

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biologische Chemie

# Konstruktion von bifunktionellen Anticalin-Fusionsproteinen für die gerichtete Diagnostik/Therapie

**Evelyn Eggenstein, M. Sc.**

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. Martin Klingenspor

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arne Skerra

2. Prof. Dr. Markus Schwaiger

Die Dissertation wurde am 03.02.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.05.2017 angenommen.



*Meinem Mann Lars &  
meiner Familie für Ihre stete und ausnahmslose Unterstützung.*



Bei Herrn Prof. Dr. Arne Skerra bedanke ich mich für die Betreuung meiner Arbeit, die ich in seinem exzellent ausgestatteten Labor in freundlicher Atmosphäre anfertigen konnte. Sowohl sein weitreichendes Fachwissen als auch sein Blick für die professionelle sowie ästhetische Aufbereitung und Präsentation von wissenschaftlichen Ergebnissen haben mich für alle Ewigkeit geprägt.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für das ausgezeichnete und motivierende Arbeitsklima, in dem – neben Wissenschaft und Forschung – Spaß, Sport und Unfug immer einen Platz hatten. Dr. Sabine Rauth, Dominik Hinz und Dr. Michaela Gebauer bin ich für ihre Hilfestellungen und wertvollen Tipps im Umgang mit der Anticalin-Technologie insbesondere zu Beginn meiner Arbeit sehr verbunden.

Bei Uli Binder, Dr. Alexandra Lensch, Dr. André Schiefner und Dr. Alexander Jarasch möchte ich mich recht herzlich für die unzähligen anregenden Diskussionen und die Weitergabe von wertvollen Tipps und Tricks aus ihrem reichhaltigen Erfahrungsschatz bedanken. Davon habe ich sehr profitiert.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Martin Schlapschy für seinen experimentellen und intellektuellen Beitrag zu den PK-Studien sowie Dr. Martin Dauner für die Synthese der divalenten DTPA-Derivate.

In guter Erinnerung bleiben mir die „guten Seelen“ des Lehrstuhls, die uns allen bei der täglichen Laborarbeit (Martina und Resi) sowie diversen Verwaltungsangelegenheiten (Claudia, Marion und Lore) eine große Unterstützung gewesen sind. Klaus Wachinger danke ich für die vielen Lebensweisheiten, gefetteten Fahrradketten, gemeinsamen Geräte Reparaturen und „Fermenter-Erntedankfeste“.

Bei Prof. Dr. med. Markus Schwaiger und den Mitarbeitern der nuklearmedizinischen Poliklinik am Klinikum rechts der Isar (TUM), vor allem Claudia Mendler, Dr. Johanna Bussemer, Dr. Calogero D'Alessandria und Dr. med. Susanne Swirczek sowie Prof. Dr. Hans-Jürgen Wester und Dr. Frauke Hoffmann vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie (TUM) bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei den *in vivo* Bildgebungs- und Biodistributionsstudien.

Ich bedanke mich außerdem bei der Pieris AG und insbesondere bei Dr. Gabi Matschiner für die freundschaftliche und fruchtbare Zusammenarbeit sowie Unterstützung im Rahmen verschiedener Anticalin-Projekte.

Дорогая Тони, я всё больше осознаю, как я счастлива, что мы провели с тобой эти четыре поучительных, напряжённых и порой изнурительных года. Не зря говорят, "беда на двоих - только пол-беда": мы всегда могли излить друг другу посылно своё горе, после чего успешно смыть его пивом с шампанским или просто по-детски посмеяться. Всё это, так же как и наши ПиЭйчДи, будет с нами всегда.



