedingungen in frühen Endosomen. Infolgedessen wird IgG durch Exocytose wieder freigesetzt, während andere Proteine in den Lysosomen verbleiben und abgebaut werden (Rath *et al.*, 2015). Von Nachteil sind allerdings die aufwendige Produktion, Dimerisierung und immunologischen Effektorfunktionen.

**(b)** Die Fusion mit einer Albumin-Bindedomäne (ABD) – oder auch direkt mit Serumalbumin – führt zu einer effizienten Verlängerung der Tracer-Zirkulation und hoher Tumoranreicherung. Zum Beispiel nutzten Dennis *et al.* (2007) ein mittels Phage-Display gegen menschliches Serumalbumin selektiertes Peptid, um die Plasma-Halbwertszeit des für HER2 spezifischen Fabs 4D5 zu verlängern und konnten mit diesem Konstrukt tatsächlich höhere Tumoraufnahme erreichen. Albumin liegt in hoher Konzentration im Blutplasma vor, überschreitet die glomeruläre Porengröße (s. oben) und wird vergleichbar den Antikörpern über FcRn recycelt, wodurch eine den mAK vergleichbare Plasma-Halbwertszeit erreicht wird (Chaudhury *et al.*, 2003; Baker *et al.*, 2009). Weiterhin wird Albumin von vielen Tumoren verstoffwechselt, was zu einer verstärkten Albumin-Aufnahme führt (Stehle *et al.*, 1997). Nachteilig für das Imaging ist allerdings die lange Verweildauer des Tracers im Blut, wodurch ein hohes Hintergrundsignal entsteht.

**(c)** Eine alternative, klinisch anerkannte Methode besteht darin das hydrodynamische Volumen eines Proteins durch chemische Konjugation mit Polyethylenglycol (PEG) zu vergrößern, um die Nierenfiltration zu reduzieren und folglich dessen Zirkulationsdauer im Blutplasma zu verlängern (Pasut & Veronese, 2012). Studien mit PEGylierten scFv-Fragmenten und DARPins, beide gegen HER2

gerichtet, zeigten eine verstärkte Tumoraufnahme (Zahnd *et al.*, 2010; Kubetzko *et al.*, 2006). Allerdings führt auch die erheblich längere Verweildauer im Blut durch Konjugation mit einem 20 kDa PEG Polymer ebenfalls zu einem schlechten Tumor-zu-Blut-Verhältnis. Zudem sind mit dieser chemischen Modifizierung hohe Kosten, geringe Kopplungsausbeuten sowie polydisperse und nicht biologisch abbaubare Reaktionsprodukte verbunden. Aufgrund dessen wurden PEG-Ablagerungen in „Vakuolen“ der Niere und Makrophagen beobachtet.

**(d)** Die Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit mittels PASylierung ist eine neuartige biologische Alternative zur PEGylierung und bietet aufgrund der exakten genetischen Kodierung zudem die Möglichkeit der genauen Einstellung dieses Parameters (Binder & Skerra, 2015). Das biosynthetische Aminosäurepolymer bestehend aus Prolin, Alanin und Serin wird bereits bei der gentechnischen Herstellung mit dem tumorspezifischen Bindeprotein fusioniert und nimmt in physiologischer Lösung eine stabile Zufallsknäuelstruktur an, wodurch das hydrodynamische Volumen des Fusionsproteins drastisch vergrößert und so dessen Nierenfiltration verringert und letztendlich die Plasma-Halbwertszeit verlängert wird. Im Gegensatz zur PEGylierung entfallen aufwendige zusätzliche Modifizierungsschritte, die biologische Funktion wird praktisch nicht beeinträchtigt und die biologische Zusammensetzung aus körpereigenen und metabolisierbaren Aminosäuren verhindert toxische Effekte oder eine intrazelluläre Anreicherung des Polymeranteils. Weitere biosynthetische Polypeptide wie das rekombinante *Glycine-rich Homo-amino-acid* Polymer (HAP) oder das XTEN-Polymer verlängern die Plasma-Halbwertszeit nach demselben Prinzip (Schlapschy *et al.*, 2007; Schellenberger *et al.*, 2009).

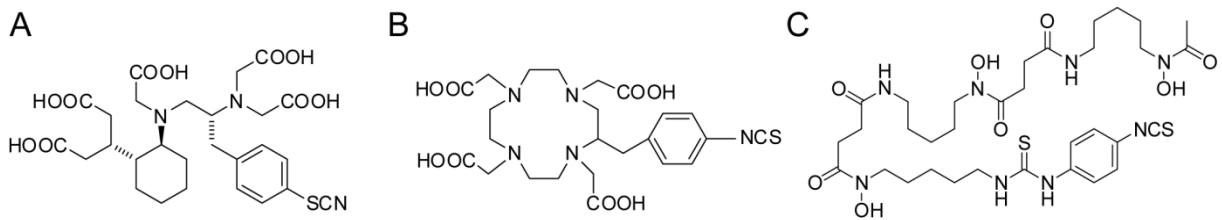
### 1.3.2 Funktionelle Markierung von Antikörpern und anderen Bindeproteinen

Für die Funktionalisierung von Proteinen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, wobei die klassische Proteinbiochemie auf der Modifizierung der 20 natürlichen Aminosäuren beruht (Carrico, 2008; Hermanson, 2013). Typischerweise werden Lysinseitenketten mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ethern und Isothiocyanat (ITC)-Gruppen funktionalisiert. Cysteinreste können dagegen selektiv mit Maleimid-Funktionen modifiziert werden. Radiometalle eignen sich besonders gut für die Markierung von großen Biomolekülen wie Proteinen und Antikörpern, da die geringe Größe des zur Komplexbildung benötigten Chelators die biologische Funktion kaum beeinträchtigt.

Für die Markierung mit Radiometallen werden typischerweise bifunktionelle Chelatoren wie 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), 2-[[[(1R)-2-[Bis(carboxymethyl)amino]cyclohexyl]-[(2S)-2-[bis] (carboxy-methyl)amino]-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]amino] acetic acid (CHXA''DTPA) sowie Desferrioxamin (Df) mittels Isothiocyanat-Chemie an mAK gekoppelt (Tolmachev & Stone-Elander, 2010) (**Abb. 6**). In der Radiochemie spielt daneben die selektive Iodierung von



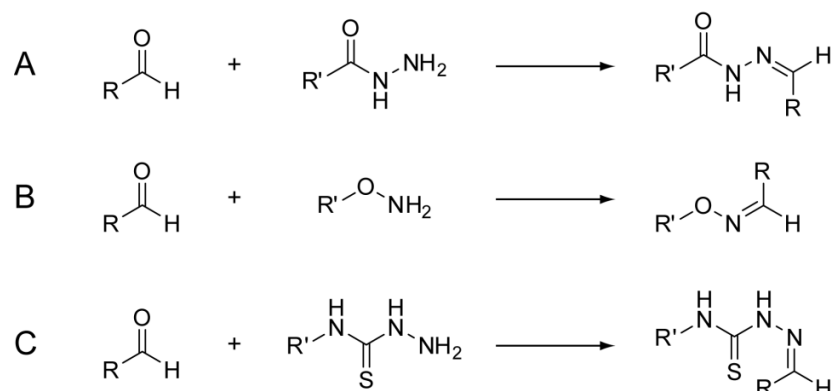
Tyrosinresten mittels der Iodogenmethode eine große Rolle (s. Abschnitt 1.4.1) (Fraker & Speck, 1978).



**Abb. 6. Die bifunktionellen Chelatoren CHX-A''-DTPA (A), p-SCN-DOTA (B) und Df-p-SCN (C).** Über die Isothiocyanat-Funktion können diese Chelatoren an Lysinreste in Proteinen gekoppelt werden. Die Komplexbildung der Radionuklide erfolgt über die Amin-, Carboxylat- und Hydroxamat-Chelatgruppen.

Enthält ein Protein jedoch mehrere Lysinreste im Bereich der Bindungsstelle, tritt durch die Konjugation meist ein Aktivitätsverlust auf. Im Vergleich zu großen mAK, welche sich gut für die bisher beschriebenen Kopplungsmethoden eignen, sind kleinere Proteine wie Fab-Fragmente und Anticaline diesbezüglich weniger tolerant, da hier statistisch betrachtet wesentlich häufiger Aminosäurereste im aktiven Zentrum konjugiert werden. Eine ortsgerichtete Markierungsstrategie, welche die biologische Funktion des Proteins nicht beeinträchtigt, ist daher für verschiedene diagnostische und therapeutische Anwendungen von großem Interesse.

Die Einführung von bioorthogonalen Funktionalitäten, wie beispielsweise einer Aldehydgruppe, ermöglicht die Kopplung an einer definierten Stelle abseits der Bindestelle. Aldehyde oder Ketone können entweder durch chemische Oxidation, z. B. von N-terminalen Serinresten (Gaertner & Offord, 1996), durch die Verwendung von nicht-natürlichen Aminosäuren wie Acetophenylalanin (Reichert *et al.*, 2015) oder durch enzymatische Modifikation (Carrico *et al.*, 2007) eingeführt werden. Hydrazid-, Aminoxy- und Thiosemicarbazid-Verbindungen bilden mit den Ketogruppen stabile Hydrazone, Oxime bzw. Thiosemicarbazone mit sehr guter Stabilität unter physiologischen Bedingungen (**Abb. 7**) (Carrico, 2008; Dirksen & Dawson, 2008; Shieh & Bertozzi, 2014).



**Abb. 7. Modifizierung von Aldehyden und Ketonen.** (A) Hydrazide, (B) Aminoxy-Derivate, (C) Thiosemicarbazide reagieren mit Aldehyden und Ketonen entsprechend zu Hydrazone, Oximen und Thiosemicarbazonen.

Die Verwendung eines sogenannten „Aldehyd-Tags“ ermöglicht die gezielte enzymatische Generierung einer Aldehydgruppe (Carrico *et al.*, 2007). Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) katalysiert die ko/posttranslationale Oxidation eines Cysteinrestes innerhalb einer Erkennungssequenz, auch als „Sulfatasemotiv“ bezeichnet, zu Formylglycin (fGly). Diese Peptidsequenz stammt aus Typ I Sulfatasen, welche Formylglycin als katalytisch aktiven Rest im aktiven Zentrum enthalten, und sie ist zwischen Pro- und Eukaryoten gut konserviert (Selmer *et al.*, 1996). Das Sulfatasemotiv besteht aus dem Kernmotiv CXPXR, wobei X meist für Serin, Threonin, Alanin oder Glycin steht, und einem Hilfsmotiv, welches die Bindung des FGE begünstigt.

Entdeckt wurde das FGE aufgrund der Multiplen Sulfatase-Defizienz (MSD) beim Menschen, welche mit einem Aktivitätsverlust aller neun humanen Sulfatasen durch die fehlende fGly-Modifikation einhergeht (Franco *et al.*, 1995). Die Klonierung des humanen FGE Gens, *Sulfatase Modifying Factor 1* (*sumf 1*), führte zur Identifizierung weiterer pro- und eukaryotischer homologer Enzyme (Cosma *et al.*, 2003; Landgrebe *et al.*, 2003).

Für die Einführung einer Aldehydfunktion verwendeten Carrico *et al.* (2007) die aus 13 Aminosäuren bestehende Sulfatasesequenz (LCTPSRGSFLTGR) sowie eine verkürzten, 6 Aminosäuren lange Sequenz mit dem Kernmotiv LCTPSR aus *Mycobacterium tuberculosis*. Diese wurden genetisch C- oder N-terminal mit dem Maltosebindeprotein (MBP), dem *human Growth Hormone* (hGH) oder einer Sulfotransferase (Stf0) fusioniert. Trotz der endogenen FGE-Aktivität von *E. coli* wurde zusammen mit den Proteinen mit Aldehyd-Tag die FGE aus *M. tuberculosis* ebenfalls coexprimiert, um die Bildung von fGly zu verbessern. Eine Umsetzung von 86-99 % wurde für verschiedene mit dem Aldehyd-Tag fusionierten Proteine erreicht und mittels selektiver Markierung mit Aminoxy- und Hydrazidreagenzien nachgewiesen (Rabuka *et al.*, 2012). Die Analyse der Spezifitäten von FGE aus *M. tuberculosis* und *Streptomyces coelicolor* zeigte, dass die FGE aus *M. tuberculosis* ein deutlich breiteres Substratspektrum aufweist (Rush & Bertozzi, 2008). Die Verwendung von weniger spezifischen FGEs ermöglicht daher im Prinzip eine Anpassung des Aldehyd-Tags an die Sequenz des zu modifizierenden Proteins.

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung einer Aldehydgruppe ist die Oxidation eines N-terminalen Serinrestes durch Periodat. Die Periodat-Oxidation, auch als Malaprade-Reaktion (Kim *et al.*, 2000) bezeichnet, wird zur Spaltung von 1,2-Diolen für die indirekte Bestimmung von Ethylenglycol oder Glycerol verwendet (Verma *et al.*, 1987) oder die Modifizierung von Zuckern. N-terminale Serin- und Theroninreste können grundsätzlich ebenfalls mittels Periodat unter Abspaltung von Formaldehyd zu Aldehydgruppen oxidiert werden (Gaertner & Offord, 1996). Allerdings hat diese Methode, abgesehen von Peptiden, in der Proteinchemie noch keine Verbreitung gefunden.

#### 1.4 Radionuklide für die *In-Vivo*-Bildgebung und Therapie

Zahlreiche Radionuklide finden heute, entsprechend ihrer Zerfallseigenschaften wie Emissionstyp, Energie, Reichweite und Halbwertszeit, sowohl in der molekularen Bildgebung als auch in der Radio-Immuntherapie (RIT) Verwendung (**Tabelle 1**). Die *In-Vivo*-Bildgebung ermöglicht die nicht-invasive Darstellung und Charakterisierung von biologischen Prozessen auf molekularer Ebene, einschließlich der Visualisierung pharmakokinetischer Eigenschaften von neuen Therapeutika, und ist insbesondere für die Tumordiagnostik und Berechnung der benötigten Dosis (Dosimetrie) vor einer RIT von großer Bedeutung. Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie Einzelphotonen-Emissions-Computer-Tomographie (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) werden in der Klinik oft multimodal in Kombination mit Computertomographie (CT) und seit einiger Zeit auch mit Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Optische Biolumineszenz- und Fluoreszenz-Bildgebung werden bislang hauptsächlich für präklinische Kleintierstudien verwendet, allerdings gewinnt die intraoperative Bildgebung mittels fluoreszenzmarkierter Zielmoleküle in der Medizin zunehmend an Bedeutung (Herrera-Almario *et al.*, 2016; Ntziachristos *et al.*, 2010).

Beim Emissionstyp unterscheidet man hauptsächlich zwischen  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Zerfällen. Beim  $\alpha$ -Zerfall wird ein  $\alpha$ -Teilchen, bestehend aus zwei Protonen und zwei Neutronen (entsprechend einem Heliumkern) emittiert, wodurch die Ordnungszahl um zwei, die Massenzahl um vier erniedrigt wird.  $\beta$ -Zerfälle werden unterteilt in  $\beta^-$ -Zerfälle, wobei ein Elektron und ein Anti-Neutrino emittieren, und  $\beta^+$ -Zerfälle, wobei ein Positron sowie ein Neutrino emittiert werden. Hierbei ändert sich die Ordnungszahl jeweils um eins. Als Elektroneneinfang (*Electron Capture*) wird ein Zerfall bezeichnet, bei dem der Atomkern ein Elektron aus seiner Hülle absorbiert und ein Neutrino emittiert.  $\gamma$ -Zerfälle dagegen treten meist in Folge eines  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Zerfalls auf, wenn das gebildete Nuklid sich in einem metastabilen Zustand befinden. Dabei werden hochenergetische Photonen abgegeben. Als Isometrischer Übergang (*Isometric Transition*) wird unter anderem der  $\gamma$ -Zerfall von Technetium bezeichnet, dessen Isomer  $^{99m}\text{Tc}$  eine ausreichend lange Halbwertszeit besitzt und in  $^{99}\text{Tc}$  übergeht.

Die SPECT-Bildgebung erfordert  $\gamma$ -Emitter wie beispielsweise  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$  oder  $^{131}\text{I}$ . Die austretende  $\gamma$ -Strahlung wird hier mittels einer oder mehrerer um den Körper rotierender Gammakameras detektiert, um ein 3D-Bild zu erhalten. Den Kameras generell ist ein Kollimator vorgeschaltet, um die  $\gamma$ -Strahlen zu „fokussieren“, wodurch allerdings ein Großteil der Photonen ausgeblendet wird (Weissleder *et al.*, 2010).

Positronen-Emitter, wie  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{124}\text{I}$  und  $^{89}\text{Zr}$  eignen sich für die PET-Bildgebung, wobei vor allem  $^{124}\text{I}$  und  $^{89}\text{Zr}$  aufgrund ihrer längeren Halbwertszeit von 3,3 und 4,2 Tagen für die Markierung von mAK Verwendung finden (Lin *et al.*, 2011). Die beiden nach dem  $\beta^+$ -Zerfall eines Positronen-Emitters entgegengesetzt austretenden Photonen werden von ringförmig um den Patienten

angeordneten Detektoren aufgezeichnet. Mittels verschiedener Rekonstruktionsalgorithmen kann anschließend ein 3D-Bild der Tracerverteilung rekonstruiert werden. Da hier die Koinzidenz-Signale der Photonenpaare auf exakt gegenüberliegenden Seiten detektiert werden, wird kein Kollimator benötigt. Dies führt im Vergleich zur SPECT-Bildgebung zu einer verbesserten Sensitivität, Bildqualität und räumlichen Auflösung (Weissleder *et al.*, 2010).

Tabelle 1: Auswahl gebräuchlicher Radionuklide für die In-Vivo-Bildgebung und RIT

| Anwendung               | Nuklid            | Zerfall <sup>i</sup>                              | Halbwertszeit | Energie [MeV] | Reichweite [mm] | Bildgebung | Chelator             |
|-------------------------|-------------------|---|---------------|---------------|-----------------|------------|----------------------|
| Bildgebung              | <sup>18</sup> F   | $\beta^+$ (96,7 %)<br>EC (3 %)                    | 109,7 min     | 0,69<br>1,7   | 0,7             | PET        | direkt/NOTA          |
|                         | <sup>11</sup> C   | $\beta^+$ (100 %)                                 | 20,4 min      | 0,96          | 1,3             | PET        | direkt               |
|                         | <sup>68</sup> Ga  | $\beta^+$ (89 %)<br>EC (10 %)                     | 67,7 min      | 1,9           | 3,8             | PET        | DOTA/NOTA/<br>NODAGA |
|                         | <sup>124</sup> I  | $\beta^+$ (23 %),<br>EC (77 %)                    | 4,2 d         | 2,14          | 3,8             | PET        | direkt               |
|                         | <sup>89</sup> Zr  | $\beta^+$ (22 %)<br>EC (77 %)                     | 78,4 h        | 0,9           | 1,4             | PET        | Df                   |
|                         | <sup>86</sup> Y   | $\beta^+$ (32 %)<br>EC (68 %)                     | 14,7 h        | 3,14          | 2,6             | PET        | DTPA<br>CHXA"DTPA    |
|                         | <sup>99m</sup> Tc | IT, $\gamma$                                      | 6 h           | 0,14          |                 | SPECT      | verschiedene         |
|                         | <sup>111</sup> In | EC, $\gamma$                                      | 67 h          | 0,17; 0,25    |                 | SPECT      | DTPA/NOTA            |
|                         | <sup>67</sup> Ga  | EC, $\gamma$                                      | 78 h          | 0,1           |                 | SPECT      | DTPA/NOTA<br>NODAGA  |
| Bildgebung und Therapie | <sup>64</sup> Cu  | $\beta^+$ (18 %)<br>EC (43 %)<br>$\beta^-$ (39 %) | 12,7 h        | 0,65          | 0,8             | PET        | DOTA                 |
|                         | <sup>90</sup> Y   | $\beta^-$<br>$\gamma$ (0,01 %)                    | 2,7 d         | 2,3<br>1,7    | 2,76            | SPECT      | DTPA/<br>CHXA"DTPA   |
|                         | <sup>131</sup> I  | $\beta^-$ , $\gamma$                              | 8,0 d         | 0,3; 0,4; 0,6 | 0,40            | SPECT      | direkt               |
|                         | <sup>177</sup> Lu | $\beta^-$ , $\gamma$                              | 6,7 d         | 0,5           | 0,28            | SPECT      | DOTA/<br>CHXA"DTPA   |
|                         | <sup>123</sup> I  | EC, $\gamma$ , Auger                              | 13,2 h        | 0,1           | 0,001 - 0,02    | SPECT      | direkt               |
| Therapie                | <sup>67</sup> Cu  | $\beta^-$ , $\gamma$                              | 2,6 d         | 0,4; 0,5; 0,6 | 0,6             | SPECT      | DOTA                 |
|                         | <sup>213</sup> Bi | $\alpha$  | 45,7 min      | 5,87          | 0,04 - 0,1      | -          | CHXA"DTPA            |
|                         | <sup>212</sup> Bi | $\alpha$  | 1,0 h         | 6,09          | 0,04 - 0,1      | -          | CHXA"DTPA            |
|                         | <sup>125</sup> I  | $\gamma$ , Auger                                  | 60,1 d        | 0,035         | 0,001 - 0,02    | SPECT      | direkt               |

<sup>1</sup>  $\beta^+$ , Positron;  $\beta^-$ , Elektron; EC, Elektroneneinfang (*Electron Capture*); IT, Isometrischer Übergang (*Isometric Transition*); entnommen aus *Molecular Imaging, Principles and Practice*

$\beta^-$ -Emitter werden häufig in der RIT verwendet, da sie aufgrund ihrer großen Reichweite von 275 bis 600  $\mu\text{m}$  (<sup>90</sup>Y) auch weiter entfernt gelegene Zellen erreichen und so eine Heterogenität der Tumorantigene oder mangelnde Penetration von mAK aufgrund des *Bystander*-Effekts homogenisieren können (Milenic *et al.*, 2004). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind lediglich die anti-

CD20 mAK  $^{90}\text{Y}$ -Ibritumomab und  $^{131}\text{I}$ -Tositumomab als Radioimmuntherapeutika von der FDA für die Behandlung von Non-Hodgkin Lymphomen zugelassen (Stevens *et al.*, 2012). Ein direkter Vergleich der RIT mit dem unmarkierten mAK in einer Phase III Studie zeigte eine bemerkenswert gesteigerte Response von 80 % für  $^{131}\text{I}$ -Ibritumomab gegenüber 34 % für Rituximab (Gordon *et al.*, 2004). Für die Behandlung von kleineren Tumoren sowie insbesondere von Leukämien und einzelnen Metastasen ist die große Reichweite der  $\beta$ -Emitter jedoch problematisch, weshalb hier  $\alpha$ -Emitter wie  $^{212}\text{Bi}$  oder  $^{213}\text{Bi}$  mit hoher Energie, relativ kurzer Reichweite und einer hohen Cytotoxizität von 1 cGy/h eingesetzt werden (Pfof *et al.*, 2009). Limitiert wird die Anwendung von  $\alpha$ -Emittlern in der RIT allerdings durch die geringe physikalische Halbwertszeit. Auger-Emitter zeigen ebenfalls hohe Cytotoxizität, welche jedoch nur bei Zerfällen direkt im Zellkern auftritt (Milenic *et al.*, 2004).

#### 1.4.1 $^{124}\text{I}$ und $^{89}\text{Zr}$ für die Positronen-Emissionstomographie

Positronen Emitter für die Markierung von mAK und kleineren tumorspezifischen Bindeprotein wie Fab-Fragmenten oder auch Anticalinen sollten die folgenden Voraussetzungen erfüllen. **(a)** Die physikalische Halbwertszeit sollte der Zirkulationsdauer des Proteins angepasst sein. **(b)** Im Fall eines Radiometalls sollten Chelatoren mit hoher Komplexbildungskonstante für das Radionuklid und geeigneten funktionellen Gruppen für die protein-chemische Modifizierung verfügbar sein. **(c)** Die Kopplung und radioaktive Markierung sollte unter physiologischen Bedingungen bezüglich Pufferzusammensetzung, pH-Wert und Temperatur erfolgen können, um die biologische Funktion und Struktur des Proteins zu erhalten. **(d)** Stabilität der Markierung während der Zirkulation und innerhalb der Zielzelle sollte gewährleistet sein.

Iodierte Proteine zeigen meist hohen Bildkontrast (Signal-zu-Hintergrund Verhältnis) und geringe Aufnahmen in den Exkretionsorganen wie Niere und Leber oder gesundem Gewebe. Eine Ausnahme stellt die Schilddrüse dar, welche Iodid-Ionen über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) einlagert. Weiterhin stellt die direkte Kopplung von Iod an Tyrosinreste mittels elektrophilen Substitution eine einfache und schnelle Methode zur radioaktiven Markierung von Proteinen unter physiologischen Bedingungen dar (Fraker & Speck, 1978). Allerdings zeigen iodierte Proteine aufgrund von Dehalogenierung im Blutplasma nur begrenzte verringerte Stabilität *in vivo*. Zudem wird nach Internalisierung und lysosomalem Abbau der physiologische Metabolit Iod-Tyrosin aus der Targetzelle freigesetzt, weshalb die Iod-Nuklide als nicht-verweilend (*Non-residualizing*) bezeichnet werden (Mendler *et al.*, 2015b). Die hohe Positronen-Energie von  $^{124}\text{I}$  und die dementsprechend weite Reichweite im Gewebe beeinträchtigt außerdem die räumliche Auflösung und Quantifizierung. Weiterhin führt das zusätzliche Auftreten einzelner  $\gamma$ -Photonen mit unterschiedlichen Energien zu erhöhtem Hintergrundsignal (Disselhorst *et al.*, 2010). Das PET-Nuklid  $^{89}\text{Zr}$  hingegen zeigt aufgrund seiner geringen durchschnittlichen Positronen-Energie von 395 keV eine bessere räumliche

Auflösung, vergleichbar mit  $^{18}\text{F}$  (Disselhorst *et al.*, 2010). Die kommerzielle Verfügbarkeit des Nuklids, welches in einem Zyklotron durch Bestrahlung des natürlichen  $^{89}\text{Y}$  hergestellt wird, einschließlich des Chelators Df, welcher über Isothiocyanat- oder Maleimid-Gruppen an Proteine gekoppelt werden kann (s. Abschnitt 1.3.2), haben zu zahlreichen Studien mit  $^{89}\text{Zr}$ -markierten mAK geführt (van de Watering *et al.*, 2014). Df weist sowohl hohe Selektivität als auch thermodynamische Stabilität für den Komplex mit Zr(VI) (Stabilitätskonstante  $>10^{31}$ ) auf, welche vermutlich sogar über der Konstante des Eisen-Komplexes liegt (Severin *et al.*, 2011). Der Fe(III) Siderophor Df stammt aus *Streptomyces pilosus* und wird Patienten mit akuter Eisenvergiftung verabreicht, ohne dass es Hinweise auf Toxizität oder Immunogenität gegeben hat, weshalb dieser Chelator als geeignet für klinische Anwendungen angesehen wird (Perlmutter & Sanders, 1966). Weiterhin bleiben  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df}$  Metabolite nach Internalisierung in der Targetzelle, wodurch die Tumoraufnahme erhöht und die Dosimetrie bei der RIT verbessert wird.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Mittels nicht-invasiver Bildgebung ist es möglich, wiederholte Tumor-Biopsien im Verlauf einer Behandlung zu vermeiden, was für die Patienten eine enorme Erleichterung darstellt (Solomayer *et al.*, 2006). Außerdem können schlecht zugängliche Tumor-Läsionen und Metastasen sichtbar gemacht werden (Lear-Kaul *et al.*, 2003). Insbesondere die gute Target-Spezifität, Auflösung und Quantifizierbarkeit der Immuno-PET-Bildgebung ermöglicht begleitend zu einer Tumorthherapie eine bessere Diagnostik und Überwachung des Therapieansprechens.

In dieser Arbeit sollten die Eigenschaften von protein-basierten Tracern bezüglich Pharmakokinetik und Tumor-Targeting für die *In-Vivo*-Bildgebung mittels Protein-Engineering unter Anwendung der PASylation Technology optimiert werden. Grundlage hierfür waren die von M. Gebauer selektierten  $\alpha\text{ED-B}$  Anticaline N7A und N7E (Gebauer *et al.*, 2013) sowie die von L. Friedrich klonierten  $\alpha\text{HER2}$  bzw.  $\alpha\text{CD20}$  Fab-Fragmente 4D5LF3.4 und 2F2, abgeleitet von den mAKs Trastuzumab (hu4D5-v8) (Carter *et al.*, 1992) und Ofatumumab (2F2) (Du *et al.*, 2009).

Um den Einfluss der Plasma-Halbwertszeit auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von Fab-Fragmenten zu untersuchen, sollten diese mit PAS-Sequenzen von 100 bis 600 Aminosäureresten fusioniert und mittels PET-Bildgebung und Biodistribution in Mäusen  $\text{CD1-Foxn1}^{nu}$  mit entsprechenden HER2- und CD20-positiven Tumor-Xenograft-Modellen charakterisiert werden.

Die radioaktive Markierung von Anticalinen für die *In-Vivo*-Bildgebung ohne Funktionsverlust erforderte die selektive Einführung einer Aldehydfunktion für die ortsspezifische Markierung mit Aminoxy- oder Hydrazin-Reagenzien. Des Weiteren wurde die Affinität der  $\alpha\text{ED-B}$  Anticaline mittels (semi)-rationaler Mutagenese verbessert, wodurch die Tumoranreicherung optimiert und ein hoher Bildkontrast erreicht werden sollte.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

##### E. coli K12-Stämme

Alle verwendeten Stämme waren im Labor von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München vorhanden.

|                 |  |
|-----------------|--|
| JM83            | <i>ara</i> $\Delta(lac-proAB)$ rpsL (= strA) $\phi 80 lacZ\Delta M15$ (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)  |
| KS272           | F <sup>-</sup> $\Delta lacX74 galE galK thi rpsL (strA) \Delta phoA (pvull)$ (Meerman & Georgiou, 1994)  |
| Origami B       | F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm lacY1 ahpC gor522:: Tn10 trxB (Kan <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> ) (Prinz <i>et al.</i> , 1997)   |
| XL1-Blue        | <i>endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1</i> $\lambda^- recA1 gyrA96 relA1 \Delta(lacZYA-argF)U169$ [F': <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta M15$ Tn10(Tet <sup>t</sup> )] (Bullock <i>et al.</i> , 1987) |
| BL21            | F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> ( $\lambda^S$ ) (Studier & Moffatt, 1986)  |
| Shuffle express | <i>fhuA2 [lon] ompT ahpC gal</i> $\lambda att::pNEB3-r1-cDsbC$ (SpecR, <i>lacI<sup>q</sup></i> ) $\Delta trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 \Delta gor \Delta(mcrC-mrr)114::IS10$ (Bessette <i>et al.</i> , 1999)          |

##### Humane Tumorzellen

|         |   |
|---------|---|
| Caco-2  | isoliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom; epithelial, adhären (Fogh <i>et al.</i> , 1977), vom Lehrstuhl für Biologische Chemie                                    |
| SK-BR-3 | Isoliert aus der Brustdrüse, epithelial, adhären (Holmes <i>et al.</i> , 1992), von Prof. Wester, Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie, TUM                        |
| Granta  | Isoliert aus dem peripheren Blut, Mantelzelllymphom, Suspension (Rudolph <i>et al.</i> , 2004), von Prof. Buck, III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, TUM |

##### Mäuse

Für die Bildgebungs- und Biodistributionsstudien wurden 6-8 Wochen alte weibliche immunsupprimierte CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäuse von Charles River Laboratories, Sulzfeld verwendet. Die Mäuse wurden im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF), Klinikum r. d. Isar der TU München, Leitung: PD Christine Baumgartner, Fachtierärztin für Versuchstierkunde, unter keimfreien Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen gehalten und überwacht. Die Versuche waren unter der Lizenz-Nr. 55.2-1-54-2532-46-12 und -87-11 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

##### Plasmide

Alle verwendeten Plasmide stammten aus der Sammlung von Prof. Dr. Arne Skerra, TU München.

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und neu konstruierten Plasmide

| Plasmid          | Eigenschaften   | Referenz                       |
|------------------|---|--------------------------------|
| pASK37-FGE       | <i>lacUV5<sup>p/o</sup></i> ; FGE; <i>bla/lacI</i>              | (Skerra & Plückthun, 1991)     |
| pASK75-FN7B8-His | <i>tet<sup>p/o</sup></i> ; ompA-FN7B8-streptII; <i>bla/tetR</i> | (Gebauer <i>et al.</i> , 2013) |

|  |   |   |
|--|---|---|
| pASK88   | wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -C <sub>H</sub> 1 <sub>huY1</sub> -his <sub>6</sub> ,<br>phoA-V <sub>K</sub> -C <sub>huK</sub>      | (Schiweck & Skerra, 1995)                                     |
| pASK88-4D5   | 4D5 Fab (Trastuzumab)   | (Schlapschy <i>et al.</i> , 2007)                             |
| pASK88-hu4D5-duoSapl-PAS#1(100)                    | 4D5 Fab fusioniert mit PAS#1(100)   | (Bullock <i>et al.</i> , 1987)                                |
| pASK88-hu4D5-duoSapl-PAS#1(200)                    | 4D5 Fab fusioniert mit PAS#1(200)   | (Bullock <i>et al.</i> , 1987)                                |
| pASK88-hu4D5-duoSapl-PAS#1(400)                    | 4D5 Fab fusioniert mit PAS#1(400)   | (Bullock <i>et al.</i> , 1987)                                |
| pASK88-hu4D5-duoSapl-PAS#1(600)                    | 4D5 Fab fusioniert mit PAS#1(400)   | (Bullock <i>et al.</i> , 1987)                                |
| pASK88-hu4D5LF3.4                                  | 4D5 Fab K3 <sub>H</sub> Q, Q5 <sub>H</sub> V, D98 <sub>H</sub> W, L104 <sub>L</sub> V, E3 <sub>L</sub> Q, L4 <sub>L</sub> M*            | L. Friedrich, Dissertation<br>(Gerstner <i>et al.</i> , 2002) |
| pASK88-4D5LF3.4-duoSapl-PAS#1(100)                 | 4D5LF3.4 Fab fusioniert mit PAS#1(100)  |   |
| pASK88-4D5LF3.4-duoSapl-PAS#1(200)                 | 4D5LF3.4 Fab fusioniert mit PAS#1(200)  |   |
| pASK88-4D5LF3.4-duoSapl-PAS#1(400) <i>StreptII</i> | 4D5LF3.4 Fab fusioniert mit PAS#1(400)  |   |
| pASK88-4D5LF3.4-duoSapl-PAS#1(600) <i>StreptII</i> | 4D5LF3.4 Fab fusioniert mit PAS#1(600)  |   |
| pASK88-2F2   | 2F2 Fab (Ofatumumab)  | L. Friedrich, Dissertation<br>(Teeling <i>et al.</i> , 2004)  |
| pASK88-2F2-duoSapl-PAS#1(100)                      | 2F2 Fab fusioniert mit PAS#1(100)   |   |
| pASK88-2F2-duoSapl-PAS#1(200)                      | 2F2 Fab fusioniert mit PAS#1(200)   |   |
| pASK88-2F2-duoSapl-PAS#1(400) <i>StreptII</i>      | 2F2 Fab fusioniert mit PAS#1(400)   |   |
| pASK88-2F2-duoSapl-PAS#1(600) <i>StreptII</i>      | 2F2 Fab fusioniert mit PAS#1(600)   |   |
| pASK106-hu4D5-ABD                                  | wie pASK75; mit ompA-V <sub>H</sub> -C <sub>H</sub> 1 <sub>huY1</sub> -his <sub>6</sub> ,<br>phoA-V <sub>K</sub> -C <sub>huK</sub> -ABD | (Schlapschy <i>et al.</i> , 2007)                             |
| pASK106-4D5LF3.4-ABD                               | 4D5 Fab (D98 <sub>H</sub> W) fusioniert mit ABD   |   |
| pTUM4  | <i>fkpA, surA, dsbA, dsbC, cat</i>  | (Schlapschy & Skerra, 2011)                                   |
| pNGAL98-Lcn2                                       | wie pASK75; mit ompA-Lcn2- <i>streptII</i>  | (Gebauer & Skerra, 2012)                                      |
| pNGAL98-N7A  | wie pASK75; mit ompA-N7A- <i>streptII</i>   | (Gebauer <i>et al.</i> , 2013)                                |
| pNGAL98-N7A.1                                      | N7A (H40R)  |   |
| pNGAL98-N7A.2                                      | N7A (D45E)  |   |
| pNGAL98-N7A.3                                      | N7A (K46A)  |   |
| pNGAL98-N7A.4                                      | N7A (D47Y)  |   |
| pNGAL98-N7A.5                                      | N7A (K50Q)  |   |
| pNGAL98-N7A.6                                      | N7A (V72L)  |   |
| pNGAL98-N7A.7                                      | N7A (K74R)  |   |
| pNGAL98-N7A.8                                      | N7A (N96R)  |   |
| pNGAL98-N7A.9                                      | N7A (Y127R)   |   |
| pNGAL98-N7A.10                                     | N7A (Q128R)   |   |
| pNGAL98-N7A.11                                     | N7A (R130K)   |   |
| pNGAL98-N7A.12                                     | N7A (L132Y)   |   |
| pNGAL98-N7A.13                                     | N7A (N146S)   |   |
| pNGAL98-N7A.14                                     | N7A (H40R, D47Y)  |   |
| pNGAL98-N7A.15                                     | N7A (H40R, Q128R)   |   |
| pNGAL98-N7A.16                                     | N7A (D47Y, Q128R)   |   |



|  |  |                                       |
|--|--|---------------------------------------|
| pNGAL98-N7A.17   | N7A (H40R, D47Y, Q128R)  |                                       |
| pNGAL98-N7A.18   | N7A (S87D)   |                                       |
| pNGAL98-N7A.19   | N7A (H40R, D47Y, Q128R, S87D)  |                                       |
| pNGAL98-N7A.20   | N7A (C-terminale Deletion QDST)  |                                       |
| pNGAL98-N7E.107  | N7E (T54I, K75E, L94V, K98R, F106Y)                                    |                                       |
| pASK112-T7RBS2-BI1   | <i>tet<sup>D/p</sup></i> ; BI1- <i>strepll</i> ; <i>cat/tetR</i>       | I. Neumaier, unveröffentlicht         |
| pASK112-T7RBS2-ald14N7A- <i>Strepll</i>                        | ald14-N7A- <i>Strepll</i>  |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7Aald14- <i>Strepll</i>                        | N7A-ald14- <i>Dtrepll</i>  |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7A- <i>Strepll</i> -ald14                      | N7A- <i>Strepll</i> -ald14   |                                       |
| pASK112-T7RBS2-ald8N7A   | ald8-N7A- <i>Strepll</i>   |                                       |
| pASK112-T7RBS2- <i>Strepll</i> -N7Aald14                       | <i>Strepll</i> -N7A-ald14  |                                       |
| pASK112-T7RBS2- <i>Strepll</i> -N7Aald8                        | <i>Strepll</i> -N7A-ald8   |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7Aald8- <i>Strepll</i>                         | N7A-ald8- <i>Strepll</i>   |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7A- <i>Strepll</i> -ald8                       | N7A- <i>Strepll</i> -ald14   |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7A   | N7A- <i>Strepll</i>  |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7A.A   | N7A (K15C, Q19R)   |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7A.B   | N7A (S87C, E91R, R109E)  |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7A.C   | N7A (G160C, N164R)   |                                       |
| pNGAL9-N7Aald14- <i>Strepll</i>                                | <i>tet<sup>D/p</sup></i> ; N7A-ald14- <i>strepll</i> ; <i>cat/tetR</i> | Pieris AG, Freising, unveröffentlicht |
| pASK112-T7RBS2-N7E.107ald14- <i>Strepll</i>                    | N7E.107-ald14- <i>strepll</i>  |                                       |
| pASK112-T7RBS2-N7E.107-Sapl-PAS#1.2(200)-ald14- <i>Strepll</i> | N7E.107-PAS#1.2(200)-ald14- <i>strepll</i>                             |                                       |
| pASK112-T7RBS2-Lcn2ald14- <i>Strepll</i>                       | Lcn2-ald14- <i>strepll</i>   |                                       |

\*Kabat Nummerierung nach Kabat *et al.* (1991)

### 2.1.2 Oligodesoxynukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Scientific, Ulm synthetisiert. Die Primer CM16, CM17 und CM36 wurden mit einer Phosphothioat-Bindung am 3' Ende synthetisiert, um Primerabbau durch *Proof-Reading*-Polymerasen mit 3'- zu 5'- Exonukleaseaktivität zu verhindern (Skerra, 1992). Die entsprechende Position ist in der Sequenz gekennzeichnet (\*).

|                         |   |
|-------------------------|---|
| PR1                     | 5'- CGC AGT AGC GGT AAA CG -3'                        |
| D20                     | 5'- CCA CTC CCT ATC AGT GAT -3'                       |
| CM1_a119g_c120t         | 5'- GCA AAG CCG GAA ATC GTG ACC TGC GTG AGG -3'       |
| CM1as_a119g_c120t       | 5'- CCT CAC GCA GGT CAC GAT TTC CGG CTT TGC -3'       |
| CM2_t135a               | 5'- CGA CCT GCG TGA GGA AAA GGA TCC GCG TAA AAT G -3' |
| CM2as_t135a             | 5'- CAT TTT ACG CGG ATC CTT TTC CTC ACG CAG GTC G-3'  |
| CM3_a136g_a137c_g138t   | 5'- CCT GCG TGA GGA TGC TGA TCC GCG TAA AAT G-3'      |
| CM3as_a136g_a137c_g138t | 5'- CAT TTT ACG CGG ATC AGC ATC CTC ACG CAG G-3'      |
| CM3_g139t               | 5'- CTG CGT GAG GAT AAG TAT CCG CGT AAA ATG C-3'      |
| CM3as_g139t             | 5'- GCA TTT TAC GCG GAT ACT TAT CCT CAC GCA G-3'      |
| CM4_a148c               | 5'- GAT AAG GAT CCG CGT CAA ATG CAA GCG ACC -3'       |

CM4as\_a148c 5'- GGT CGC TTG CAT TTG ACG CGG ATC CTT ATC -3'  
 CM5\_g214c 5'- CAC CAA TGT GCG TTT TCT TCA CAA GAA ATG CAA TTA C -3'  
 CM5as\_g214c 5'- GTA ATT GCA TTT CTT GTG AAG AAA ACG CAC ATT GGT G -3'  
 CM6\_a220c\_a221g\_g222t 5'- GTG CGT TTT GTT CAC CGT AAA TGC AAT TAC CGT ATT TG -3'  
 CM6as\_a220c\_a221g\_g222t 5'- CAA ATA CGG TAA TTG CAT TTA CGG TGA ACA AAA CGC AC -3'  
 CM7\_a286c\_a287g\_a292g\_a293c 5'- CGA GTT TAC TTT AGG CCG TAT TGC AAG TTG GCC GGG CC -3'  
 CM7as\_a286c\_a287g\_a292g\_a293c 5'- GGC CCG GCC AAC TTG CAA TAC GGC CTA AAG TAA ACT CG -3'  
 CM8\_a286c\_a287g\_a292g\_a293c 5'- CGA GTT TAC TTT AGG CCG TAT TGC AAG TTG GCC GGG CC -3'  
 CM8as\_a286c\_a287g\_a292g\_a293c 5'- GGC CCG GCC AAC TTG CAA TAC GGC CTA AAG TAA ACT CG -3'  
 CM9\_t379c\_a380g 5'- GTT CTT CAA GCG TGT GCG CCA GAA CCG CGA GC -3'  
 CM9as\_t379c\_a380g 5'- GCT CGC GGT TCT GGC GCA CAC GCT TGA AGA AC -3'  
 CM10\_a383g\_g384c 5'- CTT CAA GCG TGT GTA CCG CAA CCG CGA GCT GTT TG -3'  
 CM10as\_a383g\_g384c 5'- CAA ACA GCT CGC GGT TGC GGT ACA CAC GCT TGA AG -3'  
 CM11\_c388a\_g389a\_c390g 5'- CGT GTG TAC CAG AAC AAG GAG CTG TTT GAG ATC -3'  
 CM11as\_c388a\_g389a\_c390g 5'- GAT CTC AAA CAG CTC CTT GTT CTG GTA CAC ACG -3'  
 CM12\_c394t\_t395a\_g396c 5'- CCA GAA CCG CGA GTA CTT TGA GAT CAC ACT G -3'  
 CM12as\_c394t\_t395a\_g396c 5'- CAG TGT GAT CTC AAA GTA CTC GCG GTT CTG G -3'  
 CM13\_a436t\_a437c 5'- CAC GAA AGA ACT GAC ATC CGA GCT GAA GG -3'  
 CM13as\_a436t\_a437c 5'- CCT TCA GCT CGG ATG TCA GTT CTT TCG TG -3'  
 CM14\_a259g\_g260a 5'- CTT TGT GCC GGG GGA CCA GCC GGG CGA G -3'  
 CM14as\_a259g\_g260a 5'- CTC GCC CGG CTG GTC CCC CGG CAC AAA G -3'  
 CM15\_del64-75 5'- CGT AGC GCA GGC CTC AGA CCT GAT CCC -3'  
 CM15as\_del64-75 5'- GGG ATC AGG TCT GAG GCC TGC GCT ACG -3'  
 CM16\_N7A\_ald14\_fw 5'- GGG AAT TCC ATA TGG CAC CAC TGT GCA CAC CAT CTC GTG  
 GTT CGC TGT TCA CCG GTC AGG ACT CCA CCT CAG A\*C -3'  
 CM17\_N7A\_Ndel\_fw 5'- GGG AAT TCC ATA TGC AGG ACT CCA CCT CAG A\*C -3'  
 CM18\_N7A\_ald14\_rev 5'- GCT ACC GGT GAA CAG CGA ACC ACG AGA TGG TGT GCA CAG  
 TGG TGC GCC GTC GAT ACA CTG GTC G -3'  
 CM19\_StrepII\_ald14\_rev 5'- CAG CCC AAG CTT AAC CGG TGA ACA GCG AAC CAC GAG ATG  
 GTG TGC ACA GTG GTG CTT TTT CGA ACT GCG GGT GAG-3'  
 CM20s 5'- GCA CAC CAT CTC GTC AGG ACT CCA CCT C -3'  
 CM21as 5'- GAG GTG GAG TCC TGA CGA GAT GGT GTG C -3'  
 CM22fw 5'- CCC ACC TCT GAG CTG CGT CCC TCT GCG CCA GAA CTT CCA  
 GGA C -3'  
 CM22rev 5'- GTC CTG GAA GTT CTG GCG CAG AGG GAC GCA GCT CAG AGG  
 TGG G -3'  
 CM23fw 5'- CTT TGT GCC GGG GTG CCA GCC GGG CCG CTT TAC TTT AGG  
 CAA TAT T -3'  
 CM23rev 5'- AAT ATT GCC TAA AGT AAA GCG GCC CGG CTG GCA CCC CGG  
 CAC AAA G -3'  
 CM24fw 5'- CAT CAT GGT TGG TCG AGG TCG TGA GCA CC -3'  
 CM24rev 5'- GGT GCT CAC GAC CTC GAC CAA CCA TGA TG -3'  
 CM25fw 5'- CTT TTC CAA ATC TCT GTG CCT CCC TGA ACG CCA CAT CGT  
 CTT C -3'  
 CM25rev 5'- GAA GAC GAT GTG GCG TTC AGG GAG GCA CAG AGA TTT GGA  
 AAA G -3'

|                    |   |
|--------------------|---|
| CM26fw             | 5'- GGA GAT ATA CAT ATG CAG GAC TCC ACC -3'   |
| CM26rev            | 5'- GGT GGA GTC CTG CAT ATG TAT ATC TCC -3'   |
| CM27fw             | 5'- CAC ACC ATC TCG TAG CGC TTG GTC TC -3'  |
| CM27rev            | 5'- GAG ACC AAG CGC TAC GAG ATG GTG TG -3'  |
| CM28fw             | 5'- CAC ACC ATC TCG TTA AGC TTG ACC TGT G -3'   |
| CM28rev            | 5'- CAC AGG TCA AGC TTA ACG AGA TGG TGT G -3'   |
| CM30fw             | 5'- ACC GTA TTT GGA CCT TTG TGC CGN NST GCN NSC CGG GCC<br>GTT TTA CTT TAG -3'                                |
| CM30rev            | 5'- CAC AAA GGT CCA AAT ACG GT -3'  |
| CM32s              | 5'- TTA GAA GTA AAC CGG CCC ACA CAT CAT ACT T -3'   |
| CM32as             | 5'- AAG TAT GAT GTG TGG GCC GGT TTA CTT CTA A -3'   |
| CM33s              | 5'- GTT TTC GTA GCA AGG AAT GCC ACT ACC TG -3'  |
| CM33as             | 5'- CAG GTA GTG GCA TTC CTT GCT ACG AAA AC -3'  |
| CM34s              | 5'- GTA AAA TGT ACG CGA CCA TTT ACG AGT TGA AA -3'  |
| CM34as             | 5'- TTT CAA CTC GTA AAT GGT CGC GTA CAT TTT AC -3'  |
| CM35N7A_ald8_rev   | 5'- CAG CCC AAG CTT AAC GAG ATG GTG TGC ACA GTG GTG CGC<br>CGT CGA TAC ACT GGT CG -3'                         |
| CM36_N7A_EheI_fw   | 5'- GCC CAG GAC TCC ACC TCA GA*C -3'  |
| CM37_N7A_ald14_rev | 5'- CAG CCC AAG CTT AAC CGG TGA ACA GCG AAC CAC GAG ATG<br>GTG TGC ACA GTG GTG CGC CGT CGA TAC ACT GGT CG -3' |
| BstXIfor           | 5'- CAG GAC AAC CAA TTC CAT GGG -3'   |
| BstXIrev           | 5'- GGA GGC CCA GAG ATT TGG -3'   |

### 2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

|  |  |
|--|--|
| Accutase   | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO                                       |
| Albumin aus Rinderserum (BSA), Fraktion V  | Carl Roth, Karlsruhe   |
| Alkalische Phosphatase   | Fermentas, St. Leon-Rot  |
| Anti-Human- $\kappa$ -light chain-IgG (Maus)   | Invitrogen, Paisley, Schottland                                    |
| Benzonase  | Merck, Darmstadt   |
| Eichproteine: Alkoholdehydrogenase, $\beta$ -Amylase,<br>Apoferitin, Aprotinin, BSA, Carboanhydrase,<br>Cytochrom C, Dextranblau | Sigma Chemie, Deisenhofen  |
| Extravidin Alkalische Phosphatase Konjugat   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                                    |
| Lysozym aus Hühnereiweiß   | Sigma Chemie, Deisenhofen  |
| <i>Pfu Ultra II</i> Fusion HS DNA-Polymerase   | Stratagene, Amsterdam, Niederlande                                 |
| Restriktionsendonukleasen  | MBI Fermentas, St. Leon-Rot und<br>New England Biolabs, Schwalbach |
| Rituximab  | Apotheke, Klinikum rechts der Isar                                 |
| Streptavidin Alkalische Phosphatase Konjugat   | GE Healthcare Europe, Freiburg                                     |
| Streptavidin Mutante 1 und 1.6 gekoppelt an<br>Sephrose  | Eigenproduktion, Labor Prof. Dr. Skerra                            |
| T4 DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l und 5 U/ $\mu$ l)  | MBI Fermentas, St. Leon-Rot  |

|                                   |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot        |
| Trastuzumab                       | Apotheke, Klinikum rechts der Isar |

### 2.1.4 Chemikalien

Standardchemikalien wurden von den Firmen Carl Roth, E. Merck, AppliChem, Invitrogen bezogen.

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| (+)-Biotinamidohexansäure hydrazide                              | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim       |
| 2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)                       | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz          |
| 2-Mercaptoethanol  | Sigma Chemie, Deisenhofen             |
| <sup>89</sup> Zr-Oxalat  | IBA Molecular, Amsterdam, Niederlande |
| Acetonitril MS Grade   | E. Merck, Darmstadt                   |
| Acrylamid-Stammlösung 30 % (v/v) mit<br>0,8 % (v/v) Bisacrylamid | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Agarose  | Invitrogen, Paisley, Schottland       |
| Ameisensäure MS grade  | E. Merck, Darmstadt                   |
| Ammoniumperoxidisulfat (APS)                                     | E. Merck, Darmstadt                   |
| Ampicillin (Amp)   | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Anhydrotetracyclin (aTc)   | E. Merck, Darmstadt                   |
| Antifoam Y-30  | Sigma Chemie, Deisenhofen             |
| Ascorbinsäure  | E. Merck, Darmstadt                   |
| Bacto Agar   | Difco Laboratories, Detroit, MI       |
| Bacto Yeast Extrakt  | Difco Laboratories, Detroit, MI       |
| BD Matrigel Basement Membrane Matrix                             | BD Biosciences, Deutschland           |
| D-Biotin   | Iris Biotech, Marktredwitz            |
| Blue Dextran   | Sigma Chemie, Deisenhofen             |
| Bradford Protein Assay   | Bio-Rad, München                      |
| 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- 4-<br>Toluidinsalz (BCIP)      | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Bromphenolblau   | E. Merck, Darmstadt                   |
| Chloramphenicol (Cam)  | Carl Roth, Karlsruhe                  |
| Coomassie Brilliantblau R-250                                    | Biomol Feinchemikalien, Hamburg       |
| DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)                              | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim       |
| Deferroxamine-p-SCN  | Macrocyclics, Dallas, TX              |
| D-Desthiobiotin  | IBA, Göttingen                        |
| Dichlormethan  | E. Merck, Darmstadt                   |
| EDC (N-Ethyl-N'-(3-di-methylaminopropyl)-<br>carbodiimid)        | GE Healthcare Europe, Freiburg        |
| Ethanolamin, 1 M Lösung  | GE Healthcare Europe, Freiburg        |

|  |  |
|--|--|
| Ethidiumbromid   | E. Merck, Darmstadt                              |
| Ethylenglycol  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| Gentisinsäure  | E. Merck, Darmstadt                              |
| D(+)-Glucose   | E. Merck, Darmstadt                              |
| Iodogen  | Pierce, Rockford, IL                             |
| Isofluran  | CP-Pharma, Burgdorf                              |
| Mangan(II)-chlorid   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| Methanol   | E. Merck, Darmstadt                              |
| Methionin  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)                             | Sigma Chemie, Deisenhofen                        |
| Na <sup>123</sup> I  | GE Healthcare Europe, Freiburg                   |
| Na <sup>124</sup> I  | IBA Molecular, Amsterdam, Niederlande            |
| Na <sup>125</sup> I  | Hartman Analytic, Braunschweig                   |
| Na <sup>127</sup> I  | AppliChem, Darmstadt                             |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)   | E. Merck, Darmstadt                              |
| Natriumperiodat  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| NHS (N-Hydroxysuccinimid)  | GE Healthcare Europe, Freiburg                   |
| Nickelsulfat   | Sigma Chemie, Deisenhofen                        |
| Nitro Blue Tetrazolium (NBT)   | Carl Roth, Karlsruhe                             |
| p-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz (pNPP)                           | AppliChem, Darmstadt                             |
| Oxalsäure  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| Penicillin/Streptomycin Stammlösung                                  | PAA Laboratories, Pasching, Österreich           |
| Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween20)                         | Dr. Th. Schuchardt & Co., Hohenbrunn             |
| Propidiumiodid   | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| D(+)-Saccharose  | Carl Roth, Karlsruhe                             |
| Thiaminhydrochlorid  | Sigma Chemie, Deisenhofen                        |
| Trehalose  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| tRNA aus Hefe  | Roche Applied Science, Mannheim                  |
| Zinksulfat   | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz                     |
| Zirkonium(IV) chlorid  | Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim                  |
| <sup>89</sup> Zr(IV)-Oxalat  | IBA Molecular, VU Amsterdam                      |
| Aoa-NH-Bn-CHX-A''-DTPA (Aminoxy-DTPA)                                | Herstellung Labor Prof. Dr. Wester durch S. Robu |
| Alexa Fluor488C <sub>5</sub> -Aminoxyacetamide<br>(Aminoxy-Alexa488) | Molecular Probes, Eugene, OR                     |

### 2.1.5 Standards und Kits

|                     |                             |
|---------------------|-----------------------------|
| 6 x DNA Loading Dye | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
|---------------------|-----------------------------|

|   |   |
|---|---|
| ABI PRISM BigDye Terminator Cycle-Sequencing Ready Reaction Kit | Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg |
| Gene Ruler 1 kb DNA Ladder                                      | MBI Fermentas, St. Leon-Rot                 |
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder                                     | MBI Fermentas, St. Leon-Rot                 |
| PageRuler Plus Prestained Protein Ladder                        | Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL      |
| QIAprep Spin Plasmid Midiprep Kit                               | Qiagen, Hilden                              |
| QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit                               | Qiagen, Hilden                              |
| QIAquick Gel Extraction Kit                                     | Qiagen, Hilden                              |
| QIAquick PCR Purification Kit                                   | Qiagen, Hilden                              |
| Unstained Protein Molecular Weight Marker                       | Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL      |

### 2.1.6 Geräte

|  |   |
|--|---|
| ABI-Prism™ 310 Genetic Analyzer  | Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt |
| <u>8 Liter Laborfermenter:</u>   |   |
| Regelmodule für pH, pO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> - und Glucose Zugabe | Schütt Labortechnik, Göttingen                |
| pH Elektrode (Typ 465)   | BCC Spezialgeräte, Göttingen                  |
| O <sub>2</sub> -Sensor (12/320 A-Type)                                     | Ingold Meßtechnik, Steinbach                  |
| Äkta Explorer und Äkta Purifier  | Mettler-Toledo, Steinbach                     |
| Autoklav Varioklav Typ 500   | Pharmacia Biotech Europe, Freiburg            |
| Axiovert 40 CFL Mikroskop  | H + P Labortechnik, Oberschleißheim           |
| Biacore 2000   | Carl Zeiss, Göttingen                         |
| <u>Brutschränke:</u>   |   |
| Incusell 111   | GE Healthcare Europe, Freiburg                |
| Friocell   | MMM Group Medcenter Einrichtungen, München    |
| NUAIRE DH Autoflow CO <sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator                  | INTEGRA Biosciences, Fernwald                 |
| Capintec CRC-15R Dose Calibrator   | Capintec, Ramsey, NJ                          |
| CD-Spektropolarimeter JASCO J-810  | Jasco Labor- und Datentechnik, Groß-Umstadt   |
| Elektroblotapparatur Typ V10-SDB   | Carl Roth, Karlsruhe                          |
| Elektrophorese-Kammern   | Biometra, Göttingen Eigenbau                  |
| FACSaria Cell-Sorting system   | BD Biosciences, Heidelberg                    |
| Fluoreszenzphotometer FluoroMax-3  | Jobin Yvon, Grasbrunn                         |
| <u>Fraktionssammler:</u>   |   |
| Frac-100   | GE Healthcare Europe, Freiburg                |
| Frac-920   |   |
| Gradientenmischer  | Rainin, Woburn, MA                            |
| Hamilton ML Star mit EASYPICK  | Hamilton Robotics, Bondaduz                   |
| Hamilton Spritze   | Hamilton Company, Reno, NV                    |
| Inveon PET/CT Small Animal Scanner   | Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN      |

|   |   |
|---|---|
| maXis Massenspektrometer  | Bruker Daltonics, Bremen  |
| Millipore Synergy 185 Reinstwasser Anlage                                 | Millipore, Eschborn   |
| Mini-Scan Radioaktivitätsdetektor (DC)                                    | Bioscan, Washington, DC   |
| Peristaltische Pumpe P1   | Pharmacia Biotech Europe, Freiburg                                  |
| pH-Meter  | WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim               |
| PhosphorImager CR 35 BIO  | Raytest Isotopenmeßgeräte, Deutschland                              |
| Bildplatte Kodak Storage Phosphor screen GP                               | Eastman Kodak Company, Rochester, NY                                |
| <u>Pipettierhilfen und Pipetten:</u>                                      |   |
| Pipetus akku  | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt                                   |
| accu-jet pro  | Brand, Wertheim   |
| Gilson P20, P200 P1000  | Abimed Analysen-Technik, Langenfeld                                 |
| Eppendorf 4710 und Multipette 4780  | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg                                    |
| Schüttelinkubator Multitron   | Infors, Bottmingen, Schweiz   |
| <u>SDS-PAGE:</u>  |   |
| Apparaturen, Glasplatten, <i>Spacer</i> , Dichtungen, Kämme               | Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg und Biometra, Göttingen |
| <u>Signalschreiber:</u>   |   |
| SE120, 2210   | ABB Goerz, Wien, Österreich   |
| <u>Spektrophotometer:</u>   |   |
| Ultrospec 2100pro   | Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg                         |
| ELISA-Photometer SpectraMax 250   | Molecular Devices, Sunnyvale, CA                                    |
| Multi-Detektions-Reader Synergy 2   | BioTek, Bad Friedrichshall  |
| NanoDrop 2000   | Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL                              |
| Sterilbank BW-130 DE Biowizard Safety                                     | KOJAIR TECH, Vilppula, Finnland                                     |
| <u>Thermocycler für die PCR:</u>  |   |
| UNO-Thermoblock   | Biometra, Göttingen   |
| Mastercycler gradient   | Eppendorf Deutschland, Wesseling-Berzdorf                           |
| Vortex-Genie 2  | Scientific Industries, Bohemia, NY                                  |
| <u>Waagen:</u>  |   |
| Precisa 125A und Precisa XB220C   | Precisa Gravimetrics, Schweiz                                       |
| Zellhomogenisator Homo Genius (Panda)                                     | GEA Niro Soavi, Parma, Italien                                      |
| <u>Zentrifugen:</u>   |   |
| Sigma 4K15 und Sorvall RC 6+ mit Rotoren F10S-4x1000 LEX, SS-34, SLA-1500 | SIGMA Laborzentrifugen, Osterode                                    |
| MiniSpinplus Centrifuge 5415 R und Centrifuge 5702 R                      | Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL                              |
|   | Eppendorf Deutschland, Wesseling-Berzdorf                           |
| $\gamma$ -Counter 1480 Wallac Wizard                                      | PerkinElmer, Turku, Finland   |

### 2.1.7 Sonstiges Material

Standardmaterialien wurden von den Firmen Millipore, Sarstedt, Eppendorf-Netheler-Hinz und Greiner Labortechnik bezogen.

Chromatographiepapier:*Glass micro fiber chromatography paper*

Agilent Technologies, Santa Clara, CA

Dialyseschläuche:

Spectra/Por 6-8 MWCO

Spectrum Laboratories, Breda, Niederlande

Mini-Dialysiereinheit 10 MWCO, Slide-A-Lyzer

Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL

Chromatographie-Säulen:

Superdex 75 HR 10/30

GE Healthcare Europe, Freiburg

Superdex 200 HR 10/30

Superdex 75 HiLoad 16/60 prep grade

Superdex 200 HiLoad 16/60 prep grade

Resource Q

Superdex 75 Säulenmaterial

Folie, atmungsaktiv (Easyseal)

Greiner, Frickenhausen

Konzentratoren:

Amicon Ultra 15 mL und 50 mL, MWCO: 10 und 30 kDa

Millipore, Eschborn

Vivaspin 15, MWCO 10 kDa

Diagonal, Münster

Neubauer Zählkammer

Omnilab, München

Nunc Lab-Tekt II chamber slideT System

Thermo Fisher Scientific, Rochford, IL

PD-10 Säulen

GE Healthcare Europe, Freiburg

Quarzglasküvette Typ 110 QS

Hellma, Müllheim

SPR Sensorchip CMD 200m

XanTec, Münster

96-well Platten:

Gelfiltrationsplatte (Receiver Plate 20 µm hydrophilized mit Filterplättchen)

Macherey-Nagel, Düren

Kulturplatte (PP Masterblock 2 ml)

Greiner, Frickenhausen

Mikrotestplatte R/F (*roundwell/flatbottom*)

Sarstedt, Nümbrecht

Whatman-Filterpapier 3MM

VWR International, Darmstadt

Zellkulturflaschen BD 12,5 cm<sup>2</sup> und 75 cm<sup>2</sup> mit Gasaustauschkappe

VWR International, Darmstadt

**2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen**

Alle Medien und Lösungen wurden – falls nicht gesondert angegeben – entweder autoklaviert oder durch Filtration sterilisiert. Für Kulturmedien wurde entionisiertes Wasser verwendet, alle übrigen Lösungen wurden mit Millipore Wasser hergestellt. Zur Herstellung von Kulturplatten in Petrischalen wurde dem flüssigen Medium 15 g/l Bacto Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

LB-Medium:

10 g/l Bacto Tryptone

5 g/l Bacto Yeast Extract

5 g/l NaCl

2YT-Medium:

16 g/l Bacto Tryptone

10 g/l Bacto Yeast Extract

5 g/l NaCl



Alle genannten Medien wurden mit 5 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

|           |   |
|-----------|---|
| TB-Medium | 12 g/l Bacto Tryptone<br>24 g/l Bacto Yeast Extract<br>0,4 % (v/v) Glycerin |
|-----------|---|

Medium autoklavieren und 1:10 mit 0,72 M  $\text{HK}_2\text{PO}_4$ , 0,17 M  $\text{H}_2\text{KPO}_4$  versetzen.

#### Antibiotika- und Induktor-Stammlösungen

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45  $\mu\text{M}$ ).

|   |   |
|---|---|
| Ampicillin (Amp)                                  | 100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}$ (1:1000 zum Medium)                             |
| Anhydrotetracyclin (aTc)                          | 2 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium)<br>oder 5 mg/ml in DMF (1:10.000 zum Medium) |
| Chloramphenicol (Cam)                             | 30 mg/ml in 70 % Ethanol (1:1000 zum Medium)                                      |
| IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) | 1 M in $\text{H}_2\text{O}$ (1:5000 zum Medium)                                   |

#### Lösungen für die Zellkultur

|   |  |
|---|--|
| DMEM mit L-Glutamin   | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Fetal Bovine Serum (FBS)  | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |
| Dulbecco's PBS mit und ohne $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Mg}^{2+}$ ; | PAA Laboratories, Pasching, Österreich |

#### Lösungen für die Fermentation

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Mineralsalzlösung:            | 31 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (5,51 g/l) pH 6,9<br>19 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (2,58 g/l)<br>25 mM $\text{NH}_4\text{Cl}$ (1,33 g/l)<br>5 mM $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0,47 g/l) |
| Glucoselösungen:              | 20 % (w/v) Glucose (separat autoklaviert)<br>50 % (w/v) Glucose (separat autoklaviert)   |
| $\text{MgSO}_4$ -Stammlösung: | 1 M $\text{MgSO}_4$ (separat autoklaviert)   |
| Thiamin-Stammlösung:          | 10 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid (sterilfiltriert)  |
| $\text{FeCl}_3$ -Stammlösung: | 35 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (mit HCl bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert, sterilfiltriert)  |
| Zn-Acetat-Stammlösung:        | 8 g/l Zn-Acetat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)   |

|  |  |
|--|--|
| Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert): | 3 g/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$<br>0,3 g/l $\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$<br>0,6 g/l $\text{H}_3\text{BO}_3$<br>0,5 g/l $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$<br>1,2 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$<br>4 mM EDTA |
| Ammoniak:                                    | 12,5 % (w/v) $\text{NH}_3$ zur pH Regulierung  |

#### Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

|                     |   |
|---------------------|---|
| TAE-Puffer:         | 40 mM Tris/HCl<br>20 mM Essigsäure<br>1 mM EDTA                     |
| 1 % DNA-Agarosegel: | 0,7 g Agarose<br>70 ml TAE-Puffer<br>7 $\mu\text{l}$ Ethidiumbromid |

#### Lösungen für die SDS-PAGE

|   |   |
|---|---|
| 1x SDS-Laufpuffer nach (Fling & Gregerson, 1986): | 50 mM Tris/HCl pH 8,8<br>190 mM Glycin<br>1 g/l SDS   |
| 4 x Lower-Tris:                                   | 3 M Tris/HCl pH 8,8<br>4 g/l SDS  |
| 4 x Upper-Tris:                                   | 0,5 M Tris/HCl pH 6,8<br>4 g/l SDS  |
| 5 x Auftragspuffer:                               | 250 mM Tris/HCl pH 8,0<br>7,5 % (w/v) SDS<br>25 % (v/v) Glycerin<br>0,25 mg/ml Bromphenolblau<br>12,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol (bei<br>reduzierendem Auftragspuffer) |
| Färbelösung:                                      | 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R-250<br>(in DMF vorgelöst)<br>25 % (v/v) Isopropanol<br>10 % (v/v) Essigsäure   |
| Entfärbelösung 1                                  | 25 % (v/v) Isopropanol<br>10 % (v/v) Essigsäure   |
| Entfärbelösung 2                                  | 10 % (v/v) Essigsäure   |

Sonstige Puffer

|  |   |
|--|---|
| AP-Puffer:   | 100 mM Tris/HCl pH8,8<br>100 mM NaCl<br>5 mM MgCl <sub>2</sub>  |
| Puffer für die Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC-Puffer):       | 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,8<br>0,5 M Betain   |
| Regenerierungspuffer (IMAC):   | 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,8<br>0,5 M NaCl<br>50 mM EDTA                                       |
| PBS:   | 4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4<br>115 mM NaCl            |
| PBS/T 0,1:   | PBS mit 0,1 % (v/v) Tween20   |
| HBS/T 0,1:   | 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4<br>150 mM NaCl<br>0,1 % (v/v) Tween20   |
| HBS/T 0,5:   | 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4<br>150 mM NaCl<br>0,5 % (v/v) Tween20   |
| Periplasma-Aufschlusspuffer:   | 500 mM Saccharose<br>100 mM Tris/HCl pH 8,0<br>1 mM EDTA  |
| Puffer für die <i>Strept</i> Tactin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer): | 100 mM Tris/HCl pH 8,0<br>50 mM NaCl<br>1 mM EDTA   |
| Puffer für die CD-Messung:   | 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>50 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>auf pH 7,5 mit KOH eingestellt |
| SA-Puffer  | 100 mM Tris/HCl pH 8,0<br>150 mM NaCl<br>1 mM EDTA  |
| FACS-Puffer  | 1x PBS<br>10 % (v/v) Fetal Bovine Serum<br>2 mM EDTA<br>0,002 % (w/v) Natriumazid                               |

## 2.2 Molekularbiologische und gentechnische Methoden

### 2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen in LB-Medium bei 180 U/min oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 l wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD<sub>550</sub>) mit Hilfe des Spektrophotometers Ultrospec 2100pro bestimmt.

### 2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen (Cohen *et al.*, 1972) wurde 50 ml LB-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur von XL1blue (Bullock *et al.*, 1987) versetzt und bei 37 °C bis zu OD<sub>550</sub> = 0,5 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4000 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem, sterilfiltriertem 0,1 M CaCl<sub>2</sub> vorsichtig resuspendiert und mindestens für 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert, in 4 ml CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und mit sterilem Glycerin (15 % Endkonzentration) versetzt. Dieses Gemisch verblieb über Nacht auf Eis und wurde am nächsten Tag aliquotiert (50 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden die CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligierungsansatz oder 1 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 30 s wurden die Zellen mit 400 µl LB-Medium versetzt und bei 37 °C, 550 rpm für 45 min inkubiert. Anschließend wurden dann 100 µl sowie der restliche Ansatz jeweils auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kits von Qiagen aus 3 ml Übernachtskultur nach Herstellerangaben isoliert und in 50 µl EB-Puffer eluiert. Diese Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der selektiven Immobilisierung der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit Hilfe eines NanoDrop 2000 bei 260 nm bestimmt.

Um größere DNA-Mengen für den präparativen Restriktionsverdau zu gewinnen, wurde die Plasmid-DNA im 50 ml-Maßstab isoliert. Ausgehend von einer stationären 50 ml Übernachtskultur wurde dazu die DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits gemäß Herstellerangaben präpariert. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

## 2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 0,8 % (w/v) oder 1 % (w/v) Suspension von Agarose in TAE-Puffer in der Siedehitze gelöst, mit 10 µl Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente anhand der Interkalation des Ethidiumbromids durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Rotfilters fotografiert.

Für die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden der PCR-Produkte oder geschnittenen Plasmid-DNA aus dem Agarosegel unter UV-Licht mittlerer Wellenlänge (312 nm) Intensität ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben extrahiert, mit 30 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert und bei -20°C gelagert.

## 2.2.5 *In vitro* Modifizierung von DNA

### 2.2.5.1 Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung sowie zur Synthese von Genen

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR; (Saiki *et al.*, 1988)) wurden DNA-Sequenzen selektiv amplifiziert oder mittels *Assembly*-PCR künstliche Gene synthetisiert. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit der Länge des zu amplifizierenden Bereiches und der Prozessivität der Polymerase variiert.

#### Standard-PCR zur Amplifizierung eines Gens

Die in der PCR paarweise eingesetzten Oligodesoxynukleotide (Primer) flankieren den zu amplifizierenden Bereich und wiesen an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz auf.

Der Standard-Reaktionsansatz für eine PCR mit der *Taq* DNA-Polymerase (Chien *et al.*, 1976) enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 0,01 bis 1 µg Matrizen-DNA und je 25 pmol der beiden Primer. Weiterhin enthielt der Ansatz 5 µl 10x *Taq*-Puffer, 3 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM) sowie 4 µl dNTP-Mix (je 2,5 mM). Wurde die *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991) verwendet, wurden 5 µl des mitgelieferten 10x *Pfu*-Puffers verwendet, in dem bereits MgCl<sub>2</sub> enthalten war. Die Verwendung einer solchen Polymerase mit Korrekturlesefunktion (*Proofreading*-Aktivität) erforderte Primer, welche vor der 3'- zu 5'-Exonukleaseaktivität durch 3'-Phosphorthioatbindung geschützt waren

(Skerra, 1992). Der PCR-Ansatz wurde zunächst im Thermocycler für 2 min auf 94 °C erhitzt, bevor 2,5 U der entsprechenden Polymerase zugegeben wurden (*Hot Start*). Die PCR wurde in aufeinanderfolgenden Zyklen durchgeführt, die aus je drei Schritten bestanden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C für 1 min; 2. Hybridisierung (*Annealing*) der Primer an die DNA-Matrix bei 55 bis 60 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 1 min; 3. Synthese der DNA bei 72 °C für 1 min je kb (*Taq* DNA-Polymerase) bzw. 2 min je kb (*Pfu* DNA-Polymerase) des Templates (Polymerase-Reaktion). Der Zyklus wurde in der Regel 25 x durchlaufen und der Ansatz schließlich zur Vervollständigung der Syntheseprodukte für 5 min bei 60 °C inkubiert.

#### Assembly-PCR für die Einführung randomisierter Aminosäurepositionen

Die *Assembly*-PCR wurde in einem Reaktionsansatz von 50 µl mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase und unter den Pufferbedingungen der Standard-PCR durchgeführt (Essen & Skerra, 1994). Dabei wurden zunächst zwei überlappende PCR-Fragmente unter Verwendung entsprechender randomisierter Primer und von pNGAL89-N7A.B als Template (**Abb. 19**) synthetisiert. Anschließend wurde die *Bst*XI-Kassette mit den flankierenden Primern *Bst*XIfor und *Bst*XIrev (10 µM) und den PCR-Fragmenten (0,5 pmol) amplifiziert. Die PCR wurde mit dem Temperatur/Zeit-Programm des Standard-PCR Ansatzes (s.o.) mit 55 °C als *Annealing* Temperatur durchgeführt.

#### **2.2.5.2 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Für einen analytischen Verdau wurde typischerweise 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 U der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µl für 1 h inkubiert. Für präparative Spaltungen wurden 5 bis 6 µg Plasmid-DNA mit 20 U eines jeden Restriktionsenzym in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 2 h verdaut. Ansätze mit mehreren Enzymen wurden unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen der beteiligten Restriktionsenzyme entweder gemeinsam oder nacheinander verdaut. Vor der weiteren Umsetzung mit DNA-modifizierenden Enzymen wurden die DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese oder durch QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben gereinigt und in 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert.

#### **2.2.5.3 Dephosphorylierung von DNA**

Bei der Konstruktion von Plasmiden durch Ligierung von DNA-Fragmenten mit stumpfen Enden (*Blunt Ends*) wurde das Vektorfragment zur Erhöhung der Ausbeute des korrekten Ligierungsprodukts mit der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (*Arctic Shrimp*) dephosphoryliert. 1 µl (1 U) Alkalische Phosphatase wurde 10 min vor Ende der Restriktionsspaltung zugegeben und der Ansatz bei 37 °C

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

#### 2.2.5.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

Die nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen isolierten DNA-Fragmente wurden zur Konstruktion neuer Plasmide mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Nach Herstellerangaben wurden die DNA-Fragmente in einem Verhältnis von Vektorfragment zu Insert von 1:3 in einem Volumen von 10 µl entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C ligiert. Zur Kontrolle wurden 50 fmol des Vektorfragments ohne Insert der Ligierungsreaktion unterworfen. 5 µl des Ligierungsansatzes wurden anschließend für die Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet.

Für die Ligierung des Inserts aus der *Assembly*-PCR (s.o.) in einen entsprechenden Vektor, wurde 1 µg Vektor, 125 ng Insert in einem Gesamtvolumen von 145 µl mit 14,5 U DNA-Ligase für 72 h bei 16 °C inkubiert. Um die DNA zu fällen, wurden dem Ligierungsansatz 1 Volumenanteil 5 M Natriumacetat, 5 Volumenanteile Ethanol und 1/40 Volumenanteil Hefe tRNA (10mg/mL Lösung in H<sub>2</sub>O) zugesetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Die DNA wurde anschließend bei 13.000 rpm und 4 °C für 1 h pelletiert, mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 resuspendiert.

#### 2.2.5.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Die Methode der ortsgerechten Mutagenese (QuikChange Mutagenese) erlaubt die einfache Einführung von Aminosäure-Punktmutationen, -Deletionen und -Insertionen. Durch die Verwendung von je zwei komplementären Mutageneseprimern, welche die entsprechende Mutation umfassen, wurde das gesamte Plasmid mittels PCR amplifiziert.

Der PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 µl 50 ng Template-DNA, je 0,2 pmol der beiden Primer, 1 µl *Pfu* UltraII Polymerase, 5 µl *Pfu* UltraII-Puffer (10x) sowie 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM). Der PCR-Ansatz wurde im Thermocycler für 30 s auf 95 °C erhitzt. Der nachfolgende Zyklus (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 68 °C 4 min) wurde in Abhängigkeit von der eingeführten Mutationen 16 bis 18 Mal wiederholt. Anschließend wurde das *dam*-methylierte Template-Plasmid mit Hilfe des Restriktionsenzym *DpnI* (10 U) verdaut, mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und für die Transformation von *E. coli* verwendet.

#### 2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Für die Analyse von DNA-Abschnitten wurde das ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit verwendet. Durch die enthaltenen Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die mit jeweils unterschiedlichen Dichlorrhodamin-Molekülen gekoppelt sind, wurde die naszierende DNA-Kette während der linearen Polymerasereaktion mit der modifizierten Taq DNA-Polymerase

(AmpliTaQ) in statistischer Weise abgebrochen und gleichzeitig mit dem der Terminatorbase entsprechenden Fluorophor markiert. Die so entstandenen DNA-Fragmente wurden im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (Performance Optimized Polymer 6, POP-6TM) aufgetrennt. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe der Software ABI PRISM DNA Sequencing Analysis 3.3 interpretiert und als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift

Zu 4 µl BigDye™ Ready Reaction Mix wurden je 2 µl Plasmid-DNA (ca. 1 µg), 2 µl eines geeigneten Primers (1 µM) und 2 µl H<sub>2</sub>O gegeben und 25-mal folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 96 °C 30 s, 55 °C 15 s, 60 °C 4 min. Danach wurde das PCR-Produkt durch Zugabe von 2,5 µl 125 mM EDTA und 25 µl Ethanol (p. a.) für 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde zentrifugiert (RT, 30 min, 14.000 rpm), mit 125 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 12 µl des im Kit enthaltenen TSR-Puffer resuspendiert, in ein passendes Reaktionsgefäß überführt und im ABI PRISM 310-Sequenzierautomaten analysiert.

### **2.2.7 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli***

Die in dieser Arbeit produzierten Proteine wurden entweder im Cytoplasma oder im periplasmatischen Raum von *E. coli* produziert. Durch die Fusion des entsprechenden Strukturgens mit dem Genabschnitt für die Signalsequenz des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) bzw. der Alkalischen Phosphatase (PhoA) wird das Protein in das Periplasma von *E. coli* sekretiert (Skerra & Plückthun, 1988). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran kann anschließend die Periplasmafraktion mit dem rekombinanten Protein gewonnen werden.

#### **2.2.7.1 Anzucht, Induktion, Ernte von Kulturen im Schüttelkolben**

##### Periplasmatische Expression von Fab-Fragmenten

50 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 l LB-Medium mit Antibiotikum in einem 5 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:40 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 22 °C und 180 rpm bis zu OD<sub>550</sub> = 0,5 geschüttelt. Die Proteinexpression wurde mit 200 µl aTc-Lösung (2 mg/ml in DMF) induziert und nach 2 bis 3 h durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 min, 5000 rpm sedimentiert. Die Zellen wurden unter Kühlung in insgesamt 20 ml eiskaltem Periplasma-Aufschlusspuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt, zunächst 5000 rpm 4 °C 15 min, dann 15000 rpm 15 min 4 °C. Der Periplasmaextrakt wurde anschließend zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie über Nacht gegen das 100-fache Volumen



des entsprechenden Chromatographie-Puffers dialysiert. Im Fall der Produktion von PASylierten Proteinen wurde das Kulturmedium mit 0,5 g/l Prolin und 2,5 g /l Glucose vor Induktion der Proteinexpression versetzt.

#### Periplasmatische Expression von Anticalinen

2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 8 h bei 37 °C, 200 rpm kultiviert. Anschließend wurde 1 ml der Vorkultur auf 2 l LB-Medium mit Antibiotika überimpft und bei 22 °C, 180 rpm über Nacht im Schüttelinkubator bis zu  $OD_{550} = 2,5$  kultiviert. Nach Induktion der Proteinexpression mit 200  $\mu$ l aTc-Lösung (2 mg/ml in DMF) wurden die Zellen für weitere 5 h kultiviert. Ernte und Periplasmaaufschluss wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Aufgrund der höheren Zelldichte bei der Ernte wurden hier 40 ml Periplasma-Aufschlusspuffer verwendet.

#### Cytoplasmatische Expression von Anticalinen mit Aldehyd-Tag

50 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 2 l LB-Medium mit Antibiotikum in einem 5 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:40 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 rpm bis zu  $OD_{550} = 0,5$  geschüttelt. Die Proteinexpression des Formylglycin generierenden Enzyms (FGE) wurde mit 500  $\mu$ l 1 M IPTG-Lösung induziert. Nach 30 min wurde die Kultur auf 22 °C gekühlt und nach weiteren 30 min die Proteinexpression mit 200  $\mu$ l aTc (2 mg/ml in DMF) induziert und über Nacht bei 22 °C exprimiert. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min wurden die Zellen sedimentiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Proben vor und nach Induktion der Proteinexpression wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Zellen aus 1 ml der Kultur wurden in 80  $\mu$ l Benzonasepuffer (3 U/ml Benzonase, 50 mM  $MgCl_2$ , 100 mM Tris/HCl pH 6,8) resuspendiert und mit 20  $\mu$ l 5x Auftragspuffer (reduzierend) für 1 h bei 4 °C lysiert, wobei die bakteriellen Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert werden.

#### **2.2.7.2 Anzucht, Induktion, Ernte von Kulturen im Laborfermenter**

Um größere Mengen eines rekombinanten Proteins herzustellen, wurde ein 8 Liter Laborfermenter verwendet (Schiweck & Skerra, 1995). Die Bakterienzellen wurden in einem 8 Liter Fermentergefäß in Mineralsalzmedium, welchem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugeführt wurde, kultiviert. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für Temperatur, pH-Wert (über die Ammoniaklösung) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des gesamten Verlaufs der Fermentation gewährleistet. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* KS272 verwendet. 2 ml LB-Medium der Vorvorkultur mit Antibiotikum wurde mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 6-8 h bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die 400ml-

Vorkultur wurde anschließend im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und für ca. 26 h bei 30 °C, 220 rpm inkubiert. Das Medium der Vorkultur bestand aus 360 ml Mineralsalzlösung, die mit 40 ml 20 % (w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, je 400 µl Antibiotika-Stammlösung und Thiamin-Stammlösung versetzt wurde.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 l Mineralsalzlösung befüllt, sterilisiert, auf einem Magnetrührer (470 rpm) fixiert und mit 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, je 8 ml der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung sowie der Thiamin-Stammlösung, je 4 ml FeCl<sub>3</sub>- und Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelement-Lösung, 200 µl Antifoam Y-30 Lösung sowie der Vorkultur versetzt und bei 25 °C kultiviert. Während des Verlaufs der Fermentation wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff auf einen Wert  $\geq 30$  % des ursprünglichen Sättigungsdrucks eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % (w/v) Ammoniak bei pH 7,0 konstant gehalten. Die Rührgeschwindigkeit betrug 470 U/min. Um die Bakterienkultur während der exponentiellen Wachstumsphase ausreichend mit Kohlenstoff zu versorgen, wurde 50 % (w/v) Glucose mit 14 ml/h ab einer Zelldichte von OD<sub>550</sub> 7,5 bzw. mit 20 ml/h ab OD<sub>550</sub> 12,5, 30 ml/h ab OD<sub>550</sub> 18,5 und 40 ml/h ab OD<sub>550</sub> 22,5 zugegeben. Weiterhin wurden der Kultur bei OD<sub>550</sub> = 13 nochmals je 4 ml Fe- bzw. Zn-Stammlösung und 10 ml der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Die Genexpression wurde bei einer Zelldichte von OD<sub>550</sub> = 25 durch Einstellen einer Konzentration von 0,5 mg aTc je Liter Kultur induziert, die Kultivierung für weitere 2,5 h fortgesetzt und die Zellen dann zügig durch Zentrifugation (4 °C 20 min 5.000 rpm) geerntet.

Die sedimentierten Zellen wurden in kaltem Periplasma-Aufschlusspuffer für 10 min auf einem Magnetrührer resuspendiert, wobei das eingesetzte Puffervolumen 2 ml l<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> betrug. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA Stammlösung pH8,0) und 250 µg Lysozym/ml (20 mg/ml Lysozym-Stammlösung in Aufschlusspuffer) eingestellt und für 20 min auf Eis gerührt, um einen vollständigen Periplasmaaufschluss zu erreichen. Der periplasmatische Proteinextrakt wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt (4 °C, 20 min, 11.500 rpm) von den Sphäroplasten grob getrennt und in einem zweiten Zentrifugationsschritt (40 min, unter identischen Bedingungen) von verbliebenen Zellen und Zellresten geklärt. Für die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde der Periplasmaextrakt gegen den entsprechenden Puffer dialysiert.

Im Fall der Produktion von PASylierten Proteinen wurde das Medium mit 0,5 g/l Prolin vor Induktion der Proteinexpression versetzt.

### 2.2.7.3 Genexpression von Aldehyd-Tag Varianten im Mikromaßstab

Die bakterielle Expression verschiedener Aldehyd-Tag Varianten wurde im 96-well Format mit Hilfe des Hamilton ML Star Roboters durchgeführt. Frisch transformierte *E. coli* Origami B Einzelkolonien wurden automatisch mittels EASYPIC-Funktion von einer rechteckigen LB-Agarplatte in eine 96-well

Mikrotestplatte, welche 150 µl TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika enthält, überimpft. Die Platte wurde anschließend mit atmungsaktiver Folie abgedeckt und über Nacht bei 30 °C im Schüttelinkubator Minitron (Amplitude 5 cm, 180 rpm, Luftfeuchtigkeit 75 %) kultiviert. Die Kulturplatten, welche mit 1 ml TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum befüllt waren, wurden mit jeweils 5 µl der Übernachtskultur versetzt und bei 37 °C bis zu  $OD_{550} = 0,5$  kultiviert. Die Genexpression von FGE wurde daraufhin durch Zugabe von 50 µl 5 mM IPTG durch den Roboter induziert. Nach 30 min wurde die Temperatur auf 18 °C gesenkt, und nach weiteren 30 min wurde die Genexpression der Anticalin-Varianten mit 50 µl 4 µg/ml aTc-Lösung ebenfalls durch den Roboter induziert. Am darauffolgenden Tag wurde die Zelldichte (OD) bei 550 nm bestimmt und die Bakterien im Anschluss durch Zentrifugation bei 5000 rpm, 4 °C pelletiert und der Kulturüberstand abgezogen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Platten bei -20 °C gelagert. Für die Messung der OD wurden jeweils 100 µl Kulturlösung in eine Mikrotestplatte F (*flatbottom*) überführt und mit dem Multi-Detektions-Reader Synergy 2 analysiert.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Chromatographische Verfahren

#### 2.3.1.1 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) beruht auf der Wechselwirkung von rekombinanten Proteinen mit typischerweise sechs aufeinander folgenden Histidinresten (His<sub>6</sub>-Tag) mit Übergangsmetallionen wie Ni<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup>, welche durch chelatisierende chemische Gruppen auf einem Säulenmaterial immobilisiert sind (Porath *et al.*, 1975). Für die Reinigung der PASylierten Fab-Fragmente wurde eine Sepharose-Matrix mit gebundenen Nitrilotriessigsäure-Gruppen (Matrix: *highly cross-linked spherical agarose*, 6%), welche mit dem Übergangsmetallion Ni<sup>2+</sup> beladen war verwendet. Eine Säule mit geeignetem Bettvolumen wurde unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe mit einem Säulenvolumen 100 mM ZnSO<sub>4</sub> beladen (Skerra, 1994), mit Wasser nachgespült und mit IMAC-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der gegen IMAC-Puffer dialysierte Periplasmaextrakt aus *E. coli* aufgetragen und bis zum Erreichen einer Basislinie mit IMAC-Puffer gespült. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe eines UV/VIS-Durchflussphotometers bei 280 nm. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten von 0-150 mM Imidazol/HCl in IMAC-Puffer über 20 Säulenvolumen eluiert. Vor der Wiederverwendung wurde die Säule mit Regenerierungspuffer und anschließend mit Wasser gespült. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und nach Sterilfiltration (0,45 µm) bei 4 °C oder -20 °C gelagert und gegebenenfalls weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

### 2.3.1.2 *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie

Die Isolierung rekombinanter Fusionsproteine mit dem *Strep*-tag II erfolgte mit Hilfe der *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie (SAC; (Schmidt & Skerra, 2007). Die gegen SA-Puffer dialysierte periplasmatische Fraktion wurde auf eine selbstgepackte Streptavidin-Sepharose-Säule (Streptavidin "Mutante 1"; (Voss & Skerra, 1997) aufgetragen und bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie (Absorption bei 280 nm) mit SA-Puffer gespült. Das gebundene Protein wurde daraufhin mit 2,5 mM Desthiobiotin in SA-Puffer eluiert. Zur Regenerierung wurde das Desthiobiotin durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer verdrängt, bis das Säulenmaterial eine intensive Orangefärbung annahm. Das gebundene HABA wurde schließlich durch Spülen mit SA-Puffer bis zur Entfärbung der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden mittels SDS-PAGE analysiert, nach Sterilfiltration (0,45 µm) bei 4 °C gelagert und gegebenenfalls weiteren Reinigungsschritten unterzogen.

Für die Reinigung cytoplasmatisch produzierter Proteine mit dem *Strep*-tag II wurde die Streptavidin-Mutante 6 verwendet, welche im Gegensatz zur Streptavidin-Mutante 1 eine geringere Affinität für Biotin bzw. das im Cytoplasma vorliegende biotinylierte Carboxylcarrier-Protein aufweist. Eluiert wurde das rekombinante Protein in diesem Fall mit 5 mM Biotin in SA-Puffer.

### 2.3.1.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe und Form. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode sowohl zur Feinreinigung, zur Isolierung von Fab-Fragmenten aus Kopplungsansätzen wie auch zur Analyse des hydrodynamischen Volumens von rekombinanten Proteinen verwendet. Für Anticaline und Fab-Fragmente wurde je nach Probenvolumen eine Superdex 75 HR 10/30 oder eine HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule mit einem Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa verwendet. PASylierte Proteine wurden mit Superdex 200 HR 10/30 oder HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade Säulen mit einem Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa an einem Äkta-HPLC-System unter Beachtung der Herstellerangaben für maximalen Säulengegendruck, Flussrate und Probenvolumen gereinigt. Als Laufpuffer wurden sterilfiltrierte und entgaste Puffer wie PBS oder HBS verwendet. Die Säulen wurden durch Spülen mit einem Säulenvolumen Wasser, 0,5 M NaOH, und wiederum Wasser, regeneriert und in 20 % (v/v) Ethanol mit 0,01 % (w/v) Natriumazid gelagert.

### 2.3.2 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie (IEX) werden Proteine entsprechend ihrer Netto-Oberflächenladung bei einem bestimmten pH-Wert unterschiedlich stark an eine Matrix mit entgegengesetzter Ladung adsorbiert und durch graduelle Erhöhung der Ionenstärke des Puffers mit hoher Auflösung voneinander separiert. In dieser Arbeit wurde eine selbstgepackte Resource Q Säule

für die Endotoxin-Abreicherung verwendet. Die Fab-Fragmente liegen in PBS pH 7,5 positiv geladen vor und passieren daher ungehindert die Säule, während das negativ geladene Endotoxin an die quartären Ammoniumgruppen bindet.

### 2.3.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse von Proteinen und Zellextrakten erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli *et al.*, 1970). Durch die Anlagerung von SDS-Molekülen wandern die dann negativ geladenen, entfalteten Proteine Richtung Anode und werden durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels (12 %) umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molmasse aufgetrennt. Für die Herstellung des Trenngels nach (Fling & Gregerson, 1986) wurden 1,25 ml 4x Lower-Tris, 2 ml Acrylamid-Stammlösung mit 5 µl TEMED und 50 µl 10 % (w/v) APS versetzt und zwischen zwei abgedichteten Glasplatten pipettiert sowie mit 1 ml 30 % (v/v) Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde die Sammelgelmischung (0,5 ml Acrylamid-Stammlösung, 0,75 ml 4x Upper-Tris, 1,75 ml Wasser, 5 µl TEMED und 50 µl APS) auf das erstarrte Trenngel gegossen und ein Taschenformer mit zehn Zähnen eingesetzt. Das vollständig auspolymerisierte SDS-Gel wurde in eine mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gespannt. Die Proteinproben wurden mit 5x Auftragspuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt, in die Probenaschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese bei 130 V betrieben. Nachdem der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht hatte, wurde die Gelelektrophorese beendet. Das Gel wurde entnommen und für 20 min in Coomassie Brilliant-Blau Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Inkubation für 10 min in Entfärbelösung I und weiteren 20 min in Entfärbelösung II sichtbar gemacht.

### 2.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationen der gereinigten Proteine wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm – unter Verwendung des entsprechenden Puffers als Referenz – mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) ermittelt. Die molaren Extinktionskoeffizienten der rekombinanten Proteine wurden gemäß der Methode von (Gill & von Hippel, 1989) mit dem Programm PEPTIDESORT des GCG-Programmpakets (Devereux *et al.*, 1984) oder mit Hilfe des ExPASy ProtParam Tools (Gasteiger *et al.*, 2005) (<http://web.expasy.org/protparam>) bestimmt (**Tabelle 3**).

Tabelle 3: Molare Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine

| Protein       | $\epsilon_{280}$ [ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ] |
|---------------|---|
| Fab 4D5.LF3.4 | 77405                                       |
| Fab 2F2       | 75915                                       |
| Anticalin N7A | 38055                                       |

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Anticalin N7A.19  | 39545 |
| Anticalin N7E.107 | 24535 |
| Anticalin Lcn2    | 31525 |
| FN-Fragment Fn7B8 | 31400 |

---

### 2.3.5 Konzentrierung von Proteinen

Zur Herstellung hochkonzentrierter Proteinlösungen, wie sie insbesondere für die chemische Kopplung von Anticalinen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Radiochelatoren benötigt werden, wurden die gereinigten Proteine mittels einer Ultrafiltrationseinheit (Amicon Ultra 15 ml und 50 ml) mit geeigneter Ausschlussgröße (10 oder 30 kDa) durch Zentrifugation (4 °C, 4.000 rpm) auf das entsprechende Volumen eingengt. Die Konzentration der Proteinlösung wurde im Anschluss durch Messung der Absorption bei 280 nm im Spektrophotometer bestimmt und die Proteine bis zur Verwendung bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

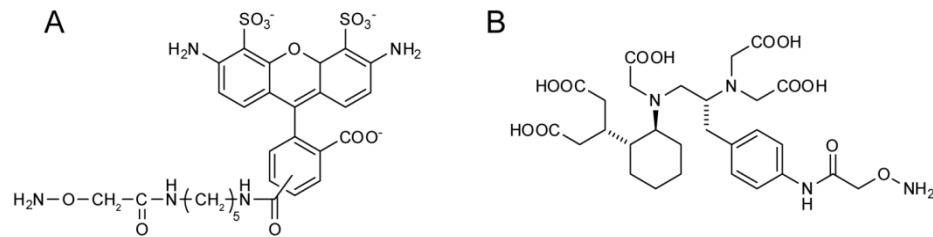
## 2.4 Modifizierung von Proteinen

### 2.4.1 Periodat-Oxidation von Proteinen

Für die Einführung einer N-terminalen Aldehydfunktion in Proteine mit N-terminalem Serin- oder Threonin-Rest mit Periodat in der Malaprade-Reaktion (Gaertner & Offord, 1996) wurden 100 µl der Proteinlösung (2 mg/ml in HBS-Puffer) mit 10 µl 50 mM Methionin und frischer Natriumperiodatlösung (0,5 mM und 5 mM Endkonzentration) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Ein 50-facher Überschuss an Methionin wurde verwendet, um weitere Reste des Proteins vor Oxidation zu schützen (Gaertner & Offord, 1996). Durch Zugabe von 10 µl 2 M Ethylenglycol wurde die Reaktion beendet und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe einer PD10-Säule wurde das Protein in 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4,5 für die nachfolgende Kopplung mit Aminoxy- oder Hydrazin-Reagenzien überführt.

### 2.4.2 Kopplung von Anticalinen mit Reportergruppen über das Aldehyd-Tag

Die gereinigten Anticaline mit Aldehyd-Funktion wurden für die Kopplung mit Aminoxy-Derivaten zunächst mit Hilfe einer PD10-Säule in 0,1 M Natriumacetat Puffer pH 4,5 überführt und eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Anschließend wurde die Proteinlösung mit der 5-fach molaren Menge an Aoa-NH-Bn-CHX-A<sup>1</sup>-DTPA (Aminoxy-acetyl-DTPA) oder Alexa Fluor488C<sub>5</sub>-Aminoxyacetamid (Aminoxy-Alexa488), jeweils aus einer 30 mM Stammlösung in DMSO, versetzt und bei 25 °C über Nacht inkubiert (**Abb. 8**).



**Abb. 8. Aminoxy-Reagenzien für die selektive Kopplung an Aldehyd-Gruppen. (A)** Alexa Fluor 488 C5-Aminoxy-acetamid (Aminoxy-Alexa488) und **(B)** Aoa-NH-Bn-CHX-A''-DTPA.

Um das Protein von überschüssigem Aminoxy-Reagenz abzutrennen, wurde erneut eine PD10-Säule verwendet oder eine SEC durchgeführt. Die Kopplungseffizienz für das Reagenz AO-Alexa488 wurde mittels Messung der Absorptionen bei 495 nm ( $\epsilon_{\text{Alexa488}} = 83000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und bei 280 nm (s. **Tabelle 3**), korrigiert um 33 % der Absorption bei 495 nm, bestimmt. Die Kopplungseffizienz ergibt sich dann aus dem Quotienten der ermittelten Konzentrationen des Fluoreszenzfarbstoffs und des Proteins.

$$c(\text{Protein}) = \frac{A_{280} - (0,33 \cdot A_{495})}{\epsilon_{280}(\text{Protein})} \quad c(\text{AlexaFluor488}) = \frac{A_{495}}{\epsilon_{495}} \quad \text{Kopplung} = \frac{c(\text{AlexaFluor488})}{c(\text{Protein})} \cdot 100\%$$

### 2.4.3 Radioaktive Markierung mit $^{177}\text{Lu}$

Die mit AO-DTPA funktionalisierten Anticaline wurden im Anschluss an die oben beschriebene Kopplung radioaktiv mit  $^{177}\text{Lu(III)}$ -chlorid mit einer spezifischen Aktivität von ca. 168,5 MBq/nmol markiert. In einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  wurden 22,2 MBq  $^{177}\text{Lu}$  in 0,1 M HCl mit 5  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat, 5  $\mu\text{l}$  1 M Gentsinsäure in 3 M Natriumacetat sowie 0,13 nmol DTPA-Anticalin in 0,1 M Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5 versetzt. Gentsinsäure wurde hier ähnlich wie sonst Ascorbinsäure zum Schutz der Proteine vor freien Radikalen, welche durch den  $\beta^-/\gamma^-$  Strahler  $^{177}\text{Lu}$  erzeugt werden, zugesetzt (Deutsch *et al.*, 1993). Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde die Menge an proteingebundenem und freiem  $^{177}\text{Lu}$  mittels Dünnschichtchromatographie (DC) unter Verwendung von Glasmicrofiber Chromatographiepapier, gesättigt mit Salizylsäure, ermittelt. Zur Detektion der in dieser Arbeit verwendeten Radionuklide, mit Ausnahme von  $^{125}\text{I}$  (hier erfolgte die Messung auf Grund der geringen Energie von 15 keV im  $\gamma$ -Counter), wurde der Mini-Scan Radioaktivitätsdetektor verwendet. Als Laufpuffer wurde 20 mM Citrat-Puffer pH 5 verwendet. Der  $R_f$ -Wert des radioaktiv markierten Anticalins betrug 0, während nicht gebundenes  $^{177}\text{Lu}$  einen  $R_f$ -Wert  $>0$  aufweist. Durch die Verwendung unterschiedlicher molarer Verhältnisse von  $^{177}\text{Lu}$  zu Protein konnte die Menge an gebundenem Chelator unter Annahme einer vollständigen Komplexierung nach 10 min berechnet werden. Typischerweise wurden die Anticaline in 2-fachem molaren Überschuss für die Markierung eingesetzt, um eine vollständige Komplexierung des Radiometalls (spezifische Aktivität 170 MBq/nmol Protein) mit einer radiochemischen Reinheit von  $>98\%$  (Detektion mittels DC) zu erreichen.

#### 2.4.4 (Radioaktive) Iodierung von Proteinen

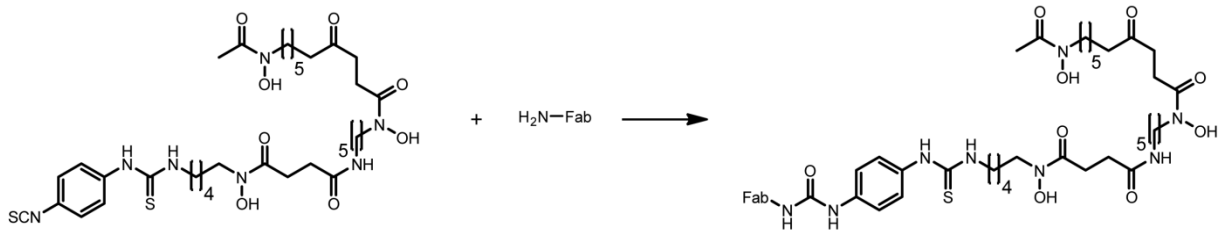
Die Radioiodierung von Fab-Fragmenten wurde nach der Iodogen-Methode durchgeführt (Fraker & Speck, 1978). Iodogen ist in der Lage,  $I^-$  zu  $I^+$  zu oxidieren, welches dann in einer elektrophilen Substitutionsreaktion mit Tyrosinresten des Proteins reagiert. Eppendorf Reaktionsgefäße wurden mit 50  $\mu$ l einer 1 mg/ml Iodogen-Lösung in Dichlormethan befüllt. Unter sanftem Argonstrom wurde das Dichlormethan verdampft und das Iodogen am Boden der Reaktionsgefäße adsorbiert. Die so vorbereiteten Iodogengefäße wurden bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Für die Markierung von Proteinen mit radioaktivem Iod wurden 0,44 nmol Fab in 200  $\mu$ l PBS und 37 MBq  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (spezifische Aktivität von 74 MBq/nmol),  $\text{Na}^{123}\text{I}$  (spezifische Aktivität von 185 MBq/nmol),  $\text{Na}^{124}\text{I}$  (spezifische Aktivität von 1.1 MBq/pmol) – oder dem Natriumsalz des stabilen Isotops  $^{127}\text{I}$  – in jeweils 100  $\mu$ l 1 mM NaOH in ein Iodogengefäß pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugaben von 10  $\mu$ l 25 mg/ml Na-Ascorbat/HCl pH 4-5 wurde die Reaktion beendet. Die Reaktionsmischung wurde im Anschluss sofort aus dem Reaktionsgefäß entnommen und vom unlöslichen Oxidationsmittel, welches an der Wand des Reaktionsgefäßes adsorbiert war, getrennt. Die mittels DC bestimmte Kopplungseffizienz betrug typischerweise 80-90 %, in Abhängigkeit des verwendeten Iodisotops. Das iodierter Fab-Fragment wurde im Anschluss über eine PD-10 Säule mit 5,2 mM Histidin/HCl pH 6, 2 % (w/v) Trehalose, 0,9 % (w/v) NaCl und 0,009 % (v/v) Tween20 als Laufmittel gereinigt (Mendler *et al.*, 2015a). Die radiochemische Reinheit wurden ebenfalls mittels DC unter Verwendung von 0,9 % (w/v) NaCl als mobile Phase analysiert. Der  $R_f$ -Wert des iodierten Fab-Fragments ist 0,0 während freies Iodid einen  $R_f$  von 1,0 aufweist. Die radiochemische Reinheit betrug  $>98\%$  und eine spezifische Aktivität von 80-100 MBq/nmol wurde aus der Reaktionsausbeute berechnet. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt.

Mit nicht-radioaktivem Iod ( $\text{Na}^{127}\text{I}$ ) markiertes Fab-Fragment wurde mittels SDS-PAGE und SEC charakterisiert und auf Antigenbindung überprüft (s. Abschnitt 2.7.1).

#### 2.4.5 Kopplung mit Deferoxamin-*p*-SCN und radioaktive Markierung mit $^{89}\text{Zr}$

Für die Funktionalisierung der Fab-Fragmente mit SCN-aktiviertem Deferoxamin (Df) wurden diese zunächst in 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  Puffer pH 8.5 überführt, auf eine Konzentration von 2 mg/ml konzentriert (s. Abschnitt 2.3.5), mit 5-fachem molarem Überschuss an Df-*p*-SCN versetzt und bei  $25\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert (**Abb. 9**). Überschüssiger Chelator wurde daraufhin mit einer PD10-Säule abgetrennt. Als Laufpuffer wurde 20 mM HEPES/NaOH pH 7,0 verwendet, welcher sich ebenfalls für die anschließende radioaktive Markierung mit  $^{89}\text{Zr}$  eignet. Stabilität und Unversehrtheit des Fab-Fragments wurde mittels SDS-PAGE und analytischer SEC überprüft.





**Abb. 9. Kopplungsreaktion mit Deferoxamin-*p*-SCN.** Isothiocyanat-Gruppen reagieren mit den freien Aminogruppen eines Fab-Fragments unter Ausbildung einer Thioharnstoff-Bindung. Df, Deferoxamin.

Die Radiomarkierung wurde nach der publizierten Methode von (Vosjan *et al.*, 2010) durchgeführt. Typischerweise wurden 3 mCi  $^{89}\text{Zr(IV)}$ -oxalat mit einer spezifischen Aktivität von ca. 150 MBq/nmol, gelöst in 1 M Oxalsäure, mit 150  $\mu\text{l}$  Wasser und 50  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  versetzt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Lösung zu neutralisieren. Nach erfolgter  $\text{CO}_2$ -Freisetzung wurden 200  $\mu\text{l}$  0,5 M HEPES/NaOH pH 7,0, 75  $\mu\text{l}$  1 M Gentisinsäure/NaOH pH 7,0 und 9 nmol Fab-Fragment in einem Volumen von  $\sim 100$   $\mu\text{l}$  zugegeben und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde das mit  $^{89}\text{Zr}$ -markierte Fab-Fragment über eine PD10-Säule von freiem  $^{89}\text{Zr}$  getrennt. Die Reaktionsausbeute nach verschiedenen Zeitpunkten sowie die finale radiochemische Reinheit wurden mittels DC bestimmt. Als Laufmittel wurde diesmal 20 mM Na-Citratpuffer pH 5 verwendet. Der  $R_f$ -Wert des radioaktiv markierten Fab-Fragments betrug 0, während nicht gebundenes  $^{89}\text{Zr}$  einen  $R_f$ -Wert  $>0$  aufweist. Eine spezifische Aktivität von 11 MBq/nmol wurde aus der bekannten Radioaktivität des Radiometalls und der Reaktionsausbeute (typischerweise  $\sim 90\%$ ) berechnet. Um die Affinität und Stabilität des Fab-Fragments nach Kopplung und Markierung mit  $^{89}\text{Zr}$  zu untersuchen, wurde eine analoge Menge an nicht-radioaktivem  $\text{Zr(IV)}$ -chlorid in 1 M Oxalsäure gelöst und das Fab-Fragment unter identischen Bedingungen markiert.

## 2.5 Immunchemische Methoden

### 2.5.1 Western-Blotting

Für den immunchemischen Nachweis eines Proteins in einem Gemisch wurde die Methode des *Western Blotting* verwendet. Das Proteingemisch wird zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.3.3) aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine hydrophobe Membran überführt und das gewünschte Protein schließlich in einem immunchemischen Verfahren selektiv angefärbt. Nach der SDS-PAGE werden das Trenngel und die Nitrocellulose-Membran dann in Transferpuffer (20 % (v/v) Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt. Für den Elektrotransfer wurden vier Blatt Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm) mit Transferpuffer getränkt und unter Vermeidung von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektroblopparatur gelegt. Darauf wurden das Trenngel, die Membran sowie weitere vier Blatt mit

Puffer getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca.  $1 \text{ mA/cm}^2$ ) betrieben.

Der immunchemische Nachweis erfolgte anhand des *Strep*-tag II. Um das *E. coli* Biotin-Carboxyl-Carrierprotein in Gesamtzellextrakten zu blockieren, wurde die Membran zunächst für 10 min in 15 ml PBS/T 0,1 mit 30  $\mu\text{g}$  Avidin (1 mg/ml) inkubiert. Danach wurde direkt das Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:1.000) zugegeben und für 1 h unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3-mal mit PBS/T und einmal mit AP-Puffer gewaschen. Durch Inkubation von 37,5  $\mu\text{g/ml}$  NBT und 150  $\mu\text{g/ml}$  BCIP in AP-Puffer wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Nachdem die gewünschte Intensität erreicht war, wurde die Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser gestoppt und die Membran getrocknet.

### 2.5.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bindungsaktivität von Anticalinen gegenüber ihrem jeweiligen Antigen wurde mit Hilfe des ELISA nachgewiesen. In eine Mikrotiterplatte wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  Antigenlösung (100  $\mu\text{g/ml}$  in HBS) pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Lösung ausgegossen und die Platte zur Entfernung von Flüssigkeitsresten ausgeklopft. Zur Absättigung verbliebener Bindungsstellen wurde jede Vertiefung für 1 h mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  3 % (w/v) BSA in HBS/T 0,5 inkubiert. Gleichzeitig wurde eine Reihe zuvor nicht belegter Vertiefungen mit der gleichen Lösung inkubiert und im weiteren Verfahren als Kontrolle verwendet. Die Vertiefungen wurden daraufhin dreimal mit HBS/T 0,1 gewaschen und ausgeklopft.

Dann wurden je 50  $\mu\text{l}$  HBS/T 0,1 in allen Wells vorgelegt. Anschließend wurde die jeweils erste Vertiefung mit 50  $\mu\text{l}$  des gereinigten Anticalins versetzt, gemischt und davon 50  $\mu\text{l}$  in die benachbarte Vertiefung pipettiert. Auf diese Weise wurde eine Verdünnungsreihe (1:1) für das jeweilige Anticalin hergestellt und nach einer Inkubationsdauer von 1 h wurde wiederum zweimal mit HBS/T 0,1 und einmal mit HBS Puffer gewaschen. Für den Nachweis des gebundenen Anticalins über das *Strep*-tag II wurde in alle Vertiefungen je 50  $\mu\text{l}$  Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat 1:1.000 in HBS/T 0,1 pipettiert. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Vertiefungen zweimal mit HBS/T 0,1 und zweimal mit HBS-Puffer gewaschen. Schließlich wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  0,5 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer zugegeben. Die Platte wurde daraufhin in das auf 37 °C temperierte SpectraMax 250 ELISA-Photometer eingesetzt. Nach 5 minütiger Äquilibrierung wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm für 30 min bei 37°C aufgezeichnet, um evtl. Temperaturschwankungen der RT, welche die Kinetik der Reaktion beeinflussen können, zu vermeiden.

Die apparente Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Anticalin/Antigen-Komplexbildung wurde durch Auftragen der Anfangsgeschwindigkeiten der gemessenen Absorptionsänderungen ( $\Delta A/\Delta t$  in

mOD/min) gegen die jeweilige Proteinkonzentration der Verdünnungsstufe bestimmt. Die Anpassung der resultierenden Sättigungskurve wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Kaleidagraph gemäß folgender Gleichung durchgeführt (Voss & Skerra, 1997):

$$[AC \cdot Ag] = \frac{[Ag]_{tot} [AC]_{tot}}{K_D + [AC]_{tot}}$$

$[AC]_{tot}$ ,  $[Ag]_{tot}$ , Gesamtkonzentration des eingesetzten Anticalins bzw. Antigens;  $[AC \cdot Ag]$ , Konzentration des Anticalin/Antigen-Komplexes.

#### Screening-ELISA für die Selektion von Aldehyd-Tag Varianten

Nach der Genexpression im 96-well Format (s. Abschnitt 2.2.7.3) wurden die Zellen mit 0,5 ml Lysepuffer (50 mM NaP<sub>i</sub> pH 8, 0,3 M NaCl, 2 mg/ml Lysozym, 14,6 U/ml Benzonase) für 30 min durch kontinuierliches Auf- und Ab-pipettieren mit Hilfe des Hamilton ML Star Roboters lysiert. Die Suspension wurde mit 50 µl 1 M Natriumacetat pH 4,5 versetzt und für 15 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5000 rpm, 20 min) wurden 270 µl des Überstands in eine neue 96-well Platte, welche bereits 3 µl 20 mM Biotin-Hydrazid in 0,1 M Natriumacetat pH 4,5 je Vertiefung enthielt, überführt.



**Abb. 10. Gelfiltrationsplatte im 96-well Format.** Eine vorgefertigte 96-well Gelfiltrationsplatte wurde mit Superdex 75 Material befüllt (Säulenvolumen ca. 1 ml) und mit Filterplättchen abgedichtet.

Für die Konjugatbildung zwischen Biotin-Hydrazid und Aldehydgruppen wurde die Platte für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde der pH-Wert durch Zugabe von 30 µl 1 M NaOH neutralisiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden je 250 µl der Kopplungsreaktion auf eine mit HBS äquilibrierte selbst hergestellte 96-well Gelfiltrationsplatte (**Abb. 10**) aufgetragen, um überschüssiges Biotin-Hydrazin abzutrennen. Die Elution erfolgte mit 400 µl HBS (Ausschlussvolumen), gefolgt von 250 µl HBS (Anticalin-Varianten). 100 µl der Anticalin-Fraktion wurde daraufhin in eine neue Mikrottestplatte zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Multi-Detektions-Reader pipettiert. Die verbleibenden 150 µl wurden mit 37,8 µl HBST 0,5 versetzt um eine Tween20 Konzentration von 0,1 % für den nachfolgenden ELISA zu erhalten. Je 100 µl dieser

Anticalinlösung wurde anschließend direkt auf die vorbereitete ELISA-Platte, welche wie oben beschrieben mit Fn7B8 beschichtet und mit BSA blockiert war, pipettiert und der ELISA nach obigen Angaben durchgeführt. Der Nachweis der biotinylierten Anticaline erfolgte hier allerdings mit dem Extravidin-AP Konjugat, welches das *Strep*-tag II nicht bindet.

## 2.6 Biophysikalische Methoden

### 2.6.1 Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Für die quantitative Analyse der kinetischen und thermodynamischen Bindungskonstanten von Anticalinen oder Fab-Fragmenten gegenüber ihrem Antigen wurde das BIAcore2000 System in Verbindung mit dem CMD-m *Sensorchip* verwendet. Über die Carboxyl-Funktion der Carboxydextran-Matrix an der Oberfläche des *Sensorchips* wurden die rekombinanten Proteine mittels Amin-Kopplung kovalent immobilisiert und ihre Interaktion mit den entsprechenden Liganden (Anticalin) in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen in Echtzeit gemessen. Über einzeln anzusteuernde Kanäle wird ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom über die *Sensorchip*-Oberfläche geleitet, so dass entweder Laufpuffer aus einem Reservoir oder die zu untersuchenden Protein-Lösungen über die Probenschleife geleitet werden kann.

Für die Immobilisierung des Antigens wurde das Protein Fn7B8 in 10 mM Natriumacetatpuffer pH 4.5 überführt, um eine effiziente elektrostatische Adsorption des positiv geladenen Proteins an die negativ geladene Carboxydextran-Oberfläche des *Sensorchips* zu fördern. Die Aktivierung der Carboxydextran-Oberfläche erfolgte durch Derivatisierung mit 35 µl einer 1:1 Mischung von 0,2 M EDC und 0,05 M NHS bei einer Flussrate von 5 µl/min, wodurch N-Hydroxysuccinimidester auf der *Sensorchip*-Oberfläche generiert werden.

Daraufhin wurden 50 µl des zu immobilisierenden Proteins appliziert, wobei die kovalente Immobilisierung des Antigens durch Ausbildung von Amidbindungen zwischen seinen freien Aminogruppen (hauptsächlich Lysin-Seitenketten) und den Carboxylgruppen der *Sensorchip*-Oberfläche erfolgte. Nach Absättigung verbliebener NHS-Estergruppen durch Injektion von 35 µl 1 M Ethanolamin war die *Chip*-Oberfläche für Bindungsanalysen bereit. Je ein zweiter Kanal diente als Referenz und wurde ohne Immobilisierung von Protein aktiviert und blockiert. Alle Messungen wurden bei 25 °C und einem kontinuierlichen Pufferfluss von 50 µl/min durchgeführt, um den Effekt des Massentransfers bei hohen Assoziationskonstanten zu reduzieren (Kortt *et al.*, 1997). Als Laufpuffer wie auch zur Lösung der verwendeten Proteine wurde sterilfiltrierter und entgaster HBS mit 0,005 % (v/v) Tween20 verwendet. Für eine Interaktionsanalyse wurden 40-80 µl des rekombinanten Proteins in verschiedenen Konzentrationen injiziert und danach durch kontinuierlichen Pufferfluss für 800 Sekunden nachgewaschen. Durch Injektion von 10 µl 10 mM

Glycin/HCl pH 2 wurde die Oberfläche des *Sensorchips* regeneriert, und es konnte eine neue Messung durchgeführt werden.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ( $k_{on}$ ) und Dissoziation ( $k_{off}$ ) durch Anpassung der Messkurven an ein 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir mit Massentransfer mit Hilfe der *BIAevaluation Software* (Version 3.0) bestimmt. Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ergibt sich aus dem Quotienten  $k_{off} / k_{on}$ . Die Komplex-Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  zwischen Anticalin und Targetmolekül wurde aus  $\ln(2)/k_{off}$  berechnet, wobei für die Bestimmung von  $k_{off}$  eine längere Dissoziationszeit von 5 h (für N7E.19) oder 12 h (N7E.107) anstatt von 800 s verwendet wurde.

### 2.6.2 CD-Spektroskopie

Cirkulardichroismus (CD) beschreibt die unterschiedliche Abschwächung von rechts- und linkshändig zirkular polarisiertem Licht beim Durchgang durch ein optisch aktives, absorbierendes Medium. Bei Proteinen unterscheidet man die Absorptionseigenschaften der Peptidbindungen im fernen UV-Bereich (180 nm bis 270 nm) von denen der aromatischen Seitenketten im nahen UV-Bereich (250 nm bis 350 nm). CD-Spektren im Absorptionsbereich der Peptidbindungen ergeben Aufschluss über den Sekundärstrukturgehalt eines Proteins und ermöglichen die Abschätzung des jeweiligen Anteils der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente (Janes, 2005). Konformationsänderungen, wie die thermische Denaturierung von Anticalinen, können daher meist bei ca. 210 nm verfolgt werden.

Zur Aufnahme der Spektren wurden die gereinigten Proteine zweimal gegen CD-Puffer dialysiert. Die Proteinlösung (8  $\mu$ M) wurde in eine Quarzglaszuvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm gefüllt, mit einem Deckel verschlossen und für 20 min bei 20 °C im Probenhalter des CD-Spektropolarimeters temperiert. CD-Spektren wurden im Bereich von 190 bis 250 nm durch Akkumulation von 16 Einzelspektren (*Response* 1 s, *Band Width* 1 nm, *Data Pitch* 0,1 nm, *Scan Speed* 100 nm/min) aufgezeichnet. Die gemessenen Werte für die Elliptizität  $\Theta$  wurden für jedes Protein auf die molare Elliptizität pro Aminosäure  $\Theta_{MWR}$  mit Hilfe der folgenden Gleichung umgerechnet:

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta \cdot M_R}{c \cdot d \cdot N_A}$$

Dabei bezeichnet  $M_R$  die Molmasse des untersuchten Proteins in g/mol,  $c$  die Konzentration in mg/ml,  $d$  die Schichtdicke in cm und  $N_A$  die Anzahl der Aminosäuren.

Zur Aufnahme von thermischen Entfaltungsübergängen wurden zunächst Spektren bei 20 °C und 95 °C aufgenommen, um mit Hilfe eines Differenzspektrums die Wellenlänge mit maximaler Signaländerung (hier: immer 210 nm) zu bestimmen. Schmelzkurven wurden unter kontrollierter Erwärmung in Temperaturschritten von 0,1 °C von 20 °C bis 95 °C bei 210 nm aufgenommen. Die

gemessenen Elliptizitäten wurden gegen die Temperatur aufgetragen. Schmelzpunkte ( $T_m$ ) und die Enthalpie der Denaturierung ( $\Delta H_m$ ) werden durch Kurvenanpassung mit folgender Gleichung ermittelt (Schlehuber & Skerra, 2002):

$$y_{obs} = \frac{(m_N T + b_N) + (m_U T + b_U) \left\{ \exp \left[ \frac{\Delta H_m}{R} \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right] \right\}}{1 + \exp \left[ \frac{\Delta H_m}{R} \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \right]}$$

Hierbei steht  $y_{obs}$  für die Elliptizität  $\Theta$  in mdeg,  $T$  für die Temperatur in K,  $R$  für die Allgemeine Gaskonstante ( $8,314 \text{ J mol}^{-1}$ ),  $T_m$  für die Schmelztemperatur des Proteins am Mittelpunkt des Übergangs und  $\Delta H_m$  für die Enthalpie des Entfaltungsübergangs bei  $T_m$  (*van't Hoff'sche* Enthalpie in  $\text{J mol}^{-1}$ ).

### 2.6.3 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Untersuchung der in *E. coli* produzierten Proteine erfolgte mit Hilfe eines maXis Massenspektrometers und wurden freundlicherweise von Andreas Reichert am Lehrstuhl für Biologische Chemie mittels *Electrospray Ionization Quadrupole-Time of Flight* (ESI-qTOF) im positive Ion-Modus durchgeführt. Für die Messungen wurden  $100 \mu\text{l}$  des Proteins in Mikrodialyseeinheiten (10 kDa MWCO) gegen  $2 \text{ l } 10 \text{ mM}$  Ammoniumacetat pH 6,6 dialysiert und direkt vor der Messung mit  $20 \%$  (v/v) Acetonitril und  $0,1 \%$  (v/v) Ameisensäure (beide LC/MS grade) versetzt. Die Spektren wurden mit Hilfe der Software Data Analysis 4.0 von Bruker analysiert.

## 2.7 Zellkultur und *in vivo* Experimente

### 2.7.1 *In vitro* Bindungsstudien mittels FACS-Titrationsanalyse

Die HER2-positive humane Brustkrebszelllinie SK-BR-3 (Holmes *et al.*, 1992) wurde in DMEM Medium mit  $10 \%$  (v/v) *Fetal Bovine Serum* (FBS),  $1 \%$  (v/v) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung bis zu einer Zelldichte von  $80\text{-}90 \%$  bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in befeuchteter Atmosphäre mit  $5 \%$   $\text{CO}_2$  in einem NUAIRE DH Autoflow  $\text{CO}_2$  Air-Jacketed Incubator kultiviert. Die Zellen wurden mit Accutase abgelöst, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit FACS-Puffer gewaschen. Das CD20-positive Mantelzelllymphom Granta-519 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Rudolph *et al.*, 2004) wurde in DMEM Medium versetzt mit  $20 \%$  (v/v) FBS kultiviert. Je  $10^5$  Zellen wurden mit Fab-Fragment ( $0.031 \text{ nM}$  bis  $512 \text{ nM}$ ) verdünnt in FACS-Puffer für  $1 \text{ h}$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  in einer 96-well Mikrotiterplatte inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit je  $50 \mu\text{l}$  des fluorescein-konjugierten  $\alpha\text{hu-kappa-light chain}$  Antikörpers,  $1:50$  verdünnt in FACS-Puffer, für  $20 \text{ min}$  bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert, in  $500 \mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert und mit  $1 \text{ mg/ml}$  Propidiumiodid im Verhältnis  $1:1000$  versetzt, um tote Zellen anzufärben. Die mit Antikörper markierten Zellen wurden mit einem FACSaria *Cell-Sorting System* analysiert. Fluorescein und

Propidiumiodid wurden bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, während für die Detektion des emittierten Lichts 530/30 nm und 585/42 nm Emissionsfilter verwendet wurden. Die Daten wurden mit Hilfe der Software FlowJo analysiert und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), korrigiert um die MFI von Zellen, welche nur mit PBS und dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, wurde gegen die Konzentration des Fab-Fragments aufgetragen. Propidiumiodid-positive tote Zellen wurden durch ein geeignet plaziertes Gate nicht in die Datenanalyse einbezogen. Der apparente  $K_D$ -Wert wurde mittels Kurvenanpassung (s. Abschnitt 2.5.2) mit Hilfe der Software Kaleidagraph ermittelt.

### 2.7.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie CaCo2 (Pujuguet *et al.*, 1996) in DMEM-Medium mit 10 % (v/v) FCS bis zu einer Zelldichte von 50-70 % bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und auf einem Nunc Lab-Tekt II chamber slideT mit acht Kammern ausgelegt. Nach 4 Tagen wurden die Zellen zuerst mit Dulbecco's PBS ohne Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> und dann mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in eiskaltem Methanol mit 500 µl DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol; 5 µg/ml) für 5 min fixiert. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit Dulbecco's PBS gewaschen und mit 150 µl der fluoreszenzmarkierten Anticaline (1 µM Proteinlösung) für 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit Dulbecco's PBS wurden die Fluoreszenzsignale mit Hilfe des Axiovert 40 CFL Mikroskops aufgenommen. Nach Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe einer Xenon Lampe wurden unter Verwendung geeigneter Bandpass-Filter, 470/40 nm für Alexa488 und 365/12 nm für DAPI, die Zellfärbungen separat aufgezeichnet, wobei identische Expositionszeiten und Blendeneinstellungen verwendet wurden. Mit Hilfe des geräteeigenen Programms AxioVision v4.8 wurden anschließend beide Bilder überlagert.

### 2.7.3 IC<sub>50</sub>-Zelltest mit radioaktiv markierten Proteinen

Für die *in vitro* Charakterisierung des radioaktiv markierten Anticalins <sup>177</sup>Lu-DTPA-N7E.107 (s. Abschnitt 2.4.3) wurde die EDB-positive Zelllinie Caco2 in DMEM Medium versetzt mit 10 % (v/v) FCS bis zu einer Zelldichte von 80-90 % in 24-well Mikrotiterplatten bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden mit 500 µl PBS gewaschen und in einem Gesamtvolumen von 250 µl mit einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem Protein-Tracer (300.000 cpm; spezifische Aktivität 170 MBq/nmol Protein) sowie mit nicht-markiertem Protein in unterschiedlichen Konzentrationen versetzt, um den Tracer kompetitiv zu verdrängen. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurde der Überstand abgenommen und die Zellen 2-mal mit 500 µl PBS gewaschen. Um die zellassoziierte Aktivität zu bestimmen, wurden die Zellen im Anschluss mit 500 µl 1 M NaOH lysiert und die Vertiefungen 2-mal mit 500 µl PBS nachgewaschen. Anschließend wurde das vereinigte Zelllysat im  $\gamma$ -Counter 1480 Wallac Wizard (Anzahl der Zerfälle pro Minute, cpm) vermessen, um die Menge an zellgebundener Aktivität/Tracer

(A) zu bestimmen. Dieser wurde dann gegen die eingesetzte Konzentration an nicht-radioaktivem Protein aufgetragen. Die Kurvenanpassung nach folgender Formel ergibt die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) des nicht-radioaktiven Proteins (Kim *et al.*, 2009). Die Steigung der Kurve  $p$  entspricht dem Hill-Koeffizienten.

$$A = \frac{A_{\max} - A_{\min}}{1 + \left(\frac{[L]_{\text{tot}}}{IC_{50}}\right)^p} + A_{\min}$$

#### 2.7.4 Biodistributionsanalyse in Mäusen

6-8 Wochen alte weibliche CD1-*Foxn1*<sup>nu</sup> Mäuse wurden mit  $5 \cdot 10^6$  SK-BR-3 Tumorzellen in 100  $\mu$ l DMEM-Medium (s. Abschnitt 2.7.1) subkutan in die rechte Schulter inokuliert. Nach 2 Wochen hatten die Xenograft-Tumore eine Größe von 300-500 mm<sup>3</sup> erreicht. Für die Injektion mit Granta-519 Tumorzellen wurden 50  $\mu$ l der Zellen mit 50  $\mu$ l BD Matrigel für die subkutane Injektion gemischt, um ein verbessertes und homogeneres Tumorstadium zu erreichen. Typischerweise hatten die Tumore in diesem Fall nach 4-5 Wochen eine Größe von 300-500 mm<sup>3</sup> erreicht.

Für die Biodistributionsexperimente wurde den Mäusen 0.37 – 0.74 MBq an <sup>123</sup>I-Fab, <sup>124</sup>I-Fab oder <sup>125</sup>I-Fab (Spezifische Aktivität 100 MBq/nmol) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Nach 6 h, 24 h oder 48 h wurden die Mäuse (n = 5-6) in einer CO<sub>2</sub> Atmosphäre geopfert. Blut und Organe wurden entnommen (der Magen wurde entleert), gewogen und im  $\gamma$ -Counter 1480 Wallac Wizard analysiert. Die injizierte Aktivität (in Becquerel) wurde durch Messung der Spritzen vor und nach Injektion (p.i.) mit einem Capintec CRC-15R Dose Calibrator bestimmt. Der Prozentsatz der injizierten Dosis (% ID), korrigiert um die verbliebene Aktivität im Schwanz der Maus, wurde durch das Feucht-Gewicht der einzelnen Organe (mittels Feinwaage bestimmt) dividiert, um den Prozentsatz an injizierter Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) zu erhalten. Für die Umrechnung der cpm in Becquerel wurde eine weitere Spritze mit vergleichbarer Aktivität in 100 ml H<sub>2</sub>O injiziert und davon fünf-mal je 1 ml (1 %) entnommen und (vor den Organen) im  $\gamma$ -Counter gemessen.

Um die Spezifität der Tracer zu überprüfen, wurden Blockadeexperimente durchgeführt. Hierfür wurden 0,56 mg Trastuzumab/Rituximab (Apotheke, Klinikum rechts der Isar) oder 0,2 mg Fab-ABD sowohl 24 h vor als auch zeitgleich mit der Tracerinjektion i.v. injiziert.

#### 2.7.5 PET-Bildgebung

Für die micro-PET-Bildgebung wurde den Mäusen wie im vorangegangenen Abschnitt mit 6-12 MBq der mit <sup>124</sup>I markierten Fab-Fragmente mit einer spezifischen Aktivität von 80 MBq/nmol (n = 2) i.v. in die Schwanzvene injiziert. 60-min statische PET-Bilder wurden 6 h, 24 h oder 120 h p.i. unter Isofluran-Narkose mit dem PET/CT Small Animal Scanner aufgenommen. Die Bilder wurden mittels



3D-OSEM (*3-Dimensional Ordered-Subsets Expectation Maximum Algorithm*) rekonstruiert und mit Hilfe der Inveon Research Workplace Software analysiert. Alle Bilder sind als MIP (*Maximum Intensity Projections*) dargestellt und wurden auf eine ähnliche Intensität des Tumors skaliert, um das Tumor-zu-Hintergrundverhältnis der einzelnen Protein-Tracern vergleichen zu können.

## 2.8 Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzen sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme MAP, MAPSORT, TRANSLATE, PEPTIDESORT sowie der Sequenzeditor SEQED aus dem Programmpaket UWGCG (Devereux *et al.*, 1984) und ApE (A Plasmid Editor v1.17, ) eingesetzt. FACS-Messungen wurden mit der Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR) analysiert. Die Ergebnisse der PET-Bildgebung wurden mit Hilfe der Inveon Research Workplace Software (Siemens Medical Solutions, Erlangen) ausgewertet. Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen erfolgte mit Hilfe des Programms PyMol (Schrödinger, 2015). Die graphische Auswertung von Messwerten und die nicht-lineare Regression erfolgte mit Hilfe des Programms Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA). Gele aus der SDS-PAGE wurden mit einem Scanner und mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems Inc.) digitalisiert und das erhaltene Bild nur hinsichtlich Helligkeit und Kontrast optimiert. Sequenzen und Strukturen von Proteinen wurden aus folgenden im *World Wide Web* zugänglichen Datenbanken bezogen: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) und ExPASy Molecular Biology Server (Gasteiger *et al.*, 2005) (<http://www.expasy.ch>).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Markierung von Anticalinen anhand einer selektiv eingeführten Aldehydfunktion

Standardmethoden zur Funktionalisierung und radioaktiven Markierung von Antikörpern und Fab-Fragmenten, wie die direkte Iodierung oder die Kopplung entsprechender Radiochelatoren an Aminogruppen, sind nicht unmittelbar auf kleinere Proteine übertragbar. Wie die Erfahrungen in der jüngeren Vergangenheit gezeigt haben, führt die übliche Modifizierung von Tyrosinresten oder Aminogruppen bei kleineren Protein-Scaffolds meist zu einem Affinitätsverlust (Sletten & Bertozzi, 2009). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Aminosäure innerhalb der Bindungstasche modifiziert wird, was die Affinität zum Target beeinträchtigt, ist bei den aus 100-200 Aminosäuren bestehenden neuartigen Bindeproteinen gegenüber den mAK deutlich größer. Um beispielsweise Anticaline in der *In-Vivo*-Bildgebung erfolgreich einsetzen zu können, ist die Möglichkeit einer ortsgerichteten Funktionalisierung und radioaktiven Markierung eine wesentliche Voraussetzung.

##### 3.1.1 Generierung einer N-terminalen Aldehydfunktion mittels Periodat-Spaltung

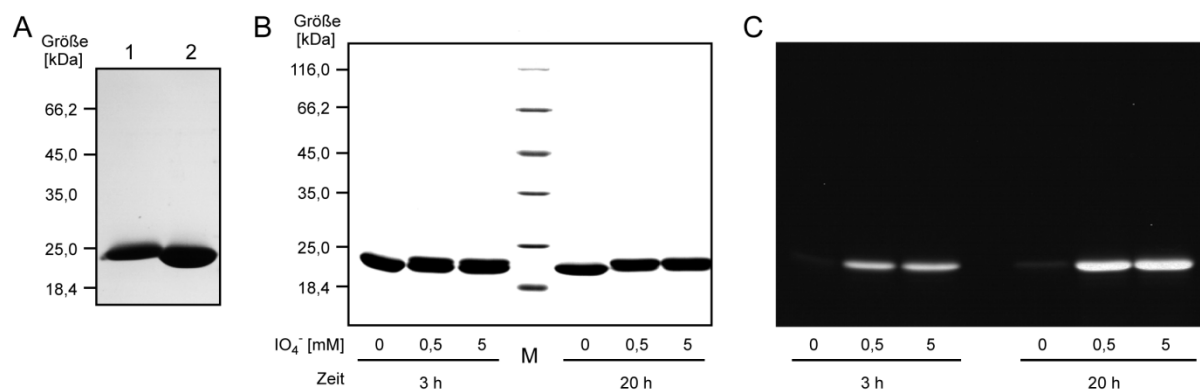
Eine Möglichkeit zur ortsspezifischen Markierung von Proteinen ist die chemische Oxidation eines N-terminalen Serin- oder Threonin-Rests mit Periodat in der Malaprade-Reaktion zu einer Aldehydgruppe (Gaertner & Offord, 1996). Diese kann unter leicht sauren Bedingungen spezifisch vor allem mit Aminooxy-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffen zu stabilen Oximen reagieren. Dieses Konzept der selektiven Reaktion der Ketogruppe von Biomolekülen mit Stickstoff-Nukleophilen, wie z.B. Hydroxylamine oder Hydrazine, wird als Bioorthogonale Chemie bezeichnet (Shieh & Bertozzi, 2014).

Im folgenden wurde das gegen ED-B gerichtete Anticalin N7A, aus unserem Labor (Gebauer *et al.*, 2013) als Modellsystem verwendet. Die Variante  $\Delta$ QDST.N7A wurde durch Deletion der ersten vier Aminosäurereste (QDST) mittels ortsgerichteter Mutagenese unter Verwendung der Primer CM15\_del64-75 und CM15as\_del64-75 hergestellt. Diese trägt einen N-terminalen Serinrest und wurde als lösliches Protein im Periplasma von *E. coli* JM83 nach Induktion bei hoher Zelldichte produziert. Die Reinigung mittels *Strep*-Tactin Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (SAC bzw. SEC) ergab eine monodisperse Proteinpräparation. Die korrekte Abspaltung der Signalsequenz und Reinheit wurde mittels SDS-PAGE (**Abb. 11A**) überprüft. Die typische Ausbeute aus einem 2 l Schüttelkolben betrug 4,8 mg.

Die Target-Affinität der verkürzten N7A Variante wurde mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) überprüft. Hierfür wurde ein SPR-Sensorchip CMD 200m, auf welchem das rekombinante FN-Fragment Fn7B8 über Aminogruppen immobilisiert war, für SPR-Messungen

mit verschiedenen Anticalin-Konzentrationen verwendet. Das FN-Fragment, welches die onkofetale Domäne B von FN zwischen den Domänen FN7 und FN8 enthält, wurde für diese Experimente rekombinant im Cytoplasma von in *E. coli* als lösliches Protein produziert und mittels IMAC und Q-Sepharose gereinigt (Gebauer *et al.*, 2013). Aus den resultierenden Kurven wurde ein  $K_D$ -Wert von 2,8 nM für  $\Delta$ QDST.N7A berechnet, der gegenüber dem unmodifizierten N7A mit einem  $K_D$  von 5,1 nM (Gebauer *et al.*, 2013) etwas günstiger ausfiel. Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation ( $k_{on}$ ) betrug  $1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und war gegenüber N7A leicht erhöht, während die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ( $k_{off}$ ) mit einem Wert von  $0,0288 \text{ s}^{-1}$  beinahe unverändert blieb.

Der N-terminale Serinrest von  $\Delta$ QDST.N7A wurde daraufhin durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Natriumperiodat ( $\text{NaIO}_4$ ) – in Gegenwart eines Überschuss an Methionin als Radikalfänger (Gaertner & Offord, 1996) – oxidiert und ohne Gelfiltration mit dem Aminoxy-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff AO-Alexa488 für 3 h oder 20 h gekoppelt. Geeignete Reaktionsbedingungen waren 0,1 M Natriumacetat pH 4,5 und eine Reaktionszeit von ca. 20 h bei 25 °C. Eine erfolgreiche Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs an das Anticalin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit konnte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 11B, C).



**Abb. 11. SDS-PAGE der Kopplung von  $\Delta$ QDST.N7A mit Aminoxy-Alexa488.** (A) Die Coomassie-Färbung von N7A (1) im Vergleich zu  $\Delta$ QDST.N7A (2) zeigt die Abspaltung der Signalsequenz und Deletion der Aminosäuren QDST. (B) Coomassie-Färbung und (C) Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht. Die Proben wurden mit steigender Natriumperiodat Konzentration oxidiert und für 3 h oder 20 h mit AO-Alexa488 inkubiert.

Das derivatisierte  $\Delta$ QDST.N7A-Konstrukt zeigte in der SDS-PAGE eine leichte Änderung des Laufverhaltens. In Abhängigkeit vom Kopplungsgrad war eine leichte Verschiebung der Banden zu einer höheren Molmasse zu beobachten. Doppelbanden waren für die partiell konjugierte  $\Delta$ QDST.N7A-Variante nach 3 h Inkubation zu beobachten, eine etwas erhöht laufende Einzelbande nach 20 h. Zur Berechnung der Kopplungseffizienz wurde die starke Absorption von Alexa488 bei 493 nm ( $\epsilon = 81.000$ ) ausgenutzt, um den Anteil an gebundenem Farbstoff je Protein (Absorption bei 280 nm) in dem mittels SEC gereinigten Reaktionsansatz zu quantifizieren (s. Abschnitt 2.4.2). Als

Kontrolle dienten Reaktionsansätze, denen kein Periodat zugesetzt war. Die Kopplungseffizienz bei 0,5 mM Periodat betrug 55,6 % (3 h) und 100 % (20 h), wohingegen durch eine Erhöhung der Periodatkonzentration auf 5 mM Kopplungseffizienzen von 73 % (3 h) und 100 % (20 h) erreicht wurden.

Nach der Kopplung mit dem Farbstoff wurde das mit 0,5 mM Periodat (20 h) erhaltene Proteinkonjugat mittels ELISA auf seine Affinität gegenüber dem rekombinanten FN-Fragment Fn7B8 überprüft. Dabei wurde ein starker Affinitätsverlust festgestellt, weshalb kein  $K_D$ -Wert aus den Datenpunkten der Verdünnungsreihe bestimmt werden konnte. Dies kann einerseits durch die chemische Modifizierung des Proteins durch Oxidation erklärt werden. Dabei ist es möglich, dass auch andere Aminosäurereste im Protein modifiziert wurden (s. Abschnitt 4.1.1). Andererseits kann es durch sterische Interferenz des konjugierten N-Terminus oder Rückfaltung des Farbstoffs in die Bindungstasche zu einer verringerten Target-Affinität kommen.

### 3.1.2 Konstruktion von Varianten des $\alpha$ ED-B Anticalins N7A mit dem Aldehyd-Tag

Um einen Affinitätsverlust nach der ortsspezifischen Markierung, wie bei der Periodat-Oxidation beobachtet, zu verhindern, wurde eine alternative Methode für die funktionelle Markierung von Anticalinen anhand einer selektiv eingeführten Aldehydfunktion etabliert. Hierfür wurden verschiedene Varianten von N7A mit dem sogenannten Aldehyd-Tag kloniert. Durch die Koexpression mit dem Formylglycin generierenden Enzym (FGE) kann ein Cysteinrest innerhalb einer Erkennungssequenz (Aldehyd-Tag) posttranslational zu Formylglycin (fGly) umgesetzt werden (Carrico *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden hierfür zwei unterschiedlich lange Sequenzen verwendet (**Abb. 12**). Der aus 14 Aminosäuren bestehende Aldehyd-Tag (APLCTPSRGSGLFTG) enthält sowohl das essentielle Kernmotiv CxPxR als auch ein Hilfsmotiv, welches die Erkennung der Sequenz durch FGE verbessert (Carlson *et al.*, 2008). Die kürzere Variante des Aldehyd-Tags mit acht Aminosäureresten (APLCTPSR) enthält hingegen nur das Kernmotiv. Die drei Aminosäuren der Erkennungssequenz, welche dem modifizierten Cysteinrest (unterstrichen) vorangehen, dienen im Falle der C-terminalen Fusion zudem als kurze Verbindungssequenz.

Die Koexpression des FGE erfolgte mit Hilfe des Vektors pASK37-FGE, welcher zuvor in unserem Labor kloniert worden war (Müller, 2008). Das in hoher Kopienzahl vorliegende Plasmid trägt das *sumf1*-Gen sowie ein Ampicillin-Resistenzgen und unterliegt der Kontrolle des durch IPTG induzierbaren *lacUV5* Promotor/Operator Systems (Skerra, 1989). Der Vektor pASK112-T7RBS2 wurde hier für die Expression der jeweiligen N7A Variante verwendet. Das Plasmid, welches ein Chloramphenicol-Resistenzgen enthält, liegt ebenfalls in hoher Kopienzahl in der Zelle vor. Die Expression der Anticaline steht dabei unter Kontrolle des *tet*-Promotors, welcher durch

Anhydrotetracyclin induziert wird, und ist daher unabhängig von der FGE-Expression. Die ribosomale Bindungsstelle des T7-Phagen begünstigt starke Translation.

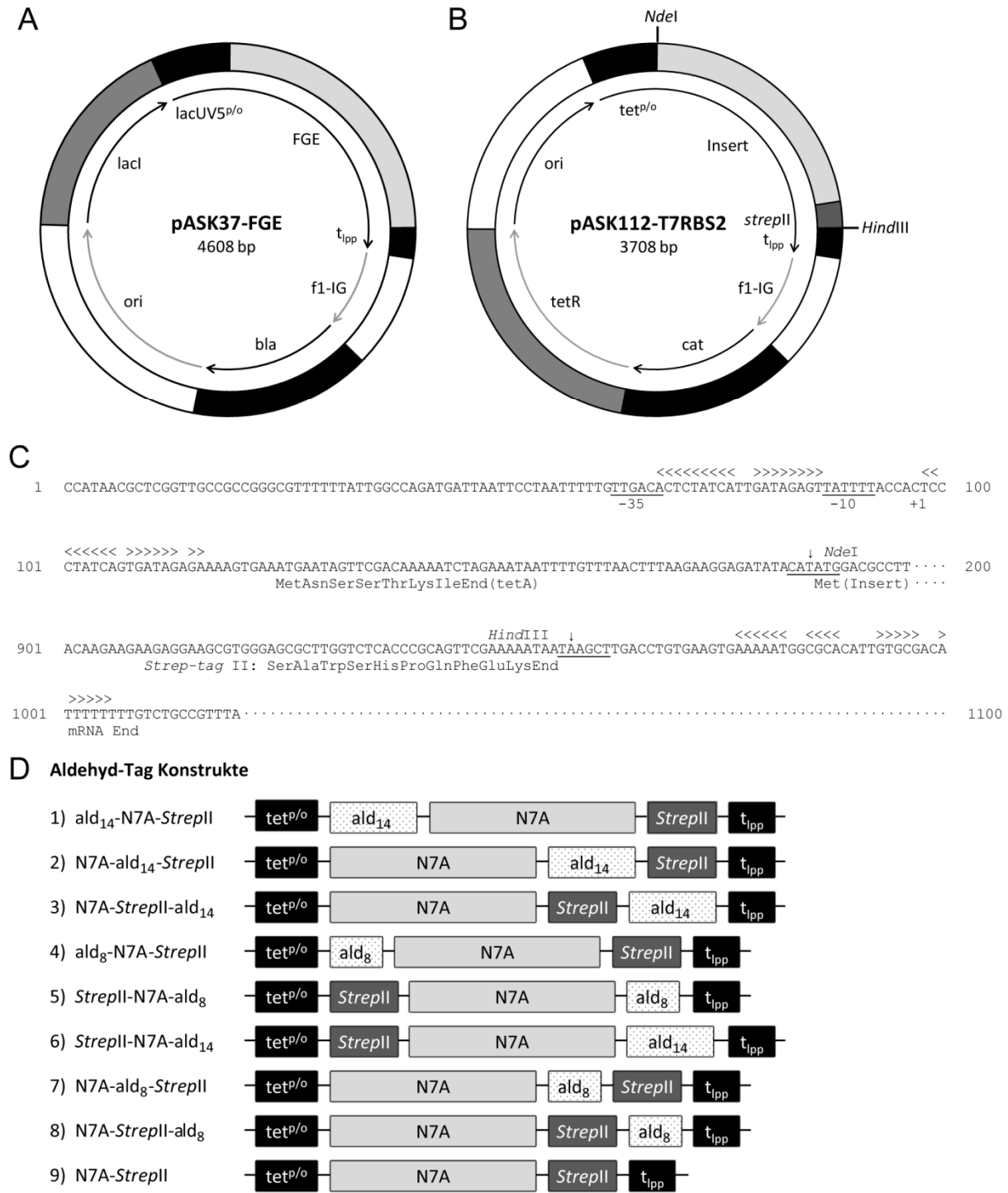
Um den Einfluss der Aldehyd-Tag Position auf Proteinausbeute, Stabilität und Bindungsaktivität zu untersuchen, wurden eine Reihe unterschiedlicher Fusionsproteine mit dem ED-B spezifischen Anticalin N7A kloniert (Gebauer *et al.*, 2013). Aldehyd-Tag und *Strep*-tag II wurden dabei sowohl N- als auch C-terminal mit dem Strukturgen N7A fusioniert. Zudem wurde die Länge der Aldehyd-Tag Sequenz wie oben beschrieben variiert. Daraus resultierten insgesamt acht Konstrukte, sowie ein Kontrollprotein (Nr. 9) ohne Aldehyd-Tag (**Abb. 12, Tabelle 4**). Zusätzlich wurde das Konstrukt N7A-ald<sub>14</sub>-*Strep*II für die periplasmatische Proteinproduktion in den Vektor pNGAL-9 subkloniert.

Tabelle 4: Übersicht der N7A-Varianten mit Aldehyd-Tag

| Nr. | Konstrukt   | Expression (Origami B) | Ausbeute aus 2 l  | ELISA K <sub>D</sub> [nM] | Affinitätsverlust | Kopplungsausbeute (üN, 25 °C)          |
|-----|---|------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|--|
| 1   | ald <sub>14</sub> -N7A- <i>Strep</i> II                   | üN, 18 °C              | 6,8 mg            | 83 ± 40                   | 3,6-fach          | 53 %                                   |
|     |   |                        |                   | 112 ± 36 (-Alexa488)      | 4,9-fach          | –                                      |
| 2   | N7A-ald <sub>14</sub> - <i>Strep</i> II                   | 3 h, 30 °C             | 4,2 mg            | –                         | –                 | 42 %                                   |
|     |   | üN, 18 °C, JM83        | 1 mg              | –                         | –                 | 30 %                                   |
|     |   | üN, 18 °C              | 1,8 mg            | 31,5 ± 8,9                | 1,4-fach          | 56 % (-Alexa488)<br>80 % (-CHXA"DTTPA) |
|     |   |                        |                   | 35,3 ± 12 (-Alexa488)     | 1,5-fach          | –                                      |
| 3   | N7A- <i>Strep</i> II-ald <sub>14</sub>                    | üN, 18 °C              | 0,2 mg            | 48 ± 13                   | 2,1-fach          | 40 %                                   |
| 4   | ald <sub>8</sub> -N7A- <i>Strep</i> II                    | üN, 18 °C              | 1 mg              | 77 ± 14                   | 3,3-fach          | 36 %                                   |
| 5   | <i>Strep</i> II-N7A-ald <sub>8</sub>                      | üN, 18 °C              | < 0,1mg           | –                         | –                 | –                                      |
| 6   | <i>Strep</i> II-N7A-ald <sub>14</sub>                     | üN, 18 °C              | –                 | –                         | –                 | –                                      |
| 7   | N7A-ald <sub>8</sub> - <i>Strep</i> II                    | 3 h, 30 °C             | 1 mg              | 17 ± 7                    | 1-fach            | 5 %                                    |
| 8   | N7A- <i>Strep</i> II-ald <sub>8</sub>                     | 3 h, 30 °C             | 0,4 mg            | 18 ± 5                    | 1-fach            | 2 %                                    |
|     |   | üN, 18 °C              | 0,4 mg            | 30 ± 13                   | 1,3-fach          | 0 %                                    |
| 9   | N7A- <i>Strep</i> II                                      | 3 h, 30 °C             | 2 mg <sub>*</sub> | 21 ± 4                    | 1-fach            | –                                      |
|     |   | 3 h, 30 °C             | 4 mg              | 23 ± 5                    | 1-fach            | –                                      |
| 10  | N7A-ald <sub>14</sub> - <i>Strep</i> II (periplasmatisch) | 5 h, 22 °C             | 0,1 mg            | –                         | –                 | –                                      |

\* ohne FGE Koexpression

Das Konstrukt ald<sub>14</sub>-N7A-*Strep*II (Nr. 1) mit N-terminalem Aldehyd-Tag wurde mit Hilfe des Vorwärtsprimers CM16\_ald14N7A*Strep*II und des Rückwärtsprimers PR1 durch PCR generiert (**Abb. 13**). Als Template diente das Plasmid pNGAL98-N7A (Gebauer *et al.*, 2013). PCR-Fragment und Vektor pASK112-T7RBS2 wurden mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Hind*III verdaut und ligiert. Das resultierende Anticalin N7A trägt anstatt der N-terminalen OmpA-Signalsequenz den 14-Aminosäuren lange Aldehyd-Tag und kann cytoplasmatisch *in E. coli* exprimiert werden.



**Abb. 12. Anticalin-Varianten mit dem Aldehyd-Tag.** **(A)** Schematische Darstellung von pASK37-FGE. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des *lacUV5*-Promotor/Operators (*lacUV5<sup>p/o</sup>*) für das Formylglycin-generierende Enzyme (FGE). Die Expressionseinheit wird durch den Lipoprotein-Transkriptionsterminator (*t<sub>ipp</sub>*) abgeschlossen. Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des *lac*-Repressor-Gens (*lacI*) gewährleistet. Ori und f1-IG bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1. Das β-Lactamasegen (*bla*) vermittelt die Ampicillin-Resistenz. **(B)** Schematische Darstellung des Vektors pASK112-T7RBS2. Der Vektor kodiert unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators (*tet<sup>p/o</sup>*) ein Fusionsprotein aus einem irrelevanten Insert und dem *Strep*-tag II. Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression *tet*-Repressor-Gens (*tetR*) gewährleistet. Die Chloramphenicolacetyltransferase (*cat*) vermittelt Chloramphenicol-Resistenz. *NdeI* und *HindIII* bezeichnen die Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen. **(C)**

Nukleotidsequenz der Regulatorischen Region von pASK112-T7RBS2, beginnend mit dem *tetA*-Promotor (-35 und -10 Konsensus Sequenzen sowie Transkriptionsstartpunkt (+1) sind eingezeichnet) und enden mit dem Transkriptions-Terminator. Die palindromischen DNA-Sequenzen der *tet*-Repressor-Bindestellen in der Promotor Region und Terminator-Struktur sind mit Größer/Kleinerzeichen markiert. (D) Konstrukte des Anticalins N7A mit unterschiedlicher Position und Länge des Aldehyd-Tags.  $ald_8$ , Aldehyd-Tag bestehend aus 8 Aminosäuren: APLCTPSR.  $ald_{14}$ , Aldehyd-Tag bestehend aus 14 Aminosäuren: APLCTPSRGSLFTG.

Der Genabschnitt für N7A- $ald_{14}$ -*StreptII* (Nr. 2) wurde unter Verwendung der Primer CM17\_N7A\_NdeI\_fw und CM18\_N7A\_ald14\_rev mittels PCR generiert und mit *NdeI* verdaut. Der Vektor pASK112-T7RBS2 wurde mit *NdeI* und *Eco47III* geschnitten und mit dem PCR-Fragment ligiert. Durch diese Klonierungsstrategie wurde der 14-Aminosäuren umfassende Aldehyd-Tag vor dem *Strep*-tag II inseriert (**Abb. 13**).

In der Anticalin-Variante N7A-*StreptII*- $ald_{14}$  (Nr. 3) wurde der Aldehyd-Tag nach dem *Strep*-tag II durch die Primer CM17\_N7A\_NdeI\_fw und CM19\_StreptII\_ald14\_rev eingeführt und über *NdeI* und *HindIII* in den entsprechend geschnittenen Vektor pASK112-T7RBS2 inseriert (**Abb. 13**).

#### $ald_{14}$ -N7A-*StreptII* (Nr. 1)

Vorwärtsprimer: CM16\_N7A\_ald14\_fw

```

      ↓ NdeI
5'-gggaattcCATATGgcaccactgtgcacaccatctcgtgggttcgctggttcaccgggcaggactccacctcagac-3'
      |||
5'...agacagctatcgcgattgcagtggtctggctggcttcgctaccgtagcgcaggcccaggactccacctcagacctgatccc...-3'
      MetAlaProLeuCysThrProSerArgGlySerLeuPheThrGlyGlnAspSerThrSerAspLeuIlePro...
  
```

Rückwärtsprimer: PR1

```

5'...aaataataagcttgacctgtgaagtgaaaaatggcgcacattgtgcgacattttttgtctgcccgtttaccgctactgct...-3'
      |||
...LysEnd
      3'-gcaaatggcgcgatgacgc-5'
  
```

#### N7A- $ald_{14}$ -*StreptII* (Nr. 2)

Vorwärtsprimer: CM17\_N7A\_NdeI\_fw

```

      ↓ NdeI
5'-gggaattcCATATGcaggactccacctcagac-3'
      |||
5'...ccgtagcgcaggcccaggactccacctcagacctgatcccagcccacctctgagcaaggtccctctgcagcagaactcca...-3'
      MetGlnAspSerThrSerAspLeuIleProAlaProProLeuSerLysValProLeuGlnGlnAsnPheGln...
  
```

Rückwärtsprimer: CM18\_N7A\_ald14\_rev

```

5'...aatcgaccagtgtatcgacggcagcgcttggtctcaccgcagttcgaaaaataataagcttgacctgtgaagtgaaaaatg...-3'
      |||
      3'-gctggtcacaatagctgccgcgctggtgacacgtgtggttagagcaccgaagcacaagtggccatcg-5'
      ...AspGlnCysIleAspGlyAlaProLeuCysThrProSerArgGlySerLeuPheThrGlySer
  
```

#### N7A-*StreptII*- $ald_{14}$ (Nr.3)

Vorwärtsprimer: CM19\_N7A\_NdeI\_fw (s. oben)

Rückwärtsprimer: StreptII\_ald14\_rev

```

5'...agcgcttggtctcaccgcagttcgaaaaataataagcttgacctgtgaagtgaaaaatggcgcacattgtgcgacatttt...-3'
      |||
      3'-gagtggcgtcaagcttttcgctggtgacacgtgtggttagagcaccgaagcacaagtggccaaATTCGAaccgac-5'
      ...HisProGlnPheGluLysAlaProLeuCysThrProSerArgGlySerLeuPheThrGlyEnd
  
```

**StreptII-N7A-ald<sub>8</sub> (Nr.5)**

Vorwärtsprimer: CM36\_N7A\_Ehel\_fw

```
5'-GCCcaggactccacctcagac-3'
      |||
5'-. . . . .caggactccacctcagacctgatcccagccccacctctgagcaaggtccctctgcagcagaacttccaggacaaccaattcc-. . .-3'
. . .AlaGlnAspSerThrSerAspLeuAlaProProLeuSerLysValProLeuGlnGlnAsnPheGlnAspAsnGlnPheHisGly. . . . .
```

Rückwärtsprimer: CM35\_N7A\_ald8\_rev

```
5'-. . . . .caatcgaccagtgtatcgacggcagcgcttggctctcaccgcagttcgaaaaataataagcttgacctgtgaagtgaaaaat-. . .-3'
      |||
      3'-gctggtcacatagctgccccgtggtgacacgtgtggtagagcaattcgaaccggac-5'
. . . . .AspGlnCysIleAspGlyAlaProLeuCysThrProSerArgEnd
```

**StreptII-N7A-ald<sub>14</sub> (Nr.6)**

Vorwärtsprimer: CM36\_N7A\_Ehel\_fw (s. oben)

Rückwärtsprimer: CM37\_N7A\_ald14\_rev

```
5'-. . . . .caatcgaccagtgtatcgacggcagcgcttggctctcaccgcagttcgaaaaataataagcttgacctgtgaagtgaaaaat-. . .-3'
      |||
      3'-gctggtcacatagctgccccgtggtgacacgtgtggtagagcaccgaagcgacaagtgccaAttcgaaccggac-5'
. . . . .AspGlnCysIleAspGlyAlaProLeuCysThrProSerArgGlySerLeuPheThrGlyEnd
```

**Abb. 13. Primer zur Herstellung der Aldehyd-Tag Konstrukte.** Mittels PCR wurde unter Verwendung der dargestellten Primer (grau unterlegt) die Sequenz (fett) für das Aldehyd-Tag N- oder C-terminal zusammen mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen (unterstrichen) für die Klonierung in pASK112-T7RBS2 eingefügt. Der modifizierte Cysteinrest ist eingerahmt, das *Strep*-tag II ist kursiv dargestellt. Als Template diente der Vektor pNGAL98-N7A.

Um die Fusionsproteine mit verkürztem Aldehyd-Tag bestehend aus nur acht Aminosäuren zu herzustellen, wurden die entsprechenden Aminosäuren mittels ortsgerichteter Mutagenese unter Verwendung der Primer CM20\_s und CD20\_as, CM27fw und CD27rev, CM28fw und CD28rev deletiert. Als Template dienten pASK112-T7RBS2-ald<sub>14</sub>-N7A-*StreptII* (Nr.1), pASK112-T7RBS2-N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* (Nr.2) und pASK112-T7RBS2-N7A-*StreptII*-ald<sub>14</sub> (Nr.3), woraus sich die Konstrukte ald<sub>8</sub>-N7A-*StreptII* (Nr.4), N7A-ald<sub>8</sub>-*StreptII* (Nr.7) und N7A-*StreptII*-ald<sub>8</sub> (Nr. 8) ergaben.

Der Genabschnitt für *StreptII*-N7A-ald<sub>8</sub> (Nr. 5) mit N-terminalem *Strep*-tag II wurde durch PCR mit dem Vorwärtsprimer CM36\_N7A\_Ehel\_fw und dem Rückwärtsprimer CM35\_ald8\_rev basierend auf pNGAL98-N7A (Gebauer *et al.*, 2013) amplifiziert und mit *HindIII* verdaut (**Abb. 13**). Der Vektor pASK-IBA5plus (IBA, Göttingen) mit N-terminalem *Strep*-tag II wurde mit den Restriktionsenzymen *Ehel* und *HindIII* geschnitten und mit dem PCR-Fragment ligiert. Anschließend wurde die DNA-Sequenz für das Fusionsprotein mit N-terminalem *Strep*-tag II und C-terminalem Aldehyd-Tag auf den Vektor pASK112-T7RBS2 über die Schnittstellen *XbaI* und *HindIII* subkloniert. Das Konstrukt *StreptII*-N7A-ald<sub>8</sub> (Nr. 6) wurde entsprechend unter Verwendung der Primer CM36\_N7A\_Ehel\_fw und CM37\_N7A\_ald14\_rev kloniert (**Abb. 13**).

Um das Kontrollprotein N7A-*StreptII* für die cytoplasmatische Produktion von N7A ohne Aldehyd-Tag zu generieren, wurden die acht Aminosäuren des Aldehyd-Tags mittels ortsgerichteter Mutagenese



unter Verwendung der Primer CM26fw und CM26rev und dem Vektor pASK112-T7RBS-ald<sub>8</sub>-N7A als Template deletiert.

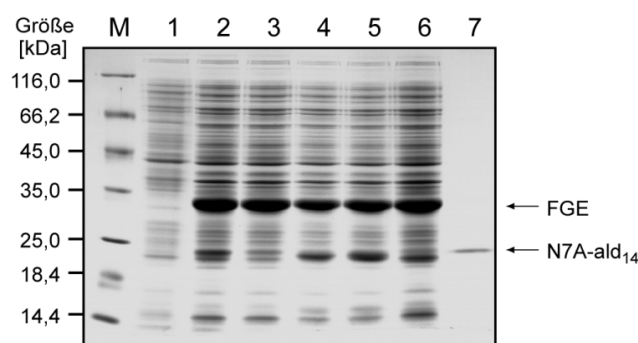
Für die periplasmatische Expression des Anticalins N7A mit C-terminalem Aldehyd-Tag wurde der Vektor pNGAL9 (Pieris AG, Freising), welcher die OmpA-Signalsequenz für die periplasmatische Expression sowie ein Chloramphenicol-Resistenzgen trägt, für die Koexpression mit pASK37-FGE verwendet. Hierfür wurde pASK112-T7RBS2-N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* mit den Restriktionsenzymen *PstI* und *HindIII* verdaut. Das resultierende Insert wurde anschließend mit dem entsprechend verdauten Vektor pNGAL9 ligiert, um den Vektor pNGAL9-N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* (Nr. 10) zu erhalten.

Die korrekte Sequenz der hergestellten Konstrukte wurde jeweils im Anschluss an die Klonierung durch einen analytischen Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung überprüft.

### 3.1.3 Bakterielle Produktion und Reinigung von Anticalinen mit dem Aldehyd-Tag

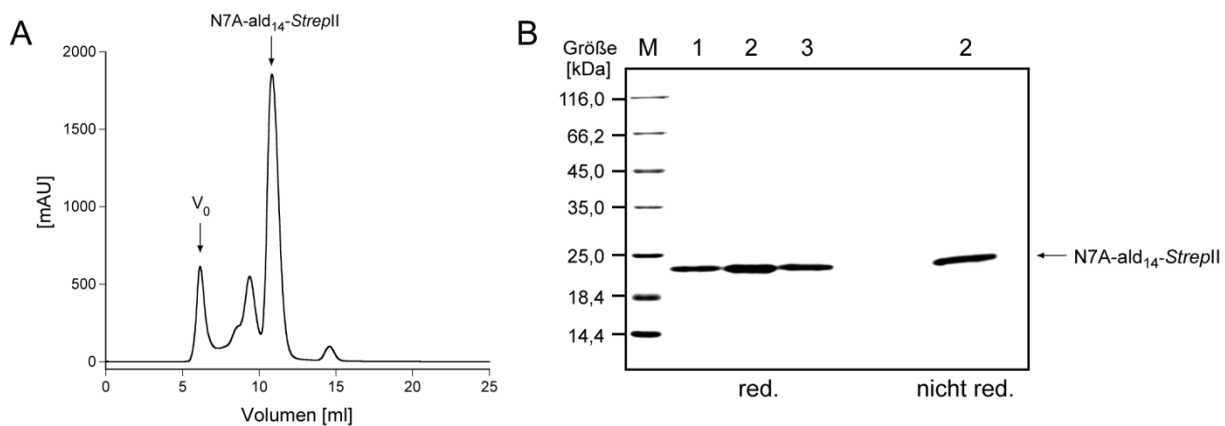
Die Koproduktion der unterschiedlichen N7A-Varianten mit Aldehyd-Tag wurde zunächst in verschiedenen *E. coli* Stämmen (BL21, Shuffle Express, JM83, Origami und Origami B) unter diversen Expressionsbedingungen untersucht. Variiert wurden Temperatur (18 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) und Expressionsdauer (entweder für 3 h oder üN). Im Anschluss daran wurden Löslichkeit und exprimierte Proteinmenge mittels SDS-PAGE und *Western-Blotting* verglichen. Die Produktion der Fusionsproteine mit dem Aldehyd-Tag in *E. coli* Origami B üN bei 18 °C stellte sich hinsichtlich Ausbeute, Löslichkeit und fGly-Generierung als optimal heraus (s. Abschnitt 2.2.7.1).

Aufgrund seines leicht oxidierenden Cytoplasmas ist der Expressionsstamm Origami B (Bessette *et al.*, 1999) für die cytoplasmatische Produktion des Anticalins N7A, welches eine Disulfidbrücke enthält, gut geeignet. Eine Analyse der Proteinexpression mittels SDS-PAGE zeigt die deutliche Überexpression von FGE bei ca. 32 kDa (**Abb. 14**).



**Abb. 14. Produktion verschiedener Fusionsproteine mit dem Aldehyd-Tag in *E. coli* Origami B.** Die Proteinexpression erfolgte im 2 l Maßstab bei 30 °C. Das SDS-Gel zeigt das Gesamtzelllysat von *E. coli* Origami B vor (1) und nach (2-6) Induktion der Proteinexpression sowie gereinigtes Protein (7: N7A-ald<sub>14</sub>). Die Banden bei 32 kDa entsprechen dem FGE, die Banden um 23 kDa den jeweiligen Aldehyd-Tag Varianten (2: *StreptII*-N7A-ald<sub>8</sub>, 3: *StreptII*-N7A-ald<sub>8</sub>, 4: N7A-ald<sub>8</sub>-*StreptII*, 5: N7A-*StreptII*-ald<sub>8</sub>, 6: N7A.C (s. Abschnitt 3.1.5)). Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Die verschiedenen Fusionsproteine mit dem Aldehyd-Tag zeigten allerdings hinsichtlich Expressionsstärke und Löslichkeit große Unterschiede (**Tabelle 4**). Die Reinigung der modifizierten Anticaline erfolgte mittels SAC und SEC, wobei Protein-Aggregate wie auch das coexprimierte FGE, welches in der SEC kurz vor dem Anticalin mit dem Aldehyd-Tag eluiert, abgetrennt wurden (**Abb. 15A**). Eine Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE zeigt die Reinheit der isolierten Proteine sowie unter nicht reduzierenden Bedingungen – die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke (**Abb. 15B**).



**Abb. 15. Reinigung von N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII.** (A) SEC als letzter Reinigungsschritt nach SAC. N7Aald<sub>14</sub>StrepII eluiert bei 12,2 ml entsprechend einer Größe von 21,0 kDa. Der Peak bei ca. 7 ml enthält höhermolekulare Verunreinigungen und aggregiertes N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII. Der Peak bei ca. 9 ml entspricht dem Komplex aus FGE und N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII. (B) SDS-PAGE. Die Spuren 1-3 zeigen das mittels SEC gereinigte Fusionsprotein N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII unter reduzierenden Bedingungen sowie eine Probe (Spur 2) zusätzlich unter nicht reduzierenden Bedingungen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

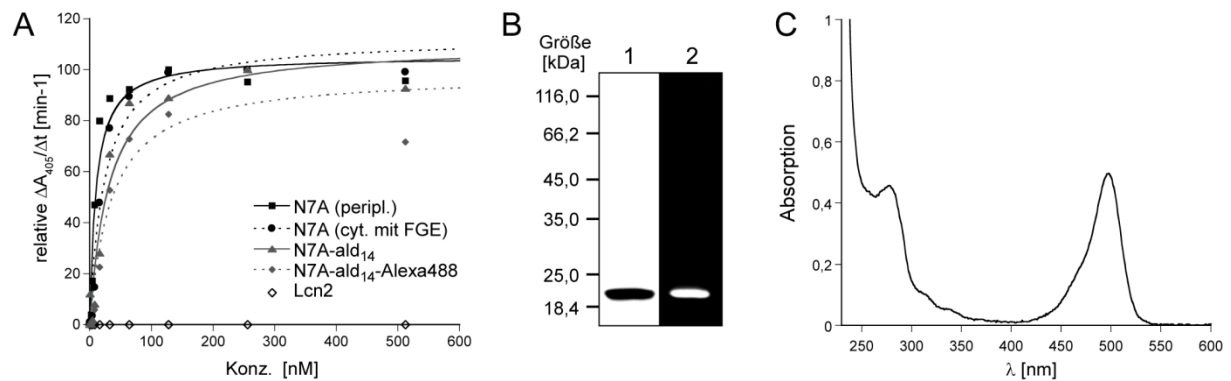
Die analytische SEC zeigte monodisperse Elution für alle gereinigten N7A-Varianten. Für N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII wurde durch SEC in PBS eine apparente Molmasse von 21 kDa bestimmt (s. oben). Die schlechteste Proteinausbeute zeigten die Fusionsproteine mit N-terminalem Strep-tag II (StrepII-N7A-ald<sub>8</sub> und StrepII-N7A-ald<sub>14</sub>) (**Tabelle 4**). Die Konstrukte N7A-ald<sub>8</sub>-StrepII, N7A-StrepII-ald<sub>8</sub> und N7A-StrepII-ald<sub>14</sub> lagen mit Proteinausbeuten von 0,2 bis 1 mg aus 2 l Schüttelkolben im Mittelfeld. Die besten Ausbeuten von 6,8 mg wurden für ald<sub>14</sub>-N7A-StrepII (üN, 18°C) und 4,2 mg für N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII (3h, 30 °C) erreicht. Geringe Proteinausbeuten gingen stets mit erhöhter Bildung von Disulfidisomeren und Proteinaggregaten nach SAC sowie einem geringen Ausmaß an fGly-Generierung einher (s. Abschnitt 3.1.4). Dies war wahrscheinlich auf den zusätzlich enthaltenen Thiolrest, welcher unphysiologische Disulfidbrücken ausbilden kann, zurückzuführen.

Die Produktion der Proteine im Periplasma von *E. coli* war angesichts der geringen Ausbeuten der Anticalin-Varianten mit dem Aldehyd-Tag nicht erfolgreich. Einerseits konnte möglicherweise die Zeit für eine effiziente fGly-Generierung vor dem Export der naszierenden Polypeptidkette in den

periplasmatischen Raum nicht ausreichen, weshalb die vermehrte Bildung an Disulfidisomeren und resultierenden Aggregate zu einer niedrigen Ausbeute an löslichem Protein führte. Andererseits konnten die Bindung von FGE an die Erkennungssequenz sowie die Aldehydfunktion selbst die Sekretion der Proteine in das Periplasma behindern.

### 3.1.4 Verwendung der Aldehydfunktion zur Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff und funktionelle Analyse

Die gereinigten Anticalin-Fusionsproteine mit dem Aldehyd-Tag wurden sowohl auf ihre Affinität gegenüber ED-B als Fn7B8 mittels ELISA als auch hinsichtlich fGly-Generierung durch Aufnahme von Absorptionsspektren nach der Kopplung mit Aminooxy-Alexa488 untersucht (s. Abschnitt 2.4.2). Für das cytoplasmatisch produzierte unmodifizierte Anticalin N7A wurde ein  $K_D$  Wert von 21 nM ermittelt (**Abb. 16**).



**Abb. 16. Kopplung der Aldehydfunktion mit Aminooxy-Alexa488.** (A) ELISA zur Untersuchung der Bindungsaktivität von Anticalin-Fusionsproteinen mit dem Aldehyd-Tag. Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit Fn7B8 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) beladen und die Oberfläche mit BSA abgesättigt. Im Anschluss wurde eine Verdünnungsreihe der N7A-Varianten mit und ohne Aldehyd-Tag appliziert. Gebundenes Anticalin wurde mit Hilfe eines Streptavidin-AP-Konjugates anhand des *Strep*-tag II nachgewiesen. Durch nicht-lineare Kurvenanpassung nach dem Massenwirkungsgesetz (s. Abschnitt 2.5.2) wurden die apparenten  $K_D$ -Werte (Tabelle 4) bestimmt. (B) SDS-PAGE von N7A-ald<sub>14</sub> nach Kopplung mit Aminooxy-Alexa488 (s. Abschnitt 2.4.2). Die Proteinbande (1) wurde mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt und die Fluoreszenz des gekoppelten Farbstoffs (2) wurde separat unter UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. (C) Absorptionsspektrum von N7A-ald<sub>14</sub>-Alexa488.

Die ELISA Daten zeigten, dass die N-terminale Fusion von N7A mit dem Aldehyd-Tag am schlechtesten toleriert wurde. Für ald<sub>14</sub>-N7A-*StrepII* und ald<sub>8</sub>-N7A-*StrepII* wurde eine 3-fache Verschlechterung der Affinität im Vergleich zu N7A-*StrepII* beobachtet (**Tabelle 4**). Durch die Kopplung mit Aminooxy-Alexa488 wurde der Affinitätsverlust wie für N7A-ald<sub>14</sub>-*StrepII* gezeigt noch verstärkt ( $K_D = 112$  nM). Die Verkürzung des N-terminalen Aldehyd-Tags führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Affinität ( $K_D = 77$  nM für ald<sub>8</sub>-N7A-*StrepII* und  $K_D = 83$  nM für ald<sub>14</sub>-N7A-*StrepII*). Der Affinitätsverlust kann, wie bereits bei der Periodatoxidation diskutiert (s. Abschnitt 3.1.1), durch sterische Interferenz des konjugierten N-Terminus mit der Bindungstasche erklärt werden. Fusionsproteine mit modifiziertem C-Terminus wie N7A-ald<sub>14</sub>-*StrepII*, N7A-ald<sub>8</sub>-*StrepII* und

N7A-*StreptII*-ald<sub>8</sub> zeigten hingegen keine signifikante Änderung des  $K_D$ -Werts gegenüber dem nicht-modifizierten Protein, sowohl vor als auch nach der Kopplung mit Aminooxy-Alexa488 (Faktor zwischen 1 und 1,5) (**Tabelle 4**).

Um die erfolgreiche Generierung von fGly während der Proteinexpression zu quantifizieren, wurden die N7A-Varianten mit dem Fluoreszenzfarbstoff AO-Alexa488 in 5-fachem molarem Verhältnis umgesetzt. Die gekoppelten Proteine wurden anschließend mittels SDS-PAGE und analytischer SEC untersucht. Für die Bestimmung der Kopplungseffizienz wurden Absorptionsspektren der gekoppelten N7A-Varianten aufgenommen (**Abb. 16**). Die schlechtesten Kopplungseffizienzen mit lediglich 2-5 % wurden für die Varianten N7A-ald<sub>8</sub>-*StreptII* und N7A-*StreptII*-ald<sub>8</sub> beobachtet. Das Fusionsprotein mit N-terminalem Aldehyd-Tag ald<sub>8</sub>-N7A-*StreptII* lag mit einer Kopplungseffizienz von 36 % im Mittelfeld. Die effizienteste Generierung von fGly wurde hingegen für ald<sub>14</sub>-N7A-*StreptII*, N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* und N7A-*StreptII*-ald<sub>14</sub> mit Kopplungsausbeuten zwischen 40 und 50 % für die Kopplung mit Aminooxy-Alexa488 erreicht. Allgemein zeigten Aldehyd-Tag-Varianten mit langer Aldehyd-Tag-Sequenz höhere Kopplungsausbeuten verglichen mit den entsprechenden Fusionsproteinen mit verkürztem Aldehyd-Tag. Das zusätzliche Hilfsmotiv in den aus 14 Aminosäuren bestehenden Aldehyd-Tag-Varianten ermöglichte vermutlich die affinere Bindung von FGE und folglich effizientere Generierung von Cystein zu fGly.

Abschließend ließ sich feststellen, dass sich N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* aufgrund der guten Expressionsausbeute von 4,2 mg aus 2 l Bakterienkultur, der hohen Kopplungseffizienz von bis zu 80 % (Kopplung mit Aminooxy-CHXA"DTTPA) sowie des geringen Affinitätsverlusts (Faktor 1,5 nach Kopplung mit Aminooxy-Alexa488) am besten für die funktionelle Markierung dieses Anticalins eignet.

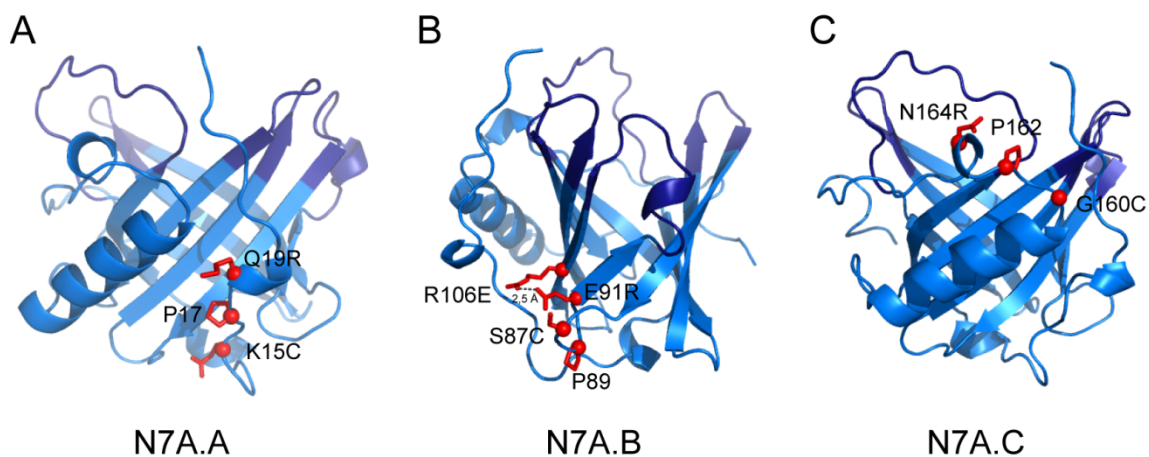
### 3.1.5 Versuch zur Integration des Aldehyd-Tags in die Sekundärstruktur des Anticalins

#### N7A

Durch das N- oder C-terminal angeordnete flexible Aldehyd-Tag kann es zu einer sterischen Interferenz mit der Bindungstasche kommen. Insbesondere nach der Funktionalisierung mit kleinen Fluoreszenzmolekülen oder Chelatoren für die Radiomarkierung kann die Bindung des Anticalins an sein Target daher beeinträchtigt sein (s. Abschnitt 3.1.1 und 3.1.4). Deshalb sollte in einem weiteren Versuch die Aldehydfunktion direkt in das Proteinstrukturgerüst von N7A eingeführt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass zur enzymatischen Generierung von fGly das minimale Sequenzmotiv CxPxR ausreichend ist (Carrico *et al.*, 2007). Zunächst sollte dieses Motiv an sterisch günstigen Positionen in die Sekundärstruktur von N7A eingeführt werden, um im zweiten Schritt biokatalytisch die Generierung von fGly mittels Sättigungsmutagenese zu optimieren (s. Abschnitt

2.2.5.1). Mit Hilfe der Kristallstruktur von N7A (Gebauer *et al.*, 2013) wurden drei verschiedene Positionen für die Konstruktion der N7A-Varianten mit dem integrierten Aldehyd-Tag ausgewählt. Um die Faltung des Anticalins nicht zu beeinträchtigen, wurde das Aldehyd-Tag-Motiv bevorzugt in solche Schleifenregionen von N7A abseits der Bindungstasche eingebaut, welche bereits einen Prolinrest enthielten. Ausgehend von der Prolin-Position wurden dann die flankierenden Aminosäuren Cystein und Arginin entsprechend platziert (**Abb. 17**). Zudem war zu beachten, dass der essentielle Cysteinrest nach außen gerichtet und somit Lösungsmittel exponiert ist, damit dieser von FGE effizient zu fGly umgesetzt werden kann.

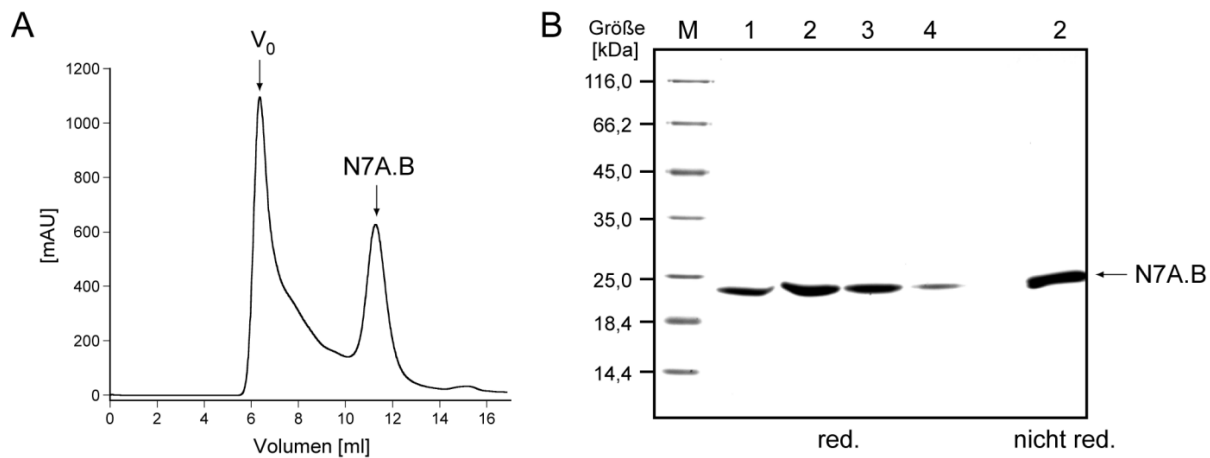


**Abb. 17. N7A-Varianten mit dem Aldehyd-Tag als Teil der Sekundärstruktur.** Das Anticalin N7A ist blau, die Schleifenregionen der Bindungstasche dunkelblau und die Reste, welche für die Einführung des Aldehyd-Kernmotivs CXPXR ausgewählt wurden, rot dargestellt. Durch die zusätzliche Mutation R106E in N7E.B bleibt die zwischen den Aminosäureresten R106 und E91 ausgebildete Salzbrücke in inverser Anordnung (jetzt zwischen R91 und E106) erhalten. Die Koordinaten wurden von der RCSB Protein Data Bank (PDB Eintrag 4GH7) entnommen und mit der Software PyMOL (Schrödinger, 2015) bearbeitet.

Die Herstellung der Proteinvarianten N7A.A, N7A.B und N7A.C erfolgte mittels ortsgerechter Mutagenese. Als Template wurde pASK112-T7RBS2-N7A (**Tabelle 4**) verwendet. Zur Konstruktion von N7A.A wurden die Aminosäuren K15C und Q19R unter Verwendung der Primer CM22fw und CDM22rev mutiert. Im Fall von N7A.B wurden die Mutationen S87C und E91R mit CM23fw und CM23rev sowie zusätzlich R109E mit CM24fw und CM24rev eingeführt. N7A.C trägt die Mutationen G160C und N164R und wurde unter Verwendung der Primer CM25fw und CM25rev hergestellt (**Abb. 17**).

Die Proteinexpression der Anticalin-Varianten N7A.A, N7A.B und N7A.C erfolgte im Cytoplasma von *E. coli* unter Koexpression von FGE (s. Abschnitt 3.1.3). Die Reinigung wurde wie weiter oben für das N7A-Fusionsprotein mit dem Aldehyd-Tag beschrieben durchgeführt und ist beispielhaft für N7A.B dargestellt (**Abb. 18**). Die im Anschluss an die SAC durchgeführte SEC zeigte prominente Elution des

monomeren Proteins N7A.B sowie einen erheblichen Anteil an Proteinaggregat, welches beim Ausschlussvolumen ( $V_0$ ) der Säule eluierte.



**Abb. 18. Reinigung von N7A.B.** (A) SEC als letzter Reinigungsschritt nach SAC. N7A.B eluiert bei 11,3 ml entsprechend einer Molekülgröße von 29 kDa, der Peak bei ca. 6 ml enthält höhermolekulare Verunreinigungen und aggregiertes N7A.B. (B) SDS-PAGE. Die Spuren 1-4 zeigen das mittels SEC gereinigte Anticalin N7A.B unter reduzierenden Bedingungen sowie eine Probe (Spur 2) zusätzlich unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Die Analyse der entsprechenden Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und zeigte die Reinheit der isolierten Anticalinvarianten sowie – unter nicht reduzierenden Bedingungen – die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke. Vermutlich aufgrund der hohen Verluste durch Aggregation wurden für die Anticalin-Varianten N7A.A, N7A.B und N7A.C geringere Protein-Ausbeuten als für die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Fusionsproteine mit N- oder C-terminalem Aldehyd-Tag erreicht. Das Konstrukt N7A.A lag am Ende der Reinigung unter nicht-reduzierenden Bedingungen noch zu 15 % als Dimer vor. Dies kann durch den zusätzlich eingeführte Cysteinrest im Aldehyd-Tag Motiv erklärt werden. Bei unvollständiger Biokatalyse von Cys zu fGly durch das koexprimierte FGE kann es zur Ausbildung von intermolekulare Disulfidbrücke mit weiteren Anticalin-Molekülen kommen. Die beste Ausbeute wurde für N7A.B mit 0,4 mg gereinigtem Protein aus 2 l Schüttelkolbenkultur erhalten (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Übersicht der N7A-Varianten mit Aldehyd-Tag-Motiv in der Sekundärstruktur*

| Konstrukt | Expression (Origami B) | Ausbeute aus 2 l Kultur | ELISA $K_D$ [nM] | Kopplungsausbeute (üN 25 °C) |
|-----------|------------------------|-------------------------|------------------|------------------------------|
| N7A.A     | 3 h, 30 °C             | 0,2 mg (15 % Dimer)     | 138 ± 30         | –                            |
| N7A.B     | üN, 18 °C              | 0,4 mg                  | 22 ± 7           | 5 %                          |
| N7A.C     | 3 h, 30 °C             | 0,16 mg                 | 48 ± 10          | 2 %                          |

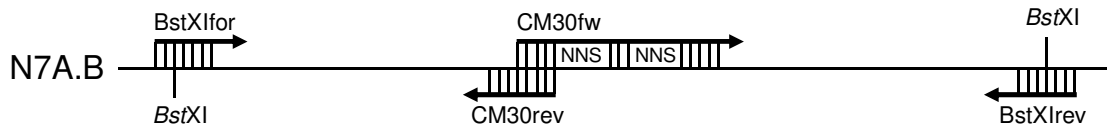
Im Anschluss wurden die Proteine mittels ELISA auf ihre Affinität zu Fn7B8 untersucht. Für N7A.A wurde ein 6-fach schlechterer  $K_D$ -Wert von 138 nM im Vergleich zum unmodifizierten Protein N7A-

*StreptII* ( $K_D = 23$  nM) beobachtet (**Tabelle 5**). Die Mutationen in N7A.C führten hingegen lediglich zu einer um den Faktor zwei verringerten Target-Affinität ( $K_D = 48$  nM). Am besten wurde das Aldehyd-Tag-Motiv in N7A.B toleriert. Hier war die Bindungsaktivität ( $K_D = 22$  nM) vergleichbar mit N7A-*StreptII*.

Kopplungsexperimente mit Aminooxy-Alexa488 zeigten jedoch nur eine schlechte Reaktion des Proteins mit dem Fluoreszenzfarbstoff ( $\leq 5\%$ ), was vermutlich auf eine ungenügende Generierung von fGly während der Proteinexpression zurückzuführen war (**Tabelle 5**). Dies legte nahe, dass das minimale Sequenzmotiv CxPxR für eine effiziente Generierung von fGly in diesem Kontext nicht ausreichend war. In weiteren Experimenten sollte daher die durch FGE katalysierte Umsetzung von Cystein zu fGly durch die Einführung zusätzlicher Aminosäuremutationen verbessert werden. Da N7A.B hinsichtlich Ausbeute (0,4 mg aus 2l Schüttelkultur) und Affinität ( $K_D = 22$  nM) im Vergleich zu N7A.A und N7A.C die besten Eigenschaften zeigte, wurde dieses Anticalin als Ausgangspunkt verwendet.

Die Optimierung der Erkennungssequenz für FGE erfolgte mittels Sättigungsmutagenese. Hierfür wurden die beiden zu Cystein 87 benachbarten Aminosäurepositionen aufgrund ihrer räumlichen Nähe zum eigentlichen "Enzymsubstrat" (Cys87) ausgewählt, und unter Verwendung der Primer CM30fw und CM30rev mit Hilfe einer *Assembly*-PCR randomisiert (**Abb. 19**).

A



B

```

CM30fw 5'-accgtatTTggacctTTgtgcccNNStgcNNSccgggcccgtTTTactTTtag-3'
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
...aaatgcaattaccgtatTTggacctTTgtgcccgggtgcagccgggcccgtTTTactTTtaggcaatattaaaagttg...
...TTTactgTTaatggcataaacctggaacacggccccacgtcggcccgcaaaatgaaatccgTTataatTTTcaac...
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
CM30rev 3'-tggcataaacctggaacac-5'

...LysCysAsnTyrArgIleTrpThrPheValProGlyCysGlnProGlyArgPheThrLeuGlyAsnIleLys...

```

**Abb. 19. Sättigungsmutagene für die Einführung zweier randomisierter Positionen benachbart zu Cystein 87 als Bestandteil des Sequenzmotivs CxPxR. (A)** Schematische Darstellung der *Assembly*-PCR. Zunächst werden die einzelnen Fragmente mit den Primerpaaren BstXIfor und CM30rev bzw. CM30fw und BstXIrev hergestellt. Das Plasmid pASK112-T7RBS2-N7A.B diene als Template. Im Anschluss wurden beide Fragmente unter Zugabe der flankierenden Primer BstXIfor und BstXIrev zu einem PCR-Produkt assembliert. **(B)** Primerdesign für die Sättigungsmutagenese. Die angrenzenden Codons zu Cystein 87 (fett) wurden randomisiert (NNS).

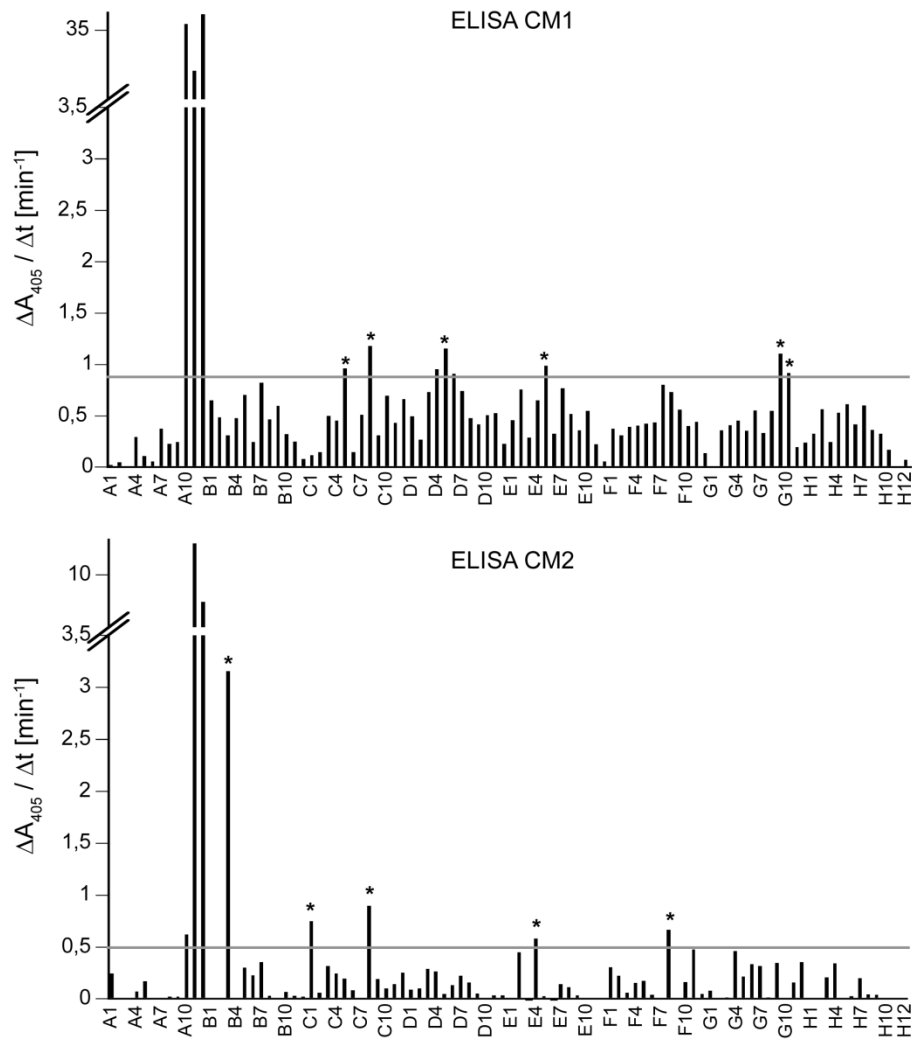
Hierfür wurden in zwei separaten PCR-Reaktionsansätzen zunächst zwei überlappende PCR-Fragmente generiert, die die *Bst*XI-Kassette des Anticalins N7A.B abdecken. Fragment 1 wurde mit den Primern *Bst*XIfor und CM30rev und Fragment 2 mit den randomisierten Primer CM30fw sowie dem Primer *Bst*XIrev hergestellt. Als Template diente das Plasmid pASK112-T7RBS2-N7A.B. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die beiden überlappenden Fragmente mit den Primern *Bst*XIfor und *Bst*XIrev vereinigt, das resultierende assemblierte PCR-Fragment mit *Bst*XI verdaut und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pASK112-T7RBS2 ligiert. Bei einer Transformationseffizienz von  $7,9 \cdot 10^5/\mu\text{g}$  lag die Anzahl der unabhängigen Kolonien mit  $3,4 \cdot 10^5$  deutlich über der theoretischen Komplexität einer Bibliothek mit zwei randomisierten Aminosäurepositionen von  $32 \times 32 = 1024$  Varianten.

Um die N7A.B-Varianten auf verbesserte Generierung von fGly im 96-well Maßstab mit Hilfe eines Hamilton Roboters durchzumustern wurde die Bibliothek zunächst mit pASK37-FGE zur Transformation von *E. coli* Origami B verwendet. Die Produktion der Anticalin-Varianten erfolgte anschließend in je 1 ml TB-Medium in einer 96-well Platte über Nacht bei 18 °C (s. Abschnitt 2.2.7.3). Um die Aldehydfunktion nachzuweisen, wurden die Proteine nach dem Zellaufschluss im Sauren (pH 4,5) mit 200  $\mu\text{M}$  Biotin-Hydrazin für 2 h bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen reagiert das Hydrazin spezifisch mit Aldehyden zu Hydrazonen. Überschüssiges Biotin-Hydrazin Reagenz wurde mittels einer selbstgepackten 96-well Gelfiltrationsplatte (s. Abschnitt 2.5.2) abgetrennt, wodurch unspezifische Wechselwirkungen von Biotin-Hydrazin mit dem Target Fn7B8 verhindert werden sollten. Zum Nachweis der biotinylierten N7A.B-Varianten wurde ein Screening-ELISA durchgeführt. Das Target Fn7B8 (s. Abschnitt 3.1.1) wurde auf der ELISA Platte adsorbiert und mit den gelfiltrierten biotinylierten N7A.B-Varianten inkubiert. Durch die Verwendung von Extravidin-AP Konjugat, welches Biotin – jedoch nicht das *Strep*-tag II – bindet, konnten schließlich die biotinylierten Anticalin-Varianten nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden mit diesem Versuchsaufbau nur N7A.B-Varianten mit Affinität zu Fn7B8 detektiert (**Abb. 20**).

Die Vertiefungen B1-H12 enthielten verschiedene Klone der Bibliothek. Beide analysierten 96-well Platten (ELISA CM1 und ELISA CM2) zeigten ein starkes Signal der Positivkontrolle N7A-ald<sub>14</sub>-*Strep*II und keine Signale für die Negativkontrollen.

N7A.B-Varianten mit einem stärkeren Signal gegenüber der Ausgangsvariante N7A.B (in der **Abb. 20** mit einem Stern gekennzeichnet) wurden anschließend unter Verwendung des Primers D20 sequenziert und analysiert.





**Abb. 20. Screening-ELISA auf verbesserte Generierung von fGly (s. Abschnitt 2.5.2).** Die Anticlinvarianten wurden im 96-well Maßstab exprimiert, nach dem Zellaufschluss mit Biotin-Hydrazin konjugiert und von überschüssigem Kopplungsreagenz mittels SEC befreit. Zum Nachweis der biotinylierten N7A.B Varianten wurden diese auf eine mit Fn7B8 immobilisierten ELISA Platte pipettiert und die Kinetik der Phosphataseaktivität mittels Extravidin-AP Konjugat bei 405 nm für 30 min bei 37 °C verfolgt und um die OD<sub>550</sub> bei der Zell-Ernte korrigiert. Die Vertiefungen A1-A3 enthielten lediglich Medium, wohingegen A4-A6 das Plasmid pASK112-T7RBS2-B1 mit dem BAX-Inhibitorprotein 1 aus Gerste ohne Formylglycin-Erkennungssequenz – als Negativkontrolle – enthielten. In den Vertiefungen A7-A9 wurde das Ausgangskonstrukt N7A.B als Referenz und in A10-A12 N7A-ald<sub>14</sub>-StrepII als Positivkontrolle verwendet. B1-H12 enthielten die Klone der Bibliothek.

Ein Alignment der Aminosäuresequenz der ausgewählten Klone zeigt, dass Leucin an Position 88 bevorzugt auftritt (**Abb. 21**). Generell sind für beide Positionen hydrophobe Aminosäuren favorisiert, wobei die Präferenz für hydrophobe Reste an Position 86 weniger ausgeprägt ist. Interessanterweise zeigte die Variante N7A.2B3 mit dem stärksten Signal im ELISA an Position 86 Serin und an Position 88 Leucin, wohingegen die natürliche Sequenz des Aldehyd-Tags hier entsprechend Leucin und Threonin enthält. Die Klone ohne Signal im Assay hingegen tragen (bis auf 1E12) bevorzugt geladene Aminosäuren, was auf ein erfolgreich durchgeführtes funktionelles ELISA-Screening schließen lässt.

```

      80          90          100
N7A.B      ···YRIWTFVPG·C·Q·P·GRFTLGNIKS·W·P·GLTS···
N7A.1C5    .....Y.L.....
N7A.1C8    .....V.P.....
N7A.1D5    .....S.V.....
N7A.1G9    .....A.L.....
N7A.1G10   .....L.P.....
N7A.2B3   .....S.L.....
N7A.2C1    .....F.P.....
N7A.2C8    .....V.L.....
N7A.2E4    .....V.S.....
N7A.2F8    .....L.L.....
N7A.2B9(-) .....Q.L.....
N7A.2F7(-) .....G.R.....
N7A.1B12(-).....D.P.....
N7A.1E12(-).....V.L.....
ald8      A.L.T.S.
          ==D==          =E==-----#3-----

```

**Abb. 21.** Ausschnitt aus den Aminosäuresequenzen der N7A.B-Varianten des Screening-ELISA im Vergleich zu N7A.B. Die konservierten  $\beta$ -Faltblätterstränge des Anticalins (D und E) und der strukturell variable Loop #3 sind markiert. Die Positionen 86 und 88 wurden randomisiert. Punkte repräsentieren Aminosäuren, die mit N7A.B identisch sind. Die natürliche FGE-Erkennungssequenz des aus acht Aminosäuren bestehenden Aldehyd-Tags sind unten dargestellt.

## 3.2 Funktionalisierung von $\alpha$ ED-B Anticalinen für die *In-Vivo*-Bildgebung

Die Anticaline N7A und N7E wurden von Gebauer *et al.* (2013) ausgehend von einer verbesserten Zufallsbibliothek des humanen Lipocalin 2 (Lcn2) durch Phage-Display und Screening-ELISA gegen die Extradomäne B von FN im Kontext ihrer Nachbardomänen selektiert. Beide Anticaline zeichnen sich durch eine gute Target-Affinität im niederen nanomolaren Bereich aus. Allerdings zeigten SPR-Messungen beider Anticaline eine relativ schnelle Dissoziation des Anticalin•Fibronektin Komplexes mit Halbwertszeiten von 31 s für N7A und 24 s für N7E. Um die biomedizinischen Anwendungsmöglichkeiten dieser ED-B spezifischen Proteine hinsichtlich Tumor-Bildgebung und Therapie zu erweitern, sollten Affinität und kinetische Komplex-Stabilität beider Anticaline optimiert werden.

### 3.2.1 Affinitätsmaturierung des Anticalins N7A mittels rationaler Mutagenese

Die Affinitätsmaturierung des Anticalins N7A wurde mittels rationaler Mutagenese basierend auf der Kristallstruktur von N7A in Komplex mit dem FN-Fragment Fn7B8 (Gebauer *et al.*, 2013) durchgeführt. Insgesamt wurden 13 Aminosäurepositionen für die ortsgerichtete Mutagenese ausgewählt und sowohl individuell als auch in geeigneten Kombination in das Anticalin N7A eingeführt. Die entsprechenden Primerpaare sind in Abschnitt 2.1.2 angegeben. Ziel war es, zusätzliche hydrophobe, elektrostatische und polare intermolekulare Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken zwischen Fn7B8 und N7A einzuführen. Der jeweils vorhergesagte Mechanismus für die einzelnen Mutationen ist in Tabelle 6 aufgeführt.

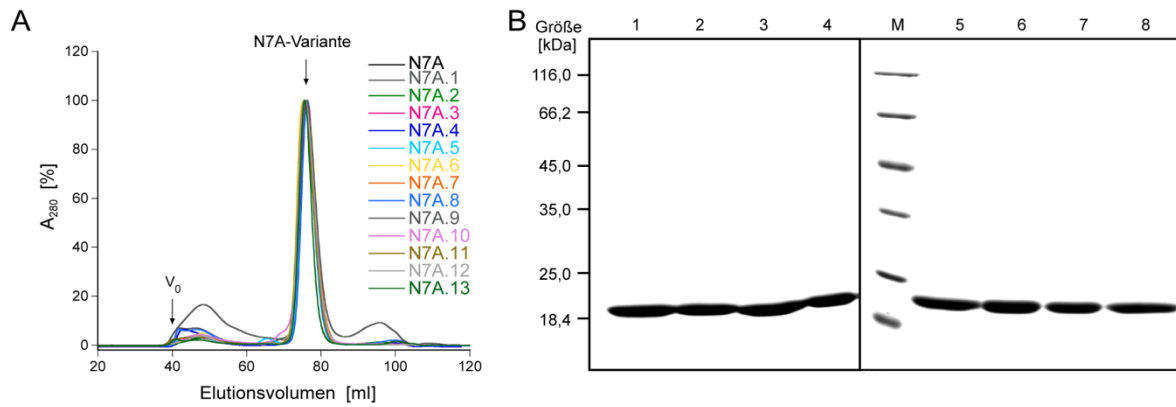
Tabelle 6: Beabsichtigte Effekte der mittels rationaler Mutagenese eingeführten Aminosäure-Austausche in N7A

| N7A-Variante | Mutation(en)          | Voraussichtlicher Effekt   |
|--------------|-----------------------|--|
| N7A.1        | His40Arg              | Salzbrücke zu Fn7B8:Glu136   |
| N7A.2        | Asp45Glu              | Beeinflussung der Position Arg43, welche eine Salzbrücke mit Fn7B8:Glu263 und Fn7B8:Gln264 eingeht                                     |
| N7A.3        | Lys46Ala              | Abbau gespannter Seitenkettenkonformation  |
| N7A.4        | Asp47Tyr              | Packung gegen Fn, hydrophobe Wechselwirkung  |
| N7A.5        | Lys50Gln              | Reduzierung der positiven Gesamtladung von N7A   |
| N7A.6        | Val72Leu              | Stabilisierung der Konformation von His73, der eine Wasserstoffbrücke zu Fn7B8:Glu158 ausbildet  |
| N7A.7        | Lys74Arg              | Verbesserte Salzbrücke zu Fn7B8:Asp214   |
| N7A.8        | Asn96Arg,<br>Lys98Ala | Salzbrücke zu Fn7B8:Glu142, kompensatorischer Austausch Lys98 zu Ala zur Reduzierung der positiven Gesamtladung in N7A                 |
| N7A.9        | Tyr127Arg             | Salzbrücke zu Fn7B8:Asp164   |
| N7A.10       | Gln128Arg             | Stabilisierung Tyr127, Salzbrücke zu Fn7B8:Asp164 (Alternative zu N7A.9)   |
| N7A.11       | Arg130Lys             | Polare Wechselwirkung mit FN-Rückgrat  |
| N7A.12       | Leu132Tyr             | Eventuell H-Brücke zu Arg 130 und Fn7B8:Gly135   |
| N7A.13       | Asn146Ser             | Rückmutation in Schleifenregion am Boden des Lipocalins zur Wildtypsequenz, Reduzierung der Immunogenität, Verbesserung der Stabilität |
| N7A.18       | Ser87Asp              | Verbesserung Proteinlöslichkeit und -stabilität  |

Nach der Produktion der N7A-Varianten im Periplasma von *E. coli* und Reinigung mittels SAC und SEC wurde in allen Fällen (bis auf N7A.9) eine monodisperse Proteinpräparation mit einem vernachlässigbaren Anteil an Aggregat, vergleichbar mit der Ausgangsvariante N7A, erhalten (**Abb. 22A**).

Reinheit und korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke der mutierten Anticaline wurde durch SDS-PAGE verifiziert. Produktionsausbeuten der einzelnen Varianten aus 2 l Schüttelkolbenkulturen mit LB-Medium wurden nach der Gelfiltration bestimmt (**Tabelle 7**).

Generell konnte durch die Verwendung von Vollmedien wie 2YT oder TB eine 2-3-fache Steigerung der Proteinausbeuten gegenüber der Produktion in LB-Medium erreicht werden. Die gereinigten N7A-Varianten wurden daraufhin mittels SPR auf ihre Affinität gegenüber Fn7B8 untersucht.



**Abb. 22 Reinigung der N7A-Varianten.** (A) SEC der N7A-Varianten N7A.1 bis N7A.13 nach SA-Chromatographie. Alle N7A-Varianten eluierten bei ca. 76 ml, entsprechend einer Molekülgröße von 21,0 kDa. (B) SDS-PAGE nach SEC exemplarisch für die N7A-Varianten N7A.1 bis N7A.8 unter reduzierenden Bedingungen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) sowie die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und Dissoziation,  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , wurden durch entsprechende Kurvenanpassung ermittelt und mit N7A verglichen. Wegen der schnellen Assoziation des Komplexes wurde bei der Kurvenanpassung ein Massentransfer berücksichtigt. Die N7A-Varianten N7A.1, N7A.4 und N7A.10 zeigten jeweils eine 3- bis 5-fache Verbesserung der Dissoziationskonstante gegenüber N7A, wohingegen die übrigen Varianten keine Verbesserung oder gar eine Verschlechterung ergaben (Tabelle 7). Insbesondere N7A.10 wies eine mehr als doppelte Halbwertszeit des Komplexes auf, während die verbesserten Affinitäten von N7A.1 und N7A.4 hauptsächlich auf eine schnellere Assoziation zurückzuführen waren.

*Tabelle 7: Effekt der eingeführten Mutationen auf Proteinausbeute und Target-Affinität*

| Lcn2-Variante | Mutation(en) | Ausbeute aus 2 l Kultur [mg] <sup>a</sup> | $K_D$ [nM] | $k_{off}$ [1/s] | $\tau_{1/2}$ [s] | $k_{on}$ [1/Ms]   | Verbesserung $K_D$ (N7A/Mutante) |
|---------------|--------------|---|------------|-----------------|------------------|-------------------|----------------------------------|
| N7A           | –            | 5,5                                       | 5,12       | 0,0223          | 31               | $4,35 \cdot 10^6$ | 1,00                             |
| N7A.1         | H40R         | 3,0                                       | 1,56       | 0,0260          | 27               | $1,66 \cdot 10^7$ | 3,28                             |
| N7A.2         | D45E         | 6,5                                       | 6,19       | 0,0310          | 22               | $5,08 \cdot 10^6$ | 0,83                             |
| N7A.3         | K46A         | 7,0                                       | 55,30      | 0,0851          | 8                | $1,54 \cdot 10^6$ | 0,09                             |
| N7A.4         | D47Y         | 3,0                                       | 0,97       | 0,0194          | 36               | $2,01 \cdot 10^7$ | 5,28                             |
| N7A.5         | K50Q         | 6,0                                       | 19,80      | 0,0392          | 18               | $1,98 \cdot 10^6$ | 0,26                             |
| N7A.6         | V72L         | 11,0                                      | 7,38       | 0,0401          | 17               | $5,43 \cdot 10^6$ | 0,69                             |
| N7A.7         | K74R         | 5,5                                       | 4,14       | 0,0264          | 26               | $6,37 \cdot 10^6$ | 1,24                             |
| N7A.8         | N96R, K98A   | 3,0                                       | 4,68       | 0,0290          | 24               | $6,32 \cdot 10^6$ | 1,09                             |
| N7A.9         | Y127R        | 0,6                                       | 26,20      | 0,0414          | 17               | $1,58 \cdot 10^6$ | 0,20                             |
| N7A.10        | Q128R        | 3,0                                       | 0,98       | 0,0094          | 74               | $9,64 \cdot 10^6$ | 5,25                             |
| N7A.11        | R130K        | 10,0                                      | 19,50      | 0,0582          | 12               | $2,98 \cdot 10^6$ | 0,26                             |

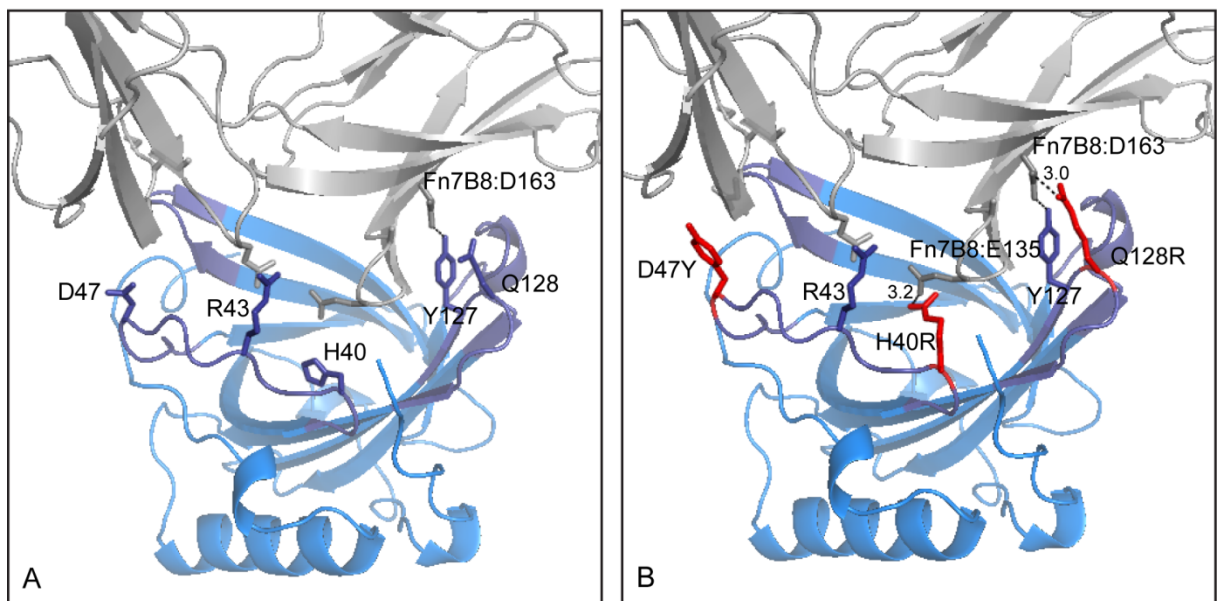
|        |                            |                  |       |                     |     |                   |      |
|--------|----------------------------|------------------|-------|---------------------|-----|-------------------|------|
| N7A.12 | L132Y                      | 8,0              | 10,60 | 0,3980              | 2   | $3,75 \cdot 10^6$ | 0,48 |
| N7A.13 | N146S                      | 1,5              | 6,18  | 0,0288              | 24  | $4,66 \cdot 10^6$ | 0,83 |
| N7A.14 | H40R, D47Y                 | 1,50             | 0,43  | 0,0110              | 63  | $2,58 \cdot 10^7$ | 11,9 |
| N7A.15 | H40R, Q128R                | 0,80             | 0,24  | 0,0098              | 71  | $4,06 \cdot 10^7$ | 21,3 |
| N7A.16 | D47Y, Q128R                | 0,15             | 0,15  | 0,0085              | 82  | $5,80 \cdot 10^7$ | 34,1 |
| N7A.17 | H40R, D47Y, Q128R          | 0,15             | 0,057 | 0,0069              | 100 | $1,20 \cdot 10^8$ | 89,8 |
| N7A.18 | S87D                       | 4,00             | 4,50  | 0,0263              | 26  | $5,81 \cdot 10^6$ | 1,1  |
| N7A.19 | H40R, D47Y, S87D,<br>Q128R | 1,4 <sup>c</sup> | 0,043 | 0,0033 <sup>b</sup> | 210 | $7,70 \cdot 10^7$ | 119  |

<sup>a</sup> gemessen für das aus dem Periplasmaextrakt von *E. coli* gereinigte Protein nach abschließender SEC

<sup>b</sup> Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation gemessen nach 5 h anstatt 800 s Dissoziationszeit

<sup>c</sup> Proteinexpression in TB-Medium

Modellierung dieser Aminosäure-Austausche (H40R, D47Y und Q128R) auf der Grundlage der Kristallstruktur macht die Wechselwirkungen zwischen Fn7B8 und den jeweiligen N7A-Varianten sichtbar (**Abb. 23**).



**Abb. 23 Strukturelle Modellierung der hochaffinen, mittels rationalem Design identifizierten N7A-Variante N7A.19.** Blick auf die Bindestellen zwischen Fn7B8 und den Anticalinen N7A (A) und N7A.19 (B). Das FN Target ist grau, die jeweiligen Anticaline sind blau dargestellt, wobei der Koordinatensatz 4GH7 aus der PDB für N7A:Fn7B8 verwendet wurde. Wichtige Aminosäure-Positionen, welche sich aus der rationalen Affinitätsmaturierung ergaben, sind hervorgehoben, und modellierte mutierte Reste sind in N7A.19 rot eingefärbt. Seitenketten-Austausche wurden mit PyMOL (Schrödinger, 2015) modelliert, wobei eine Rückgrat-abhängige Rotamer-Bibliothek verwendet wurde. Intramolekulare Wechselwirkungen mit FN sind schwarz (gestrichelt) dargestellt, die Abstände sind in Å angegeben.

In der Mutante N7A.1 (H40R) ist Arginin in der Lage, eine Salzbrücke zu Fn7B8:Glu136 auszubilden. Durch den Aminosäure-Austausch Asp47Tyr in N7A.4 werden hydrophobe Interaktionen mit Fn7B8

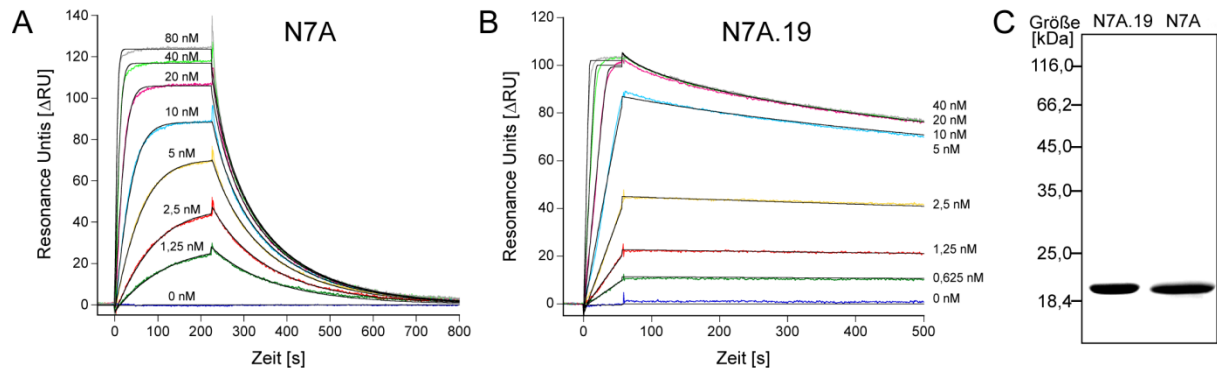
durch Kontakte mit Fn7B8:Pro238 verstärkt, was in einer 3-fach besseren Dissoziationskonstante resultierte. Eine Salzbrücke zu Fn7B8:Asp164 wurde durch den Aminosäure-Austausch Gln128Arg in N7A.10 ermöglicht. Diese Mutation kann vermutlich die Konformation des benachbarten Tyr127, welcher eine H-Brücke zu Fn7B8:Asp164 ausbildet, stabilisieren. Die Bedeutung dieser H-Brücke wurde durch die Mutante N7A.9 verdeutlicht, wobei Tyr127 durch Arg ersetzt wurde, was in einer 5-fach schlechteren Dissoziationskonstante resultierte.

Die Einführung positiv geladener Aminosäureseitenketten oder die Entfernung negativ geladener Reste führte zu einer schnelleren Komplex-Assoziation mit dem negativ geladenen FN Molekül als Resultat zusätzlicher elektrostatischer Wechselwirkungen. Die N7A-Varianten N7A.1 (H40R), N7A.4 (D47Y) and N7A.10 (Q128R) zeigten 3,8-, 4,6- and 2,2-fach schnellere Assoziation im Vergleich zu N7A. Die Entfernung positiv geladener Reste, wie in N7A.2 (K46A) und N7A.5 (K50Q), führte hingegen zu erhöhter  $k_{\text{off}}$  um einen Faktor von 1,4 und 1,8, entsprechend.

Allerdings war nach der Einführung zusätzlicher positiv Ladungen eine Abnahme der Proteinausbeute zu verzeichnen. So war beispielsweise für N7A.9 (Y127R) eine 9-fach verringerte Ausbeute gegenüber N7A zu beobachten. Cluster positiv geladener Seitenketten können den Transport der naszierenden Polypeptidkette durch die innere Bakterienmembran ins Periplasma beeinträchtigen (Fujita *et al.*, 2011). Bemerkenswerterweise konnte durch den Aminosäureaustausch Ser87Asp in N7A.18, welcher eine negative Ladung am unteren Ende des Anticalins einführte, die Proteinausbeute um den Faktor von 10 bei gleichbleibenden funktionellen Eigenschaften gesteigert werden. Das Lipocalin Lcn2 trug an Position 87 ursprünglich einen Cysteinrest (Schiefer & Skerra, 2015), welcher bei der Herstellung der Zufallsbibliothek durch Serin ersetzt wurde.

Um die Target-Affinität weiter zu steigern, wurden die drei Mutationen, welche zu verbesserten Bindungseigenschaften führten (H40R/D47Y/Q128R), kombiniert (**Tabelle 7**). SPR-Messungen zeigten eine Verbesserung der Dissoziationskonstante für die Doppelmutanten N7A.14 (H40R/D47Y), N7A.15 (H40R/Q128R) and N7A.16 (D47Y/Q128R) um die Faktoren 12, 21 bzw. 34 (**Tabelle 7**). Die Kombination aller drei Mutationen in N7A.17 (H40R, D47Y, Q128R) resultierte sogar in einer 90-fach besseren Dissoziationskonstante im Vergleich zur Originalvariante N7A.

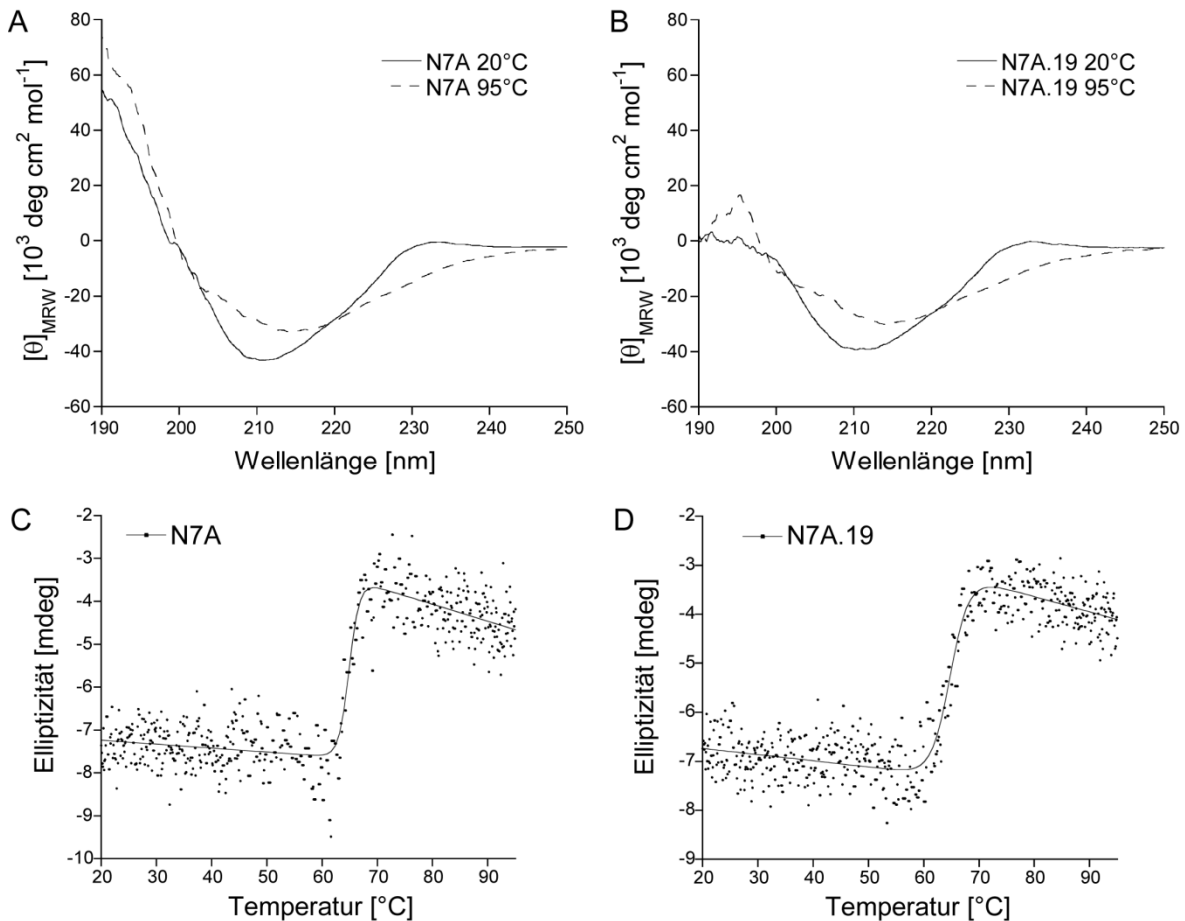
Abschließend wurde die Mutation Ser87Asp aus N7A.18 (siehe oben) in N7A.17 eingeführt, um eine Verbesserung der Proteinausbeute zu erreichen. Das resultierende Anticalin N7A.19 (H40R/D47Y/S87D/Q128R) zeigte tatsächlich eine 7-fach höhere Proteinausbeute als N7A.17. Zudem konnte mit dieser Variante durch rationales Proteindesign eine 120-fach bessere Dissoziationskonstante von 43 pM und eine 300-fach verlangsamte Dissoziation des Anticalin•Fibronektin Komplexes von 2,7 h im Vergleich zu N7A erzielt werden (**Abb. 24**).



**Abb. 24. *In vitro* Charakterisierung des affinitätsmaturierten Anticalins N7A.19 im Vergleich mit der Ausgangsvariante N7A.** SPR-Analyse der Bindungsaktivität von N7A (A) und N7A.19 (B) gegenüber dem rekombinanten Fn7B8. Konzentrationsreihen der gereinigten Anticaline wurden auf einen mit Carboxymethyl-Dextran beschichteten Sensor-Chip, welcher mit Fn7B8 über Amin-Chemie kovalent beladen wurde, appliziert. Die Kurvenanpassung (farbig) erfolgte mittels globaler nicht-linearer Regression entsprechend einem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell mit Massentransfer (schwarze Linien). Die resultierenden kinetischen Parameter sind in Tabelle 7 aufgeführt. (C) SDS-PAGE der Anticaline N7A und N7A.19 unter nicht-reduzierenden Bedingungen, die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Um zu untersuchen, ob Proteinfaltung und Stabilität durch die Aminosäure-Austausche in N7A.19 beeinträchtigt wurden, wurde die thermische Stabilität dieses Anticalins im Vergleich zur Ausgangsvariante N7A mittels CD-Spektroskopie untersucht (**Abb. 25**). Der Sekundärstrukturgehalt wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm verfolgt, da hier maximale Elliptizitätsänderungen im Differenzspektrum zwischen 20 °C und 95 °C bei einem Vorexperiment beobachtet wurden. Sowohl die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) als auch die Enthalpie der Denaturierung ( $\Delta H_m$ ) sind ein Maß für die Stabilität der Anticaline.

Obwohl beide Anticaline einen vergleichbaren Schmelzpunkt besitzen (64,9 °C für N7A und 64,8 °C für N7A.19), war die Kooperativität der Entfaltung signifikant unterschiedlich. Die Schmelzkurve von N7A zeigte einen steileren Übergang mit einer 1,8-fach höheren Denaturierungsenthalpie ( $\Delta H_m$ ) als N7A.19. Dementsprechend war die freie Enthalpie ( $\Delta G_u$ , 25 °C), welche durch Extrapolation bei Standard-Bedingungen erhalten wird (unter Annahme von konstantem  $\Delta C_p$ ), für N7A mit 121 kJ mol<sup>-1</sup> gegenüber N7A.19 mit 66,4 kJ mol<sup>-1</sup> erhöht und sogar größer als für wtLcn2 mit 82,5 kJ mol<sup>-1</sup> (Eggenstein *et al.*, 2014).



**Abb. 25. Temperaturabhängige CD-Spektroskopie der Anticaline N7A und N7A.19.** CD-Spektren der Anticaline N7A (A) und N7A.19 (B) in 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 7,5 wurden sowohl bei 20 °C als auch bei 95 °C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm aufgenommen und jeweils auf die molare Elliptizität  $\Theta_M$  normiert. Die Schmelzpunkte der Anticaline N7A (C) (64,9 °C) und N7A.19 (D) (64,8 °C) wurden durch konstantes Erhitzen (1 °C/min) der Proteinlösung (8  $\mu\text{M}$ ) auf 95 °C unter Beobachtung der Entfaltung bei 210 nm bestimmt.

### 3.2.2 Affinitätsmaturierung des Anticalins N7E durch gerichtete Evolution

Die Kristallstruktur des Anticalins N7E (Gebauer *et al.*, 2013) in Komplex mit Fn7B8 (Schiefner *et al.*, in Vorbereitung) zeigte im Vergleich zu N7A eine unterschiedliche Orientierung und dichtere Packung an der Grenzfläche. Daher wurde diese Variante für eine Affinitätsmaturierung durch gerichtete Evolution ausgewählt. Auch hier lag der Fokus auf einer Erniedrigung der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ( $k_{\text{off}}$ ). Im Verlauf ihrer Masterarbeit selektierte M. Trumpfheller unter Anwendung fehlerhafter PCR-Amplifizierung des Strukturgens für N7E und Selektion auf verstärkt bindungsaktive Varianten durch bakterielle Oberflächenpräsentation des Anticalins verschiedene N7E-Varianten mit verbesserter Affinität und deutlich verlängerter Komplex-Dissoziation (Trumpfheller, 2013).



Um die Target-Affinität gegenüber ED-B weiter zu optimieren und den Einfluss einzelner Mutationen, wie G102A, K75E und T54I, welche aus den Selektionsexperimenten resultierten, zu untersuchen, wurden folgende Kombinationsmutanten konstruiert: N7E.105 (T54I/L94V/K98R/G102A/F106Y), N7E.106 (T54I/K75E/L94V/K98R/G102D/F106Y), N7E.107 (T54I/K75E/L94V/K98R/F106Y) und N7E.108 (L94V/K98R/G102D/F106Y) (**Tabelle 8**). Die Mutationen wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.2 aufgeführten Primer eingeführt.

**Tabelle 8:** Effekt der in das Anticalin N7E eingeführten Mutationen bezüglich Ausbeute aus *E. coli* und Affinität zu ED-B

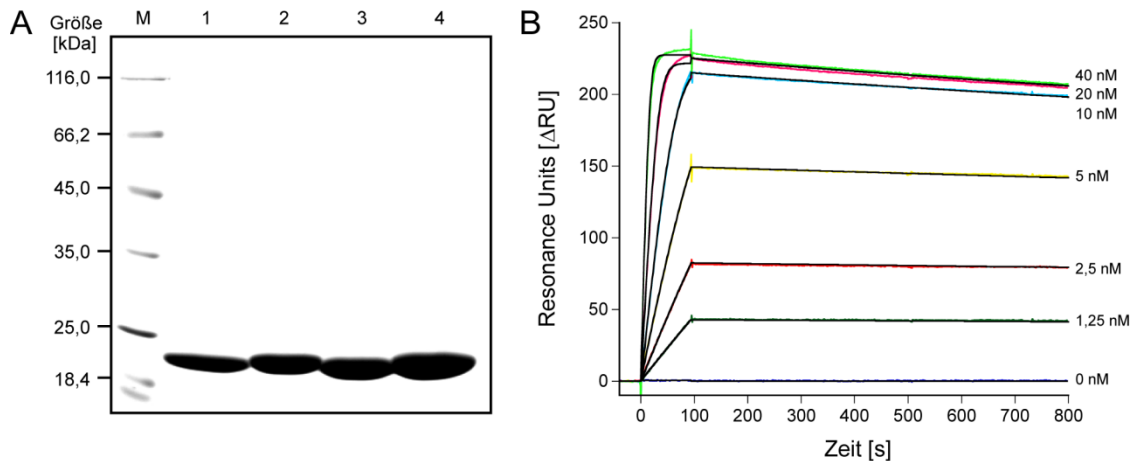
| Lcn2-Variante        | Aminosäure-Mutationen                        | Ausbeute aus 2 l Kultur [mg] <sup>b</sup> | K <sub>D</sub> [nM] | k <sub>off</sub> [1·10 <sup>-3</sup> /s] | τ <sub>1/2</sub> [min] | k <sub>on</sub> [1·10 <sup>6</sup> /Ms] | Verbesserung K <sub>D</sub> (N7E/Mutante) |
|----------------------|--|---|---------------------|--|------------------------|---|---|
| N7E <sup>a</sup>     | –  | 1,75                                      | 5,63                | 28,4                                     | 0,4                    | 5,1                                     | 1   |
| N7E.5 <sup>a</sup>   | K75E/L94V/K98R/M120I                         | 4,4                                       | 0,42                | 0,87                                     | 13                     | 1,9                                     | 13  |
| N7E.5.1 <sup>a</sup> | L94V/K98R                                    | 1,5                                       | 0,18                | 2,8                                      | 4                      | 16,1                                    | 31  |
| N7E.8 <sup>a</sup>   | T54I/L94V/G102D/F106Y/<br>T145A/E147V        | 0,3                                       | 0,15                | 0,92                                     | 13                     | 6,1                                     | 38  |
| N7E.8.1 <sup>a</sup> | T54I/L94V/G102D/F106Y                        | 4,6                                       | 0,20                | 0,58                                     | 20                     | 2,9                                     | 28  |
| N7E.101 <sup>a</sup> | T54I/L94V/K98R/G102D/F106Y                   | 2,5                                       | 0,041               | 0,175                                    | 66                     | 4,3                                     | 137                                       |
| N7E.102 <sup>a</sup> | T54Q/L94V/G102D/F106Y                        | 4,6                                       | 2,7                 | 6,53                                     | 2                      | 2,42                                    | 2   |
| N7E.103 <sup>a</sup> | T54I/L94V/K98R/F106Y                         | 2,3                                       | 0,011               | 0,279                                    | 41                     | 26,5                                    | 511                                       |
| N7E.104 <sup>a</sup> | L94V/K98R/F106Y                              | 1,9                                       | 0,042               | 0,46                                     | 25                     | 10,8                                    | 134                                       |
| N7E.105              | T54I/L94V/K98R/ <b>G102A</b> /F106Y          | 1   | 0,022               | 0,242                                    | 48                     | 10,9                                    | 252                                       |
| N7E.106              | T54I/ <b>K75E</b> /L94V/K98R/G102D/<br>F106Y | 1,7                                       | 0,046               | 0,082                                    | 141                    | 1,8                                     | 122                                       |
| N7E.107              | T54I/ <b>K75E</b> /L94V/K98R/F106Y           | 1,8                                       | 0,024               | 0,141 <sup>c</sup>                       | 82                     | 825,9                                   | 237                                       |
| N7E.108              | L94V/K98R/G102D/F106Y                        | 2,5                                       | 0,104               | 0,378                                    | 31                     | 331,6                                   | 54  |

<sup>a</sup>Daten von Trumpfheller *et al.*, 2013

<sup>b</sup> gemessen für das aus dem Periplasmaextrakt von *E. coli* gereinigte Protein nach abschließender SEC

<sup>c</sup> Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation gemessen nach 12 h anstatt 800 s Dissoziationszeit

Die Anticaline wurden unter Standardbedingungen in *E. coli* (sekretorisch) produziert und mittels SAC und SEC gereinigt. Proteinausbeuten lagen dabei in einem vergleichbaren Bereich mit der Ausgangsvariante N7E (**Tabelle 8**). Reinheit sowie die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke wurde im Anschluss mittels SDS-PAGE (**Abb. 26**) und analytischer SEC verifiziert, wobei homogene, monodisperse Elution der N7E-Varianten beobachtet wurde. Die anschließende SPR-Analyse der gereinigten Varianten zeigte besonders niedrige Dissoziationskonstanten im unteren picomolaren Bereich für die Varianten N7E.105 mit 22,3 pM und N7E.107 mit 23,8 pM (**Tabelle 8**).

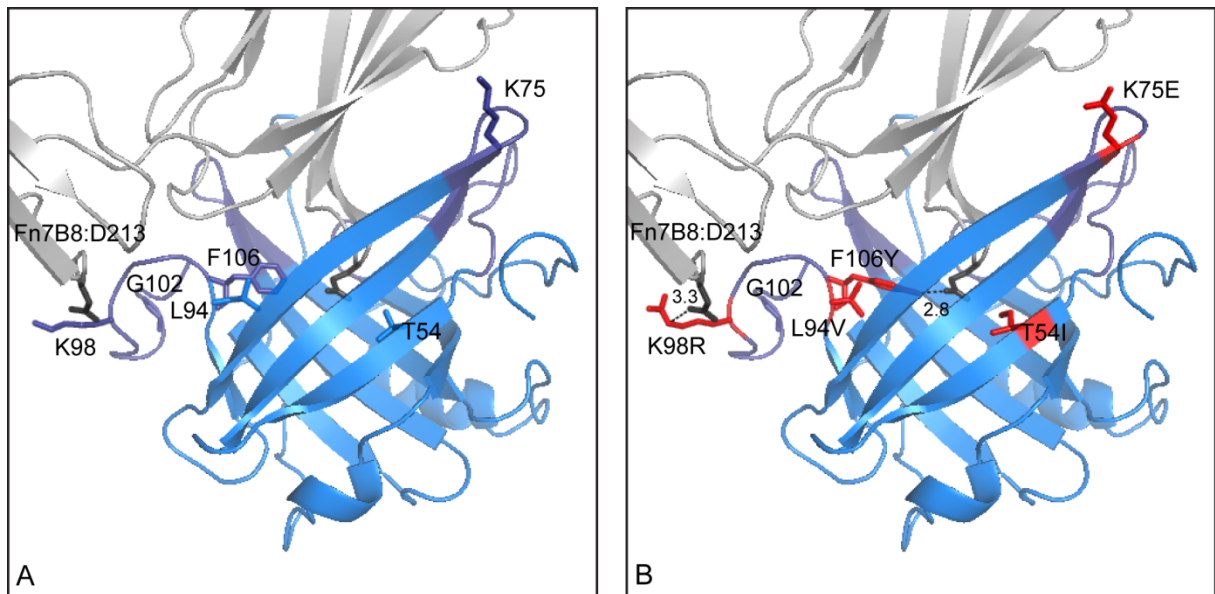


**Abb. 26. *In vitro* Charakterisierung der N7E-Varianten.** (A) SDS-PAGE. Die N7E-Varianten N7A.105 (1), N7A.106 (2), N7A.107 (3) und N7E.108 (4) sind unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt. (B) SPR-Analyse von N7E.107. Eine Konzentrationsreihe des gereinigten Anticalins wurde auf einen mit Carboxymethyl-Dextran beschichteten Sensor-Chip, welcher mit Fn7B8 durch Amin-Chemie kovalent beladen wurde, appliziert. Die Kurvenanpassung (farbig) erfolgte mittels globaler nicht-linearer Regression entsprechend einem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell mit Massentransfer (schwarze Linien). Die resultierenden kinetischen Parameter sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Die Analyse der eingeführten Aminosäure-Austausche erfolgte auf Grundlage der Kristallstruktur des Komplexes N7E•Fn7B8 (**Abb. 27**). Aus dem Vergleich von N7E.101 und N7E.103 konnte man darauf schließen, dass speziell die Mutation 102D einen ungünstigen Effekt (Faktor 4 schlechtere  $K_D$ ) hatte. Dies kann entweder durch die zusätzliche negative Ladung oder durch den Verlust von Gly erklärt werden, das aufgrund seiner fehlenden Seitenkette dem Rückgrat besondere Eigenschaften verleiht. Um dies zu untersuchen, wurde an Position 102 Ala eingeführt, was in N7E.103 resultierte. Das Ergebnis war ein um den Faktor 2 bessere  $K_D$ -Wert verglichen mit Asp in N7E.101, aber immer noch schlechter als Gly in N7E.103. Folglich handelt es sich hier um eine Mischung aus elektrostatischen (negative Ladung von Asp) und konformationellen Effekten (Konformationsflexibilität von Gly).

Die direkt aus der kombinatorischen Mutagenese resultierende Mutation Lys75Glu (in der Variante N7E.5) wurde aufgrund scheinbar fehlender Interaktionen zu Fn7B8 zunächst entfernt (Trumpfheller, 2013). Um den Effekt dieser Mutation genauer zu untersuchen, wurde sie allerdings in dieser Arbeit (in den Varianten N7E.101 und N7E.103) wieder eingeführt, woraus sich die Varianten N7E.106 und N7E.107 ergaben (**Tabelle 8**). Interessanterweise führte dieser Aminosäure-Austausch dabei zu einer langsameren Assoziation, vermutlich durch elektrostatische Abstoßung zwischen dem negativ geladenen Glutamat und dem insgesamt negativ geladenen Target Fn7B8. Allerdings wurde auch ein 2- bis 2,4-fach langsamerer  $k_{off}$ -Wert beobachtet, was durch konformationelle Stabilisierung der Schleifenregion #2, welche wichtige Interaktionen mit Fn7B8 ausbildet, erklärt werden kann.

Die Rückmutation zu Threonin 54 in N7E.108 führte im Vergleich mit N7A.101 zu einer 2,5-fachen Beschleunigung von  $k_{\text{off}}$ . Daher kann Isoleucin 54 vermutlich den Raum zwischen Anticalin und Fn7B8 besser ausfüllen, wodurch hydrophobe Interaktionen gestärkt werden.



**Abb. 27 Strukturelle Modellierung der hoch-affinen, durch kombinatorisches Design entwickelten N7E-Variante N7E.107.**

Blick auf die Bindestellen zwischen Fn7B8 und den Anticalin-Versionen N7E (A) und N7E.107 (B). Das FN Target ist grau, die jeweiligen Anticaline sind blau dargestellt. Die Struktur von N7E:Fn7B8 wurde im Labor von Prof. Dr. Arne Skerra gelöst (Schiefner *et al.*, in Vorbereitung). Wichtige Aminosäure-Positionen, welche sich aus der Affinitätsmaturierung ergaben, sind hervorgehoben, und modellierte mutierte Reste in N7E.107 wurden rot eingefärbt. Die neuen Seitenketten an den entsprechenden Positionen für N7E.107 wurden mit PyMOL (Schrödinger, 2015) modelliert, wobei eine Rückgrat-abhängige Rotamer-Bibliothek verwendet wurde. Die resultierenden Wechselwirkungen der einzelnen Mutationen mit FN sind in schwarz (gestrichelt) dargestellt, die Abstände sind in Å angegeben.

Weitere aus der kombinatorischen Selektion resultierende Mutation waren Leu94Val, Lys89Arg und Phe106Tyr (**Tabelle 8**). Die Mutation Leu94Val war in den beiden ursprünglich selektierten N7E Varianten (N7E.5 und N7E.8) aufgetreten. Sie ist direkt vor der Schleifenregion #3 gelegen, wodurch diese vermutlich in eine günstige Konformation für die Wechselwirkung mit Fn7B8 gebracht wird (Trumpfheller, 2013). Die Mutation Lys89Arg befindet sich ebenfalls in der Schleifenregion #3 an der Kontaktfläche zu Fn7B8 und die entsprechende Seitenkette kann möglicherweise eine Wasserstoffbrücke zu Fn7B8:Asp213 oder Fn7B8:Ser211 ausbilden. Die Mutation Phe106Tyr stellt eine Rückmutation zur Lcn2 Wildtyp-Sequenz dar und ist direkt nach Schleifenregion #3 positioniert. Der Tyrosinrest ist wahrscheinlich in der Lage, eine Wasserstoffbrücke mit Fn7B8:Glu135 in der CC'-Schleifenregion von Fn7B8 auszubilden, was zu einer verbesserten Dissoziations-Kinetik führen kann (**Abb. 27**).

Abschließend betrachtet kombiniert das Anticalin N7E.107 mit seinen fünf zusätzlichen Mutationen hohe Target-Affinität im unteren picomolaren Bereich mit einer bemerkenswert langen Komplex-

Halbwertszeit von 7,2 Tagen. Diese Variante repräsentiert somit den idealen Kandidaten für Anwendungen zur *In-vivo*-Bildgebung und Therapie. Im Vergleich mit N7A.19 zeigt N7E.107 eine 64-fach langsamere Dissoziation vom Target, trotz insgesamt ähnlicher Verbesserung der Affinität um Faktoren 233 gegenüber 119 (s. **Tabellen 7** und **8**) als Ergebnis der rationalen bzw. kombinatorischen Affinitätsmaturierung.

### 3.2.3 Ortsspezifische Markierung der Variante N7E.107 mit Hilfe des Aldehyd-Tags

Das Anticalin N7E.107 erscheint vielversprechend für die *In-Vivo*-Bildgebung von ED-B. Für dessen Funktionalisierung mit einem geeigneten Radionuklid sollte die bereits für das Anticalin N7A etablierte Methode der ortsspezifischen Markierung mit Hilfe des Aldehyd-Tags angewandt werden. Als Negativkontrolle wurde das humane Lipocalin 2 nun ebenfalls mit dem Aldehyd-Tag fusioniert.

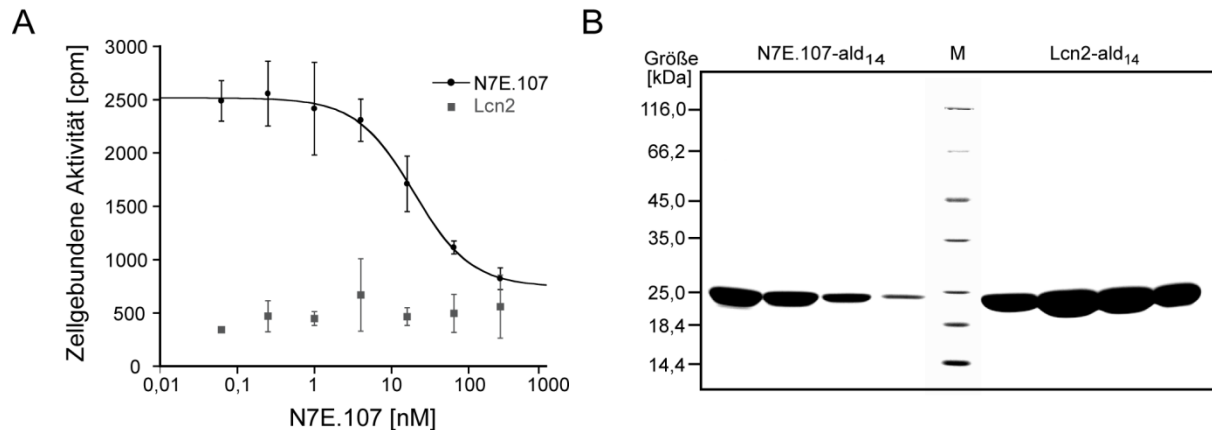
Hierfür wurde jeweils die *Bst*XI-Kassette aus pNGAL98-N7E.107 und pNGAL98-Lcn2 durch *Bst*XI-Verdau ausgeschnitten und in den entsprechen geschnittenen Vektoren pASK112-T7RBS2-N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* subkloniert, woraus schließlich die Vektoren pASK112-T7RBS2-N7E.107-ald<sub>14</sub> und pASK112-T7RBS2-Lcn2-ald<sub>14</sub> resultierten. Beide Fusionsproteine wurden wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben in *E. coli* produziert und verhielten sich hinsichtlich Monodispersität und Reinheit wie N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* (**Abb. 28**). Für N7E.107-ald<sub>14</sub> und Lcn2-ald<sub>14</sub> wurden Produktionsausbeuten von 3 mg bzw. 11 mg aus 2 l Schüttelkolbenkulturen nach SEC ermittelt.

Im nächsten Schritt wurden die Proteine sowohl mit AlexaFluor488-C5-Aminoxyacetamide (Aminoxy-Alexa488) als auch mit dem Chelator Aoa-NH-Bn-CHX-A''DTPA (Aminoxy-DTPA) wie zuvor für N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* gekoppelt (s. Abschnitt 3.1.4). Der Chelator CHXA''DTPA-NH<sub>2</sub> wurde dazu über einen Aminoxy-acetyl-Linker (Aoa) von S. Robu (Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie der TUM, Prof. Wester) funktionalisiert.

Für die radioaktive Markierung der mit DTPA-gekoppelten Proteine wurden diese in 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH 5 überführt und mit unterschiedlichen Mengen an <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> in 0,1 M HCl versetzt. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde eine DC mit 0,1 M Citrat pH 5 als mobile Phase durchgeführt. Radioaktiv markiertes Anticalin verweilte am Startpunkt ( $R_f = 0$ ), während freies <sup>177</sup>Lu<sup>3+</sup> mit der mobilen Phase nach oben wanderte ( $R_f > 0$ ). Für DTPA-N7E.107 und DTPA-Lcn2 wurden Markierungseffizienzen >80 % berechnet.

Mit den Anticalinen <sup>177</sup>Lu•DTPA-N7E.107 und <sup>177</sup>Lu•DTPA-Lcn2 wurde ein IC<sub>50</sub>-Zell-Bindungstest durchgeführt. Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie CaCo2 (Fogh *et al.*, 1977), welche konstitutiv die onkofetale Isoform B von FN exprimiert, ist ein geeignetes Modellsystem für die *in vitro* Charakterisierung der Bindungsaktivität von N7E.107 gegenüber ED-B in seinem natürlichen Kontext auf der Zelloberfläche (Gebauer *et al.*, 2013). Caco2-Zellen wurden mit einer konstanten

Konzentration an radioaktiv markiertem Protein (ca. 45.000 cpm, entsprechend einer Proteinkonzentration von 0,3 nM) und gleichzeitig mit steigendem Überschuss an unmarkiertem Anticalin N7E.107 inkubiert. Durch Kurvenanpassung (s. Abschnitt 2.7.3) wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 19,4 nM für N7E.107 ermittelt (**Abb. 28**). Die Negativkontrolle  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA-Lcn2}$  zeigte hingegen keine spezifische Bindung auf an diese Zelllinie.

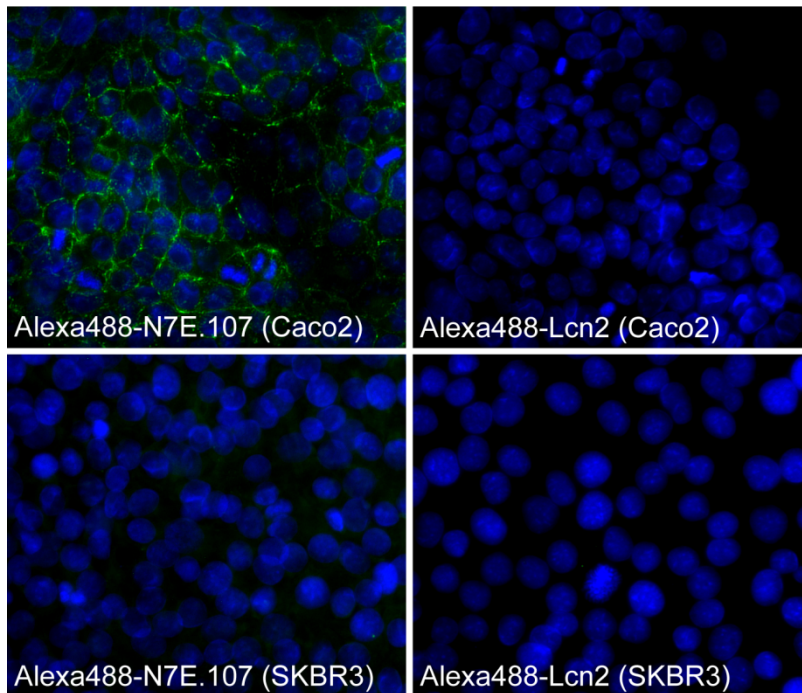


**Abb. 28. (A)**  $IC_{50}$ -Zell-Bindungstest. Caco2 Zellen wurden mit  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA-N7E.107}$  und  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA-Lcn2}$  (je 45.000 cpm, entsprechend einer Proteinkonzentration von 0,3 nM) in Gegenwart von nichtmarkiertem N7E.107 und Lcn2 verschiedener Konzentrationen für 1 h bei 4°C inkubiert. Mittels Kurvenanpassung wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von  $19,4 \pm 2,5$  nM berechnet (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n=3$ ). **(B)** SDS-PAGE von N7E.107ald<sub>14</sub> und Lcn2ald<sub>14</sub>. Gezeigt sind die Hauptfraktionen nach SEC unter reduzierenden Bedingungen. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt (M, Marker).

Die mit Aminoxy-Alexa488 markierten Anticaline wurden durch Gelfiltration von freiem Kopplungsreagenz befreit und in PBS-Puffer überführt. Eine Markierungsausbeute von >98 % für Alexa488-N7E.107 und 30 % für Alexa488-Lcn2 wurde durch die Aufnahme von UV-VIS Spektren bei 280 nm und 493 nm bestimmt (s. Abschnitt 2.4.2). Dabei war die Kopplungseffizienz von N7E.107 besser als N7A, wobei aber nicht ausgeschlossen war, dass dies bei den später durchgeführten Experimenten auf besserer Methodik beruhte. Anschließend wurden mit den fluoreszenzmarkierten Anticalinen Alexa488-N7E.107 und Alexa488-Lcn2 Immunfluoreszenz-Färbungen der ED-B positiven Zelllinie Caco2 sowie der ED-B negativen Brustkrebszelllinie SK-BR-3 (Holmes *et al.*, 1992) durchgeführt (**Abb. 29**). Die fixierten Zellen wurden für 1 h mit 1  $\mu\text{M}$  des fluoreszenzmarkierten Proteins inkubiert.

Alexa488-N7E.107 zeigte eine deutliche Färbung der Zelloberfläche von Caco2, wie für ein Protein in der extrazellulären Matrix zu erwarten. Die Färbung war besonders deutlich an den Zell-Zell Kontakten. Alexa488-N7E.107 zeigte dagegen keine Bindung im Fall der ED-B negativen SK-BR-3 Zelllinie, und auch für das Lipocalin 2 (Alexa488-Lcn2) war erwartungsgemäß weder auf Caco2- noch auf SK-BR-3-Zellen ein spezifisches Fluoreszenzsignal zu sehen.

Diese *in vitro* Zell-Bindungsstudien zeigten deutlich, dass N7E.107 in der Lage ist ED-B insbesondere unter physiologischen Bedingungen in der extrazelluläre Matrix von humanen Tumorzellen hoch selektiv zu binden. Sowohl das radioaktiv- als auch das fluoreszenzmarkierte Protein stellen demnach geeignete Tracer-Moleküle für die *in vivo* Detektion von ED-B in entsprechenden Tumor-Xenografts und orthotopen Tumormodellen dar.



**Abb. 29. Immunfluoreszenzmikroskopie von ED-B positiven Caco2-Zellen mit Alexa488-N7E.107.** Tumorzellen wurden auf Objektträgern für 4 Tage kultiviert, mit Methanol fixiert und mit 1  $\mu$ M Alexa488-N7E.107 bzw. Alexa488-Lcn2 für 1 h bei RT inkubiert. Die Zellkerne wurden gleichzeitig mit DAPI angefärbt. Als Negativkontrolle diente die ED-B negative Brustkrebs-Zelllinie SK-BR-3. Die Bilder wurden mit einem Axiovert 40 CFL Mikroskop unter Verwendung entsprechender Filter (UV für DAPI und blau für Alexa488) und einer 20 x Vergrößerung aufgenommen. Die blauen Zellkerne sind mit der Alexa488 Fluoreszenz überlagert.

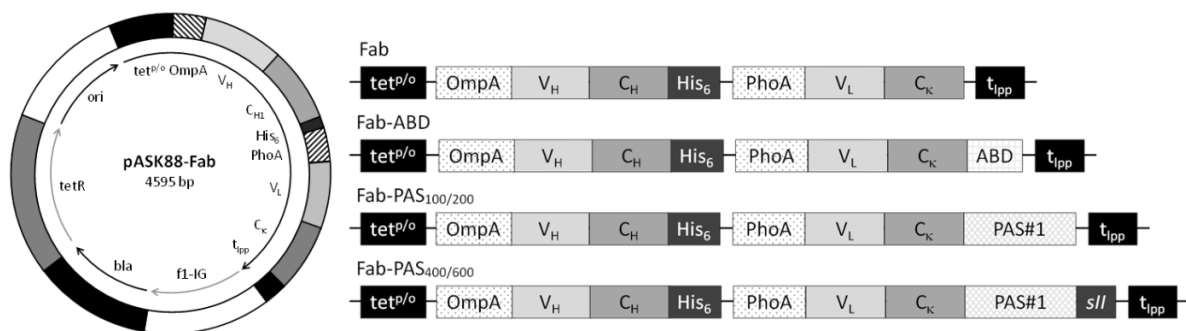
### 3.3 Fab-Fragmente mit optimierter Pharmakokinetik für die *In-Vivo*-Bildgebung

In dieser Studie wurde der Einfluss der PASylierung rekombinanter Fab-Fragmente mit tumorspezifischer Aktivität auf deren pharmakokinetische Eigenschaften wie Tumoraufnahme, Tumor-zu-Blut-Verhältnis, Verteilung und Gewebepenetration untersucht. Hierfür wurden sowohl das  $\alpha$ HER2 Fab, abgeleitet von Trastuzumab (hu4D5-v8) (Carter *et al.*, 1992), sowie das  $\alpha$ CD20 Fab, abgeleitet von Ofatumumab (2F2) (Du *et al.*, 2009), als Modell-Tracer mit klinischer Relevanz verwendet, da beide Antigene gut etablierte Tumormarker darstellen (McKeage & Perry, 2002). Die Fab-Fragmente wurden mit PAS-Sequenzen von 100 bis 600 Resten fusioniert (Schlapschy *et al.*, 2013), in *E. coli* produziert und radioaktiv markiert. Anschließend wurden PET-Messungen und Biodistributionsanalysen in CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäusen (Charles River) mit HER2- und CD20-positiven

Tumoren durchgeführt (Mendler *et al.*, 2015a). Die PASylierung mit Polymersequenzen unterschiedlicher Länge ermöglichte dabei die Variation der Blutzirkulationsdauer der Fab-Fragmente und erlaubte es so, den Parameter Plasma-Halbwertszeit unabhängig von Antigen-Affinität bzw. -Avidität zu untersuchen.

### 3.3.1 Produktion der PASylierten Fab-Fragmente von Trastuzumab und Ofatumumab in *E. coli*

Für die *In-Vivo*-Bildgebung von HER2-positiven Xenograft-Tumoren wurde eine affinitätsmaturierte Variante des  $\alpha$ HER2 Fabs von dem humanisierten Antikörper Trastuzumab (Carter *et al.*, 1992) verwendet. Ausgehend von einem im Labor schon vorliegenden Expressionsplasmids, pASK88-4D5 (Schlupschy *et al.*, 2007), wurden einige Aminosäuremutationen an den N- und C-Termini der V-Genregionen, welche bei dessen Konstruktion eingeführt wurden, mittels ortsgerechter Mutagenese entfernt (Dissertation Lars Friedrich), um die exakte Sequenz von hu4D5-v8 zu erhalten (Carter *et al.*, 1992) (**Abb. 30**). Anschließend wurde die Punktmutation D<sup>H98</sup>W (Nummerierung nach Kabat) in CDR-H3 eingeführt, welche eine 3-fach verbesserte Antigenaffinität bewirkt (Gerstner *et al.*, 2002). Diese Version des  $\alpha$ HER2 Fab-Fragments, 4D5LF3.4, wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente verwendet.



**Abb. 30. Schematische Darstellung von Expressionsvektoren für die periplasmatische Produktion von Fab-Fragmenten in *E. coli*.** Die Genexpression auf dem Plasmidtyp pASK88 (Schlupschy *et al.*, 2007) erfolgt unter der Transkriptionskontrolle des Tetracyclin-Promotor/Operators ( $tet^{P/O}$ ) bis zum Lipoprotein-Transkriptionsterminator ( $t_{IPP}$ ). Die Repression des Promotors wird durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressorgens (*tetR*) gewährleistet. Die PASylierung bzw. die Fusion mit einer ABD erfolgten am C-Terminus der leichten Kette. Für die Sekretion in den periplasmatischen Raum von *E. coli* sind die schwere und leichte Kette des Fabs jeweils am 5' Ende mit den bakteriellen Signalsequenzen des Outer Membrane Protein A (OmpA) und der Alkalischen Phosphatase (PhoA) fusioniert. Über einen His<sub>6</sub>-Tag am C-Terminus der schweren Kette kann das Fab-Fragment durch Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Das *Strep*-tag II (SII) am C-Terminus der leichten Kette ermöglicht zusätzlich eine Reinigung mittels SAC im Fall der längeren PAS-Sequenzen. Ori und f1-IG bezeichnen den Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie sowie die intergenische Region des filamentösen Phagen f1. Weitere Gensegmente: bla,  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz); V<sub>H</sub>, variable Domäne der schweren Kette; C<sub>H</sub>, konstante Domäne der schweren Kette; V<sub>L</sub>, variable Domäne der leichten Kette; C<sub>K</sub>, konstante Domäne der leichten Kette.

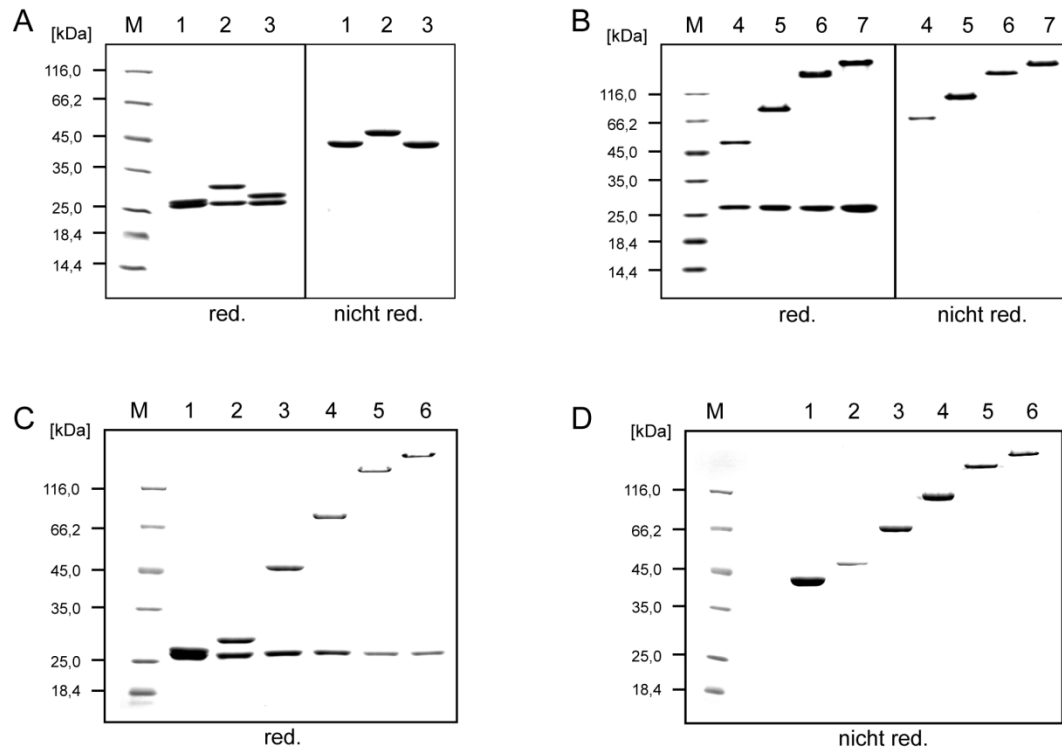
Für die *In-Vivo*-Bildgebung von CD20-positiven Tumoren stand das rekombinante Fab entsprechend dem  $\alpha$ CD20 Antikörper Ofatumumab (2F2) (Teeling *et al.*, 2004) ebenfalls aus einer Gensynthese basierend auf dessen V-Genregionen auf dem Expressionsvektor pASK88 im gleichen Format wie das  $\alpha$ HER2 Fab-Fragment zur Verfügung (Dissertation von Lars Friedrich). pASK88 trägt die humanen IgG1/ $\kappa$  konstanten Genregionen mit einem His<sub>6</sub>-Tag am C-Terminus der schweren Kette sowie die *E. coli* Signalsequenzen für die periplasmatische Sekretion (Schiweck & Skerra, 1995).

Um den Einfluss der Plasma-Halbwertszeit auf die Tumoraufnahme in den Maus Xenograft-Modellen zu untersuchen, wurden PAS-Sequenzen bestehend aus 100, 200, 400 und 600 Aminosäureresten, sowie im Falle der Konstrukte mit 400 und 600 Aminosäureresten mit dem das *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007), mit dem C-Terminus der leichten Kette fusioniert (Schlapschy *et al.*, 2013) (**Abb. 30**). Zur Herstellung der Expressionsplasmide für die PASylierten  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente wurde der Vektor pASK88-hu4D5LF3.4 mit den Restriktionsendonukleasen *Sac*II und *Xba*I verdaut und in die entsprechend geschnittenen Vektoren pASK88-hu4D5-duoSapI-PAS#1(100), pASK88-hu4D5-duoSapI-PAS#1(200), pASK88-hu4D5-duoSapI-PAS#1(400) und pASK88-hu4D5-duoSapI-PAS#1(600) subkloniert. Die Herstellung der Expressionsvektoren für die PASylierten  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente erfolgte analog. Hierfür wurde der Vektor pASK88-2F2 mit *Xba*I und *Xho*I verdaut und in die entsprechend geschnittenen Vektoren pASK88-hu4D5-duoSapI-PAS#1(100), usw. (s. oben) subkloniert. Die Fusion mit der Albumin-Bindedomäne (ABD) aus *Streptokokken* wurde durch Umklonierung der Genregionen der  $\alpha$ HER2 bzw.  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente (s. oben) in pASK106-4D5 entsprechend durchgeführt (König & Skerra, 1998) und bietet eine alternative Methode zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit durch Komplexbildung mit Serumalbumin (Schlapschy *et al.*, 2007; Dennis *et al.*, 2007). Das Fab-Fragment des murinen Antikörpers IN1, welches gegen das nicht verwandte Zelloberflächenprotein NogoA auf Oligodendrozyten gerichtet ist, diente als Negativkontrolle (Fiedler *et al.*, 2002; Bandtlow *et al.*, 1996).

Alle Fab-Fragmente wurden als funktionelle lösliche Proteine im Periplasma von *E. coli* produziert, wo unter oxidierenden Bedingungen Disulfidbrücken gebildet und die Faltung des funktionellen Fab-Fragments sowie die Assoziierung von schwerer und leichter Kette stattfinden. Die Reinigung über das His<sub>6</sub>-Tag und ggf. das *Strep*-tag II sowie SEC ergab jeweils eine homogene Proteinpräparation. Proteinausbeuten nach Reinigung von 0,4 mg l<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> aus Kulturen in Schüttelkolben, vergleichbar mit dem 4D5 Fab-Fragment (Schlapschy *et al.*, 2007), wurden auch für das 2F2 Fab-Fragment erreicht, wohingegen die affinitätsverbesserte Version des  $\alpha$ HER2 Fab-Fragments eine etwas geringere Ausbeute von 0,21 mg l<sup>-1</sup> OD<sup>-1</sup> ergab. Durch die PASylierung wurden die Expressionsausbeuten der Fab-Fragmente nicht beeinträchtigt. Die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken mit  $\geq 95$  % kovalenter Bindung zwischen leichter und schwerer Kette wie auch verzögertes elektrophoretisches

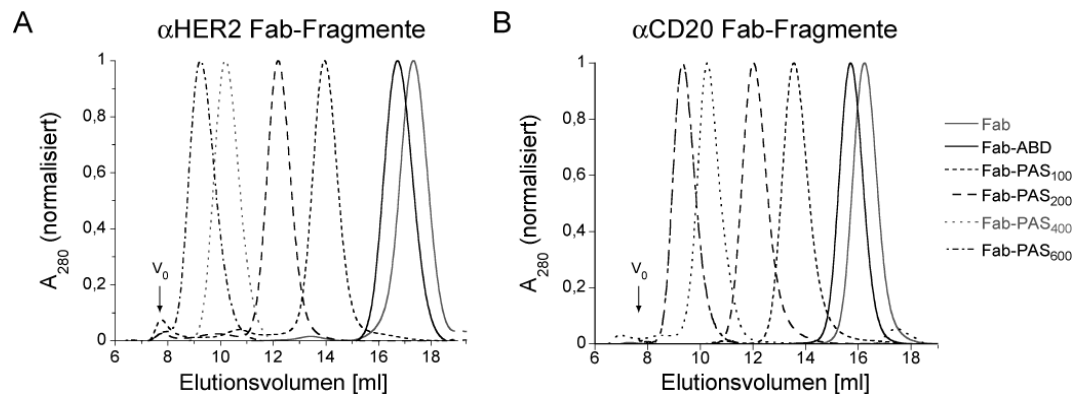


Laufverhalten abhängig von der Länge der fusionierten PAS-Sequenz wurden mittels SDS-PAGE nachgewiesen und stehen im Einklang mit vorhergehenden Ergebnissen (Schlapschy *et al.*, 2013).



**Abb. 31. SDS-PAGE-Analyse der mittels IMAC und SEC gereinigten Fab-Fragmente.** (A) Die  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente 4D4LF3.4 (Spur 1) und 4D5LF3.4-ABD (Spur 2) sowie das gegen NogoA gerichtete Fab-Fragment IN1 (Spur 3) im reduzierten und im nicht reduzierten Zustand. (B) Die  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente 4D4LF3.4-PAS<sub>100</sub> (Spur 1), 4D4LF3.4-PAS<sub>200</sub> (Spur 2), 4D4LF3.4-PAS<sub>400</sub> (Spur 3) und 4D4LF3.4-PAS<sub>600</sub> (Spur 4) im reduzierten und nicht reduzierten Zustand. (C, D) Die  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente 2F2 (Spur 1), 2F2-ABD (Spur 2), 2F2-PAS<sub>100</sub> (Spur 3), 2F2-PAS<sub>200</sub> (Spur 4), 2F2-PAS<sub>400</sub> (Spur 5) und 2F2-PAS<sub>600</sub> (Spur 6) im reduzierten (C) und nicht reduzierten Zustand (D). Die Protein-Banden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau angefärbt.

Die gereinigten Fab-Fragmente, welche für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden, wurden abschließend vergleichend durch SDS-PAGE analysiert (Abb. 31).



**Abb. 32. Analytische SEC der PASylierten Fab-Fragmente.** (A) Elutionsprofil der  $\alpha$ HER2 und (B) der  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente.  $V_0$ , Ausschlussvolumen der Säule (Superdex S200 10/300 GL; Bettvolumen 24 ml).

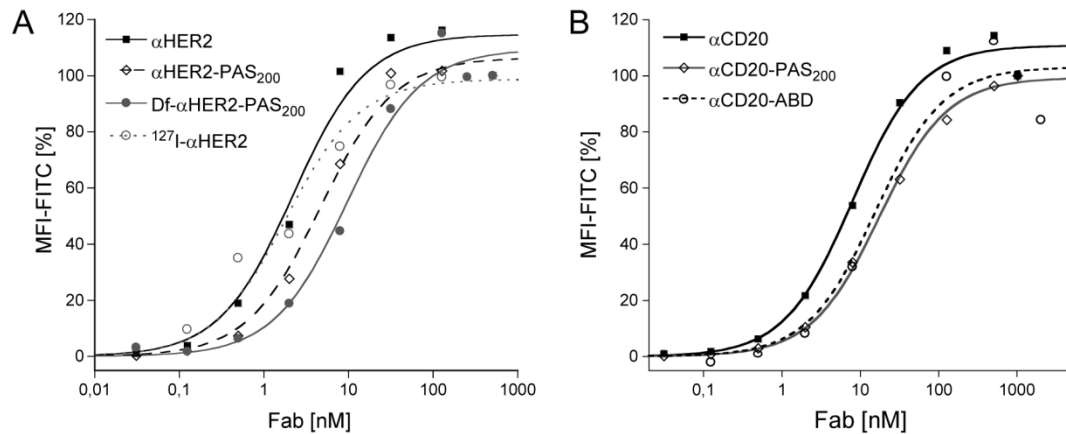
Die Untersuchung der Fab-Fragmente mittels analytischer SEC zeigte ebenfalls jeweils eine homogene Proteinpräparation und die Abwesenheit von Proteinaggregaten (**Abb. 32**). Für die PASylierten Fab-Fragmente wurde dabei in Abhängigkeit von der PAS-Sequenz eine drastische Verringerung des Elutionsvolumens beobachtet, was wie erwartet auf eine höhere apparente Molmasse und eine drastische Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens hinweist (Schlapschy *et al.*, 2013). Mit Hilfe verschiedener Eichproteine mit bekannter Molmasse wurde eine logarithmische Eichgerade erstellt, und die apparenten Molmassen der  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente konnten so bestimmt werden (**Tabelle 9**).

*Tabelle 9: Apparente Molmassen der PASylierten  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente*

| Protein                          | Calc. Masse [kDa] | SEC Größe [kDa] | SEC-Faktor Größe |
|----------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| $\alpha$ CD20                    | 48,3              | 24,7            | =1               |
| $\alpha$ CD20-ABD                | 53,6              | 31,7            | 1,3              |
| $\alpha$ CD20-PAS <sub>100</sub> | 56,7              | 87,0            | 3,5              |
| $\alpha$ CD20-PAS <sub>200</sub> | 65,0              | 180,2           | 7,3              |
| $\alpha$ CD20-PAS <sub>400</sub> | 82,8              | 402,1           | 16,3             |
| $\alpha$ CD20-PAS <sub>600</sub> | 99,3              | 634,1           | 25,7             |
| $\alpha$ HER2                    | 48,0              | 14,9            | =1               |
| $\alpha$ HER2-ABD                | 53,3              | 19,7            | 1,3              |
| $\alpha$ HER2-PAS <sub>100</sub> | 56,5              | 72,5            | 4,9              |
| $\alpha$ HER2-PAS <sub>200</sub> | 64,7              | 165,6           | 11,1             |
| $\alpha$ HER2-PAS <sub>400</sub> | 82,5              | 411,7           | 27,6             |
| $\alpha$ HER2-PAS <sub>600</sub> | 99,0              | 661,5           | 44,4             |

### 3.3.2 Radioaktive Markierung und funktionelle Analyse der Fab-Fragmente

Nach der Reinigung wurden die Antigenaffinitäten der  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente mittels FACS-Titrationsanalyse bestimmt. Hierfür wurden die HER2-positive Zelllinie SK-BR-3 (Holmes *et al.*, 1992) und die CD20-positive Zelllinie Granta-519 (Rudolph *et al.*, 2004) verwendet. Für das  $\alpha$ CD20 Fab-Fragment wurde ein  $K_D$ -Wert von 8 nM auf Granta Zellen bestimmt, während das affinitätsverbesserte  $\alpha$ HER2 Fab-Fragment eine Dissoziationskonstanten von 2,2 nM auf SK-BR-3-Zellen zeigte (**Abb. 33**).



**Abb. 33.** FACS-Titrationsanalysen von  $\alpha$ HER2 (A) und  $\alpha$ CD20 (B) Fab-Fragmenten in verschiedenen Formaten mit der jeweiligen Tumorzelllinie. Die gereinigten Fab-Fragmente wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit den Tumorzelllinien SK-BR-3 (HER2) oder Granta (CD20) für 1 h bei 4 °C in FACS-Puffer inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde das gebundene Fab-Fragment mit einem Fluorescein-gekoppelten Antikörper, welcher gegen die humane leichte Kette gerichtet ist, detektiert. Sigmoidale Kurvenanpassung (s. Abschnitt 2.7.1);  $K_D$  Werte s. Tabelle 10.

Dabei hatten weder die PASylierung noch die Fusion mit einer ABD einen markanten Einfluss auf die funktionelle Bindungsaktivität (Tabelle 10). Die gemessenen Affinitäten sind vergleichbar den entsprechenden Antikörpern Trastuzumab und Ofatumumab, für welche jeweils  $K_D$ -Werte um 5 nM basierend auf *in vitro* Studien mit Tumorzelllinien beschrieben wurden (Uchiyama *et al.*, 2010; De Lorenzo *et al.*, 2004).

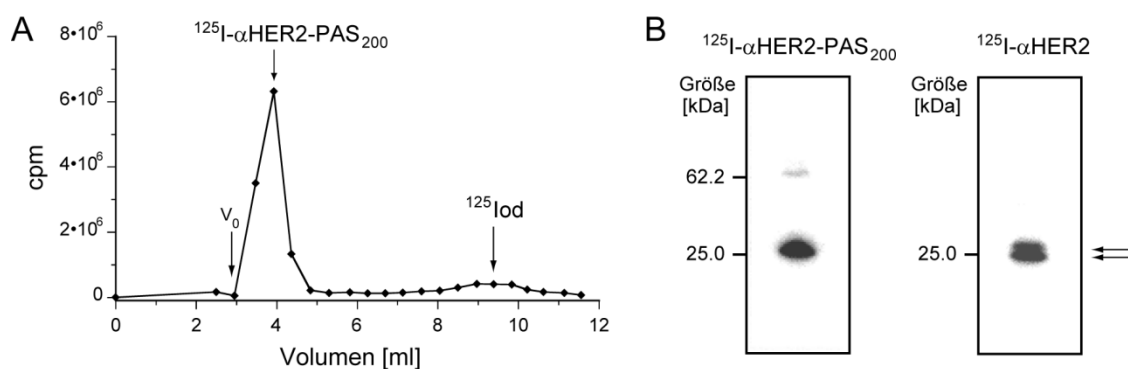
Tabelle 10: Antigen-Affinitäten der  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente nach FACS-Titrationsanalyse

| $K_D$ -Werte              | $\alpha$ HER2    | $\alpha$ CD20     |
|---------------------------|------------------|-------------------|
| Fab                       | $2,2 \pm 0,6$ nM | $8,0 \pm 1,1$ nM  |
| Fab-ABD                   | –                | $15,6 \pm 5,7$ nM |
| Fab-PAS <sub>200</sub>    | $3,0 \pm 0,7$ nM | $7,5 \pm 1,0$ nM  |
| <sup>127</sup> I-Fab      | $1,8 \pm 0,5$ nM | –                 |
| Df-Fab-PAS <sub>200</sub> | $9,6 \pm 2,0$ nM | –                 |

Für die Funktionalisierung und Markierung der Fab-Fragmente mit den Radioisotopen <sup>123/124/125</sup>I und <sup>89</sup>Zr wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Die Kopplung des Chelators Desferrioxamin (Df) mittels Isothiocyanat-Chemie an Lysine im Protein ermöglichte die Radiomarkierung mit <sup>89</sup>Zr (Vosjan *et al.*, 2010). Daneben wird zur direkten selektiven Markierung von Tyrosinresten durch elektrophile Substitution die Iodogenmethode von Fraker & Speck (1978) eingesetzt. Der Einfluss beider Markierungsstrategien auf die Antigenaffinitäten der Fab-Fragmente wurde im Anschluss ebenfalls mittels FACS-Titration untersucht. Für die Iodierung wurde ein entsprechender Reaktionsansatz mit nicht-radioaktivem Na<sup>127</sup>I verwendet, und das Df-Fab-PAS<sub>200</sub> wurde mit kaltem <sup>91</sup>Zr-Oxalat komplexiert. Die biochemische Integrität der Fab-Fragmente wurde im Anschluss mittels SDS-PAGE

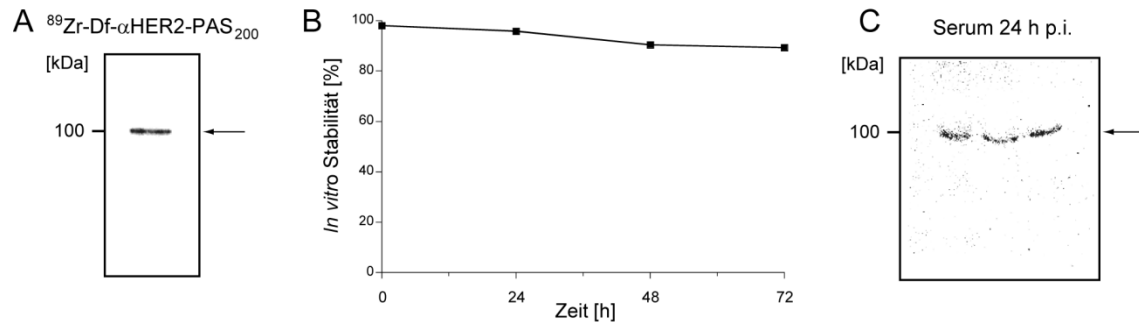
und SEC überprüft. Für das  $\alpha$ HER2 Fab 4D5LF3.4 ( $K_D = 2,2$  nM) wurde keine Beeinträchtigung der Affinität nach der Iodierung ( $K_D = 1,8$  nM) festgestellt (**Tabelle 10**). Die Kopplung mit Df und anschließende Markierung mit Zirkonium führte hingegen zu einer etwas geringeren Affinität mit einem  $K_D$  von 9,6 nM für Df- $\alpha$ HER2-PAS<sub>200</sub>. ESI-MS Messungen des mit Df markierten Fab-Fragments zeigten ein Verhältnis von Chelator zu Fab-Fragment von 2:1.

Für die *In-Vivo*-Bildgebung wurden die  $\alpha$ HER2 and  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente zunächst radioaktiv mit dem Positronenemitter <sup>124</sup>I markiert, während für die *in vivo* Biodistributionsexperimente der  $\gamma$ -Emitter <sup>125</sup>I und für Dualtracer-Experimente zusätzlich <sup>124</sup>I oder <sup>123</sup>I für die radioaktive Markierung eingesetzt wurden. Die Iodierungsreaktion mit Iodogen (Fraker & Speck, 1978) ergab ein Verhältnis von <sup>125</sup>I zu Protein von 1:1, welches aus der Proteinkonzentration nach dem letzten Reinigungsschritt und der spezifischen Aktivität von <sup>125</sup>I mit 74 MBq/nmol berechnet wurde. Die Reaktionsausbeute wurde durch DC des Reaktionsansatzes bestimmt und betrug typischerweise 80-90 (s. Abschnitt 2.4.4). Nicht gekoppeltes freies Iodid im Reaktionsansatz wurde über eine PD-10 Säule abgetrennt, wodurch eine radiochemische Reinheit, welche als Abwesenheit anderer radioaktiv-markierter Verbindungen als der gewünschten Substanz definiert ist (Wienhard *et al.*, 2013), von >98 % erreicht wurde (**Abb. 34**). Um hydrophobe Wechselwirkungen der iodierten Fab-Fragmente mit der Säulenmatrix zu vermeiden, wurde hierzu ein auf der Formulierung von Trastuzumab (s. [www.fda.gov](http://www.fda.gov)) beruhender Laufpuffer verwendet (Mendler *et al.*, 2015a). Die Stabilität des Tracers wurde mittels SDS-PAGE (**Abb. 34**) und SEC überprüft. Die iodierten Fab-Fragmente wurden zudem bei RT in PBS inkubiert, woraufhin eine weitere DC zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurde, um die Deiodierung des Tracers in PBS zu untersuchen. Nach 3 Tagen war noch >95 % der Radioaktivität mit dem Fab-Fragment assoziiert.



**Abb. 34 Präparation und Analyse der iodierten  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente.** (A) Reinigung des iodierten Fab-Fragments <sup>125</sup>I- $\alpha$ HER2-PAS<sub>200</sub> mittels SEC (PD-10 Säule). Das iodierte Fab-Fragment eluiert nach 3 ml und kann von freiem <sup>125</sup>I welches bei etwa 8 ml eluiert getrennt werden.  $V_0$  Ausschlussvolumen (Bettvolumen = 8,3 ml). (B) SDS-PAGE der iodierten Fab-Fragmente <sup>125</sup>I- $\alpha$ HER2-PAS<sub>200</sub> und <sup>125</sup>I- $\alpha$ HER2 unter reduzierenden Bedingungen. Die Detektion der iodierten Fab-Fragmente erfolgte mittels PhosphorImager.

Um den Einfluss des verwendeten Radionuklids auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Tracers zu untersuchen, wurde als Alternative zur Iodierung die Markierung mit dem Radiometall Zirkonium über den Chelator Df (s. oben) etabliert. Der Positronenemitter  $^{89}\text{Zr}$  eignet sich aufgrund seiner physikalischen Halbwertszeit von 3,3 Tagen sehr gut für die *In-Vivo*-Bildgebung von Fab-Fragmenten mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit. Die radioaktive Markierung wurde mit  $^{89}\text{Zr}$ -Oxalat durchgeführt. Eine Reaktionsausbeute von 95 % wurde nach Inkubation für 10 Minuten bei RT mittels DC bestimmt.



**Abb. 35. Stabilitätsanalyse und SDS-PAGE von  $^{89}\text{Zr}$ -Df- $\alpha\text{HER2}$ -PAS<sub>200</sub>.** (A) SDS-PAGE des mit  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Fab-Fragments unter nicht reduzierenden Bedingungen. (B) Die Stabilität des Tracers  $^{89}\text{Zr}$ -Df- $\alpha\text{HER2}$ -PAS<sub>200</sub> in PBS wurde mittels DC (t = 0, 24 h und 48 h) sowie SEC (t = 72 h) bestimmt. (C) SDS-PAGE von Serumproben aus 3 verschiedenen CD1-*Foxn1*<sup>nu</sup> Mäusen mit SK-BR-3 Tumor-Xenograft 24 h p.i. Die Detektion des mit  $^{89}\text{Zr}$  markierten  $\alpha\text{HER2}$  Fab-Fragments erfolgte mittels PhosphorImager.

Das mit  $^{89}\text{Zr}$ -markierte Fab-Fragment wurde nach der Chelatbildung, analog zu den iodierten Fab-Fragmenten, über eine PD-10 Säule gereinigt. Die Stabilität des Fab-Fragments wurde mittels SDS-PAGE überprüft (**Abb. 35A**). Weiterhin wurde der Tracer  $^{89}\text{Zr}$ -Df- $\alpha\text{HER2}$ -PAS<sub>200</sub> bei RT in PBS inkubiert und mittels DC zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Nach 24 h waren lediglich 2,2 % der ursprünglich gebundenen Radioaktivität dissoziiert ( $R_f > 0$ ) (**Abb. 35B**). Die Analyse mittels SEC zeigte, dass nach 72 h immer noch >91 % der Radioaktivität mit dem Fab-Fragment assoziiert war. Die hier gemessene Tracerstabilität war vergleichbar mit Literaturdaten, wo eine Stabilität von 94 % nach 48 h und 89,5 % nach 144 h in 0.25 M Na-Acetat, 5 mg/ml Gentisinsäure/NaOH (pH 5.5) bei RT mittels DC nachgewiesen werden konnte (Perk *et al.*, 2010). Weiterhin wurde das Serum von CD1-*Foxn1*<sup>nu</sup> Mäusen 24 h nach Injektion (p.i.) von  $^{89}\text{Zr}$ -Df- $\alpha\text{HER2}$ -PAS<sub>200</sub> mittels SDS-PAGE analysiert. Der Tracer konnte selbst 24 h p.i. noch im Serum nachgewiesen werden, wobei das Fab-Fragment keine Anzeichen von Abbau oder Aggregation zeigte.

### 3.3.3 PET-Bildgebung im Maus-Tumormodell und Biodistributionsanalyse

Um die pharmakokinetischen und bildgebenden Eigenschaften der  $\alpha\text{HER2}$  und  $\alpha\text{CD20}$  Fab-Fragmente in ihren verschiedenen molekularen Formaten zu untersuchen, wurden *In-Vivo*-PET-Messungen in CD1-*Foxn1*<sup>nu</sup> Mäusen mit HER2- oder CD20-positiven Tumor-Xenograft je 6, 24 oder

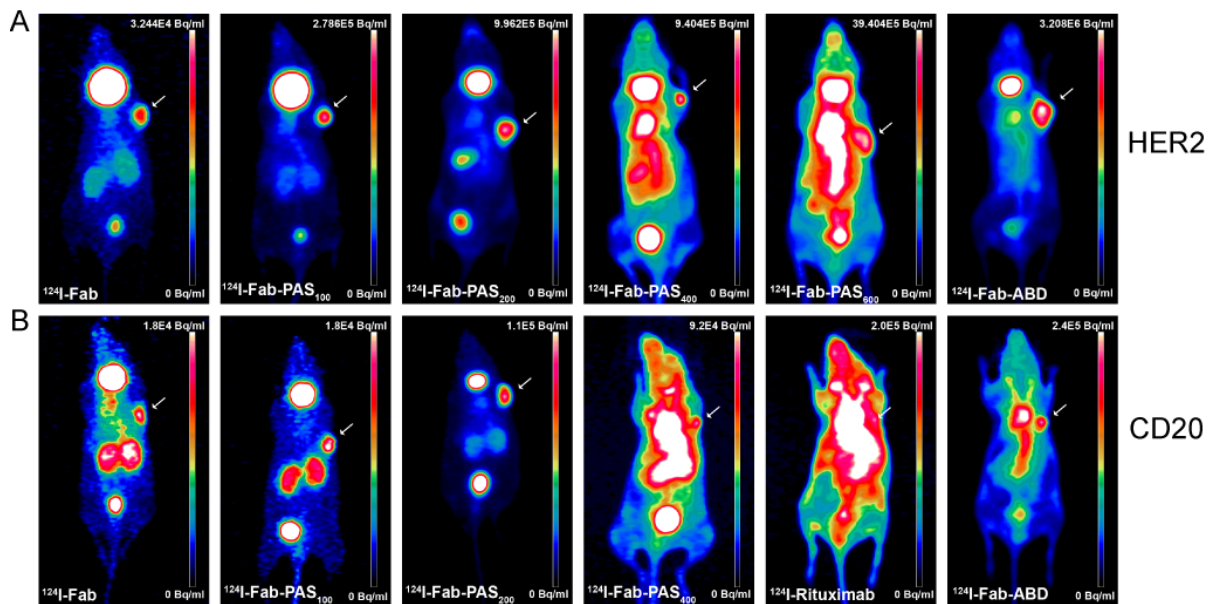
120 h p.i. durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse mit der HER2-positiven Zelllinie SKBR-3 bzw. der CD20-positiven Zelllinie Granta-519 subcutan im Bereich der rechten Schulter mit den Tumorzellen inokuliert. Für den Vergleich der einzelnen Konstrukte wurden repräsentative MIP (*Maximum Imaging Projection*) PET-Bilder 24 h p.i. gegenübergestellt, also zu einem Zeitpunkt als hoher Kontrast (Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis) erreicht war (**Abb. 36**).

Zu diesem Zeitpunkt zeigten beide unmodifizierten Fab-Fragmente eine deutliche Visualisierung des Tumors, wobei das  $\alpha$ HER2 Fab-Fragment ein besseres Tumor-zu-Hintergrund-Signal und geringere Nierenaufnahme aufwies, möglicherweise aufgrund der 4-fach höheren Antigenaffinität. Das hohe Signal in der Blase deutete auf renale Exkretion der beiden unmodifizierten  $^{124}\text{I}$ -Fab-Fragmente hin, typisch für Proteine mit einer Molmasse unter der Ausschlussgröße (70 kDa) für die glomeruläre Filtration (Haraldsson *et al.*, 2008). Die erhebliche Aufnahme in der Schilddrüse ist ein Hinweis auf die Dehalogenierung der Tracer, welche nach Internalisierung (vor allem in der Niere) und lysosomalem Abbau auftritt, da die Iod-Aufnahme in diesen Experimenten nicht durch die Gabe von Perchlorat oder Iodid blockiert wurde (Reiners & Schneider, 2013).  $^{124}\text{I}$  wird außerdem aus dem Blutstrom in das Magenlumen transportiert, was das dortige Auftreten von Radioaktivität erklärt (Wyffels *et al.*, 2009).

Abgesehen von diesem allgemeinen Bild für unmodifizierte Fab-Fragmente, welches im Einklang mit vorangegangenen *In-Vivo*-Bildgebungs- und Biodistributionsstudien von iodierten Fab-Fragmenten steht (Burvenich *et al.*, 2007), war ein starker Effekt der Signalverteilung im Zuge der schrittweisen Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit zu beobachten. Tatsächlich führte die PASylierung zu einem deutlich verbesserten Bildkontrast für Fab-PAS<sub>100</sub> und Fab-PAS<sub>200</sub>, sowohl für  $\alpha$ HER2 als auch  $\alpha$ CD20 (**Abb. 36**). Dieser Effekt war besonders auffällig für das  $\alpha$ CD20 Fab-Fragment, da die Fusion mit 200 PAS-Resten zu einem vergleichbar guten Kontrast führte wie für  $\alpha$ HER2 Fab-PAS<sub>200</sub> beobachtet, trotz der 4-fach geringeren Antigen-Affinität.

Im Gegensatz dazu zeigte die Untersuchung von Fab-Fragmenten mit längeren PAS-Sequenzen von 400 und 600 Aminosäureresten eine Erhöhung des Hintergrundsignals, welches vor allem in gut perfundierten Organen sichtbar wurde und letztendlich zu einem schlechteren "Tumor-zu-normalem Gewebe"-Verhältnis der Tracer führt. Bemerkenswerterweise war die Verteilung der Fab-Fragmente, welche mit langen PAS-Polymeren fusioniert sind, mit der Biodistribution eines intakten mAK, wie  $^{124}\text{I}$ -Rituximab, vergleichbar (**Abb. 36**).

Allgemein weisen mAK mit ihrer außergewöhnlich langen Zirkulationsdauer oft ein schlechtes Tumor-zu-Blut-Verhältnis auf. Für Rituximab wurde in der Literatur (Dias *et al.*, 2011) beispielsweise ein Tumor-zu-Blut-Verhältnis von bloß 0,5 (24 h p.i.) beobachtet, welches im Einklang mit den hier gezeigten Daten steht.



**Abb. 36.** MIP-PET Bilder von Xenograft-Tumoren mit  $^{124}\text{I}$ -markierten  $\alpha\text{HER2}$  und  $\alpha\text{CD20}$  Fab-Fragmenten.  $\text{CD1-Foxn1}^{\text{nu}}$  Mäusen mit subkutanen HER2-positiven (SK-BR-3) und CD20-positiven (Granta) Tumor-Xenograft in der rechten Schulter wurden die iodierten ( $^{124}\text{I}$ ) Fab-Fragmenten intravenös (i.v.) injiziert. PET Bilder wurden 24 h nach Tracer-Injektion für  $\alpha\text{HER2}$  (A) und  $\alpha\text{CD20}$  (B) Fab-Fragmente in verschiedenen Formaten aufgenommen: Fab, Fab-PAS<sub>100</sub>, Fab-PAS<sub>200</sub>, Fab-PAS<sub>400</sub>, Fab-PAS<sub>600</sub> und Fab-ABD sowie dem IgG Antikörper Rituximab. Die Pfeile zeigen die Position der HER2- und CD20-positiven Tumore. Das starke Schilddrüsensignal ist unabhängig vom verwendeten Tracer und wird durch die Aufnahme von  $^{124}\text{I}$  verursacht, da dieses Organ nicht mittels Natriumperchlorat blockiert wurde.

Interessanterweise führte die Fusion der  $\alpha\text{CD20}$  und  $\alpha\text{HER2}$  Fab-Fragmente mit einer ABD, als alternative Strategie zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit, ebenfalls zu einem verhältnismäßig guten Kontrast in der Bildgebung 24 h p.i. Verglichen mit Fab-PAS<sub>600</sub>, welches eine vergleichbare Plasma-Halbwertszeit aufweist (Schlapschy *et al.*, 2013), zeigte Fab-ABD sogar ein besseres Verhältnis von Tumor-zu-normalem-Gewebe. Allerdings führte die Bindung an Serumalbumin auch zu einer ungünstig langen Verweildauer des Tracers im Blut, weshalb gut durchblutete Organe wie Herz und Lunge ebenfalls hohe Signale zeigten, was besonders deutlich in der PET Aufnahme des  $\alpha\text{CD20}$  Fab-ABD 24 h p.i. zu sehen war (Abb. 36).

Für alle  $\alpha\text{HER2}$  und  $\alpha\text{CD20}$  Fab-Fragmente wurden zudem *in vivo* Biodistributionsstudien in  $\text{CD1-Foxn1}^{\text{nu}}$  Mäusen mit HER2-positiven SK-BR-3 oder CD20-positiven Granta Tumor-Xenograft-Modellen durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen jeweils intravenös (i.v.) 5 pmol (spezifische Aktivität 80-100 MBq/nmol) der radio-iodierten Fab-Fragmente injiziert. Beide unmodifizierten Fab-Fragmente zeigten eine spezifische aber verhältnismäßig geringe Tumoraufnahme von 0,80 % ID/g für HER2 und 0,24 % ID/g für CD20 24 h p.i. (Tabelle 11 und 12).

Tabelle 11: Biodistribution der radioaktiv markierten  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente

| [%ID/g]            | $^{125}\text{I}$ -Fab                      |           |           | $^{125}\text{I}$ -Fab-PAS <sub>100</sub> * |           |           | $^{125}\text{I}$ -Fab-PAS <sub>200</sub> * |            |            |
|--------------------|--|-----------|-----------|--|-----------|-----------|--|------------|------------|
|                    | 6 h  | 24 h      | 48 h      | 6 h  | 24 h      | 48 h      | 6 h  | 24 h       | 48 h       |
| <b>Tumor</b>       | 2,67±0,33                                  | 0,80±0,32 | 0,33±0,15 | 7,41±1,02                                  | 2,69±1,05 | 1,20±0,43 | 3,40±0,70                                  | 2,15±0,95  | 2,77±0,79  |
| <b>Blut</b>        | 2,46±0,47                                  | 0,15±0,02 | 0,13±0,03 | 4,10±0,39                                  | 0,22±0,10 | 0,08±0,04 | 4,16±0,82                                  | 0,38±0,11  | 0,24±0,03  |
| <b>Herz</b>        | 0,91±0,17                                  | 0,06±0,01 | 0,06±0,02 | 1,49±0,12                                  | 0,10±0,05 | 0,04±0,01 | 1,24±0,13                                  | 0,11±0,04  | 0,08±0,01  |
| <b>Lunge</b>       | 1,76±0,34                                  | 0,16±0,07 | 0,14±0,08 | 2,90±0,34                                  | 0,25±0,09 | 0,10±0,03 | 2,18±0,33                                  | 0,25±0,08  | 0,17±0,02  |
| <b>Leber</b>       | 0,96±0,19                                  | 0,09±0,02 | 0,12±0,04 | 1,14±0,13                                  | 0,11±0,04 | 0,07±0,03 | 1,04±0,22                                  | 0,10±0,02  | 0,08±0,01  |
| <b>Milz</b>        | 1,73±0,52                                  | 0,06±0,01 | 0,05±0,01 | 1,96±0,41                                  | 0,17±0,09 | 0,05±0,01 | 1,18±0,18                                  | 0,10±0,03  | 0,11±0,03  |
| <b>Niere</b>       | 2,34±0,36                                  | 0,21±0,03 | 0,16±0,03 | 8,39±1,19                                  | 0,35±0,08 | 0,12±0,02 | 3,09±0,49                                  | 0,27±0,07  | 0,23±0,02  |
| <b>Nebenniere</b>  | 0,83±0,21                                  | 0,09±0,03 | 0,14±0,07 | 1,62±0,35                                  | 0,29±0,12 | 0,07±0,02 | 1,63±0,39                                  | 0,10±0,02  | 0,16±0,02  |
| <b>Pankreas</b>    | 1,56±0,26                                  | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 | 2,11±0,70                                  | 0,13±0,07 | 0,03±0,02 | 0,93±0,14                                  | 0,07±0,02  | 0,06±0,01  |
| <b>Magen</b>       | 10,0±1,7                                   | 0,21±0,07 | 0,13±0,04 | 10,7±3,9                                   | 0,59±0,31 | 0,10±0,05 | 3,25±0,80                                  | 0,21±0,08  | 0,16±0,07  |
| <b>Dünndarm</b>    | 1,93±0,36                                  | 0,09±0,02 | 0,11±0,07 | 2,12±0,33                                  | 0,20±0,09 | 0,05±0,03 | 0,83±0,14                                  | 0,07±0,03  | 0,07±0,02  |
| <b>Dickdarm</b>    | 2,13±0,54                                  | 0,11±0,05 | 0,12±0,04 | 2,51±0,64                                  | 0,26±0,20 | 0,06±0,04 | 0,55±0,11                                  | 0,06±0,01  | 0,07±0,01  |
| <b>Muskel</b>      | 0,46±0,09                                  | 0,02±0,00 | 0,02±0,01 | 0,75±0,21                                  | 0,05±0,02 | 0,03±0,04 | 0,35±0,03                                  | 0,04±0,01  | 0,03±0,01  |
| <b>Knochen</b>     | 0,76±0,16                                  | 0,03±0,01 | 0,03±0,01 | 0,88±0,13                                  | 0,08±0,03 | 0,03±0,01 | 0,57±0,09                                  | 0,05±0,01  | 0,04±0,01  |
| <b>Haut</b>        | 1,86±0,45                                  | 0,14±0,03 | 0,10±0,04 | 2,69±0,81                                  | 0,25±0,09 | 0,06±0,01 | 1,30±0,18                                  | 0,15±0,05  | 0,12±0,02  |
| <b>Hirn</b>        | 0,13±0,02                                  | 0,01±0,00 | 0,02±0,01 | 0,15±0,01                                  | 0,02±0,00 | 0,01±0,01 | 0,13±0,02                                  | 0,01±0,00  | 0,01±0,00  |
| <b>[% ID]</b>      |  |           |           |  |           |           |  |            |            |
| <b>Schilddrüse</b> | 5,28±3,06                                  | 8,47±4,33 | 3,34±1,40 | 6,72±3,11                                  | 6,30±2,71 | 8,53±1,35 | 0,74±0,22                                  | 2,56±0,81  | 4,26±1,49  |
| [%ID/g]            | $^{123}\text{I}$ -Fab-PAS <sub>400</sub> * |           |           | $^{124}\text{I}$ -Fab-PAS <sub>600</sub> * |           |           | $^{125}\text{I}$ -Fab-ABD                  |            |            |
|                    | 6 h  | 24 h      | 48 h      | 6 h  | 24 h      | 48 h      | 6 h  | 24 h       | 48 h       |
| <b>Tumor</b>       | 6,64±0,59                                  | 7,19±2,22 | 5,30±1,01 | 4,61±1,31                                  | 5,77±0,94 | 3,72±0,37 | 10,79±2,07                                 | 15,42±5,63 | 12,41±3,19 |
| <b>Blut</b>        | 18,4<br>6±1,63                             | 7,31±0,94 | 2,06±0,66 | 17,39±4,35                                 | 8,22±0,56 | 4,16±0,63 | 21,17±4,17                                 | 9,86±2,85  | 5,75±1,34  |
| <b>Herz</b>        | 5,56±0,89                                  | 1,98±0,39 | 0,52±0,15 | 4,24±1,08                                  | 1,87±0,36 | 0,98±0,10 | 6,97±1,73                                  | 3,16±1,06  | 1,79±0,34  |
| <b>Lunge</b>       | 7,32±1,04                                  | 2,90±0,45 | 1,05±0,21 | 7,10±2,16                                  | 2,90±0,33 | 1,53±0,23 | 10,33±2,28                                 | 4,90±1,96  | 2,74±0,73  |
| <b>Leber</b>       | 4,45±0,67                                  | 1,64±0,09 | 0,61±0,10 | 3,55±1,09                                  | 1,51±0,14 | 0,99±0,13 | 4,53±0,60                                  | 2,01±0,62  | 1,14±0,24  |
| <b>Milz</b>        | 2,72±0,20                                  | 1,46±0,28 | 0,62±0,13 | 2,60±0,79                                  | 1,18±0,30 | 1,19±0,21 | 3,64±0,86                                  | 1,55±0,54  | 0,95±0,17  |
| <b>Niere</b>       | 7,53±1,03                                  | 3,13±0,29 | 0,85±0,20 | 4,24±1,26                                  | 1,91±0,13 | 1,15±0,25 | 4,76±0,99                                  | 2,33±0,71  | 1,32±0,26  |
| <b>Nebenniere</b>  | 3,73±0,99                                  | 2,13±0,34 | 0,42±0,07 | 5,20±1,76                                  | 2,19±0,93 | 1,14±0,32 | 4,10±1,82                                  | 2,46±0,81  | 1,11±0,15  |
| <b>Pankreas</b>    | 1,85±0,47                                  | 1,16±0,16 | 0,29±0,09 | 1,62±0,35                                  | 0,63±0,10 | 0,41±0,07 | 1,77±0,54                                  | 1,14±0,28  | 0,65±0,12  |
| <b>Magen</b>       | 3,82±0,82                                  | 2,30±0,64 | 0,65±0,19 | 3,07±0,60                                  | 1,14±0,13 | 0,79±0,13 | 3,79±0,75                                  | 1,57±0,32  | 0,91±0,14  |
| <b>Dünndarm</b>    | 1,84±0,21                                  | 1,03±0,23 | 0,28±0,07 | 1,48±0,28                                  | 0,48±0,06 | 0,40±0,03 | 2,45±0,36                                  | 1,04±0,33  | 0,62±0,13  |
| <b>Dickdarm</b>    | 1,67±0,36                                  | 1,05±0,25 | 0,31±0,06 | 0,91±0,22                                  | 0,37±0,08 | 0,34±0,04 | 1,44±0,33                                  | 0,67±0,16  | 0,47±0,11  |
| <b>Muskel</b>      | 0,66±0,20                                  | 0,48±0,04 | 0,16±0,07 | 0,55±0,07                                  | 0,37±0,08 | 0,23±0,10 | 0,90±0,25                                  | 0,74±0,28  | 0,50±0,09  |
| <b>Knochen</b>     | 1,39±0,36                                  | 0,98±0,18 | 0,20±0,05 | 1,48±0,30                                  | 0,66±0,16 | 0,34±0,06 | 1,82±0,17                                  | 0,98±0,38  | 0,54±0,11  |
| <b>Haut</b>        | 2,56±0,97                                  | 1,64±0,28 | 0,44±0,08 | 2,28±0,54                                  | 1,39±0,08 | 0,81±0,07 | 3,62±0,87                                  | 2,48±0,73  | 1,64±0,26  |
| <b>Hirn</b>        | 0,52±0,06                                  | 0,22±0,05 | 0,06±0,02 | 0,47±0,11                                  | 0,18±0,04 | 0,12±0,02 | 0,53±0,07                                  | 0,21±0,07  | 0,14±0,02  |
| <b>[% ID]</b>      |  |           |           |  |           |           |  |            |            |
| <b>Schilddrüse</b> | 1,16±0,58                                  | 2,89±1,49 | 6,08±1,40 | 0,54±0,22                                  | 2,07±0,32 | 2,63±0,82 | 0,19±0,04                                  | 2,41±0,97  | 2,20±1,32  |

\*Diese Biodistributionsanalysen wurde mit Hilfe von Dualtracer-Experimenten in den Kombinationen  $^{125}\text{I}$ -Fab-PAS<sub>100</sub> /  $^{123}\text{I}$ -Fab-PAS<sub>400</sub> und  $^{125}\text{I}$ -Fab-PAS<sub>200</sub> /  $^{124}\text{I}$ -Fab-PAS<sub>600</sub> durchgeführt. (Mittelwerte ± Standardabweichung; n=5-6). Nn, Nebenniere



Tabelle 12: Biodistribution der radioaktiv markierten  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente

| [%ID/g]            | <sup>125</sup> I-Fab* |           |           | <sup>125</sup> I-Fab-PAS <sub>100</sub> * |           |           | <sup>124</sup> I-Fab-PAS <sub>200</sub> * |           |           |
|--------------------|-----------------------|-----------|-----------|---|-----------|-----------|---|-----------|-----------|
|                    | 6 h                   | 24 h      | 48 h      | 6 h                                       | 24 h      | 48 h      | 6 h                                       | 24 h      | 48 h      |
| <b>Tumor</b>       | 1,33±0,14             | 0,24±0,09 | 0,17±0,07 | 8,45±1,38                                 | 2,82±0,58 | 2,18±1,15 | 4,15±1,21                                 | 2,41±0,76 | 1,47±0,67 |
| <b>Blut</b>        | 1,39±0,37             | 0,06±0,01 | 0,04±0,01 | 6,98±1,77                                 | 0,37±0,08 | 0,26±0,08 | 6,71±0,65                                 | 0,59±0,24 | 0,09±0,02 |
| <b>Herz</b>        | 0,52±0,18             | 0,03±0,00 | 0,02±0,00 | 2,58±0,56                                 | 0,17±0,05 | 0,12±0,04 | 2,42±0,49                                 | 0,19±0,09 | 0,04±0,00 |
| <b>Lunge</b>       | 1,16±0,43             | 0,08±0,04 | 0,06±0,02 | 5,11±0,94                                 | 0,44±0,13 | 0,35±0,12 | 3,82±0,71                                 | 0,43±0,18 | 0,14±0,09 |
| <b>Leber</b>       | 0,52±0,12             | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 | 2,44±0,56                                 | 0,21±0,06 | 0,26±0,09 | 1,62±0,16                                 | 0,18±0,06 | 0,06±0,01 |
| <b>Milz</b>        | 0,97±0,54             | 0,04±0,01 | 0,03±0,01 | 3,77±0,36                                 | 0,22±0,06 | 0,20±0,08 | 2,02±0,51                                 | 0,25±0,06 | 0,08±0,02 |
| <b>Niere</b>       | 2,75±0,51             | 0,41±0,07 | 0,23±0,04 | 19,4±1,8                                  | 0,86±0,23 | 0,56±0,19 | 13,4±2,3                                  | 0,92±0,33 | 0,17±0,03 |
| <b>Nebenniere</b>  | 0,73±0,42             | 0,04±0,02 | 0,04±0,01 | 4,38±1,09                                 | 0,45±0,15 | 0,27±0,16 | 3,46±1,20                                 | 0,37±0,12 | 0,11±0,03 |
| <b>Pankreas</b>    | 1,10±0,44             | 0,02±0,01 | 0,01±0,00 | 4,92±0,68                                 | 0,17±0,05 | 0,09±0,04 | 1,89±0,20                                 | 0,19±0,07 | 0,03±0,01 |
| <b>Magen</b>       | 6,02±3,11             | 0,10±0,04 | 0,04±0,01 | 15,5±6,1                                  | 0,62±0,10 | 0,27±0,17 | 6,53±2,87                                 | 0,59±0,31 | 0,08±0,03 |
| <b>Dünndarm</b>    | 1,13±0,63             | 0,04±0,01 | 0,03±0,01 | 3,95±0,73                                 | 0,24±0,04 | 0,18±0,07 | 1,47±0,46                                 | 0,18±0,08 | 0,04±0,01 |
| <b>Dickdarm</b>    | 1,06±0,19             | 0,04±0,01 | 0,03±0,01 | 3,18±0,31                                 | 0,28±0,05 | 0,22±0,07 | 1,11±0,14                                 | 0,15±0,08 | 0,04±0,01 |
| <b>Muskel</b>      | 0,27±0,08             | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 1,60±0,20                                 | 0,08±0,02 | 0,04±0,01 | 0,66±0,07                                 | 0,11±0,04 | 0,02±0,00 |
| <b>Knochen</b>     | 0,46±0,10             | 0,02±0,01 | 0,02±0,01 | 2,18±0,71                                 | 0,10±0,02 | 0,06±0,02 | 1,11±0,14                                 | 0,14±0,03 | 0,05±0,02 |
| <b>Haut</b>        | 1,03±0,28             | 0,04±0,01 | 0,03±0,01 | 5,19±1,10                                 | 0,33±0,09 | 0,19±0,06 | 2,41±0,21                                 | 0,31±0,09 | 0,05±0,01 |
| <b>Hirn</b>        | 0,07±0,01             | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,37±0,09                                 | 0,02±0,01 | 0,03±0,01 | 0,23±0,02                                 | 0,02±0,01 | 0,01±0,00 |
| <b>[% ID]</b>      |                       |           |           |   |           |           |   |           |           |
| <b>Schilddrüse</b> | 7,2±1,1               | 4,6±1,2   | 3,7±1,5   | 13,6±2,74                                 | 13,1±8,0  | 23,58±6,0 | 4,2±0,5                                   | 3,1±0,3   | 2,9±1,0   |

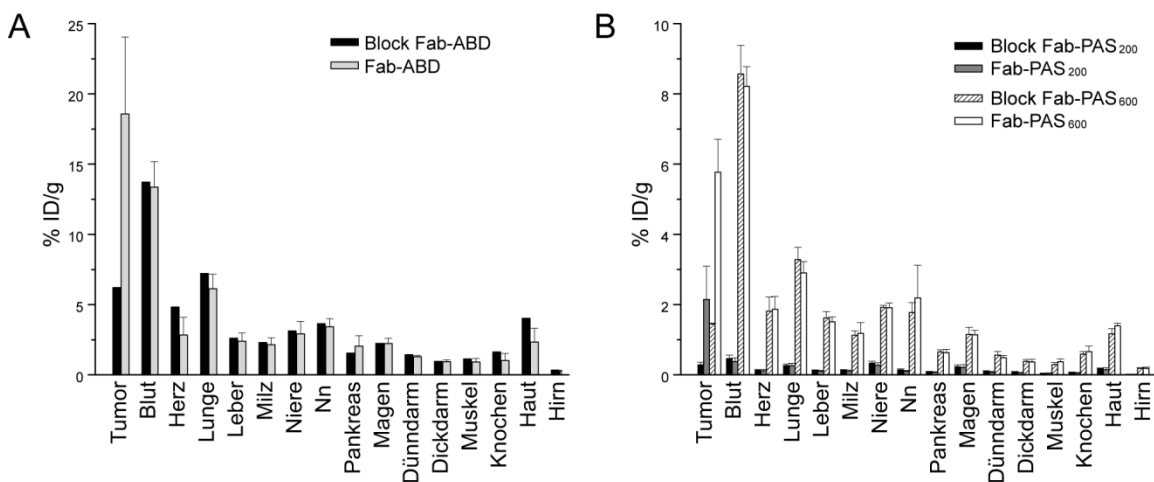
| [% ID]             | <sup>124</sup> I-Fab-PAS <sub>400</sub> * |           |           | <sup>125</sup> I-Fab-PAS <sub>200</sub> * | <sup>125</sup> I-Fab-ABD |
|--------------------|---|-----------|-----------|---|--------------------------|
|                    | 6 h                                       | 24 h      | 48 h      | Blockade 24 h                             | 24 h                     |
| <b>Tumor</b>       | 4,03±0,71                                 | 6,33±1,73 | 2,92±1,55 | 0,68±0,38                                 | 12,29±3,53               |
| <b>Blut</b>        | 15,6±2,9                                  | 5,86±0,52 | 1,58±0,66 | 0,63±0,11                                 | 11,52±0,17               |
| <b>Herz</b>        | 4,98±0,76                                 | 1,77±0,20 | 0,50±0,22 | 0,25±0,09                                 | 3,54±0,45                |
| <b>Lunge</b>       | 6,98±0,46                                 | 2,43±0,08 | 0,71±0,28 | 0,47±0,16                                 | 5,36±0,41                |
| <b>Leber</b>       | 3,18±0,48                                 | 1,10±0,11 | 0,35±0,10 | 0,21±0,03                                 | 2,03±0,08                |
| <b>Milz</b>        | 2,63±0,46                                 | 1,00±0,15 | 0,42±0,15 | 0,26±0,08                                 | 1,65±0,13                |
| <b>Niere</b>       | 11,1±2,4                                  | 2,62±0,25 | 0,83±0,30 | 1,10±0,33                                 | 2,63±0,32                |
| <b>Nebenniere</b>  | 5,78±1,97                                 | 2,67±0,63 | 0,58±0,18 | 0,98±1,37                                 | 2,75±0,47                |
| <b>Pankreas</b>    | 2,02±0,25                                 | 0,76±0,09 | 0,18±0,11 | 0,14±0,02                                 | 1,31±0,17                |
| <b>Magen</b>       | 3,36±1,06                                 | 1,64±0,47 | 0,33±0,18 | 0,29±0,05                                 | 2,31±0,24                |
| <b>Dünndarm</b>    | 1,75±0,16                                 | 0,66±0,12 | 0,16±0,07 | 0,18±0,02                                 | 1,29±0,05                |
| <b>Dickdarm</b>    | 1,23±0,17                                 | 0,44±0,07 | 0,11±0,04 | 0,17±0,03                                 | 0,95±0,13                |
| <b>Muskel</b>      | 0,68±0,14                                 | 0,40±0,07 | 0,11±0,03 | 0,08±0,02                                 | 0,64±0,06                |
| <b>Knochen</b>     | 1,63±0,50                                 | 0,66±0,14 | 0,15±0,05 | 0,09±0,01                                 | 0,85±0,19                |
| <b>Haut</b>        | 2,89±0,52                                 | 1,61±0,40 | 0,44±0,35 | 0,32±0,04                                 | 3,02±0,13                |
| <b>Hirn</b>        | 0,45±0,13                                 | 0,15±0,02 | 0,04±0,01 | 0,02±0,00                                 | 0,28±0,03                |
| <b>[% ID]</b>      |   |           |           |   |                          |
| <b>Schilddrüse</b> | 1,5±0,3                                   | 3,4±1,7   | 2,4±0,8   | 5,0±2,2                                   | 2,4±0,5                  |

\*Diese Biodistributionsanalysen wurde mit Hilfe von Dualtracer-Experimenten in den Kombinationen <sup>125</sup>I-Fab / <sup>124</sup>I-Fab-PAS<sub>200</sub> und <sup>125</sup>I-Fab-PAS<sub>100</sub> / <sup>124</sup>I-Fab-PAS<sub>400</sub> durchgeführt. (Mittelwerte ± Standardabweichung; n=5-6). Nn, Nebenniere

Wie erwartet, wurde keine spezifische Akkumulation des IN1 Fab-Fragments (Negativkontrolle) in den SK-BR-3 Tumoren (0,07 % ID/g 24 h p.i.) beobachtet (**Abb. 38**). Weiterhin zeigten beide  $\alpha$ HER2

und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente aufgrund ihrer raschen Ausscheidung über die Niere gute Tumor-zu-Blut-Verhältnisse von 5.3 und 4.0 (24 h p.i.). Auch in den Biodistributionsstudien ist die Dehalogenierung der Tracer für die hohe Aufnahme der Radioaktivität in Schilddrüse und Magen verantwortlich, was besonders für die unmodifizierten Fabs und Fab-PAS<sub>100</sub> zu einem Zeitpunkt 6 h p.i. deutlich wird (**Tabelle 11** und **12**).

Verglichen mit den unmodifizierten  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmenten zeigten die PASylierten Fab-Fragmente mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit eine Erhöhung der Tumoraufnahme (in % ID/g) mit einem Maximum für 400 PAS-Reste: 7,2 % ID/g für  $\alpha$ HER2 und 6.3 % ID/g für  $\alpha$ CD20 (**Tabelle 11** und **12**, **Abb. 38A**). Die höchste Tumoraufnahme mit 15,4 % ID/g für  $\alpha$ HER2 und 12,3 % ID/g für  $\alpha$ CD20 24 h p.i wurde für die ABD-Fusion erzielt. Allerdings zeigen diese Konstrukte ein relativ schlechtes Tumor-zu-Blut-Verhältnis von 1,6 (24 h p.i.), offensichtlich aufgrund ihrer Bindung an Albumin im Blutplasma. Sowohl PASylierung mit 200 oder mehr Aminosäureresten als auch die Fusion mit einer ABD führt zu einer Verbesserung der *in vivo* Stabilität der Fab-Fragmente, da für diese Konstrukte weniger Radioaktivität in Schilddrüse und Magen nachgewiesen werden konnte.

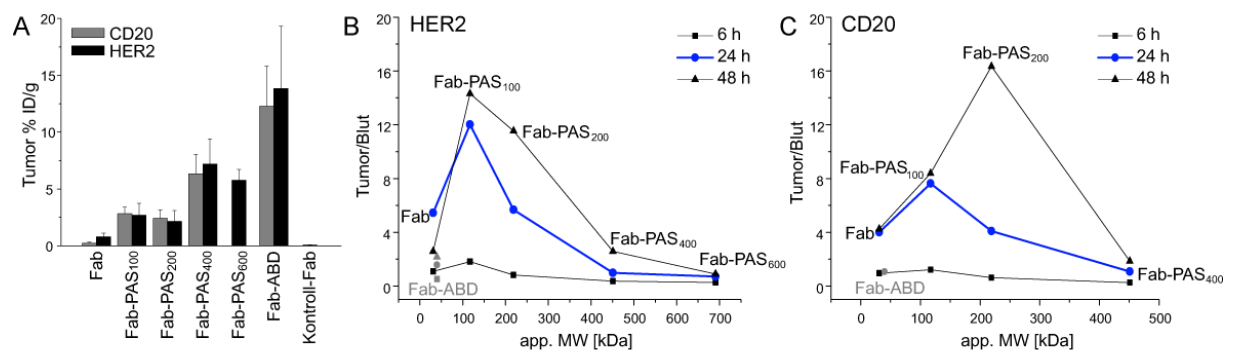


**Abb. 37. Selektive Blockade der Tumoraufnahme von HER2-Fab-Fragmenten.** Die Tumoraufnahme der  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente wurde durch Injektion einer 1000-fachen Menge an Trastuzumab 24 h vor sowie gleichzeitig mit der Tracerinjektion blockiert. *In vivo* Biodistributionsexperimente wurden 24 h p.i. für **(A)**  $\alpha$ HER2 Fab-ABD und **(B)**  $\alpha$ HER2 Fab-PAS<sub>200</sub> und Fab-PAS<sub>600</sub> durchgeführt (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n=4). Nn, Nebenniere.

In Kontrollexperimenten wurde die Spezifität der Tumoranreicherung der  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente überprüft, indem CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäuse mit HER2-positiven Xenograft-Tumoren mit dem 1000-fachen Menge an Trastuzumab zum radio-iodierten Fab behandelt wurden. Biodistributionsexperimente 24 h p.i. zeigten im Falle der Blockade mit Trastuzumab eine signifikante Reduktion der Tumoraufnahme für <sup>125</sup>I-Fab-ABD von 15,4 % ID/g auf 6,2 % ID/g ( $p < 0.05$ ) (**Abb. 37**). Die Tumoraufnahme der  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmente Fab-PAS<sub>200</sub> und Fab-PAS<sub>600</sub> konnte ebenfalls signifikant mit Trastuzumab blockiert werden ( $p < 0.05$  und  $p < 0.001$ ).

In analogen Kontrollexperimenten mit CD20-positiven Xenograft-Modellen wurde die Tumoraufnahme der radio-iodierten  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente mit einer 1000-fachen Menge an Rituximab ebenfalls signifikant von 2,41 %ID/g auf 0,68 %ID/g reduziert ( $p < 0.05$ ) (**Tabelle 12**). Rituximab erkennt Schleifenregionen von CD20, welche sterisch sehr nahe am Epitop von Ofatumumab positioniert sind, wodurch die Bindung des Ofatumumab Fab-Fragments kompetitiv verhindert wird (Du *et al.*, 2009).

Um zu untersuchen, wie sich die pharmakokinetischen Eigenschaften der Fab-Fragmente auf die spezifische Tumoranreicherung auswirken, wurde das Tumor-zu-Blut-Verhältnis gegen die mittels SEC bestimmte apparente Molmasse (Tabelle 9), welche mit der verlängerten Plasma-Halbwertszeit einhergeht, aufgetragen (**Abb. 38**).

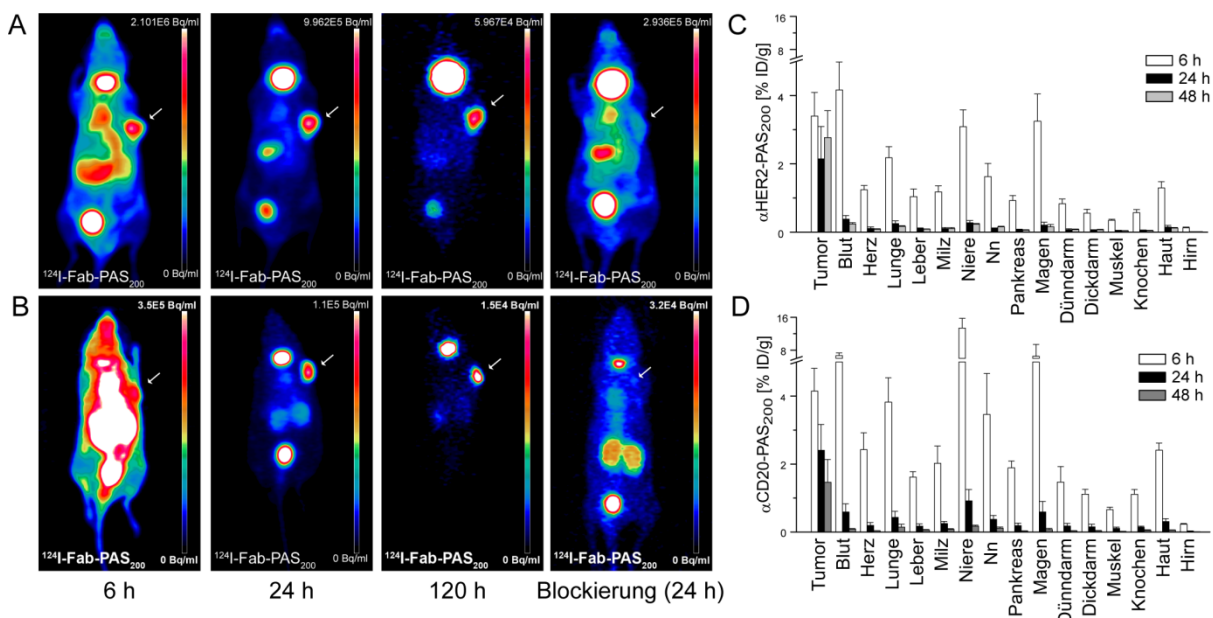


**Abb. 38. Korrelation von Tumoraufnahme bzw. Tumor-zu-Blut-Verhältnis mit der Plasma-Halbwertszeit.** CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäuse mit subcutanen SK-BR-3 und Granta Tumoren wurden mit <sup>125</sup>I-markierten Fab-Fragmenten i.v. injiziert. **(A)** Tracer Aufnahme in HER2- und CD20-positive Tumoren für die verschiedenen PASylierten Fab-Fragmente 24 h p.i. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n=5). **(B, C)** Das Tumor-zu-Blut-Verhältnis wurde gegen die apparente Molmasse (MW) der verschiedenen PASylierten  $\alpha$ HER2 (B) und  $\alpha$ CD20 (C) Fab-Fragmente 6, 24 und 48 h p.i. (n=5) aufgetragen. Die einzelnen Datenpunkte für Fab-ABD sind zum Vergleich in grau dargestellt.

Sowohl für die  $\alpha$ HER2 als auch für die  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente zeigten die resultierenden Graphen, dass die PASylierung zu einer starken Erhöhung des Tumor-zu-Blut-Verhältnisses 24 h p.i. und 48 h p.i. mit einem Optimum im Bereich von 100 bis 200 PAS-Resten führte. Exzellente Verhältnisse von Tumor-zu-Blut mit 12,2 bei HER2 und 7,5 bei CD20 vor allem für das Format Fab-PAS<sub>100</sub> 24 h p.i. beobachtet. Während das Tumor-zu-Blut-Verhältnis von Fab-PAS<sub>200</sub> zu diesem Zeitpunkt etwa dem der unmodifizierten Fab-Fragmente entsprach, zeigte dieses Format zu einem späteren Zeitpunkt 48 h p.i. ein vergleichbar gutes oder sogar besseres Tumor-zu-Blut-Verhältnis, vermutlich durch langsamere Ausscheidung des Tracers aus dem Blut und folglich verringerte Auswaschung aus dem Tumorgewebe. Beide Konstrukte sind daher den unmodifizierten Fab-Fragmenten erheblich überlegen.

Die weitere Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens, durch Fusion mit 400 bzw. 600 PAS-Resten, führte zur Verlängerung der Zirkulationsdauer der Fab-Fragmente im Blut vergleichbar mit der ABD-Fusion (Schlapschy *et al.*, 2013). Wie erwartet, bewirkte in diesem Fall die hohe Radioaktivität im Blut 24 h p.i. zu einem verringerten Tumor-zu-Blut-Verhältnis, welches mit einem schlechten Kontrast in der *In-Vivo*-Bildgebung einherging (**Abb. 38**).

Da das Fab-PAS<sub>200</sub> Format in den vorangehenden Experimenten im wesentlichen beste Tumoraufnahme und Kontrast in der Bildgebung gezeigt hatte, wurden mit diesen Konstruktsereien fortlaufender statischer PET Bilder nach 6, 24 und 120 h p.i. aufgenommen, um die Verteilung sowohl für  $\alpha$ HER2 als auch  $\alpha$ CD20 über die Zeit mittels PET-Bildgebungs- und Biodistributionsexperimenten zu verfolgen (**Abb. 39**).

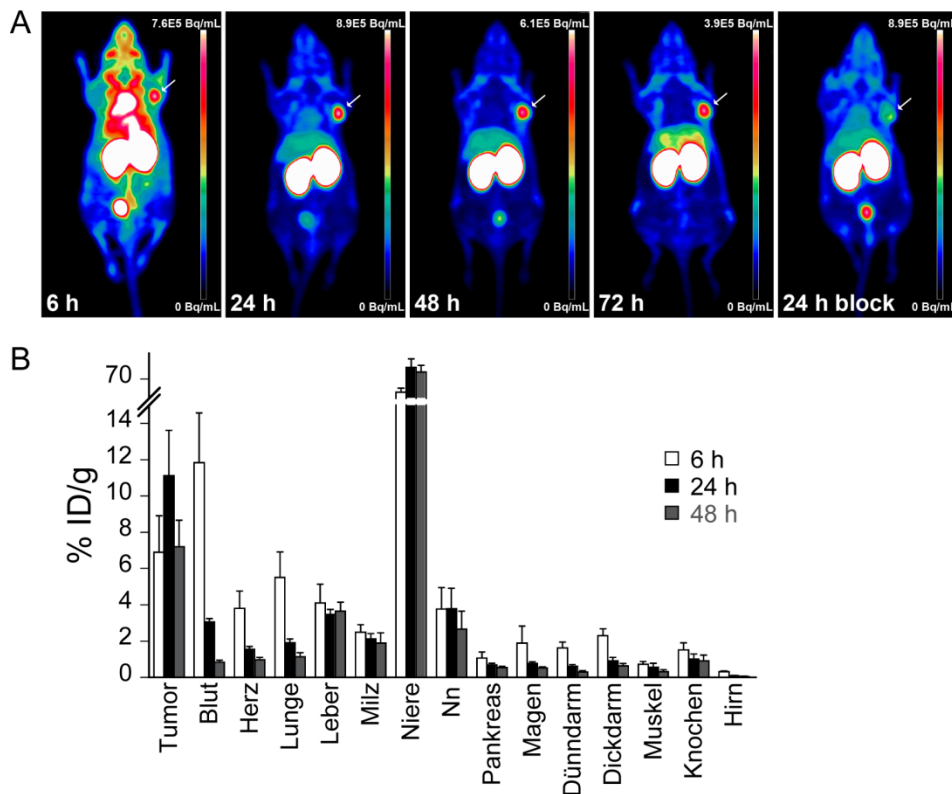


**Abb. 39. Evaluierung des Fab-PAS<sub>200</sub> Formats als radioaktiver Tracer.** Fortlaufende PET-MIP Bilder von CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäusen mit s.c. HER-positiven (SK-BR-3) (**A,C**) und CD20-positiven (Granta) (**B,D**) Tumoren wurden nach Injektion von <sup>124</sup>I-Fab-PAS<sub>200</sub> zu Zeitpunkten 6, 24 und 120 h p.i. aufgenommen. Um die Tumoraufnahme zu blockieren, wurde 0,56 mg Trastuzumab oder Rituximab je einmal 24 h vor und gleichzeitig mit dem radioaktiv markierten Fab-Fragment injiziert, worauf 24 h später die PET-Bildgebung erfolgte. Die Pfeile zeigen die Position der HER2- und CD20-positiven Tumoren. Die Iodtaufnahme in der Schilddrüse wurde nicht blockiert. Die Biodistributionsexperimente (**C, D**) zeigen den prozentualen Anteil der injizierten Dosis pro Gramm (% ID/g) für  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 <sup>125</sup>I-Fab-PAS<sub>200</sub> nach 6, 24 und 48 h (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n=5).

Für beide Tracer wurde in diesem Experiment ein sehr guter Bildkontrast und keine unspezifische Anreicherung in anderen Organen beobachtet, mit Ausnahme der Schilddrüse 24 h p.i. Selbst 120 h p.i. konnten die Tracer noch im Tumor detektiert werden. Die Target-Blockade mit einer 1.000-fachen Menge an Trastuzumab bzw. Rituximab führte zu einer starken Reduktion der Tumoraufnahme, wodurch die biomolekulare Targetspezifität beider Fab-Fragmente bestätigt wurde.

Eine zudem durchgeführte Biodistributionsanalyse 6, 24 und 48 h p.i. zeigte weiterhin, dass die maximale Tumoraufnahme bereits 6 h p.i. erreicht war und beide  $\alpha$ HER2- und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente 24 h p.i. fast komplett aus Blut und normalem Gewebe ausgeschieden waren (**Abb. 39**).

Um den Einfluss des verwendeten Radionuklids auf die Pharmakokinetik des  $\alpha$ HER2-Tracers Fab-PAS<sub>200</sub> zu untersuchen, wurden weitere *In-Vivo*-PET-Bildgebungs- und Biodistributionsexperimente mit dem <sup>89</sup>Zr-markierten Fab-Fragment in CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäusen mit HER2-positiven Xenografts durchgeführt. Hierfür wurden statische MIP PET-Bilder 6, 24, 48 und 72 h p.i. aufgenommen, um die Verteilung des Tracers über die Zeit zu verfolgen. Wie erwartet, war der optimale Bildkontrast nach 24 h erreicht, vergleichbar mit dem radio-iodierten Konstrukt und eine stabile Tumoraufnahme bis zu 72 h p.i. war zu beobachten (**Abb. 40**).



**Abb. 40. PET-Kinetik und Biodistribution von  $\alpha$ HER2 <sup>89</sup>Zr•Df-Fab-PAS<sub>200</sub>.** (A) Fortlaufende PET-MIP Bilder von CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäusen mit s.c. HER2-positiven (SK-BR-3) Xenograft Tumoren wurden 6, 24, 48 und 72 h p.i. aufgenommen. Um die Tumoraufnahme zu blockieren, wurde 0,56 mg Trastuzumab je 24 h vor und gleichzeitig mit dem radioaktiv markierten Fab-Fragment injiziert, worauf 24 h später die PET-Bildgebung erfolgte. Die Pfeile zeigen die Position der HER2-positiven Tumore. (B) Biodistributionsexperimente. Der prozentuale Anteil der injizierten Dosis pro Gramm (% ID/g) ist für  $\alpha$ HER2 <sup>89</sup>Zr•Df-Fab-PAS<sub>200</sub> nach 6, 24 und 48 h aufgetragen (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n=5). Nn, Nebenniere.

Im Unterschied zum radio-iodierten Konstrukt zeigte das mit <sup>89</sup>Zr markierte Fab-Fragment allerdings eine höhere Nierenaufnahme. Diese Beobachtung bestätigt den bereits für das radio-iodierte Konstrukt postulierten renalen Ausscheidungsweg. Das Radiometall <sup>89</sup>Zr ist im Gegensatz zu <sup>124</sup>I/<sup>125</sup>I

allerdings nicht in der Lage, nach Internalisierung im proximalen Tubulus die Zellen wieder zu verlassen (Behr *et al.*, 1998; Dennis *et al.*, 2007). Wie bereits für die radio-iodierten Fab-Fragmente beobachtet werden konnte, führte auch hier die Target-Blockade mit einer 1000-fachen Menge an Trastuzumab zu einer starken Reduktion der Tumoraufnahme von  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df-Fab-PAS}_{200}$  (**Abb. 40A**).

Um die Verteilung der mit  $^{125}\text{I}$ - und  $^{89}\text{Zr}$ -markierten  $\alpha\text{HER2}$  Fab-PAS<sub>200</sub> Tracer direkt vergleichen zu können, wurden Dualtracer-Experimente in CD1-Foxn1<sup>nu</sup> Mäusen mit HER2-positiven Tumoren durchgeführt. Dadurch konnten Variationen durch Unterschiede z.B. in der individuellen Ausscheidungskinetik und Tumorgroße ausgeglichen werden (**Tabelle 13**). Im Gegensatz zum radio-iodierten Tracer war die maximale Tumoraufnahme von  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df-Fab-PAS}_{200}$  erst nach 24 h erreicht und lag mit 11,1 % ID/g zudem deutlich höher (**Abb. 40**).

*Tabelle 13: Biodistribution von  $^{125}\text{I}$ - und  $^{89}\text{Zr}$ -markierten  $\alpha\text{HER2}$  Fab-PAS<sub>200</sub> gemessen als Dualtracer Experiment*

| [% ID/g]            | $^{89}\text{Zr-Fab-PAS}_{200}$ |           |            |           | $^{125}\text{I-Fab-PAS}_{200}$ |           |            |           |
|---------------------|--------------------------------|-----------|------------|-----------|--------------------------------|-----------|------------|-----------|
|                     | 6 h                            | 24 h      | 24 h block | 48 h      | 6 h                            | 24 h      | 24 h block | 48 h      |
| <b>Tumor</b>        | 6,89±2,02                      | 11,1±1,73 | 3,11±0,35  | 7,19±1,46 | 3,21±0,68                      | 2,33±0,25 | 0,33±0,06  | 2,06±0,40 |
| <b>Blut</b>         | 11,84±2,73                     | 3,05±0,19 | 2,55±0,53  | 0,82±0,13 | 4,56±1,06                      | 0,53±0,04 | 0,52±0,10  | 0,27±0,05 |
| <b>Herz</b>         | 3,79±0,97                      | 1,55±0,15 | 1,40±0,39  | 0,96±0,14 | 1,38±0,34                      | 0,15±0,01 | 0,16±0,05  | 0,07±0,01 |
| <b>Lunge</b>        | 5,50±1,41                      | 1,90±0,20 | 1,58±0,31  | 1,13±0,23 | 2,25±0,50                      | 0,28±0,04 | 0,28±0,05  | 0,18±0,05 |
| <b>Leber</b>        | 4,11±1,03                      | 3,45±0,29 | 2,96±0,69  | 3,65±0,48 | 1,06±0,29                      | 0,13±0,01 | 0,12±0,02  | 0,11±0,02 |
| <b>Milz</b>         | 2,48±0,41                      | 2,10±0,30 | 1,36±0,78  | 1,88±0,56 | 1,18±0,22                      | 0,12±0,01 | 0,14±0,02  | 0,10±0,03 |
| <b>Niere</b>        | 49,4±6,6                       | 88,3±12,8 | 70,7±14,3  | 80,7±10,4 | 3,87±1,07                      | 0,38±0,09 | 0,34±0,06  | 0,18±0,03 |
| <b>Nebenniere</b>   | 3,76±1,18                      | 3,77±1,12 | 2,26±0,28  | 2,65±0,99 | 1,11±0,43                      | 0,17±0,03 | 0,16±0,03  | 0,09±0,04 |
| <b>Pankreas</b>     | 1,06±0,32                      | 0,68±0,09 | 0,63±0,18  | 0,52±0,09 | 0,90±0,13                      | 0,09±0,01 | 0,11±0,04  | 0,04±0,01 |
| <b>Magen</b>        | 1,87±0,95                      | 0,76±0,09 | 0,62±0,15  | 0,51±0,05 | 3,12±1,22                      | 0,21±0,06 | 0,28±0,18  | 0,08±0,01 |
| <b>Dünndarm</b>     | 1,61±0,32                      | 0,62±0,08 | 0,63±0,17  | 0,29±0,07 | 0,89±0,14                      | 0,09±0,01 | 0,10±0,02  | 0,04±0,01 |
| <b>Dickdarm</b>     | 2,28±0,38                      | 0,91±0,18 | 0,88±0,24  | 0,62±0,13 | 0,59±0,09                      | 0,08±0,02 | 0,09±0,03  | 0,05±0,01 |
| <b>Muskel</b>       | 0,72±0,16                      | 0,55±0,23 | 0,47±0,09  | 0,30±0,11 | 0,41±0,11                      | 0,05±0,02 | 0,06±0,00  | 0,02±0,01 |
| <b>Knochen</b>      | 1,52±0,38                      | 1,01±0,27 | 0,84±0,20  | 0,91±0,32 | 0,61±0,13                      | 0,06±0,01 | 0,07±0,01  | 0,03±0,01 |
| <b>Gehirn</b>       | 0,30±0,05                      | 0,09±0,01 | 0,07±0,01  | 0,04±0,01 | 0,13±0,02                      | 0,01±0,00 | 0,01±0,00  | 0,01±0,00 |
| <b>Schilddrüse</b>  | 2,88±0,55                      | 1,52±0,14 | 1,03±0,33  | 0,90±0,17 | 366±49                         | 673±318   | 461±138    | 1412±710  |
| <b>Tumor/Blut</b>   | 0,6                            | 3,6       | 1,2        | 8,8       | 0,7                            | 4,4       | 0,6        | 7,8       |
| <b>Tumor/Muskel</b> | 9,6                            | 20        | 6,7        | 24        | 7,8                            | 43        | 5,3        | 101       |

Zu diesem Zeitpunkt war der Tracer bereits weitgehend aus Blut und normalem Gewebe ausgeschieden, wodurch sehr gute, mit dem radio-iodierten Tracer vergleichbare Verhältnisse von Tumor-zu-Blut und Tumor-zu-normalem-Gewebe erreicht wurden. Geringere Traceraufnahme gegenüber der Aktivität im Blut zeigten alle Organe mit Ausnahme der Niere (88 % ID/g, 24 h p.i.), Nebenniere (2,7 % ID/g), Leber (3,7 % ID/g) und Milz (1,9 % ID/g) zu späteren Zeitpunkten (48 h p.i.). Für die Demetallierung bzw. den Abbau von  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df-Fab-PAS}_{200}$  ist der Fettstoffwechsel in der Leber

der Mäuse verantwortlich (Hosseinimehr *et al.*, 2012). Während das Abbauprodukt  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df}$  rasch über die Niere ausgeschieden wird, bindet freies  $^{89}\text{Zr}$  an Plasmaproteine (Abou *et al.*, 2011).

Die biomolekulare Targetspezifität von  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df}\cdot\text{Fab}\cdot\text{PAS}_{200}$  wurde in den Dualtracer-Biodistributionsexperimenten in CD1-*Foxn1*<sup>nu</sup> Mäusen mit HER2-positiven Xenografts wie oben beschrieben durch Target-Blockade mit Trastuzumab bestätigt. Dabei wurde eine 3,3-fache Verringerung der Tumoraufnahme für  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df}\cdot\text{Fab}\cdot\text{PAS}_{200}$  ( $p < 0.001$ ) im Vergleich mit den nicht blockierten Tumoren 24 h p.i. beobachtet.

Abschließend betrachtet konnte durch die moderate Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit der  $\alpha\text{HER2}$  bzw.  $\alpha\text{CD20}$  Fab-Fragmente eine signifikante Verbesserung sowohl der absoluten Tumoraufnahme als auch des Tumor-zu-Blut-Verhältnisses im Vergleich zu den unmodifizierten Fab-Fragmenten erreicht werden. Zudem führte die Radiomarkierung mit  $^{89}\text{Zr}$  zu einer besseren *in vivo* Stabilität und 5-fach höheren Tumoraufnahme von 11 %ID/g für  $\alpha\text{HER2}$  Fab- $\text{PAS}_{200}$  im Vergleich mit der radio-iodierten Variante.

## 4 Diskussion

### 4.1 Funktionelle Markierung von Anticalinen

Das kleine robuste Format der Anticaline, welches aus nur einer Polypeptidkette besteht, bietet gegenüber mAKs und deren Fragmenten diverse Vorteile, sowohl während der Proteinproduktion als auch bei der *In-Vivo*-Bildgebung. So können Anticaline kostengünstig in *E. coli* produziert und leicht mittels *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie (SAC) in einem Schritt gereinigt werden. Ihre geringe Molmasse von ca. 21 kDa bewirkt zudem die rasche renale Ausscheidung aus Blut und normalem Gewebe, wodurch hoher Kontrast in der *In-Vivo*-Bildgebung bereits wenige Stunden nach Tracerinjektion erreicht werden kann. Allerdings erfordert die radioaktive Markierung der Anticaline den Einsatz von neuen Methoden zur ortsspezifischen Funktionalisierung. Da in der Vergangenheit konventionelle unspezifische Markierungsverfahren, wie die Iodierung von Tyr-Resten und Kopplung über Aminogruppen, meist zu Affinitätsverlust führten, wurden in dieser Arbeit zwei neue Ansätze für die ortgerichtete Einführung einer Aldehydgruppe in das Proteinstrukturgerüst von Anticalinen zur anschließenden Kopplung mit Aminoxy- oder Hydrazin-Reagenzien evaluiert.

#### 4.1.1 Einführung einer N-terminalen Aldehydfunktion mittels Periodat-Oxidation

Die Fähigkeit von Periodat, benachbarte Diolgruppen zu oxidieren ist schon lange bekannt und wurde zuerst 1928 von Léon Malaprade entdeckt (El-Mahdi & Melnyk, 2013). Mit Hilfe der sogenannten Malaprade-Reaktion, auch als Periodat-Oxidation bekannt, kann im Prinzip selektiv am N-Terminus eines Proteins eine Aldehydfunktion eingeführt werden (Gaertner & Offord, 1996). Hierzu wird ein N-terminaler Serin- oder Threonin-Rest durch Periodat unter Abspaltung von Formaldehyd/Acetaldehyd unter Ausbildung einer Aldehydgruppe am Polypeptid oxidiert, während Periodat zu Iodat reduziert wird. Bislang wurde diese Methode allerdings meist für die Einführung von Aldehyd- oder Ketogruppen in Polysaccharide und Glykoproteine wie mAKs unter Oxidation benachbarter Diolgruppen in den Zuckerresten verwendet (Fukuda, 2001; Kurth *et al.*, 1993).

Ein weiteres Anwendungsgebiet für die Periodat-Oxidation stellt die spezifische Anreicherung von Peptid-Fragmenten mit N-terminalem Serin/Threonin zur Analyse mittels LC-MS/MS dar (Yao *et al.*, 2015). Die Peptide wurden dabei mit Na-Periodat oxidiert, mit Hydrazin-Reagenzien umgesetzt und im Anschluss mittels LC-MS/MS analysiert.

Die Oxidation von Proteinen oder Peptiden mit N-terminalen Serin- oder Threonin-Resten hingegen konnte sich bisher für die ortsspezifische Funktionalisierung und Markierung noch nicht durchsetzen, vor allem da es nicht trivial ist, biosynthetische Proteine mit solchen Aminosäuren am N-Terminus auszustatten (Spears & Fascione, 2016). Daher wurden bislang in der Literatur hauptsächlich Peptide



oder Proteine durch Periodat oxidiert und konjugiert, welche natürlicherweise bereits einen N-terminalen Serin- oder Threonin-Rest tragen. Einen guten Überblick hierzu gibt ein Review-Artikel von El-Mahdi & Melnyk (2013). Ist dies nicht der Fall, so müssen die Proteine entsprechend mittels Protein-Design verändert werden. Um das gegen den Tumor- und Angiogenesemarker ED-B gerichtete Anticalin N7A (Gebauer *et al.*, 2013) mit N-terminalem Serin auszustatten, wurde es mit der N-terminale Signalsequenz OmpA versehen. Durch Deletion der ersten vier Aminosäurereste nach der Signalsequenz war der nächste Aminosäure-Rest Serin. Auf diese Weise konnte das Anticalin dann, nach Translokation ins Periplasma und Abspaltung der Signalsequenz, mit N-terminalem Serin ohne Funktionsverlust produziert werden. Die erfolgreiche Oxidation des N-terminalen Serinrestes mit Periodat zu der Aldehydfunktion wurde durch die anschließende Kopplung des Anticalins mit Aminoxy-Alexa488 mit Kopplungsausbeuten >98 % nachgewiesen. Nach der Behandlung mit Periodat zeigte das Protein keine Anzeichen für Abbau oder Aggregation, wie die Analysen mittels SEC und SDS-PAGE ergaben. Allerdings führte die chemische Modifizierung zu einer deutlich reduzierten Target-Affinität von Alexa488- $\Delta$ QDST.N7A gegenüber dem unbehandelten Protein.

Der Affinitätsverlust nach Periodat-Oxidation und Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff kann zum einen durch die neue Gruppe am N-Terminus von N7A erklärt werden. Die Kristallstruktur von N7A (Gebauer *et al.*, 2013) zeigt, dass der N-Terminus des Anticalins sehr nahe an der kelchartigen Bindungstasche positioniert ist. Hier kann es zu einer sterischen Interferenz des konjugierten N-Terminus durch entropisch begünstigte Einlagerung des kleinen hydrophoben Fluoreszenzfarbstoffs Alexa488 in die Bindungstasche kommen, wodurch die Bindung des Targetmoleküls Fn7B8 blockiert wird. Weiterhin können durch die Behandlung mit Periodat neben der N-Terminale Aminosäure im Prinzip noch weitere Seitenketten oxidiert werden, wodurch die Funktionalität des Anticalins beeinträchtigt werden kann. Da Anticaline keine freien Cysteine enthalten, sind vor allem Methioninreste betroffen (Mikolajczyk *et al.*, 1994), wohingegen Histidin, Tyrosin und Tryptophan weniger reaktiv sind. Zudem ist bei neutralem pH, wie hier verwendet, die Oxidation des N-Terminus bevorzugt (Geoghegan & Stroh, 1992). In der Literatur wurde bei anderen Proteinen ebenfalls eine Reduktion der Affinität durch Periodat-Oxidation beobachtet. So führte beispielsweise die Oxidation von Interleukin 8, welches natürlicherweise ein N-terminales Serin enthält, und Kopplung mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu einer 10-fach schlechteren Rezeptor-Affinität (Alouani *et al.*, 1995).

Zusammengenommen war die Einführung der Aldehydfunktion in das Proteinstrukturgerüst der Anticalinen mit Hilfe der Periodat-Oxidation demnach erfolgreich. Aufgrund des Affinitätsverlusts, war dieser Ansatz zur Funktionalisierung des Anticalins N7A für die *In-Vivo*-Bildgebung allerdings nicht zielführend. Durch Protein-Design kann die hier etablierte Methode der Periodat-Oxidation

jedoch auf andere tumorspezifische Bindeproteine, deren N-Terminus abseits der Bindungstasche liegt, übertragen werden.

#### 4.1.2 Ortsspezifische Markierung von Anticalinen mittels des Aldehyd-Tags

Um eine funktionelle ortsspezifische Markierung von Anticalinen zu erreichen, wurde in einem zweiten Ansatz die Einführung einer Aldehydfunktion mit Hilfe des sogenannten Aldehyd-Tags evaluiert (Carrico *et al.*, 2007). Da die enzymatische Umsetzung von Cystein zu fGly bereits intrazellulär posttranslational stattfindet, treten keine chemischen Nebenreaktionen wie bei der Periodat-Oxidation auf. Außerdem kann die Aldehydfunktion im Prinzip an verschiedenen Positionen innerhalb der Polypeptidkette eingeführt werden, wodurch ein Affinitätsverlust, wie er speziell bei der N-terminalen Modifizierung von Anticalinen zu befürchten ist, verhindert werden kann. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Position und Länge der enzymatischen Erkennungssequenz für das Aldehyd-Tag (Carrico *et al.*, 2007) sowie der Produktionsbedingungen in *E. coli* auf Kopplungseffizienz und Target-Affinität des ED-B-spezifischen Anticalins N7A (Gebauer *et al.*, 2013) untersucht.

Der Nachweis einer erfolgreichen Einführung der Aldehydfunktion wurde wiederum indirekt durch die Kopplung mit Aminoxy- und Hydrazin-Reagenzien erbracht. Dies setzte allerdings eine quantitative Umsetzung der fGly-Funktion voraus, was stark von den chemischen Kopplungsbedingungen wie Konzentration der Reagenzien, Temperatur und Zeit abhängig ist und daher in Vorexperimenten optimiert wurde. Wie bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte (Carrico *et al.*, 2007) liegt die tatsächliche fGly-Generierung vermutlich auch hier über der experimentell nachgewiesenen Kopplungsausbeute.

##### Einfluss der Produktionsbedingungen

Da die Aldehydfunktion bereits während der Proteinproduktion im Cytoplasma von *E. coli* eingeführt wird, haben die Bedingungen während der Genexpression entscheidenden Einfluss auf die Generierung von fGly. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese unter anderem von Temperatur, Zeit und Wahl des Expressionsstamms abhängig war. Durch die Reduktion der Temperatur kommt es zu einer verlangsamten Translationsgeschwindigkeit. Dies führt zu einer längeren Kontaktzeit des Genprodukts mit seiner Erkennungssequenz mit dem FGE, wodurch mehr Zeit für die Umsetzung von fGly vorhanden ist. Eine Verlängerung der Expressionszeit führte ebenfalls zu einer längeren Kontaktzeit des Enzyms mit der Peptidsequenz, wodurch für das gesamte Protein N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* eine Steigerung der fGly-Generierung von 42 % auf eine beinahe quantitative Umsetzung mit bis zu 80 % erreicht werden konnte. Auch die Verwendung eines Expressionsstamms mit oxidierendem cytoplasmatischem Milieu, wie *E. coli* Origami B, ist für eine hohe fGly-Umsetzung entscheidend. Gegenüber der Produktion in *E. coli* JM83, mit einem

reduzierenden cytoplasmatischen Milieu, konnte durch die Verwendung von Origami B als Expressionsstamm die fGly-Generierung und damit die Kopplungseffizienz mit AO-Alexa488 um den Faktor 2,5 gesteigert werden.

#### Einfluss der Erkennungssequenz

Zudem wurde eine starke Abhängigkeit der fGly-Umsetzung sowohl von Position als auch der Länge der Erkennungssequenz beobachtet. Die 14 Aminosäuren umfassende Version wurde sowohl C- als auch N-terminal von FGE erkannt und mit vergleichbaren Kopplungseffizienzen von ca. 50 % zu fGly umgesetzt. Dieses Resultat steht im Einklang mit der Literatur, wo vergleichbare oder sogar etwas schlechtere Kopplungseffizienzen erreicht wurden. So wurde beispielsweise für die Kopplung der Sulfotransferase aus *M. smegmatis* und des Maltose-Bindeproteins mit Aminooxy-PEG eine Kopplungseffizienz <50 % mittels SDS-PAGE bestimmt (Carrico *et al.*, 2007).

Die aus acht Aminosäuren bestehende verkürzte Version am C-Terminus konnte hingegen nicht und die entsprechende N-Terminale Fusion nur mit geringer Effizienz von 36 % mit den Kopplungsreagenz AO-Alexa488 umgesetzt werden. Die schlechtere fGly-Generierung in dem verkürzten Aldehyd-Tag kann durch fehlende Interaktionen mit FGE erklärt werden, welche in der langen Tag-Variante zusätzlich vorhanden sind und dadurch die Bindung von FGE an die Peptidsequenz verbessern. Ein kürzeres Aldehyd-Tag scheint allerdings nicht generell zu einer schlechteren Generierung von fGly zu führen, da Carrico *et al.* (2007) einen sehr hohen fGly-Anteil von 99 % für das C-terminal modifizierte Maltosebindeprotein mit einem bloß sechs Aminosäuren langen Aldehyd-Tag bestehend mit der Sequenz LCTPSR nachweisen konnten (Carrico *et al.*, 2007; Sletten & Bertozzi, 2009).

#### Target-Affinität

Neben einer möglichst hohen Kopplungseffizienz ist der Erhalt der Bindungsaktivität des Anticalins zum Target ED-B für eine erfolgreiche Anwendung in der *In-Vivo*-Bildgebung entscheidend. Wie bereits bei der Periodat-Oxidation beobachtet, führte auch hier die Kopplung des kleinen Fluoreszenzmoleküls AO-Alexa488 an den N-Terminus von N7A zu einer verringerten Affinität gegenüber Fn7B8, wenn auch weniger drastisch um den Faktor fünf. Der flexible Aldehyd-Tag mit dem gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff ist wahrscheinlich in der Lage, durch Bindung in die Ligandentasche des Anticalins dessen Bindung an das Targetmolekül zu blockieren. Die Modifikation des C-Terminus von N7A, welcher weiter von der Bindungstasche entfernt ist, wurde in den Konstrukten N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* und N7A-*StreptII*-ald<sub>14</sub> hingegen sehr gut toleriert und führte zu keiner nennenswerten Reduktion der Target-Affinität. Insbesondere stellte sich die Variante N7A-ald<sub>14</sub>-*StreptII* mit einer hohen Kopplungseffizienz von bis zu 80 % bei gleichzeitigem Erhalt der biomolekularen Target-Affinität als optimal heraus.

Durch einfache Umklonierung der *BstXI*-Genkassette ist es nach dem Baukastenprinzip möglich, den biomolekularen Aufbau von N7A-ald<sub>14</sub>-*StrepII*, bestehend aus der Anticalinsequenz, dem 14 Aminosäuren langen Aldehyd-Tag und dem *Strep*-tag II, auf Anticaline mit anderen Target-Spezifitäten zu übertragen. Mit Hilfe des hier etablierten Verfahrens können daher im Prinzip unterschiedliche Anticaline ortsspezifisch ohne Aktivitätsverlust für die *In-Vivo*-Bildgebung funktionalisiert und radioaktiv markiert werden (vergleiche Abschnitt 3.2.3).

Da die Aldehyd-Funktion bereits während der Produktion eingeführt wird, ist kein zusätzlicher chemischer Modifizierungsschritt notwendig. Weiterhin sind viele Reagenzien mit Aminoxy- oder Hydrazin-Gruppen für die bioorthogonale Kopplung kommerziell verfügbar bzw. lassen sich relativ einfach chemisch synthetisieren (Hovinen, 2006). Diese Verbindungen sind unter physiologischen Bedingungen sehr stabil und eignen sich daher gut für *in vivo* Applikationen (Kalia & Raines, 2008).

#### 4.1.3 Einbau der FGE-Erkennungssequenz in die Sekundärstruktur von Anticalinen

Im Gegensatz zu der künstlich in das rekombinante Protein angehängten FGE-Erkennungssequenz des Aldehyd-Tags befindet sich die natürliche Konsensus-Sequenz von Typ I Sulfatasen innerhalb der Proteinsequenz (Selmer *et al.*, 1996). Um den Funktionsverlust durch Wechselwirkung des ggf. konjugierten Aldehyd-Tags mit der Bindungstasche zu verhindern, wurde das Kernmotiv (CxPxR) der Sulfatasesequenz auch in die Sekundärstruktur der Anticaline eingeführt. Basierend auf der Kristallstruktur von N7A (Gebauer *et al.*, 2013) wurde dabei drei sterisch günstige Positionen in den Schleifenregionen des Anticalins abseits der Ligandentasche ausgewählt (s. Abschnitt 3.1.5).

Für alle drei in *E. coli* produzierten Varianten wurde ein hoher Anteil an unlöslichem Protein sowie starke Aggregatbildung nach der *Strep*-Tactin Affinitätschromatographie (SAC) beobachtet, was vermutlich auf den nicht quantitativ zu fGly umgesetzten Thiolrest in der Erkennungssequenz zurückzuführen war, welcher unphysiologische Disulfidbrücken ausbilden kann. Weiterhin zeigte keines der untersuchten Konstrukte eine Kopplung mit Aminoxy-Alexa488, was ebenfalls für eine unzureichende enzymatische Generierung von fGly spricht. Anders als in der Literatur beschrieben, genügt das Kernmotiv offenbar nicht, um von FGE erkannt und effektiv modifiziert zu werden (Rush & Bertozzi, 2008).

Für die weitere Optimierung wurde die Variante N7A.B ausgewählt, welche die Aminosäure-Austausche hinsichtlich Target-Affinität und Proteinausbeute am besten tolerierte. Die Erkennungssequenz war hier zwischen den strukturell konservierten  $\beta$ -Faltblatt-Strängen D und E mit dem Cystein-Rest an Position 87 eingeführt worden. Das humane Lipocalin 2 besitzt an Position 87 ebenfalls einen freien Cysteinrest (Goetz *et al.*, 2002; Schiefner & Skerra, 2015), welcher allerdings zuvor für die Herstellung der Zufallsbibliothek zu Serin mutiert worden war (Gebauer *et al.*, 2013).

Mittels Sättigungsmutagenese wurden nun die Positionen vor und nach Cys87 in N7A.B randomisiert. Im nachfolgenden Screening-ELISA konnten einige Varianten mit verbesserter fGly-Generierung im Vergleich zu N7A.B identifiziert werden.

Die Sequenzanalyse dieser Varianten ergab eine Präferenz für hydrophobe Aminosäuren an den randomisierten Positionen. Die häufigste Aminosäure an Position 86 war Valin, gefolgt von Serin und Leucin. Leucin ist im natürlichen Sulfatasemotiv von *Mycobacterium tuberculosis* (AtsG) ebenfalls vor dem konservierten Cysteinrest positioniert (Carrico *et al.*, 2007). Auch Position 88 zeigte eine klare Präferenz für Leucin (50 %), gefolgt von Prolin, Valin und Serin, wohingegen in der natürlichen Sequenz an dieser Stelle die Aminosäure Threonin vorkommt. Varianten, welche keine Verbesserung im Vergleich zu N7A.B zeigten, tragen hingegen meist geladene oder polare Aminosäuren. Daher war vermutlich unter anderem die hydrophile Seitenkette Gln Position 88 in N7A.B für die schlechte fGly-Generierung verantwortlich. Eine ausführliche Charakterisierung der besten Anticalin-Variante N7A.2B3 bleibt zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

Um die Spezifität des FGE aus *M. tuberculosis*, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, zu untersuchen, führten (Rush & Bertozzi, 2008) Alanin-Mutationen in das Sulfatasemotiv ein. Jeweils ein Aminosäurerest der Erkennungssequenz wurde zu Alanin mutiert, und anschließend wurde die Bildung von fGly untersucht. Überraschenderweise zeigte *M. tuberculosis* FGE eine hohe Toleranz für die Alanin-Mutationen. Um einen besseren Einblick in Wechselwirkungen zwischen FGE und Peptidsubstrat (CTPSR) zu erhalten, wurde ein Homologie-Modell von *M. tuberculosis* FGE basierend auf der Kristallstruktur des Enzyms aus *S. coelicolor* generiert. Im Vergleich zur FGE-Struktur von *S. coelicolor* ist die Bindungstasche bei *M. tuberculosis* offener, wodurch ein größeres Spektrum an Peptidsubstraten toleriert wird (Rush & Bertozzi, 2008; Carlson *et al.*, 2008). Dies erklärt einerseits die gute Toleranz der Alanin-Mutationen und andererseits die Präferenz von Leucin nach dem konservierten Cystein-Rest (CLPGR) bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Optimierungsexperiment. Im Vergleich zu Threonin in der natürlichen Erkennungssequenz ist Leucin vermutlich besser in der Lage, die Bindungstasche in FGE aus *M. tuberculosis* auszufüllen.

Abschließend betrachtet ist N7A.2B3 mit der Erkennungssequenz SCLPGR ein vielversprechender Kandidat für die ortsspezifische Funktionalisierung von Anticalinen. Durch die maßgeschneiderte Erkennungssequenz innerhalb der Anticalinstruktur wird die biologische Funktion kaum beeinträchtigt. Zudem stellt N7A.2B3 einen guten Ausgangspunkt für die weitere Optimierung der fGly-Generierung mit Hilfe der erfolgreich etablierten *Screening*-Methode dar. Dafür bietet sich Gly 90 oder weitere Positionen im Bereich des Hilfsmotivs an. Andererseits kann natürlich auch die Generierung von fGly durch Optimierung des FGE selbst z.B. mittels Zufallsmutagenese, verbessert werden.

## 4.2 Optimierung ED-B spezifischer Anticaline für die *In-Vivo*-Bildgebung

Für den Einsatz in der *In-Vivo*-Bildgebung und ggf. Tumorthherapie sind kleine und robuste Tracer-Formate gegenüber den mAK mit ihrer langen Verweildauer in Blut und Gewebe bevorzugt. Aufgrund ihrer geringen Größe von ungefähr 21 kDa werden Anticaline sehr schnell aus dem Blut und normalen Geweben ausgeschieden, wodurch rasch ein guter Bildkontrast erreicht werden kann.

### 4.2.1 Affinitätsmaturierung der Anticaline N7A und N7E

Target-Affinität und Bindungskinetik spielen eine wichtige Rolle bei der Tumor-Aufnahme/Ausscheidung wie auch Biodistribution, insbesondere wenn kleine Tracer-Moleküle verwendet werden (Schmidt & Wittrup, 2009). Weiterhin begünstigt eine lange Halbwertszeit des Antigen•Tracer-Komplexes die Anreicherung im Tumor, indem das Auswaschen nach Absinken der Serumkonzentration als Resultat renaler Ausscheidung verlangsamt wird (Mendler *et al.*, 2015a). Daher wurde in dieser Arbeit die Target-Affinität der Anticaline N7A und N7E, welche unterschiedliche Epitope innerhalb der ED-B von onkofetalem Fibronectin auf der Tumor-Neovaskulatur erkennen, mittels (semi)-rationaler Affinitätsmaturierung verbessert. Der Fokus lag dabei neben der Dissoziationskonstante  $K_D$  auf der Verringerung der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation,  $k_{off}$ , um eine lange Verweildauer des Anticalins im Tumor-Gewebe zu begünstigen.

Die Kristallstruktur im Komplex mit dem Fragment Fn7B8 diente als Ausgangspunkt für die Affinitätsmaturierung von N7A durch rationales Protein-Design (Gebauer *et al.*, 2013). Die Maturierung des Anticalins N7E wurde hingegen mittels *Directed Evolution*, gefolgt von *E. coli* *Surface-Display* (Trumpfheller, 2013) und rationaler Mutagenese durchgeführt. Die resultierenden Anticalin-Varianten N7A.19 bzw. N7E.107 zeigten beide sehr gute Bindungseigenschaften mit Dissoziationskonstante im unteren picomolaren Bereich. Dabei war N7E.107 mit einer 64-fach längeren Komplexhalbwertszeit von 7,2 d gegenüber N7A.19 mit 2,7 h aus kinetischer Sicht deutlich überlegen.

Eine publizierte vergleichende Studie mit radio-iodierten  $\alpha$ HER2 scFv-Fragmenten mit variierenden Dissoziationskonstanten von 15 pM bis 320 nM in einem SK-OV-3 Maus Tumor-Xenograft-Modell zeigte den Vorteil verbesserter Target-Affinität von solch kleinen Tracer-Proteinen (Adams *et al.*, 2001). Biodistributionsanalysen deuteten in diesem Fall darauf hin, dass die quantitative Tumoranreicherung ab einer Target-Affinität von 1 nM ein Plateau erreichte. Extrem hohe Affinitäten von 15 pM führten sogar zu einer verringerten Tumorpenetration, was durch die bevorzugte Sättigung von Antigenbindestellen, die den Blutgefäßen nächstgelegenen sind, erklärt wurde. Da das Molekulargewicht von scFvs mit ungefähr 28 kDa nur wenig höher als das der Anticaline ist, liegen

die Dissoziationskonstanten, welche in dieser Arbeit erreicht wurden, in einem optimalen Bereich für das Tumor-Targeting. Zudem wird das Target ED-B auf neugebildeten Blutgefäßen während der Tumor-Angiogenese exprimiert (Castellani *et al.*, 1994), was gute Zugänglichkeit der Bindestellen gewährleistet.

In der Literatur sind verschiedene Ansätze für die Affinitätsmaturierung diverser Proteinstrukturgerüste – Affibodies, DARPins, scFvs oder Antikörper – welche tumor-spezifische Antigene erkennen, beschrieben (Friedman *et al.*, 2008; Lamdan *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2013; Zahnd *et al.*, 2007). Friedman *et al.* (2008) verwendete *Directed Evolution* für die Affinitätsmaturierung von Affibodies, welche den epidermalen Wachstumsfaktor EGFR binden. Phage-Display gefolgt von einem Screening-ELISA ergaben Binder mit einer 30-fachen Verbesserung der Affinität im unteren nanomolaren Bereich. Zufallsmutagenese und Ribosome-Display wurde für die Maturierung von HER2-spezifischen DARPins angewendet (Zahnd *et al.*, 2007). Mit dieser Methode konnte eine Dissoziationskonstante von 90 pM mit einer Verbesserung insgesamt um den Faktor 3.000 erreicht werden. Dieser kam allerdings hauptsächlich durch eine 500-fach Verbesserung der Assoziationskonstante zustande. Eine 18-fach erhöhte Target-Affinität konnte für ein gegen VEGF gerichtetes scFv mittels Phage-Display erreicht werden (Lamdan *et al.*, 2013). Im Vergleich zu diesen Befunden aus der Literatur konnten für die ED-B spezifischen Anticaline N7A.19 und N7E.107 in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bemerkenswerte Verbesserungen hinsichtlich Target-Affinität (Faktor 120/230) wie auch kinetischer Stabilität des Anticalin•Fibronektin Komplexes (Faktor 300/430) erzielt werden.

#### **4.2.2 Funktionelle Markierung und *in vitro* Charakterisierung von N7E.107**

Neben der Target-Affinität ist die ortsspezifische Funktionalisierung der Anticaline entscheidend für einen erfolgreichen Einsatz in der *In-vivo*-Bildgebung. Die bereits für N7A etablierte ortsgerechte Markierung mit Hilfe des C-terminalen Aldehyd-Tags (s. Abschnitt 3.1.4) konnte erfolgreich auf die N7E-Variante N7E.107 übertragen werden. Sehr gute Kopplungsausbeuten von >90 % wurden sowohl für Aminooxy(AO)-Alexa488 als auch für AO-CHX<sup>2</sup>-DTPA erreicht. Im Anschluss wurde das Anticalin DTPA-N7E.107-ald<sub>14</sub> ohne Funktionsverlust radioaktiv mit <sup>177</sup>Lu markiert und die spezifische Bindung von <sup>177</sup>Lu•DTPA-N7E.107-ald<sub>14</sub> auf ED-B positiven Caco2-Tumorzellen nachgewiesen (IC<sub>50</sub> von 19,4 nM). Die Immunfluoreszenz-Färbung mit Alexa488-N7E.107-ald<sub>14</sub> zeigte ebenfalls eine spezifische Färbung der EZM von Caco2-Tumorzellen.

Bisher wurde für die klinische Bildgebung von ED-B vor allem das humane scFv Fragment L19 (Pini *et al.*, 1998) in unterschiedlichen Formaten eingesetzt. Die radiomarkierte Version des sogenannten SIP-Formats von L19, <sup>131</sup>I-L19SIP (Radretumab, Philogen), wurde bereits in klinischen Studien der

Phasen I und II (Poli *et al.*, 2013) für die Radioimmuntherapie mit  $^{131}\text{I}$  in Patienten mit unterschiedlichen Tumortypen wie Prostata-Krebs (Locher *et al.*, 2014) oder NHL (Sauer *et al.*, 2009) evaluiert. Da Anticaline ebenfalls schnell aus dem Blut und normalen Gewebe ausgeschieden werden, bietet diese Tracer-Format die Möglichkeit, hohen Bildkontrast innerhalb weniger Stunden nach der Injektion des Tracers zu erhalten. Das Anticalin N7E wurde bereits als diagnostischer Tracer für Glioblastome *in vitro* evaluiert (Albrecht *et al.*, 2016). Daher stellt dessen funktionalisierbare Version N7E.107-ald<sub>14</sub> einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die ortsspezifische Konjugation mit geeigneten Radiochelatoren zur *In-Vivo*-Bildgebung und Tumorthherapie dar.

### 4.3 Fab-Fragmente mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit in der *In-Vivo*-Bildgebung

Für die klinische *In-Vivo*-Bildgebung sind funktionelle Fab-Fragmente aufgrund ihrer schnellen Ausscheidung und guten Tumorpenetration vielversprechende Tracer-Formate gegenüber den deutlich größeren mAK (Holliger & Hudson, 2005; Kenanova & Wu, 2006). Während scFvs, die kleinsten stabilen Ig-Fragmente, wegen ihrer einkettigen Zusammensetzung als von rekombinante Proteinen leichter zu produzieren sind, zeigen diese allerdings oft eine Tendenz zur Oligomerisierung (Skerra *et al.*, 1991; Škerlova *et al.*, 2014), was meist zu inhomogenen Proteinpräparationen mit variierender Molekülgröße und Target-Avidität führt. Fabs hingegen haben deutliche Vorteile in Bezug auf höhere Proteinstabilität, was zu einer Reihe von biopharmazeutischen Produkten geführt hat (Nelson & Reichert, 2009). Hierzu gehören u.a. die von der FDA oder EMA für *Single-Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) zugelassenen Agenzien  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Arcitumomab (CEA-Scan; (Goldenberg *et al.*, 1997),  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sulesomab (LeukoScan; (Gratz *et al.*, 2003) und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Bectumomab (LymphoScan; (Lamonica *et al.*, 2002).

Im Vergleich zu den mAK haben Fabs eine deutlich kürzere Plasma-Halbwertszeit (ungefähr um einen Faktor 30 im Menschen) durch das Fehlen von FcRn-vermitteltem Recycling (Roopenian & Akilesh, 2007) und ihrer kleineren Größe, wodurch die renale Ausscheidung beschleunigt wird (Binder & Skerra, 2015). Eine kürzere Zirkulation wird generell als vorteilhaft für die *In-vivo*-Bildgebung erachtet, da dies zu einer besseren Tumor/Gewebe-Penetration sowie zu einem schnelleren Abfall der Hintergrundaktivität im Blut führt. Andererseits neigen die monovalenten Fabs, welche nicht wie bivalente mAK von einem Aviditätseffekt profitieren, dazu, schnell aus dem Tumorgewebe ausgewaschen zu werden, wenn deren Serumkonzentration sinkt. Dieser Umstand ist für eine geringere Tumoraufnahme im Vergleich zu mAK mit ihrer sehr langen Zirkulationsdauer verantwortlich. Folglich ist neben der Antigen-Affinität ein Zusammenhang mit der molekularen Größe und Zirkulationsdauer eines Protein-Tracers für dessen effizientes Tumor-Targeting von



Bedeutung (Schmidt & Wittrup, 2009). Eine kürzlich durchgeführte Analyse (Schmidt & Wittrup, 2009; Wittrup *et al.*, 2012) von Literaturdaten verschiedener Radiotracer für die Tumor-Bildgebung oder -Therapie zeigte, wie dass die molekulare Größe eines Radiokonjugats im Verhältnis zur Antigen-Affinität dessen Tumor-Targeting-Eigenschaften beeinflusst. Während die Affinität direkt mit der Tumorakkumulation korreliert, hat der Moleküldurchmesser unterschiedliche Effekte auf Parameter wie kapillaren Austritt aus dem Blut, Diffusion durch das Tumor-Interstitium, zugängliches Verteilungsvolumen im Tumor und insbesondere die Zirkulationsdauer. Erstaunlicherweise sagt ein theoretisches Tumor-Targeting-Modell die geringste Tumoraufnahme für Agenzien von mittlerer Größe mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa vorher, wohingegen kleinere Moleküle deutlich schneller im Tumor akkumulieren sollte. mAK hingegen profitieren vom sogenannten EPR-Effekt, der besagt, dass große Moleküle generell im Tumorgewebe auch ohne spezifische Interaktion akkumulieren (Iyer *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2010). Im Einklang mit diesen Überlegungen können die Tumor-Targeting-Eigenschaften von Protein-Tracern mittlerer Größe verbessert werden, indem ihre molekularen Dimensionen vergrößert werden, was mit einer Zunahme der Plasma-Halbwertszeit einhergeht.

#### **4.3.1 Einfluss der Plasma-Halbwertszeit auf Pharmakokinetik und Tumoraufnahme**

In dieser Arbeit wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften von  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmenten durch Verlängerung ihrer Plasma-Halbwertszeit mittels PASylierung verbessert. Die PASylation-Technologie stellt ein ideales Werkzeug für derlei Zwecke dar, da die Zunahme der molekularen Größen und die dadurch verringerte renale Ausscheidung durch einfache genetische Fusion der PAS Polypeptidsequenz mit dem rekombinanten Fab erreicht werden kann (Schlappschy *et al.*, 2013). Die Möglichkeit, den Parameter Plasma-Halbwertszeit zu optimieren, indem PAS-Tags verschiedener Länge verwendet werden, ohne dabei die Target-Affinität des Fabs zu beeinflussen, erlaubte es, den Zusammenhang zwischen Zirkulationsdauer, Molekülgröße und Tumor-zu-Blut-Verhältnis direkt zu evaluieren.

Erstaunlicherweise zeigten PET und Biodistributionsstudien aller untersuchten  $\alpha$ HER2- und  $\alpha$ CD20-Fabs mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit keine unerwünschte Anreicherung der Tracer in normalem Gewebe. Dies beweist das biologisch inerte Verhalten der PAS-Polypeptide und bestätigt die Eignung der PASylierung für die *In-vivo*-Bildgebung.

Besonders die Formate Fab-PAS<sub>100</sub> und Fab-PAS<sub>200</sub>, welche PAS-Tags von mittlerer Länge tragen, zeigten hier exzellente Tumor-zu-Blut-Verhältnisse und stellen dadurch vielversprechende Tracer für klinische Anwendungen dar. Ihre Spezifität für die Tumorantigene HER2 und CD20 wurde durch Blockadeexperimente mit Trastuzumab und Rituximab überprüft. Als weitere Kontrolle diente das

Fab-Fragment IN1, dessen neuronales Antigen NogoA für Antikörper und deren Fab-Fragmente in der Maus nicht zugänglich ist.

Die nichtmodifizierten  $\alpha$ HER2- und  $\alpha$ CD20-Fabs zeigten eine rasche Ausscheidung und Auswaschung aus dem Tumorgewebe, was für kleine Proteine mit einer kurzen Plasma-Halbwertszeit von 1,3 h zu erwarten war (Schlupschy et al., 2013). Durch Fusion der Fab-Fragmente mit PAS-Sequenzen variabler Länge konnte die Plasma-Halbwertszeit schrittweise verlängert werden. Wie erwartet nahm die Zirkulationsdauer mit steigender Polymerlänge zu, so dass eine Korrelation der Plasma-Halbwertszeit mit der Tumoraufnahme wie bereits für PEGylierte Proteine beschrieben bestätigt werden konnte (Zahnd et al., 2010; Delgado et al., 1996). In dieser Arbeit wurde eine maximale Tumoraufnahme 24 h p.i. für Fab-PAS<sub>400</sub> mit einem hydrodynamischen Volumen von 451 kDa und einer Plasma-Halbwertszeit von ca. 14 h in Mäusen beobachtet. Eine weitere Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens durch die Fusion mit 600 PAS-Resten führte dagegen trotz einer Plasma-Halbwertszeit von 28 h zu keiner weiteren Steigerung der Tumoraufnahme 24 h p.i. Dafür ist wahrscheinlich eine reduzierte Penetration des Tumorgewebes bei einem hydrodynamischen Volumen von 691 kDa verantwortlich.

Das vergleichend untersuchte Fab-ABD zeigte zwar ein gutes Tumor-zu-normalem-Gewebe Verhältnis, allerdings war die Albumin-Bindung auch für hohe Radioaktivität im Blut verantwortlich, was folglich zu einem schlechten Tumor-zu-Blut-Verhältnis führte. Im Vergleich zu Fab-PAS<sub>600</sub> besitzt die ABD Fusion eine ähnliche Plasma-Halbwertszeit (29 h), allerdings scheint die deutlich kleinere Molekülgröße (ohne Albumin) in einer höheren Tumorakkumulation zu resultieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorangegangenen Studien, in welchen ein Albumin-bindendes Peptid mit dem Trastuzumab Fab 4D5 fusioniert wurde (Dennis *et al.*, 2007). Dieses Verhalten kann aber auch durch das bekannte Phänomen erklärt werden, dass Albumin selbst vom Tumor aufgenommen wird, vermutlich um dessen Versorgung mit Nährstoffen sicherzustellen (Stehle *et al.*, 1997).

Interessanterweise zeigte eine Studie mit dem  $\alpha$ HER2-Affibody <sup>114m</sup>In-CHX-A"-DTPA-ABD-(Z<sub>HER2:342</sub>)<sub>2</sub> in einem LS174T Xenograft-Modell ein ähnliches Biodistributionsmuster wie Fab-ABD mit 14,5 % ID/g im Tumor und 12,6 % ID/g im Blut 18 h p.i. (Tolmachev *et al.*, 2009). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das Tumor-Targeting von Albumin bindenden Tracern nur teilweise von den Eigenschaften der eigentlichen Antigen-spezifischen Komponente abhängig ist. Dies steht auch im Einklang mit der unzureichenden Blockade von <sup>125</sup>I-Fab-ABD mit einem Überschuss an nicht-markiertem Trastuzumab, die hier in den Kontrollexperimenten beobachtet wurde.

Publizierte Experimente mit dem PEGylierten  $\alpha$ HER2 scFv (4D5-PEG20) in SK-OV-3 Tumor Xenografts zeigten, dass die Tumoraufnahme durch Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit auch mit Hilfe eines

von Albumin unabhängigen biophysikalischen Prinzips erreicht werden kann (Kubetzko *et al.*, 2006). Allerdings führte dies zu einem deutlich geringeren Tumor-zu-Blut-Verhältnis 24 h p.i. verglichen mit dem unmodifizierten Protein-Tracer. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in dieser Arbeit untersuchten Fab-Fragmente mit besonders langer Plasma-Halbwertszeit von  $\geq 14$  h, also Fab-PAS<sub>400</sub> und Fab-PAS<sub>600</sub> (s. Abschnitt 3.3.3).

Umgekehrt wurden deutlich verbesserte Tumor-zu-Blut-Verhältnisse für Fab-PAS<sub>100</sub> (24 h p.i.) und Fab-PAS<sub>200</sub> (48 h p.i.) im Vergleich mit den nicht-modifizierten  $\alpha$ CD20 und  $\alpha$ HER2 Fab-Fragmenten beobachtet. Folglich stellt eine Plasma-Halbwertszeit in Mäusen von 2,7 h oder 5,2 h – bei einer apparenten Molmasse von 117 kDa bzw. 219 kDa – für Fab-PAS<sub>100</sub> bzw. Fab-PAS<sub>200</sub> eine günstige Kombination zwischen Tracer-Größe und Zirkulationsdauer für die *In-vivo*-Bildgebung dar. Tatsächlich führte das vergrößerte hydrodynamische Volumen und die dadurch leicht erhöhte Zirkulationszeit zu einer 3-fachen (HER2) und 12-fachen (CD20) erhöhten Tumoraufnahme und zu einer 2-fachen Verbesserung des Tumor-zu-Blut-Verhältnisses für Fab-PAS<sub>100</sub> (24 h p.i.) bzw. 2- bis 4-fach für Fab-PAS<sub>200</sub> (48 h p.i.) bei HER2- und CD20-positiven Tumoren.

Interessanterweise lag das hydrodynamische Volumen der größeren Fusionsproteine im Bereich von mAK, ohne jedoch die Tumoraufnahme zu behindern. Diesbezüglich muss beachtet werden, dass sich PASylierte Proteine nicht exakt wie gefaltete globuläre Proteine, beispielsweise Albumin oder mAK, verhalten. Die dynamisch ungeordnete Struktur der schlanken linearen PAS-Polypeptide gewährt dagegen verbesserte Diffusionseigenschaften in einer beengten Umgebung, vergleichbar mit PEG (Schlapschy *et al.*, 2013). Folglich kommt vor allem für die PAS-Fusionen mittlerer Länge (PAS<sub>100/200</sub>) der Effekt der verlängerten Plasma-Halbwertszeit – und somit verlängerter Kontaktzeit mit dem Tumor, was andauernde Tumoraufnahme erlaubt – zum Tragen. Tatsächlich zeigte  $\alpha$ HER2 Fab-PAS<sub>200</sub> weiter zunehmende Tumorakkumulation zwischen 24 h und 48 h, was vermutlich durch die Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgradienten zwischen Blutplasma und Tumor über einen längeren Zeitraum resultierte, wie bereits in anderen Studien diskutiert (Dennis *et al.*, 2007; Kubetzko *et al.*, 2006). Daher erscheint dieses Format (Fab-PAS<sub>100/200</sub>) geeignet für klinische Anwendungen, in dem damit in Abhängigkeit vom optimalen Zeitpunkt für die Bildgebung sowohl ein verbessertes Tumor-zu-Blut-Verhältnis als auch höhere Tumoraufnahme zu erzielen ist.

#### **4.3.2 Vergleich mit anderen Tracer-Molekülen für HER2 und CD20**

Andere Typen von Bindeproteinen, welche gegen HER2 als Target gerichtet sind, lieferten Ergebnisse, die mit den Befunden dieser Arbeit im Einklang stehen. Biodistributionsexperimente mit <sup>111</sup>In-DOTA-F(ab')<sub>2</sub>-Herceptin und <sup>111</sup>In-DOTA-Herceptin zeigten beispielsweise hohe Tumoraufnahme von 20 % ID/g bzw. 31 % ID/g 24 h p.i. in Mäusen mit HER2-positiven BT-474 Tumoren (Smith-Jones *et al.*,

2004). Trotz der generell höheren Tumoraufnahme, welche vermutlich durch die ausgeprägte Molekülgröße und die Verwendung eines Radiometals (*Residualizing Tracer*) anstelle Iod erklärt werden können, wurden in der vorliegenden Arbeit bessere Tumor-zu-Blut-Verhältnisse von 5,3 für das unmodifizierte Fab und sogar 12,2 für Fab-PAS<sub>100</sub> erreicht, verglichen mit 3,4 für Trastuzumab bzw. 10 für das entsprechende F(ab')<sub>2</sub>.

Der für CD20 spezifische mAK <sup>99m</sup>Tc/<sup>188</sup>Re(CO)<sub>3</sub>-RTX (Rituximab) zeigte demgegenüber bloß geringe Tumoranreicherung von 0,8 bis 2,7 % ID/g (24 h p.i.), abhängig vom Radionuklid, in Mäusen mit Ramos-Lymphom-Xenografts sowie niedriges Tumor-zu-Blut-Verhältnis von 0,5 (Dias *et al.*, 2011). Divalente scFv-Fusionsproteine abgeleitet von Rituximab (<sup>124</sup>I-Minibody) lieferten hingegen eine deutlich höhere Tumorakkumulation von 13 % ID/g und ein Tumor-Blut-Verhältnis von 4,8 (21 h p.i.) bei Verwendung der murinen B-Zell Lymphom-Zelllinie 38C13, die mit humanem CD20 transduziert war, in einem Xenograft-Modell (Olafsen *et al.*, 2009; Olafsen *et al.*, 2010). Die hier analysierten monomeren αCD20 Fab-Fragmente Fab-PAS<sub>100</sub> und Fab-PAS<sub>200</sub> ergaben zwar geringere absolute Tumoraufnahme, aber deutlich bessere Verhältnisse von Tumor-zu-Blut und Tumor-zu-normalem-Gewebe 24 h p.i. Dies führte zu in einem hohen Bildkontrast mit Tumor-zu-Blut-Verhältnissen von 4 bis 8.

Die in der Literatur beschriebenen mit <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-markierten und gegen HER2 gerichteten Protein-Tracer scFv4D5 und scFv4D5-PEG20 eignen sich mit ihren Plasma-Halbwertszeiten von 1,1 bzw. 13 h in Mäusen (Kubetzko *et al.*, 2006) für einen Vergleich mit dem unmodifizierten Fab (1,3 h) bzw. Fab-PAS<sub>400</sub> (14 h) und ermöglichen somit die direkte Gegenüberstellung von PASylierung und PEGylierung. Die PEGylierung der scFv-Fragmente führte zu einer 5-fach erhöhten Tumoraufnahme von 1,7 % ID/g (scFv) auf 9,3 % ID/g (scFv-PEG20) 24 h p.i. In dieser Arbeit wurde dagegen für Fab-PAS<sub>400</sub> (6-7 % ID/g) verglichen mit dem unmodifizierten Fab-Fragment eine 9- (HER2) bis 26-fache (CD20) Erhöhung der Tumoraufnahme beobachtet. Tumor-zu-Blut-Verhältnisse waren sowohl für das scFv-PEG20 Fragment (4-fach) als auch für Fab-PAS<sub>400</sub> (4,5-fach) reduziert.

In weiteren Studien mit PEGylierten HER2-positiven DARPins konnte ein ähnlicher Trend aufgrund Zunahme der Molekülgröße mittels PEGylierung in einem SK-OV-3 Maus Xenograft-Modell beobachtet werden (Zahnd *et al.*, 2010). Dabei führte die Konjugation mit PEG20k zu einer 1,6 bis 5-fachen Verbesserung der Tumoraufnahme in Abhängigkeit von der Target-Affinität der untersuchten DARPins, aber auch zu verringerten Tumor-zu-Blut-Verhältnissen. Daher zeigen PEGylierung und PASylierung vergleichbare Effekte auf Tumoraufnahme der Tracer für die *In-Vivo*-Bildgebung im Einklang mit den vergleichbaren biophysikalischen Eigenschaften beider Polymere und dem dadurch resultierenden Effekt auf Molekülgröße und Zirkulationsdauer (Schlapschy *et al.*, 2013).

Bemerkenswerterweise wurde eine moderate Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit im Bereich von 2 bis 14 h bisher nicht untersucht. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Verlängerung der Zirkulationsdauer um einen Faktor 2-3, verglichen mit dem unmodifizierten rekombinanten Fab, zu einem deutlich verbesserten Tumor-zu-Blut-Verhältnis führt wie für Fab-PAS<sub>100</sub> (24 h p.i.) und Fab-PAS<sub>200</sub> (48h p.i.) beobachtet. Diese positiven Effekte auf den Bildkontrast wurden in den vorhergehenden Studien mit PEGylierten Proteinen offenbar übersehen, da hier nur sehr große PEG-Polymere (20, 40 oder 60 kDa) untersucht wurden (Kubetzko *et al.*, 2006; Zahnd *et al.*, 2010). PAS-Polypeptide von 100-200 Resten würden jedoch einer PEG-Kette von 5-10 kDa hinsichtlich molekularer Größe und verringerter renaler Ausscheidung entsprechen. Demzufolge ist für effektives Tumor-Targeting und hohen Bildkontrast eine moderate Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens des Protein-Tracers entscheidend, um ein Optimum zwischen Plasmakonzentration, Zirkulationsdauer, Gewebepenetration und Tumoraufnahme zu erzielen.

Im Vergleich zur PEGylierung, welche die chemische Modifizierung mit einem synthetischen Polymer mit vorgegebener Größe und Polydispersität mit sich bringt, ergibt die PASylierung ein einheitliches Protein Produkt. Da hier keine chemischen Kopplungsschritte notwendig sind, bleibt die biologische Aktivität oder Affinität der Proteine, wie für das  $\alpha$ HER2 Fragment gezeigt, erhalten (Schlapschy *et al.*, 2013). Dies ermöglicht ganz allgemein die schnelle Generierung von verbesserten Fab-Reagenzien, ausgehend von humanisierten Antikörpern, um andere krankheitsrelevante Targets für die *In-Vivo*-Bildgebung zu adressieren, wobei im Prinzip eine bereits klinisch erprobte Klasse von Protein-Tracern ausgenutzt wird. Darüber hinaus scheint die PASylierung die *in vivo* Stabilität der radiomarkierten Fabs zu verbessern, da Fab-PAS<sub>200</sub>, Fab-PAS<sub>400</sub> und Fab-PAS<sub>600</sub> eine geringere Akkumulation von freiem Iod in der Schilddrüse zeigten, was als Indikator für Proteolyse, Dehalogenierung und Metabolismus gilt (Boswell *et al.*, 2013).

#### 4.3.3 Einfluss des Radionuklids auf die *in vivo* Biodistribution

Als weiterer Parameter wurde der Einfluss des verwendeten Radionuklids auf die pharmakokinetischen Eigenschaften und *in vivo* Verteilung des  $\alpha$ HER2 Fab-PAS<sub>200</sub> untersucht. Sowohl das mit <sup>124</sup>I/<sup>125</sup>I als auch das mit <sup>89</sup>Zr markierte Fab-Fragment zeigte eine spezifische Anreicherung in HER2-positiven Tumoren, wie durch *in vivo* Blockadeexperimente verifiziert wurde. PET-Bildgebungsexperimente zeigten zudem in beiden Fällen – bei <sup>89</sup>Zr wie auch bei <sup>123/124/125</sup>I – einen hohen Kontrast 24 h p.i. und ausgezeichnete Verhältnisse von Tumor-zu-Blut und Tumor-zu-normalem-Gewebe, im Einklang mit Dualtracer-Biodistributionsanalysen (s. Abschnitt 3.3.3).

Außerhalb des Xenograft-Tumors wurde Anreicherung für das <sup>89</sup>Zr-markierte Fab-PAS<sub>200</sub> in Niere, Leber und Milz und für das <sup>124/125</sup>I-markierte Fab-PAS<sub>200</sub> in Schilddrüse und Magen beobachtet. Dies

ist auf das unterschiedliche chemische Verhalten der jeweiligen Radionuklide zurückzuführen und kann durch *in vivo* Mechanismen der Demetallierung einerseits und Deiodierung andererseits erklärt werden (Hosseinimehr *et al.*, 2012). Die Nierenaufnahme des  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Fabs ist ein Hinweis auf dessen renale Exkretion, trotz einer Molekülgröße welche im Prinzip die glomeruläre Porengröße übersteigen sollte (Schlapschy *et al.*, 2013). Aus dem Primärfiltrat wird das Protein dann sehr wahrscheinlich im proximalen Tubulus reabsorbiert und durch Endozytose, vermittelt durch Rezeptoren wie Megalin und Cubulin, oder auch durch Pinozytose internalisiert (Vegt *et al.*, 2010). In den Lysosomen wird der Proteinanteil daraufhin abgebaut, und die Aminosäuren werden in den Blutkreislauf abgegeben, wohingegen das  $\text{Zr}\bullet\text{Df}$ -Lysin/Peptid (bzw. das unkomplexierte, unter physiologischen Bedingungen unlösliche Metall-Ion) in den Lysosomen akkumuliert. Monoiodotyrosin, das Abbauprodukt radioiodierter Proteine, hingegen kann die Zellen rasch wieder verlassen und wird in der Schilddrüse aufgenommen oder schlussendlich mit dem Urin ausgeschieden (Shih *et al.*, 1994).

Interessanterweise zeigen  $^{89}\text{Zr}$ -markierte mAK keine so ausgeprägte Nierenaufnahme, was vermutlich ihrer enormen Größe und dem bevorzugten Ausscheidungsweg über die Leber zuzuschreiben ist (Meijs *et al.*, 1997; Dijkers *et al.*, 2010). Im Vergleich mit dem  $^{89}\text{Zr}$ -markierten Fab-PAS<sub>200</sub> besitzen andere kleine Proteintracer wie der mit  $^{111}\text{In}$ -markierte  $\alpha\text{HER2}$  Affibody DOTA-Z<sub>HER2:342-pep2</sub> eine noch höhere Nierenakkumulation von >200 % ID/g (24 h p.i.), obgleich eine Beteiligung des Megalin/Cubulin-Rezeptorsystems durch Verwendung entsprechender *knock-out* Mäuse ausgeschlossen werden konnte (Altai *et al.*, 2013). Andererseits lag die Nierenaufnahme des hinsichtlich der molekularen Größe näher verwandten HER2-spezifischen  $^{111}\text{In}$  DOTA-F(ab')<sub>2</sub> mit ca. 65 % ID/g, 24 h p.i. (Smith-Jones *et al.*, 2004) in einem vergleichbaren Bereich wie das monovalente PASylierte  $^{89}\text{Zr}$ -markierte Fab-PAS<sub>200</sub>.

In dieser Arbeit wurden zwei prinzipiell verschiedene Methoden zur Radiomarkierung von Proteinen verglichen. Die direkte radiochemische Markierung mit  $^{124/125}\text{I}$  ist eine schnelle, einfache Methode, welche die Target-Affinität in der Regel wenig beeinflusst. Da Fab-Fragmente auch abseits der Bindungstasche zahlreiche Tyrosinreste besitzen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein für die Target-Affinität essentieller Tyrosinrest modifiziert wird, gering. Vergleichbare Ergebnisse wurden für die indirekte, chelatvermittelte Markierung mit dem Radiometall beobachtet. Hier wurde die Kopplung mit dem Chelator Df über Aminogruppen des Fab-Fragments vor der eigentlichen radioaktiven Markierung mit  $^{89}\text{Zr}$  durchgeführt. Auch diese Modifizierung erfolgte unter milden Bedingungen, wodurch Protein-Integrität und Target-Affinität erhalten blieben. Da der Protein-Anteil für die PASylierten  $^{89}\text{Zr}$ - und  $^{124/125}\text{I}$ -markierten Fab-Fragmente jeweils identisch ist, war ein ähnliches Verhalten beider Tracer *in vivo* zu erwarten. Daher sollten sich Unterschiede in den relativen Signalen von Tumor und Organen – wie Niere und Leber – lediglich aus den unterschiedlichen Wegen der

biochemischen Metabolisierung der beiden Radionuklide ergeben. Zudem wurden in diesen Experimenten keine Reagenzien zur Blockade der Schilddrüse oder Niere – wie beispielsweise Lugol's Lösung, Irenat [Bayer Schering Pharma], oder Gelofusine [B. Braun] (Vegt *et al.*, 2010) – verabreicht, um einen unverfälschten Vergleich der Biodistribution beider Tracer zu erhalten.

In Maus PET-Experimenten (s. Abschnitt 3.3.3) zeigte das mit  $^{124}\text{I}/^{125}\text{I}$ -markierte Fab-PAS<sub>200</sub> eine schnelle Ausscheidung aus dem Blutplasma und daher ein hohes Tumor-zu-Blut-Verhältnis 24 h p.i., welches mit der nicht-verweilenden Natur der Radionuklide  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$  und  $^{125}\text{I}$  in Einklang steht. Freies Iodid, welches nach Dehalogenierung von iodierten Protein-Tracern im Blutplasma oder nach deren Internalisierung und lysosomalem Abbau auftritt, wird über den Natrium/Iodid-Symporter (Darrouzet *et al.*, 2014) in der Schilddrüse akkumuliert und stellt eine Strahlenbelastung für dieses Organ dar. Für klinische Anwendungen kann jedoch die Anreicherung von  $^{124}\text{I}/^{125}\text{I}$  durch die Verabreichung von Natriumperchlorat blockiert werden (Reiners & Schneider, 2013).

$^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df}$ -Fab-PAS<sub>200</sub> zeigte im direkten Vergleich mit dem iodierten Tracer eine verlängerte Verweilzeit im Plasma, welche auf höhere Tracerstabilität hindeutet. Die Bindung von  $^{89}\text{Zr}$ -Phosphat an Plasmaproteine kann ebenfalls die beobachtete erhöhte Aktivität des Tracers im Blut erklären. Umgekehrt wird das iodierte Fab-Fragment durch Deiodasen im Blutplasma deiodiert (Mendler *et al.*, 2015b), was zur kürzeren Verweilzeit im Blut beiträgt. Bemerkenswerterweise wurde für das  $^{89}\text{Zr}$ -Label gegenüber dem  $^{125}\text{I}$ -Label eine 5-fach erhöhte Tumoraufnahme 24 h p.i. in der Biodistributionsmessung festgestellt. Dies ist vermutlich auf den Umstand zurückzuführen, dass  $^{89}\text{Zr}\cdot\text{Df}$  nach Internalisierung in den Tumorzellen verbleibt. Dennoch zeigten beide Tracer trotz der leicht unterschiedlichen Pharmakokinetik vergleichbar hohe Tumor-zu-Blut-Verhältnisse und einen guten Kontrast in der Bildgebung 24 h p.i.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus früheren Studien, welche die Unterschiede zwischen "verweilenden" und "nicht verweilenden" Radionukliden untersuchten. Beispielsweise zeigt eine Arbeit mit  $^{111}\text{In}$ - oder  $^{125}\text{I}$ - markierten anti-CEA scFv-Fc Fusionsproteinen ebenfalls eine höhere Tumoraufnahme des Radiometall-Tracers (Kenanova *et al.*, 2007). Weiterhin ergaben Experimente mit dem gegen Hals/Kopf-Plattenepithelkarzinom-gerichteten chimären Antikörper U36, welcher entweder mit  $^{89}\text{Zr}$  oder mit  $^{124}\text{I}$  markiert war, eine signifikant höhere Aufnahme in Tumor und Leber für  $^{89}\text{Zr}$  (Verel *et al.*, 2003). In einer ähnlichen vergleichenden Studie mit  $^{89}\text{Zr}$ - und  $^{124}\text{I}$ -markierten Versionen des anti-PSMA Minibody A11 in Mäusen mit PSMA-positiven Xenograft-Tumoren, wurde zudem höhere Tumoranreicherung für das verweilende Radiometall beobachtet, wohingegen ein besseres Tumor-zu-Blut-Verhältnis für den  $^{124}\text{I}$ -markierten Minibody festgestellt wurde.

Zusammenfassend betrachtet, wurden für die zwei unterschiedlich markierten  $\alpha$ HER2 Fab-PAS<sub>200</sub> Tracer mit ihrer optimierten Plasma-Halbwertszeit in Abhängigkeit von der Chemie der verwendeten Radioisotope verschiedene Verteilungsprofile *in vivo* beobachtet. Das <sup>89</sup>Zr-markierte Fab-PAS<sub>200</sub> und das <sup>124</sup>I-Fab-PAS<sub>200</sub> zeigten vergleichbar hohe Tumor-zu-Blut-Verhältnisse und einen hohen Kontrast in der PET-Bildgebung 24 h nach Injektion. Allerdings erscheint aufgrund der besseren *in vivo* Stabilität und der signifikant höheren Tumoraufnahme das <sup>89</sup>Zr•Df-Fab-PAS<sub>200</sub> als bevorzugter Tracer für die Translation in die Klinik.

#### 4.3.4 Potential von $\alpha$ HER2 und $\alpha$ CD20 Fab-PAS<sub>200</sub> für Tumordiagnostik und Therapie

Neben Biodistributionsstudien in Mausmodellen (Tinianow *et al.*, 2010) wurde <sup>89</sup>Zr-Trastuzumab bereits in Patienten mit metastasierendem Brustkrebs (Laforest *et al.*, 2016, Dijkers *et al.*, 2010, Dijkers *et al.*, 2009) getestet. Diese Studien zeigen das Potential der nicht-invasiven Bildgebung hinsichtlich des HER2-Status in Patienten begleitend zu einer Brustkrebstherapie. Folglich sollte die klinische Anwendung eines Protein-Tracers basierend auf dem diesem Antikörper entstammenden Fab-Fragment relativ einfach erreichbar sein. Tatsächlich wurde der beste Bildkontrast für <sup>89</sup>Zr•Df-Bz-SCN-Trastuzumab in Mäusen mit HER2-positivem BT474M1 Xenograft erst nach 96–144 h p.i. erreicht (Tinianow *et al.*, 2010), was durch die lange Plasma-Halbwertszeit des Antikörpers und die damit verbundene lange Abklingzeit im Blut zu erklären ist (Wu & Senter, 2005).

Im Vergleich zu dem mit <sup>89</sup>Zr markierten kompletten mAK Trastuzumab ist es möglich, mit unserem PASylierten Fab dank seiner maßgeschneiderten Plasma-Halbwertszeit bereits 24 h p.i. Immuno-PET Bildgebung mit einem hohen Bildkontrast durchzuführen. Neben den qualitativen Aspekten der *In-Vivo*-Bildgebung führen hohe Hintergrundsignale und damit verbundene Exposition von gesundem Gewebe zudem oftmals zu Nebenwirkungen und sind daher auch meist dosislimitierend im Falle einer RIT. In der vorliegenden Studie konnte tatsächlich beinahe vergleichbare Tumoraufnahme für das PASylierte Fab (11 % ID/g) wie für den analog markierten mAK Trastuzumab (15.8 % ID/g) (Tinianow *et al.*, 2010) erreicht werden. Folglich kann durch Optimierung der Pharmakokinetik an sich die geringe Tumoraufnahme eines kleinen konventionellen Fab-Fragments – mit rascher Ausscheidung aus dem Blutplasma – auf ein vergleichbares Niveau wie bei einem mAK angehoben werden, während gleichzeitig hohes Tumor-zu-Blut-Verhältnis erreicht wird und darüber hinaus der Vorteil einer einfacheren Produktion in einem bakteriellen Wirtsorganismus gegeben ist.

Das  $\alpha$ CD20 Fab-PAS<sub>200</sub> Konstrukt sollte sich dementsprechend für die nicht-invasive Überwachung von B-Zell Lymphomen und Metastasen sowohl in verschiedenen Tiermodellen als auch im Menschen eignen. Hinsichtlich klinischer Anwendungen kann der Tracer für die Überwachung des Therapieansprechens, die Diagnostik von erneutem Auftreten von Metastasen oder Tumoren



(Rezidiv) wie auch die RIT eingesetzt werden. Die Bildgebung von CD20 exprimierenden Zellen kann weiterhin für die Detektion von "B-Zell Kompartimenten" in experimentellen oder pathologischen Studien verwendet werden, wie beispielsweise nach B-Zell depletierender Therapie in Rheumatoider Arthritis (Scher, 2012), Multipler Sklerose (Hauser *et al.*, 2008) und systemischem Lupus erythematodes (Looney *et al.*, 2004).

Abschließend betrachtet bietet die Technologie der PASylierung die Möglichkeit, die Plasma-Halbwertszeit durch Vergrößerung des hydrodynamischen molekularen Volumens bzw. der apparenten Molmasse von Proteinen direkt zu steuern und somit die pharmakokinetischen Parameter eines Tracers systemisch zu optimieren. In dieser Arbeit konnte die hervorragende Eignung der PASylierung für die *In-Vivo*-Bildgebung im Tiermodell demonstriert werden, da Fab-Fragmente mit moderat verlängerter Zirkulationszeit mit 100 und 200 PAS-Polymerresten sowohl eine verbesserte Tumoraufnahme als auch erhöhte Tumor-zu-Blut-Verhältnisse zeigten. Diese Eigenschaften ermöglichten die Aufnahme von PET-Bildern mit hohem Kontrast sowohl für CD20- als auch für HER2-positive Xenograft-Tumore. Zudem wurde in dieser Arbeit erstmalig eine Korrelation zwischen pharmakokinetischen Parametern und dem Tumor-zu-Blut-Verhältnis gezeigt. Besonders das Fab-PAS<sub>200</sub> stellt damit ein vielversprechendes Reagenz für die klinische Anwendung in Tumordiagnostik und RIT dar. Durch Protein-Design kann dieses Format von bereits existierenden mAK mit unterschiedlicher Spezifität abgeleitet und auf andere Targets übertragen werden, um entsprechende krankheitsrelevante Antigene zu adressieren. Auch die Verbesserung der Pharmakokinetik von alternativen Proteinstrukturgerüsten ist durch PASylierung möglich, so wurden Anticaline bereits erfolgreich mit PAS-Sequenzen verschiedener Länge ausgestattet.

## 5 Zusammenfassung

Die nicht-invasive Immuno-PET Bildgebung bietet Patienten wie auch Ärzten den großen Vorteil, dass wiederholte Biopsien vermieden und eine dreidimensionale Tumordiagnostik und Evaluierung des Therapieansprechens gewährleistet sind. Neben monoklonalen Antikörpern werden wegen ihrer schnelleren Pharmakokinetik zunehmend Fab-Fragmente und andere alternative Bindeproteine für die *In-Vivo*-Bildgebung evaluiert. Anticaline, kleine auf der Gerüststruktur der Lipocaline basierende Bindeproteine, wurden bereits gegen verschiedene Tumormarker, wie z.B. die Extra-Domäne-B von onkofetalem Fibronectin oder PSMA, selektiert. Eine funktionelle Markierung der Anticaline mit Radionukliden ist für ihren erfolgreichen Einsatz in der Bildgebung von zentraler Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Protein-Engineering Parameter wie Target-Affinität und Plasma-Halbwertszeit zu modulieren, um einen optimalen Bildkontrast zu erreichen.

Die selektive Einführung einer Aldehydgruppe mit Hilfe des sogenannten Aldehyd-Tags ermöglichte die ortsspezifische funktionelle Markierung von Anticalinen. Durch Koexpression mit dem Formylglycin-generierenden Enzym wird ein Cysteinrest innerhalb einer Erkennungssequenz zu Formylglycin (fGly) oxidiert. Verschiedene Fusionskonstrukte des entsprechenden Peptids mit dem  $\alpha$ ED-B Anticalin N7A wurden mit fluoreszierenden Aminoxy-Reagenzien funktionalisiert und im Anschluss auf ihre Target-Affinität untersucht. Die C-terminale Fusion von N7A mit dem ald<sub>14</sub>-Tag ergab sehr gute Kopplungseffizienzen bis zu 80 %, ohne die Affinität zu Fn7B8 signifikant zu beeinträchtigen. Alternativ wurde die minimale Erkennungssequenz CxPxR innerhalb der Polypeptidsequenz des Anticalins in verschiedene Schleifenregionen abseits der Bindungstasche eingebaut. Da die eingeführten Mutationen jedoch für eine effiziente Formylglycin-Generierung nicht ausreichend waren, wurden mittels gerichteter Zufallsmutagenese und eines neu etablierten Screening-Verfahrens im 96-well Maßstab Varianten mit verbesserter fGly-Konversion identifiziert. Diese zeigten eine deutliche Präferenz für hydrophobe Aminosäuren zu beiden Seiten des zentralen Cysteinrestes.

Die Target-Affinität der ED-B-spezifischen Anticaline N7A und N7E wurde einerseits mittels rationaler Mutagenese basierend auf der in unserem Labor ermittelten Kristallstruktur und andererseits durch gerichtete Evolution durch *E. coli* Oberflächendisplay verbessert. SPR-Messungen der resultierenden Anticalin-Varianten N7A.19 und N7E.107 ergaben 120- bzw. 230-fach verbesserte  $K_D$ -Werte im unteren picomolaren Bereich (43 pM bzw. 23 pM), mit 300- bzw. 430-fach verlängerten Komplexhalbwertszeiten von 2,7 h bzw. 7,2 Tagen im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangsvarianten. Daraufhin erfolgte die ortsspezifische Funktionalisierung von N7E.107 mit Hilfe des Aldehyd-Tags. Die resultierenden Tracer Alexa488-N7E.107ald<sub>14</sub> und <sup>177</sup>Lu•DTPA-N7E.107ald<sub>14</sub> zeigten jeweils spezifische Bindung der ED-B-positiven Tumorzelllinie Caco2 mittels Immunfluoreszenz bzw.

radioaktivem Zelltest (19.4 nM). Die erfolgreiche Fusion der Anticaline N7A und N7E.107 mit dem C-terminalen ald<sub>14</sub>-Tag kann durch Proteindesign auf andere Anticaline übertragen werden, um weitere Tumormarker wie beispielsweise PSMA zu adressieren. N7E.107 stellt aufgrund seiner sehr guten Target-Affinität im unteren picomolaren Bereich einen vielversprechenden Tracer für die *In-Vivo*-Bildgebung von ED-B-positiven Tumoren bzw. Tumor-Neoangiogenese dar.

Die Methode der PASylierung, d.h. die genetische Fusion mit einer langen strukturell ungeordneten Polypeptidkette bestehend aus Pro, Ala und Ser, ermöglicht die gezielte Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von Proteinen, indem deren hydrodynamisches Volumen vergrößert und dadurch deren Ausscheidung über die Niere verlangsamt wird. Diese Methodik wurde im Hinblick auf die medizinische Bildgebung anhand von tumorspezifischen Fab-Fragmenten untersucht. Biodistributionsstudien der mit radioaktivem Iod markierten unmodifizierten  $\alpha$ HER2 und  $\alpha$ CD20 Fab-Fragmente zeigten relativ schwache Tumoraufnahme mit 0,8 % ID/g (HER2) bzw. 0,24 % ID/g (CD20) 24 h p.i. Mit steigender Länge der PAS-Polymersequenz nahm hingegen die Tumoraufnahme 9-fach (HER2) bzw. 26-fach (CD20) zu, mit einem Optimum für Fab-PAS<sub>400</sub>. Interessanterweise wurden 6- bzw. 5-fach höhere Tumor-zu-Blut-Verhältnisse verglichen mit den umodifizierten Fab-Fragmenten für  $\alpha$ HER2 Fab-PAS<sub>100</sub> und Fab-PAS<sub>200</sub> (48 h p.i.) beobachtet. Gegenüber  $\alpha$ HER2 <sup>125</sup>I-Fab-PAS<sub>200</sub> mit 2,2 %ID/g wurde für <sup>89</sup>Zr•Df-Fab-PAS<sub>200</sub> eine 5-fach verbesserte Tumoraufnahme von 11 % ID/g 24 h p.i., bei vergleichbarem Tumor-zu-Blut-Verhältnis, erreicht. Allerdings wurde auch eine erhöhte Nierenaufnahme mit 88 % ID/g 24 h p.i. beobachtet, welche durch die Reabsorption des Tracers und Rückhaltung des Radiometalls im proximalen Tubulus erklärt werden kann.

Die Methode der PASylierung führte zu einer signifikanten Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften der evaluierten Fab-Tracer, wobei sowohl die absolute Tumoraufnahme als auch das Tumor-zu-Blut-Verhältnis deutlich verbessert wurden. <sup>89</sup>Zr- und <sup>124</sup>I-markiertes Fab-PAS<sub>200</sub> zeigten beide hohen Bildkontrast 24 h p.i. Die Radiomarkierung mit <sup>89</sup>Zr führte dabei zu einer besseren *in vivo* Stabilität und signifikant höherer Tumoraufnahme des Tracers, weshalb <sup>89</sup>Zr•Df-Fab-PAS<sub>200</sub> ein vielversprechendes Reagenz für die klinische Translation darstellt. Weiterhin kann das zunächst für das Tumorantigen HER2 entwickelte Fab-PAS<sub>200</sub>-Format mittels Protein-Engineering auf weitere onkologisch relevante Targets, wie hier für CD20 gezeigt, übertragen werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|             |  |
|-------------|--|
| 3D-OSEM     | <i>3-Dimensional Ordered-Subsets Expectation Maximum Algorithm</i>   |
| ABD         | Albumin-Bindedomäne  |
| ADCC        | <i>Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity</i>  |
| Amp         | Ampicillin   |
| Aoa         | Aminooxy-acetyl  |
| AO-Alexa488 | Alexa Fluor® 488 C5-Aminooxyacetamide  |
| AO-DTPA     | Aoa-NH-Bn-CHX-A''DTPA  |
| ApoD        | Apolipoprotein D   |
| APS         | Ammoniumperoxidisulfat   |
| aTc         | Anhydrotetracyclin   |
| BBP         | Bilinbindeprotein  |
| BSA         | <i>Bovine Serum Albumin</i>  |
| Cam         | Chloramphenicol  |
| CD          | Cirkulardichroismus  |
| CDC         | <i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>   |
| CDR         | <i>Complementary Determining Region</i>  |
| CEA         | Carcinoembryonales Antigen   |
| CHXA''DTPA  | 2-[[[(1R)-2-[bis(carboxymethyl)amino]cyclohexyl]-[(2S)-2-[bis] (carboxymethyl)amino]-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]amino] acetic acid |
| CLL         | chronische lymphatische Leukämie   |
| cpm         | <i>counts per minute</i>   |
| CT          | Computertomographie  |
| CTLA-4      | <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>  |
| DAPI        | 4',6-diamidino-2-phenylindol   |
| DARPin      | <i>Designed Ankyrin Repeat Proteins</i>  |
| DC          | Dünnschichtchromatographie   |
| Df          | Desferrioxamin   |
| DOTA        | 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid  |
| EC          | <i>Electronic Capture</i>  |

|                  |  |
|------------------|--|
| ED-B             | Extra-Domäne B                                   |
| EDC              | 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid    |
| EGFR             | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>          |
| ELISA            | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay                |
| EMA              | European Medicines Agency                        |
| EPR              | <i>Enhanced Permeability and Retention</i>       |
| EZM              | extrazellulären Matrix                           |
| Fab              | <i>Fragment antigen-binding</i>                  |
| FBS              | Fetal Bovine Serum                               |
| Fc               | <i>Crystallisable Fragment</i>                   |
| FcRn             | neonatale Fc-Rezeptoren                          |
| FDA              | <i>Food and Drug Administration</i>              |
| FGE              | Formylglycinegenerierendes Enzym                 |
| fGly             | Formylglycin                                     |
| FN               | Fibronektin                                      |
| GMP              | <i>Good Manufacturing Practice</i>               |
| HABA             | 2 <sup>1</sup> -(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure |
| HAP              | <i>Homo-Amino-Acid Polymer</i>                   |
| HBP              | Histamin Bindeprotein                            |
| HER2             | humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2    |
| IEP              | Isoelektrischer Punkt                            |
| Ig               | Immunglobulin                                    |
| IMAC             | <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> |
| IPTG             | Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid            |
| IT               | <i>Isometric Transition</i>                      |
| ITC              | Isothiocyanat                                    |
| k <sub>off</sub> | Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation       |
| k <sub>on</sub>  | Geschwindigkeitskonstante der Assoziation        |
| Lcn1             | Lipocalin-1                                      |
| Lcn2             | Lipocalin-2                                      |
| mAK              | monoklonaler Antikörper                          |

|          |  |
|----------|--|
| MAPK     | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>                                  |
| MFI      | mittlere Fluoreszenzintensität   |
| MIP      | <i>Maximum Intensity Projections</i>                                     |
| MRT      | Magnetresonanztomographie  |
| MSD      | Multiplen Sulfatase Defizienz  |
| NGAL     | <i>Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin</i>                        |
| NHL      | Non-Hodgkin-Lymphom  |
| NHS      | N-Hydroxysuccinimid  |
| NIS      | Natrium-Iodid-Symporter  |
| Nn       | Nebenniere   |
| p.i.     | nach Injektion   |
| PAS      | Polypeptidsequenz bestehend aus Prolin, Alanin und Serin                 |
| PCR      | <i>Polymerase Chain Reaction</i>   |
| PEG      | Polyethylenglycol  |
| PET      | Positronen-Emissions-Tomographie   |
| PI3K     | <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>                                     |
| pNPP     | p-Nitrophenylphosphat  |
| RCSB     | <i>Research Collaboratory for Structural Bioinformatics</i>              |
| RIT      | Radioimmuntherapie   |
| scFv     | <i>Single-Chain Variable Fragment</i>                                    |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat   |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese                     |
| SEC      | Größenausschlusschromatographie ( <i>Size Exclusion Chromatography</i> ) |
| SIP      | <i>Small Immunoprotein</i>   |
| SMCC     | Succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl)cyclohexane-1-carboxylate         |
| SPECT    | <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>                        |
| SPR      | Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie                                 |
| s.c.     | subcutan   |
| sumf 1   | <i>Sulfatase modifying factor 1</i>                                      |
| TEMED    | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                                       |
| Tlc      | Tränen Lipocalin   |

|               |   |
|---------------|---|
| $T_m$         | Schmelztemperatur                         |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$              |
| üN            | über Nacht                                |
| VEGF          | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |

## 7 Literatur

- Abou, D.S., Ku, T. & Smith-Jones, P.M. (2011) In vivo biodistribution and accumulation of  $^{89}\text{Zr}$  in mice. *Nucl Med Biol* 38, 675-681.
- Adams, C.W., Allison, D.E., Flagella, K., Presta, L., Clarke, J., Dybdal, N., McKeever, K. & Sliwkowski, M.X. (2006) Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 55, 717-727.
- Adams, G.P., Schier, R., McCall, A.M., Simmons, H.H., Horak, E.M., Alpaugh, R.K., Marks, J.D. & Weiner, L.M. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain fv antibody molecules. *Cancer Res* 61, 4750-4755.
- Albrecht, V., Richter, A., Pfeiffer, S., Gebauer, M., Lindner, S., Gieser, E., Schüller, U., Schichor, C., Gildehaus, F.J., Bartenstein, P., Tonn, J.C., Skerra, A. & Glass, R. (2016) Anticalins directed against the fibronectin extra domain B as diagnostic tracers for glioblastomas. *Int J Cancer* 138, 1269-1280.
- Alouani, S., Gaertner, H.F., Mermod, J.J., Power, C.A., Bacon, K.B., Wells, T.N. & Proudfoot, A.E. (1995) A fluorescent interleukin-8 receptor probe produced by targetted labelling at the amino terminus. *Eur J Biochem* 227, 328-334.
- Altai, M., Varasteh, Z., Andersson, K., Eek, A., Boerman, O. & Orlova, A. (2013) In vivo and in vitro studies on renal uptake of radiolabeled affibody molecules for imaging of HER2 expression in tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 28, 187-195.
- Baker, K., Qiao, S.W., Kuo, T., Kobayashi, K., Yoshida, M., Lencer, W.I. & Blumberg, R.S. (2009) Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. *Semin Immunopathol* 31, 223-236.
- Bandtlow, C., Schiweck, W., Tai, H.H., Schwab, M.E. & Skerra, A. (1996) The *Escherichia coli*-derived  $\text{F}_{\text{ab}}$  fragment of the IgM/ $\kappa$  antibody IN-1 recognizes and neutralizes myelin-associated inhibitors of neurite growth. *Eur J Biochem* 241, 468-475.
- Baselga, J. (2001) Clinical trials of Herceptin (trastuzumab). *Eur J Cancer* 37 Suppl 1, S18-24.
- Beers, S.A., Chan, C.H., French, R.R., Cragg, M.S. & Glennie, M.J. (2010) CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol* 47, 107-114.
- 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, 201-212.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13703-13708.
- Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T. & Skerra, A. (1999) Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1898-1903.
- Binder, U. & Skerra, A. (2015) Current Strategies for Pharmacokinetic Optimization. In Rosenberg, A. & Demeule, B. (Eds.) *Biobetters*.
- Birchler, M.T., Thuerl, C., Schmid, D., Neri, D., Waibel, R., Schubiger, A., Stoeckli, S.J., Schmid, S. & Goerres, G.W. (2007) Immunoscintigraphy of patients with head and neck carcinomas, with an anti-angiogenetic antibody fragment. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136, 543-548.
- Bird, R.E. & Walker, B.W. (1991) Single chain antibody variable regions. *Trends Biotechnol* 9, 132-137.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.



- Blumenthal, G.M., Scher, N.S., Cortazar, P., Chattopadhyay, S., Tang, S., Song, P., Liu, Q., Ringgold, K., Pilaro, A.M., Tilley, A., King, K.E., Graham, L., Rellahan, B.L., Weinberg, W.C., Chi, B., Thomas, C., Hughes, P., Ibrahim, A., Justice, R. & Pazdur, R. (2013) First FDA Approval of Dual Anti-HER2 Regimen: Pertuzumab in Combination with Trastuzumab and Docetaxel for HER2-positive Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 15, 4911-4916.
- Bosch, F. & Rosich, L. (2008) The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology* 82, 171-179.
- Boswell, C.A., Marik, J., Elowson, M.J., Reyes, N.A., Ulufatu, S., Bumbaca, D., Yip, V., Mundo, E.E., Majidy, N., Van Hoy, M., Goriparthi, S.N., Trias, A., Gill, H.S., Williams, S.P., Junutula, J.R., Fielder, P.J. & Khawli, L.A. (2013) Enhanced tumor retention of a radiohalogen label for site-specific modification of antibodies. *J Med Chem* 56, 9418-9426.
- Breustedt, D.A., Chatwell, L. & Skerra, A. (2009) A new crystal form of human tear lipocalin reveals high flexibility in the loop region and induced fit in the ligand cavity. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65, 1118-1125.
- Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.
- Bubien, J.K., Zhou, L.J., Bell, P.D., Frizzell, R.A. & Tedder, T.F. (1993) Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca<sup>2+</sup> conductance found constitutively in B lymphocytes. *J Cell Biol* 121, 1121-1132.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-379.
- Burvenich, I.J., Schoonooghe, S., Blanckaert, P., Bacher, K., Vervoort, L., Coene, E., Mertens, N., De Vos, F. & Slegers, G. (2007) Biodistribution and planar gamma camera imaging of <sup>123</sup>I- and <sup>131</sup>I-labeled F(ab')<sub>2</sub> and Fab fragments of monoclonal antibody 14C5 in nude mice bearing an A549 lung tumor. *Nucl Med Biol* 34, 257-265.
- Carlson, B.L., Ballister, E.R., Skordalakes, E., King, D.S., Breidenbach, M.A., Gilmore, S.A., Berger, J.M. & Bertozzi, C.R. (2008) Function and structure of a prokaryotic formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem* 283, 20117-20125.
- Carrico, I.S. (2008) Chemoselective modification of proteins: hitting the target. *Chem Soc Rev* 37, 1423-1431.
- Carrico, I.S., Carlson, B.L. & Bertozzi, C.R. (2007) Introducing genetically encoded aldehydes into proteins. *Nat Chem Biol* 3, 321-322.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E. & Shepard, H.M. (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4285-4289.
- Castellani, P., Viale, G., Dorcaratto, A., Nicolo, G., Kaczmarek, J., Querze, G. & Zardi, L. (1994) The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer* 59, 612-618.
- Chaudhury, C., Mehnaz, S., Robinson, J.M., Hayton, W.L., Pearl, D.K., Roopenian, D.C. & Anderson, C.L. (2003) The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med* 197, 315-322.
- Chien, A., Edgar, D.B. & Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.

- Cosma, M.P., Pepe, S., Annunziata, I., Newbold, R.F., Grompe, M., Parenti, G. & Ballabio, A. (2003) The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 113, 445-456.
- Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R. & Glennie, M.J. (2003) Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101, 1045-1052.
- Cragg, M.S., Walshe, C.A., Ivanov, A.O. & Glennie, M.J. (2005) The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun* 8, 140-174.
- Darrouzet, E., Lindenthal, S., Marcellin, D., Pellequer, J.L. & Pourcher, T. (2014) The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochim Biophys Acta* 1838, 244-253.
- De Lorenzo, C., Tedesco, A., Terrazzano, G., Cozzolino, R., Laccetti, P., Piccoli, R. & D'Alessio, G. (2004) A human, compact, fully functional anti-ErbB2 antibody as a novel antitumour agent. *Br J Cancer* 91, 1200-1204.
- Deans, J.P., Robbins, S.M., Polyak, M.J. & Savage, J.A. (1998) Rapid redistribution of CD20 to a low density detergent-insoluble membrane compartment. *J Biol Chem* 273, 344-348.
- Delgado, C., Pedley, R.B., Herraez, A., Boden, R., Boden, J.A., Keep, P.A., Chester, K.A., Fisher, D., Begent, R.H. & Francis, G.E. (1996) Enhanced tumour specificity of an anti-carcinoembryonic antigen Fab' fragment by poly(ethylene glycol) (PEG) modification. *Br J Cancer* 73, 175-182.
- Dennis, M.S., Jin, H., Dugger, D., Yang, R., McFarland, L., Ogasawara, A., Williams, S., Cole, M.J., Ross, S. & Schwall, R. (2007) Imaging tumors with an albumin-binding Fab, a novel tumor-targeting agent. *Cancer Res* 67, 254-261.
- Deutsch, E.A., Goedemans, W.T., De, J.M.T.M., Miller, K.M. & Brodack, J.W. (1993) Use of gentisic acid or gentisyl alcohol for stabilising radiolabeled peptides and proteins. Google Patents.
- Devereux, J., Haeberli, P. & Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-395.
- Dias, C.R., Jeger, S., Osso, J.A., Jr., Muller, C., De Pasquale, C., Hohn, A., Waibel, R. & Schibli, R. (2011) Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology. *Nucl Med Biol* 38, 19-28.
- Dickson, R.C., Abelson, J. & Johnson, P. (1977) Nucleotide sequence changes produced by mutations in the lac promoter of Escherichia coli. *J Mol Biol* 111, 65-75.
- Dijkers, E.C., Oude Munnink, T.H., Kosterink, J.G., Brouwers, A.H., Jager, P.L., de Jong, J.R., van Dongen, G.A., Schröder, C.P., Lub-de Hooge, M.N. & de Vries, E.G. (2010) Biodistribution of <sup>89</sup>Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther* 87, 586-592.
- Dirix, L.Y., Rutten, A., Huget, P. & Dirix, M. (2013) Trastuzumab emtansine in breast cancer. *Expert Opin Biol Ther* 13, 607-614.
- Dirksen, A. & Dawson, P.E. (2008) Rapid oxime and hydrazone ligations with aromatic aldehydes for biomolecular labeling. *Bioconjug Chem* 19, 2543-2548.
- Disselhorst, J.A., Brom, M., Laverman, P., Slump, C.H., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Gotthardt, M. & Visser, E.P. (2010) Image-quality assessment for several positron emitters using the NEMA NU 4-2008 standards in the Siemens Inveon small-animal PET scanner. *J Nucl Med* 51, 610-617.
- Dreher, M.R., Liu, W., Michelich, C.R., Dewhirst, M.W., Yuan, F. & Chilkoti, A. (2006) Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst* 98, 335-344.

- Du, J., Yang, H., Guo, Y. & Ding, J. (2009) Structure of the Fab fragment of therapeutic antibody Ofatumumab provides insights into the recognition mechanism with CD20. *Mol Immunol* 46, 2419-2423.
- Eggenstein, E., Eichinger, A., Kim, H.J. & Skerra, A. (2014) Structure-guided engineering of Anticalins with improved binding behavior and biochemical characteristics for application in radio-immuno imaging and/or therapy. *J Struct Biol* 185, 203-214.
- El-Mahdi, O. & Melnyk, O. (2013) alpha-Oxo aldehyde or glyoxylyl group chemistry in peptide bioconjugation. *Bioconjug Chem* 24, 735-765.
- Essen, L.O. & Skerra, A. (1994) The de novo design of an antibody combining site. Crystallographic analysis of the VL domain confirms the structural model. *J Mol Biol* 238, 226-244.
- Fiedler, M., Horn, C., Bandtlow, C., Schwab, M.E. & Skerra, A. (2002) An engineered IN-1 F(ab) fragment with improved affinity for the Nogo-A axonal growth inhibitor permits immunochemical detection and shows enhanced neutralizing activity. *Protein Eng* 15, 931-941.
- Fling, S.P. & Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83-88.
- Flower, D.R. (1995) Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J Mol Recognit* 8, 185-195.
- Fluckinger, M., Haas, H., Merschak, P., Glasgow, B.J. & Redl, B. (2004) Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3367-3372.
- Fogh, J., Wright, W.C. & Loveless, J.D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58, 209-214.
- Folkman, J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182-1186.
- Fraker, P.J. & Speck, J.C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80, 849-857.
- Franco, B., Meroni, G., Parenti, G., Levilliers, J., Bernard, L., Gebbia, M., Cox, L., Maroteaux, P., Sheffield, L., Rappold, G.A., Andria, G., Petit, C. & Ballabio, A. (1995) A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 81, 15-25.
- Friedman, M., Orlova, A., Johansson, E., Eriksson, T.L., Höidén-Guthenberg, I., Tolmachev, V., Nilsson, F.Y. & Ståhl, S. (2008) Directed evolution to low nanomolar affinity of a tumor-targeting epidermal growth factor receptor-binding affibody molecule. *J Mol Biol* 376, 1388-1402.
- Friedman, M. & Stahl, S. (2009) Engineered affinity proteins for tumour-targeting applications. *Biotechnol Appl Biochem* 53, 1-29.
- Fujita, H., Yamagishi, M., Kida, Y. & Sakaguchi, M. (2011) Positive charges on the translocating polypeptide chain arrest movement through the translocon. *J Cell Sci* 124, 4184-4193.
- Fukuda, M. (2001) Chemical labeling of carbohydrates by oxidation and sodium borohydride reduction. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 17*, Unit17 15.
- Gaertner, H.F. & Offord, R.E. (1996) Site-specific attachment of functionalized poly(ethylene glycol) to the amino terminus of proteins. *Bioconjug Chem* 7, 38-44.

- Gao, W., Liu, W., Christensen, T., Zalutsky, M.R. & Chilkoti, A. (2010) In situ growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16432-16437.
- Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Kofler, M., Jorissen, R.N., Nice, E.C., Burgess, A.W. & Ward, C.W. (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11, 495-505.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In Walker, J.M. (Ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press.
- Gebauer, M., Schiefner, A., Matschiner, G. & Skerra, A. (2013) Combinatorial design of an Anticalin directed against the extra-domain B for the specific targeting of oncofetal fibronectin. *J Mol Biol* 425, 780-802.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2012) Anticalins small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol* 503, 157-188.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2015) Alternative Protein Scaffolds as Novel Biotherapeutics. In Rosenberg, A. & Demeule, B. (Eds.) *Biobetters*.
- Geoghegan, K.F. & Stroh, J.G. (1992) Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine. *Bioconjug Chem* 3, 138-146.
- Gerstner, R.B., Carter, P. & Lowman, H.B. (2002) Sequence plasticity in the antigen-binding site of a therapeutic anti-HER2 antibody. *J Mol Biol* 321, 851-862.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.
- Gille, H., Hülsmeier, M., Trentmann, S., Matschiner, G., Christian, H.J., Meyer, T., Amirkhosravi, A., Audoly, L.P., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2016) Functional characterization of a VEGF-A-targeting Anticalin, prototype of a novel therapeutic human protein class. *Angiogenesis* 19, 79-94.
- Goel, N. & Stephens, S. (2010) Certolizumab pegol. *MAbs* 2, 137-147.
- Goetz, D.H., Holmes, M.A., Borregaard, N., Bluhm, M.E., Raymond, K.N. & Strong, R.K. (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10, 1033-1043.
- Goldenberg, D.M., Juweid, M., Dunn, R.M. & Sharkey, R.M. (1997) Cancer imaging with radiolabeled antibodies: new advances with technetium-99m-labeled monoclonal antibody Fab' fragments, especially CEA-Scan and prospects for therapy. *J Nucl Med Technol* 25, 18-23; quiz 34.
- Gordon, L.I., Witzig, T., Molina, A., Czuczman, M., Emmanouilides, C., Joyce, R., Vo, K., Theuer, C., Pohlman, B., Bartlett, N., Wiseman, G., Darif, M. & White, C. (2004) Yttrium 90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy produces high response rates and durable remissions in patients with previously treated B-cell lymphoma. *Clin Lymphoma* 5, 98-101.
- Gratz, S., Schipper, M.L., Dorner, J., Hoffken, H., Becker, W., Kaiser, J.W., Behe, M. & Behr, T.M. (2003) LeukoScan for imaging infection in different clinical settings: a retrospective evaluation and extended review of the literature. *Clin Nucl Med* 28, 267-276.
- Haraldsson, B., Nystrom, J. & Deen, W.M. (2008) Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 88, 451-487.

- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H. & Group, H.T. (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676-688.
- Hermanson, G. (2013) *Bioconjugate Techniques*. Academic Press, San Diego (CA).
- Herrera-Almario, G., Patane, M., Sarkaria, I. & Strong, V.E. (2016) Initial report of near-infrared fluorescence imaging as an intraoperative adjunct for lymph node harvesting during robot-assisted laparoscopic gastrectomy. *J Surg Oncol*.
- Hodeib, M., Serna-Gallegos, T. & Tewari, K.S. (2015) A review of HER2-targeted therapy in breast and ovarian cancer: lessons from antiquity - CLEOPATRA and PENELOPE. *Future Oncol* 11, 3113-3131.
- Hoelzer, D. (2011) Novel antibody-based therapies for acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 243-249.
- Holliger, P. & Hudson, P.J. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126-1136.
- Holmes, M.A., Paulsene, W., Jide, X., Ratledge, C. & Strong, R.K. (2005) Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial infections through iron sequestration. *Structure* 13, 29-41.
- Holmes, W.E., Sliwkowski, M.X., Akita, R.W., Henzel, W.J., Lee, J., Park, J.W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G.D. & et al. (1992) Identification of heregulin, a specific activator of p185<sup>erbB2</sup>. *Science* 256, 1205-1210.
- Hosseinimehr, S.J., Tolmachev, V. & Orlova, A. (2012) Liver uptake of radiolabeled targeting proteins and peptides: considerations for targeting peptide conjugate design. *Drug Discov Today* 17, 1224-1232.
- Hovinen, J. (2006) Synthesis of aminoxy-functionalized lanthanide(III) chelates for carbonyl-group conjugation. *Chem Biodivers* 3, 296-303.
- Hudis, C.A. (2007) Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* 357, 39-51.
- Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 11, 812-818.
- Janes, R.W. (2005) Bioinformatics analyses of circular dichroism protein reference databases. *Bioinformatics* 21, 4230-4238.
- Johannsen, M., Spitaleri, G., Curigliano, G., Roigas, J., Weikert, S., Kempkensteffen, C., Roemer, A., Kloeters, C., Rogalla, P., Pecher, G., Miller, K., Berndt, A., Kosmehl, H., Trachsel, E., Kaspar, M., Lovato, V., Gonzalez-Iglesias, R., Giovannoni, L., Menssen, H.D., Neri, D. & de Braud, F. (2010) The tumour-targeting human L19-IL2 immunocytokine: preclinical safety studies, phase I clinical trial in patients with solid tumours and expansion into patients with advanced renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* 46, 2926-2935.
- Kabat, E.A., National Institutes of, H. & Columbia, U. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- Kalia, J. & Raines, R.T. (2008) Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew Chem Int Ed Engl* 47, 7523-7526.
- Keating, G.M. (2010) Rituximab: a review of its use in chronic lymphocytic leukaemia, low-grade or follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Drugs* 70, 1445-1476.

- Kenanova, V., Olafsen, T., Williams, L.E., Ruel, N.H., Longmate, J., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Colcher, D., Raubitschek, A.A. & Wu, A.M. (2007) Radioiodinated versus radiometal-labeled anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments: optimal pharmacokinetics for therapy. *Cancer Res* 67, 718-726.
- Kenanova, V. & Wu, A.M. (2006) Tailoring antibodies for radionuclide delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 3, 53-70.
- Kim, H.J., Eichinger, A. & Skerra, A. (2009) High-affinity recognition of lanthanide(III) chelate complexes by a reprogrammed human lipocalin 2. *J Am Chem Soc* 131, 3565-3576.
- Kim, U.J., Kuga, S., Wada, M., Okano, T. & Kondo, T. (2000) Periodate oxidation of crystalline cellulose. *Biomacromolecules* 1, 488-492.
- Koide, A., Wojcik, J., Gilbreth, R.N., Hoey, R.J. & Koide, S. (2012) Teaching an old scaffold new tricks: monobodies constructed using alternative surfaces of the FN3 scaffold. *J Mol Biol* 415, 393-405.
- König, T. & Skerra, A. (1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. *J Immunol Methods* 218, 73-83.
- Kortt, A.A., Gruen, L.C. & Oddie, G.W. (1997) Influence of mass transfer and surface ligand heterogeneity on quantitative BIAcore binding data. Analysis of the interaction of NC10 Fab with an anti-idiotypic Fab'. *J Mol Recognit* 10, 148-158.
- Kubetzko, S., Balic, E., Waibel, R., Zangemeister-Wittke, U. & Plückthun, A. (2006) PEGylation and multimerization of the anti-p185HER-2 single chain Fv fragment 4D5: effects on tumor targeting. *J Biol Chem* 281, 35186-35201.
- Kurth, M., Pelegrin, A., Rose, K., Offord, R.E., Pochon, S., Mach, J.P. & Buchegger, F. (1993) Site-specific conjugation of a radioiodinated phenethylamine derivative to a monoclonal antibody results in increased radioactivity localization in tumor. *J Med Chem* 36, 1255-1261.
- Laemmli, U.K., Beguin, F. & Gujer-Kellenberger, G. (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85.
- Laforest, R., Lapi, S.E., Oyama, R., Bose, R., Tabchy, A., Marquez-Nostra, B.V., Burkemper, J., Wright, B.D., Frye, J., Frye, S., Siegel, B.A. & Dehdashti, F. (2016) [89Zr]Trastuzumab: Evaluation of Radiation Dosimetry, Safety, and Optimal Imaging Parameters in Women with HER2-Positive Breast Cancer. *Mol Imaging Biol* 18, 952-959.
- Lamdan, H., Gabilondo, J.V., Muñoz, Y., Pupo, A., Huerta, V., Musacchio, A., Perez, L., Ayala, M., Rojas, G., Balint, R.F. & Larrick, J.W. (2013) Affinity maturation and fine functional mapping of an antibody fragment against a novel neutralizing epitope on human vascular endothelial growth factor. *Mol Biosyst* 9, 2097-2106.
- Lamonica, D., Czuczman, M., Nabi, H., Klippenstein, D. & Grossman, Z. (2002) Radioimmunosintigraphy (RIS) with bectumomab (Tc99m labeled IMMU-LL2, Lymphoscan) in the assessment of recurrent non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Cancer Biother Radiopharm* 17, 689-697.
- Landgrebe, J., Dierks, T., Schmidt, B. & von Figura, K. (2003) The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene* 316, 47-56.
- Lear-Kaul, K.C., Yoon, H.R., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., McGavran, L. & Singh, M. (2003) Her-2/neu status in breast cancer metastases to the central nervous system. *Arch Pathol Lab Med* 127, 1451-1457.
- Lemery, S.J., Zhang, J., Rothmann, M.D., Yang, J., Earp, J., Zhao, H., McDougal, A., Pilaro, A., Chiang, R., Gootenberg, J.E., Keegan, P. & Pazdur, R. (2010) U.S. Food and Drug Administration

- approval: ofatumumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia refractory to fludarabine and alemtuzumab. *Clin Cancer Res* 16, 4331-4338.
- Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blattler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V., Lutz, R.J., Wong, W.L., Jacobson, F.S., Koeppen, H., Schwall, R.H., Kenkare-Mitra, S.R., Spencer, S.D. & Sliwkowski, M.X. (2008) Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res* 68, 9280-9290.
- Lin, X., Xie, J. & Chen, X. (2011) Protein-based tumor molecular imaging probes. *Amino Acids* 41, 1013-1036.
- Lobo, E.D., Hansen, R.J. & Balthasar, J.P. (2004) Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 93, 2645-2668.
- Locher, R., Erba, P.A., Hirsch, B., Bombardieri, E., Giovannoni, L., Neri, D., Durkop, H. & Menssen, H.D. (2014) Abundant in vitro expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin translates into selective pharmacodelivery of (131)I-L19SIP in a prostate cancer patient. *J Cancer Res Clin Oncol* 140, 35-43.
- Looney, R.J., Anolik, J.H., Campbell, D., Felgar, R.E., Young, F., Arend, L.J., Sloand, J.A., Rosenblatt, J. & Sanz, I. (2004) B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab. *Arthritis Rheum* 50, 2580-2589.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. & Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* 108, 1-6.
- Manshouri, T., Do, K.A., Wang, X., Giles, F.J., O'Brien, S.M., Saffer, H., Thomas, D., Jilani, I., Kantarjian, H.M., Keating, M.J. & Albitar, M. (2003) Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance. *Blood* 101, 2507-2513.
- McKeage, K. & Perry, C.M. (2002) Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 62, 209-243.
- Meerman, H.J. & Georgiou, G. (1994) Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)* 12, 1107-1110.
- Meijs, W.E., Haisma, H.J., Klok, R.P., van Gog, F.B., Kievit, E., Pinedo, H.M. & Herscheid, J.D. (1997) Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. *J Nucl Med* 38, 112-118.
- Mendler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2015a) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MABs* 7, 96-109.
- Mendler, C.T., Gehring, T., Wester, H.J., Schwaiger, M. & Skerra, A. (2015b) <sup>89</sup>Zr-Labeled Versus <sup>124</sup>I-Labeled  $\alpha$ HER2 Fab with Optimized Plasma Half-Life for High-Contrast Tumor Imaging *In Vivo*. *J Nucl Med* 56, 1112-1118.
- Mendler, C.T. & Skerra, A. (2013) Anticalins: an emerging class of novel biologics to treat cancer and other severe diseases. *Drugs of the Future* 38, 169-179.
- Mikolajczyk, S.D., Meyer, D.L., Starling, J.J., Law, K.L., Rose, K., Dufour, B. & Offord, R.E. (1994) High yield, site-specific coupling of N-terminally modified beta-lactamase to a proteolytically derived single-sulfhydryl murine Fab'. *Bioconjug Chem* 5, 636-646.
- Milenic, D.E., Brady, E.D. & Brechbiel, M.W. (2004) Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 3, 488-499.

- Molina, M.A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J. & Baselga, J. (2001) Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 4744-4749.
- Müller, K. (2008) Proteinmarkierung anhand einer selektiv eingeführten Aldehydfunktion. *Bachelor Arbeit am Lehrstuhl für Biologische Chemie*.
- Nelson, A.L. (2010) Antibody fragments: hope and hype. *MAbs* 2, 77-83.
- Nelson, A.L. & Reichert, J.M. (2009) Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* 27, 331-337.
- Ntziachristos, V., Yoo, J.S. & van Dam, G.M. (2010) Current concepts and future perspectives on surgical optical imaging in cancer. *J Biomed Opt* 15, 066024.
- Nygren, P.A. (2008) Alternative binding proteins: affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS J* 275, 2668-2676.
- O'Keefe, T.L., Williams, G.T., Davies, S.L. & Neuberger, M.S. (1998) Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics* 48, 125-132.
- Olafsen, T., Betting, D., Kenanova, V.E., Salazar, F.B., Clarke, P., Said, J., Raubitschek, A.A., Timmerman, J.M. & Wu, A.M. (2009) Recombinant anti-CD20 antibody fragments for small-animal PET imaging of B-cell lymphomas. *J Nucl Med* 50, 1500-1508.
- Olafsen, T., Sirk, S.J., Betting, D.J., Kenanova, V.E., Bauer, K.B., Ladno, W., Raubitschek, A.A., Timmerman, J.M. & Wu, A.M. (2010) ImmunoPET imaging of B-cell lymphoma using <sup>124</sup>I-anti-CD20 scFv dimers (diabodies). *Protein Eng Des Sel* 23, 243-249.
- Onn, A., Correa, A.M., Gilcrease, M., Isobe, T., Massarelli, E., Bucana, C.D., O'Reilly, M.S., Hong, W.K., Fidler, I.J., Putnam, J.B. & Herbst, R.S. (2004) Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 10, 136-143.
- Padlan, E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.
- Pasut, G. & Veronese, F.M. (2012) State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *J Control Release* 161, 461-472.
- Perk, L.R., Vosjan, M.J., Visser, G.W., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G.E. & van Dongen, G.A. (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 Imaging* 37, 250-259.
- Perlmutter, R. & Sanders, B. (1966) Use of desferrioxamine in treatment of acute ferrous sulfate intoxication. *Calif Med* 104, 313-314.
- Peter Jr, T. (1996) *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego (CA).
- Petit, A.M., Rak, J., Hung, M.C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B. & Kerbel, R.S. (1997) Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151, 1523-1530.
- Pfost, B., Seidl, C., Autenrieth, M., Saur, D., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Schwaiger, M. & Senekowitsch-Schmidtke, R. (2009) Intravesical alpha-radioimmunotherapy with <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med* 50, 1700-1708.



- Pils, D., Pinter, A., Reibenwein, J., Alfan, A., Horak, P., Schmid, B.C., Hefler, L., Horvat, R., Reinthaller, A., Zeillinger, R. & Krainer, M. (2007) In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway. *Br J Cancer* 96, 485-491.
- Pini, A., Viti, F., Santucci, A., Carnemolla, B., Zardi, L., Neri, P. & Neri, D. (1998) Design and use of a phage display library. Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *J Biol Chem* 273, 21769-21776.
- Poli, G.L., Bianchi, C., Virota, G., Bettini, A., Moretti, R., Trachsel, E., Elia, G., Giovannoni, L., Neri, D. & Bruno, A. (2013) Radretumab radioimmunotherapy in patients with brain metastasis: a 124I-L19SIP dosimetric PET study. *Cancer Immunol Res* 1, 134-143.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J Biol Chem* 272, 15661-15667.
- Pujuguet, P., Hammann, A., Moutet, M., Samuel, J.L., Martin, F. & Martin, M. (1996) Expression of fibronectin ED-A+ and ED-B+ isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 148, 579-592.
- Qiao, C., Lv, M., Li, X., Geng, J., Li, Y., Zhang, J., Lin, Z., Feng, J. & Shen, B. (2013) Affinity maturation of antiHER2 monoclonal antibody MIL5 using an epitope-specific synthetic phage library by computational design. *J Biomol Struct Dyn* 31, 511-521.
- Rabuka, D., Rush, J.S., deHart, G.W., Wu, P. & Bertozzi, C.R. (2012) Site-specific chemical protein conjugation using genetically encoded aldehyde tags. *Nat Protoc* 7, 1052-1067.
- Rath, T., Baker, K., Dumont, J.A., Peters, R.T., Jiang, H., Qiao, S.W., Lencer, W.I., Pierce, G.F. & Blumberg, R.S. (2015) Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Crit Rev Biotechnol* 35, 235-254.
- Reichert, A.J., Poxleitner, G., Dauner, M. & Skerra, A. (2015) Optimisation of a system for the co-translational incorporation of a keto amino acid and its application to a tumour-specific Anticalin. *Protein Eng Des Sel* 28, 553-565.
- Reichert, J.M. (2012) Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 4, 413-415.
- Reichert, J.M. (2016) Antibodies to watch in 2016. *MAbs* 8, 197-204.
- Reiners, C. & Schneider, R. (2013) Potassium iodide (KI) to block the thyroid from exposure to I-131: current questions and answers to be discussed. *Radiat Environ Biophys* 52, 189-193.
- Richter, A., Eggenstein, E. & Skerra, A. (2014) Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hypervariable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett* 588, 213-218.
- Romay-Penabad, Z., Carrera Marin, A.L., Willis, R., Weston-Davies, W., Machin, S., Cohen, H., Brasier, A. & Gonzalez, E.B. (2014) Complement C5-inhibitor rEV576 (coversin) ameliorates in-vivo effects of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 23, 1324-1326.
- Roopenian, D.C. & Akilish, S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., Boyer, D.S., Kaiser, P.K., Chung, C.Y., Kim, R.Y. & Group, M.S. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 355, 1419-1431.
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., Bloom, K.J., Linette, G.P., Stec, J., Symmans, W.F., Pusztai, L. & Hortobagyi, G.N. (2004) Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics* 3, 379-398.

- Rudolph, C., Steinemann, D., Von Neuhoff, N., Gadzicki, D., Ripperger, T., Drexler, H.G., Mrasek, K., Liehr, T., Claussen, U., Emura, M., Schrock, E. & Schlegelberger, B. (2004) Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genet Cytogenet* 153, 144-150.
- Rush, J.S. & Bertozzi, C.R. (2008) New aldehyde tag sequences identified by screening formylglycine generating enzymes in vitro and in vivo. *J Am Chem Soc* 130, 12240-12241.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakai, K., Mori, S., Kawamoto, T., Taniguchi, S., Kobori, O., Morioka, Y., Kuroki, T. & Kano, K. (1986) Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 77, 1047-1052.
- Santimaria, M., Moscatelli, G., Viale, G.L., Giovannoni, L., Neri, G., Viti, F., Leprini, A., Borsi, L., Castellani, P., Zardi, L., Neri, D. & Riva, P. (2003) Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 9, 571-579.
- Sauer, S., Erba, P.A., Petrini, M., Menrad, A., Giovannoni, L., Grana, C., Hirsch, B., Zardi, L., Paganelli, G., Mariani, G., Neri, D., Durkop, H. & Menssen, H.D. (2009) Expression of the oncofetal ED-B-containing fibronectin isoform in hematologic tumors enables ED-B-targeted <sup>131</sup>I-L19SIP radioimmunotherapy in Hodgkin lymphoma patients. *Blood* 113, 2265-2274.
- Schellenberger, V., Wang, C.W., Geething, N.C., Spink, B.J., Campbell, A., To, W., Scholle, M.D., Yin, Y., Yao, Y., Bogin, O., Cleland, J.L., Silverman, J. & Stemmer, W.P. (2009) A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat Biotechnol* 27, 1186-1190.
- Scher, J.U. (2012) B-cell therapies for rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 70, 200-203.
- Scheuer, W., Friess, T., Burtscher, H., Bossenmaier, B., Endl, J. & Hasmann, M. (2009) Strongly enhanced antitumor activity of trastuzumab and pertuzumab combination treatment on HER2-positive human xenograft tumor models. *Cancer Res* 69, 9330-9336.
- Schiefner, A., Gebauer, M. & Skerra, A. (2012) Extra-domain B in oncofetal fibronectin structurally promotes fibrillar head-to-tail dimerization of extracellular matrix protein. *J Biol Chem* 287, 17578-17588.
- Schiefner, A. & Skerra, A. (2015) The menagerie of human lipocalins: a natural protein scaffold for molecular recognition of physiological compounds. *Acc Chem Res* 48, 976-985.
- 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. & Skerra, A. (2011) Periplasmic chaperones used to enhance functional secretion of proteins in E. coli. *Methods Mol Biol* 705, 211-224.
- Schlapschy, M., Theobald, I., Mack, H., Schottelius, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (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.
- Schlehuber, S., Beste, G. & Skerra, A. (2000) A novel type of receptor protein, based on the lipocalin scaffold, with specificity for digoxigenin. *J Mol Biol* 297, 1105-1120.

- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant -- a so-called 'anticalin' -- using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213-228.
- Schmidt, F.S. & Skerra, A. (1994) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur J Biochem* 219, 855-863.
- Schmidt, M.M. & Wittrup, K.D. (2009) A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Mol Cancer Ther* 8, 2861-2871.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2, 1528-1535.
- Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., Brown, N., Kaye, P.M., Schlehuber, S., Hohlbaum, A.M. & Skerra, A. (2009) An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8198-8203.
- Schrödinger, L. (2015) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.
- Selmer, T., Hallmann, A., Schmidt, B., Sumper, M. & von Figura, K. (1996) The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in arylsulfatase from *Volvox carteri*. *Eur J Biochem* 238, 341-345.
- Severin, G.W., Engle, J.W., Barnhart, T.E. & Nickles, R.J. (2011) <sup>89</sup>Zr radiochemistry for positron emission tomography. *Med Chem* 7, 389-394.
- Shieh, P. & Bertozzi, C.R. (2014) Design strategies for bioorthogonal smart probes. *Org Biomol Chem* 12, 9307-9320.
- Shih, L.B., Thorpe, S.R., Griffiths, G.L., Diril, H., Ong, G.L., Hansen, H.J., Goldenberg, D.M. & Mattes, M.J. (1994) The processing and fate of antibodies and their radiolabels bound to the surface of tumor cells in vitro: a comparison of nine radiolabels. *J Nucl Med* 35, 899-908.
- Škerlova, J., Král, V., Fábry, M., Sedláček, J., Veverka, V. & Řezáčová, P. (2014) Optimization of the crystallizability of a single-chain antibody fragment. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70, 1701-1706.
- Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. München, Ludwigs-Maximilian-Universität.
- Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res* 20, 3551-3554.
- Skerra, A. (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* 141, 79-84.
- Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1482, 337-350.
- Skerra, A. (2001) 'Anticalins': a new class of engineered ligand-binding proteins with antibody-like properties. *J Biotechnol* 74, 257-275.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* 9, 273-278.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein Eng* 4, 971-979.

- Sletten, E.M. & Bertozzi, C.R. (2009) Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 6974-6998.
- Smith-Jones, P.M., Solit, D.B., Akhurst, T., Afroze, F., Rosen, N. & Larson, S.M. (2004) Imaging the pharmacodynamics of HER2 degradation in response to Hsp90 inhibitors. *Nat Biotechnol* 22, 701-706.
- Solomayer, E.F., Becker, S., Pergola-Becker, G., Bachmann, R., Kramer, B., Vogel, U., Neubauer, H., Wallwiener, D., Huober, J. & Fehm, T.N. (2006) Comparison of HER2 status between primary tumor and disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 98, 179-184.
- Soltys, J., Kusner, L.L., Young, A., Richmonds, C., Hatala, D., Gong, B., Shanmugavel, V. & Kaminski, H.J. (2009) Novel complement inhibitor limits severity of experimentally myasthenia gravis. *Ann Neurol* 65, 67-75.
- Spears, R.J. & Fascione, M.A. (2016) Site-selective incorporation and ligation of protein aldehydes. *Org Biomol Chem* 14, 7622-7638.
- Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R. & Schlossman, S.F. (1980) Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol* 125, 1678-1685.
- Stehle, G., Sinn, H., Wunder, A., Schrenk, H.H., Stewart, J.C., Hartung, G., Maier-Borst, W. & Heene, D.L. (1997) Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Crit Rev Oncol Hematol* 26, 77-100.
- Stevens, P.L., Oluwole, O. & Reddy, N. (2012) Advances and application of radioimmunotherapy in non-Hodgkin lymphoma. *Am J Blood Res* 2, 86-97.
- 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, 113-130.
- Stumpp, M.T., Binz, H.K. & Amstutz, P. (2008) DARPin: a new generation of protein therapeutics. *Drug Discov Today* 13, 695-701.
- Tai, W., Mahato, R. & Cheng, K. (2010) The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J Control Release* 146, 264-275.
- Tanner, M., Hollmén, M., Junttila, T.T., Kapanen, A.I., Tommola, S., Soini, Y., Helin, H., Salo, J., Joensuu, H., Sihvo, E., Elenius, K. & Isola, J. (2005) Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 16, 273-278.
- Tedder, T.F. & Schlossman, S.F. (1988) Phosphorylation of the B1 (CD20) molecule by normal and malignant human B lymphocytes. *J Biol Chem* 263, 10009-10015.
- Teeling, J.L., French, R.R., Cragg, M.S., van den Brakel, J., Pluyter, M., Huang, H., Chan, C., Parren, P.W., Hack, C.E., Dechant, M., Valerius, T., van de Winkel, J.G. & Glennie, M.J. (2004) Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 104, 1793-1800.
- Tinianow, J.N., Gill, H.S., Ogasawara, A., Flores, J.E., Vanderbilt, A.N., Luis, E., Vandlen, R., Darwish, M., Junutula, J.R., Williams, S.P. & Marik, J. (2010) Site-specifically <sup>89</sup>Zr-labeled monoclonal antibodies for ImmunopET. *Nucl Med Biol* 37, 289-297.
- Tolmachev, V. & Stone-Elander, S. (2010) Radiolabelled proteins for positron emission tomography: Pros and cons of labelling methods. *Biochim Biophys Acta* 1800, 487-510.
- Tolmachev, V., Wällberg, H., Andersson, K., Wennborg, A., Lundqvist, H. & Orlova, A. (2009) The influence of Bz-DOTA and CHX-A''-DTPA on the biodistribution of ABD-fused anti-HER2 Affibody molecules: implications for <sup>114m</sup>In-mediated targeting therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36, 1460-1468.

- Trumpfheller, M. (2013) Affinitätsmaturierung eines Anticalins gegen die Extra-Domäne B des Fibronectins für Anwendungen in der Tumordiagnose und -therapie, Masterarbeit, TUM.
- Uchiyama, S., Suzuki, Y., Otake, K., Yokoyama, M., Ohta, M., Aikawa, S., Komatsu, M., Sawada, T., Kagami, Y., Morishima, Y. & Fukui, K. (2010) Development of novel humanized anti-CD20 antibodies based on affinity constant and epitope. *Cancer Sci* 101, 201-209.
- van de Watering, F.C., Rijpkema, M., Perk, L., Brinkmann, U., Oyen, W.J. & Boerman, O.C. (2014) Zirconium-89 labeled antibodies: a new tool for molecular imaging in cancer patients. *Biomed Res Int* 2014, 203601.
- Van den Brulle, J., Fischer, M., Langmann, T., Horn, G., Waldmann, T., Arnold, S., Fuhrmann, M., Schatz, O., O'Connell, T., O'Connell, D., Auckenthaler, A. & Schwer, H. (2008) A novel solid phase technology for high-throughput gene synthesis. *Biotechniques* 45, 340-343.
- Vasudev, N.S. & Reynolds, A.R. (2014) Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions. *Angiogenesis* 17, 471-494.
- 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, 1049-1058.
- Verel, I., Visser, G.W., Boerman, O.C., van Eerd, J.E., Finn, R., Boellaard, R., Vosjan, M.J., Stigter-van Walsum, M., Snow, G.B. & van Dongen, G.A. (2003) Long-lived positron emitters zirconium-89 and iodine-124 for scouting of therapeutic radioimmunoconjugates with PET. *Cancer Biother Radio* 18, 655-661.
- Verma, K.K., Gupta, D., Sanghi, S.K. & Jain, A. (1987) Spectrophotometric determination of periodate with amodiaquine dihydrochloride and its application to the indirect determination of some organic compounds via the malaprade reaction. *Analyst* 112, 1519-1522.
- Vogt, M. & Skerra, A. (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem* 5, 191-199.
- Vollmar, A., Zündorf, I. & Dingermann, T. (2013) *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Vosjan, M.J., Perk, L.R., Visser, G.W., Budde, M., Jurek, P., Kiefer, G.E. & van Dongen, G.A. (2010) Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc* 5, 739-743.
- 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* 10, 975-982.
- Weissleder, R., Ross, B., Rehemtulla, A. & Gambhir, S. (2010) *Molecular Imaging, Principles and Practices*. Peoples Medical Publishing House—USA, Ltd, Shelton, CT, USA.
- Wester, H.J. & Kessler, H. (2005) Molecular targeting with peptides or peptide-polymer conjugates: just a question of size? *J Nucl Med* 46, 1940-1945.
- Weston-Davies, W., Westwood, J. & Nunn, M. (2013) Phase 1 clinical trial of novel complement C5 inhibitor coversin. *Mol Immunol* 56:264.
- White, E.S., Baralle, F.E. & Muro, A.F. (2008) New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol* 216, 1-14.
- Wienhard, K., Wagner, R. & Heiss, W.-D. (2013) *PET: Grundlagen und Anwendungen der Positronen-Emissions-Tomographie*. Springer-Verlag.

- Wierzbicka-Patynowski, I. & Schwarzbauer, J.E. (2003) The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J Cell Sci* 116, 3269-3276.
- Wittrup, K.D., Thurber, G.M., Schmidt, M.M. & Rhoden, J.J. (2012) Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents. *Methods Enzymol* 503, 255-268.
- Wu, A.M. & Senter, P.D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23, 1137-1146.
- Wyffels, L., De Bruyne, S., Blanckaert, P., Lambert, D.M. & De Vos, F. (2009) Radiosynthesis, in vitro and in vivo evaluation of <sup>123</sup>I-labeled anandamide analogues for mapping brain FAAH. *Bioorg Med Chem* 17, 49-56.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M.T., de Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H.K., Waibel, R. & Plückthun, A. (2010) Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res* 70, 1595-1605.
- Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J.M., Steiner, D., Lawrence, M.C., McKern, N.M., Pecorari, F., Ward, C.W., Joos, T.O. & Plückthun, A. (2007) A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2. *J Mol Biol* 369, 1015-1028.

**Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Arne Skerra möchte ich mich recht herzlich für die sehr interessante Themenstellung und die exzellente Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön Herrn Prof. Dr. Markus Schwaiger für das spannende Projekt, die sehr gute Zusammenarbeit und fachliche Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Hans-Jürgen Wester für seine Einführung in die Radiochemie sowie die ausgezeichneten wissenschaftlichen Diskussionen und fachlichen Ratschläge.

Ich danke allen Mitarbeitern und Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie der Technischen Universität München für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und freundliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt dabei meinen langjährigen Mitstreitern Petra Kornberger, Nadine Kuhn, Evelyn Eggenstein, Antonia Richter und Joscha Breibeck für die gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors sowie für zahlreiche fachliche Diskussionen und Anregungen. Herzlichen Dank auch an Irmgard Neumaier, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und für unsere schöne Zeit im Labor. Petra Kornberger danke ich außerdem für ihre fachkundige Korrektur dieser Arbeit.

Bei Klaus Wachinger möchte ich mich für die Einführung in die Fermentationstechnologie und bei Ina Theobald für die Sequenzierungen bedanken. Ein Dankeswort auch an Frau Dr. Gebauer für die Selektion der Anticaline N7A und N7E. Dr. André Schiefner danke ich für die Aufklärung und Bereitstellung der Kristallstrukturen von N7A und N7E. Lars Friedrich danke ich für die affinitätsmaturierte Version des  $\alpha$ HER2 Fabs und die Klonierung des  $\alpha$ CD20 Fabs und Herrn Dr. Martin Schlapschy für die Plasmide der PASylierten Fab Fragmente.

Maria Trumpfheller, Torben Gehring, Tom Schwarzer und Daniel Sêbenan bin ich dankbar für die wissenschaftlichen Beiträge, die sie im Rahmen ihrer Masterarbeit beziehungsweise Praktikums zu dieser Arbeit geleistet haben.

Bei Sybille Reder, Markus Mittelhäuser und Marco Lehmann möchte ich mich sehr herzlich für die Durchführung der PET-Bildgebung und bei Prof. Dr. Sybille Ziegler und Iina Laitinen für die wissenschaftliche Diskussion der PET-Daten und Auswertung bedanken.

Sabine Pirsig, Andrea Alke und Katharina McGuire danke ich für ihre Hilfe bei den *in vivo* Experimenten.

Herrn Dr. Calogero D'Allessandria und Frau Dr. Margret Schottelius danke ich für ihre ausgezeichneten Ratschläge und Vorschriften für die radioaktive Markierung von Proteinen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Stephanie Robu für die Synthese des Chelator AO-NH-Bn-CHX-A''DTPA.

Herrn Prof. Dr. Buck bin ich dankbar für die Bereitstellung der Granta-Zelllinie und Herrn Prof. Dr. Wester für die Zelllinie SK-BR-3.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, meinem Freund Christian, meiner Tochter Amelie, meinen Eltern und Großeltern, die mich während meiner Zeit als Doktorandin und ganz besonders nach der Geburt meiner Tochter nicht nur bei der Fertigstellung dieser Arbeit immer bedingungslos unterstützt haben.



**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits bzw. werden in Kürze veröffentlicht:**

**Mendler CT**, Trumpfheller M, Gebauer M, Friedrich L, Schwaiger M, Skerra A. High affinity Anticalins directed against the fibronectin extra-domain B (ED-B) for application in tumor diagnostics and therapy, Manuskript in Vorbereitung

**Mendler CT**, Gehring T, Wester HJ, Schwaiger M, Skerra, A. (2015)  $^{89}\text{Zr}$ - versus  $^{124}\text{I}$ -labeled  $\alpha\text{HER2}$  Fab with optimized plasma-half life for high contrast tumor imaging in vivo. J Nucl. Med 56, 1112-1118.

**Mendler CT**, Friedrich L, Laitinen I, Schlapschy M, Schwaiger M, Wester HJ, Skerra A. (2015) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. MAbs. 7(1):96-109

**Mendler CT & Skerra A.** (2013) Anticalins: An emerging class of novel biologics to treat cancer and other severe diseases. Drugs of the Future 38(3): 169-179

**Konferenzbeiträge:**

Mendler CT, Schlapschy M, Friedrich L, McGuire K, Alke A, Laitinen I, Schottelius M, Schwaiger M, Wester HJ, Skerra A. Antibody Fab fragments with tailored plasma half-life for *in vivo* tumor imaging using PASylation®. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN) 2012 in Bremen

Mendler CT, Schlapschy M, Friedrich L, McGuire K, Alke A, Laitinen I, Schottelius M, Schwaiger M, Wester HJ, Skerra A. High contrast *in vivo* imaging of CD20 and HER2 with Fab fragments engineered for extended plasma half-life. Tagung der Society of Nuclear Medicine's (SNM) 2012 in Miami, FL

Mendler CT, Gehring T, Friedrich L, Wester HJ, Schwaiger M, Skerra, A. High contrast HER2 and CD20 *in vivo* tumor imaging with  $^{89}\text{Zr}$ - and  $^{124}\text{I}$ -labeled PASylated Fab fragments having tailored plasma half-life. European Molecular Imaging Meeting (EMIM) 2013 in Turin

**Lebenslauf****Persönliche Daten**

Name: Claudia Theresa Mendler  
Adresse: Böcklinstraße 68, 80638 München  
Telefon: 0176 / 21 98 77 74  
E-mail-Adresse: c.mendler@web.de  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum/Ort: 3. November 1984 in Ulm

**Bildungsweg und Berufserfahrung**

ab 10/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar,  
Technische Universität München, Prof. Dr. med. Markus Schwaiger

2010-2013 **Doktorarbeit**  
Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München,  
Prof. Dr. Arne Skerra

2009 – 2010 **Diplomarbeit**  
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie Tübingen,  
Prof. Dr. Andrei Lupas

2004 - 2010 **Diplom Biochemie**  
Eberhard Karls Universität Tübingen  
Schwerpunkte: Biochemie, Immunologie, Pharmazeutische Chemie

2004 **Abitur**  
Gymnasium St. Hildegard, Ulm

**Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit in der Abteilung Proteinchemie am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München bzw. an der Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. A. Skerra ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

München, 01. Januar 2017

Claudia Mendler

---