**Teile dieser Arbeit (sowie weitere Teilprojekte) wurden bzw. werden in Kürze veröffentlicht:**

Research Articles:

- 1) **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
- 2) Jarasch A., Kopp M., **Eggenstein E.**, Richter A., Gebauer M., Skerra A. (2016) *ANTICALIgn*: visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering. *Protein Eng Des Sel.* 29, 263-270
- 3) **Eggenstein E.**, Richter A., Skerra A. (20xx) ChromoCalins – Anticalins fused to a fluorescent protein for applications in biomolecular imaging and detection. *In Vorbereitung*
- 4) **Eggenstein E.**, Mendler C.T., Dauner M., Schlapschy M., Yazaki P.J., Wester H.-J., Schwaiger M., Skerra A. (20xx) Pretargeting of CEA-positive tumors using bispecific Antibody-Anticalin fusion proteins with tailored plasma half-life and a divalent hapten. *In Vorbereitung*
- 5) Dauner M., **Eggenstein E.**, Mendler C.T., Blechert B., Schwaiger M., Skerra A. (20xx) Synthesis and *in vivo* evaluation of divalent DTPA molecules with different chemical linkers for a pretargeting approach. *In Vorbereitung*

Review:

- 1) Richter A., **Eggenstein E.**, Skerra A. (2014) Anticalins: exploiting a non-Ig scaffold with hyper-variable loops for the engineering of binding proteins. *FEBS Lett.* 588, 213-218





**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Strategien zur nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie solider Tumore mit Hilfe biomolekularer <i>Tracer</i> .....	1
1.1.1	Direkte Markierung von therapeutischen Proteinen mit Radionukliden.....	4
1.1.2	Der <i>Pretargeting</i> -Ansatz unter Verwendung von bispezifischen Bindeproteinen und bifunktionellen Metallchelatoren als Liganden.....	7
1.2	Zielgerichtete Adressierung solider Tumore .....	8
1.2.1	Fibronectin-Spleißform mit ED-B in der Tumorangiogenese .....	9
1.2.2	Carcinoembryonales Antigen (CEA) .....	12
1.3	Anticaline als alternative Bindeproteine zu therapeutischen Antikörpern .....	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1	Material .....	21
2.1.1	Bakterienstämme, Tumorzelllinien und Versuchstiere .....	21
2.1.2	Plasmide .....	22
2.1.3	Oligodesoxynukleotide .....	22
2.1.4	Enzyme und sonstige Proteinreagenzien.....	25
2.1.5	Standards und Kits .....	26
2.1.6	Chemikalien .....	27
2.1.7	Geräte und Zubehör.....	29
2.1.8	Verbrauchsmaterialien .....	32
2.1.9	Antibiotika, Medien und allgemeine Lösungen .....	34
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	38
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	39
2.2.3	Isolierung doppelsträngiger Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	39
2.2.4	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA .....	40
2.2.5	<i>In vitro</i> Modifizierung von DNA .....	41
2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	45
2.3.1	Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	45
2.3.2	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose (SA-Chromatographie) .....	48
2.3.3	Ionenaustauschchromatographie (IEX).....	48
2.3.4	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	49
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	50
2.3.6	Western Blotting .....	50
2.3.7	Konzentrieren von Proteinen.....	51
2.3.8	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	51
2.3.9	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	52

2.4	Biophysikalische Methoden .....	55
2.4.1	Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie .....	55
2.4.2	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie .....	57
2.4.3	Fluoreszenztitration .....	58
2.4.4	Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) .....	59
2.5	Radiochemische Methoden.....	59
2.5.1	Markierung von DTPA mit radioaktivem <sup>177</sup> Lu .....	59
2.5.2	Kalte und radioaktive Iodierung von Proteinen.....	60
2.6	Zellbiologische Methoden .....	61
2.6.1	Kultivieren und Konservieren humaner Zelllinien.....	61
2.6.2	Nachweis von Mycoplasmen.....	62
2.6.3	Fluoreszenzmarkierung von ED-B-exprimierenden Caco-2 Zellen.....	63
2.6.4	Bindungsstudien auf antigenexprimierenden Zellen .....	63
2.7	<i>In vivo</i> Versuche in Mäusen .....	65
2.7.1	Pharmakokinetische (PK) Studien.....	65
2.7.2	Positronen-Emissions-Tomographie (PET) .....	66
2.7.3	Biodistributionsanalyse .....	67
2.7.4	Autoradiographische Analyse von Gewebeschnitten .....	67
2.7.5	Computer-Programme und Datenbanken .....	68
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
3.1	Optimierung der Bindungseigenschaften Me-DTPA-spezifischer Anticaline .....	69
3.1.1	Charakterisierung der Me-DTPA-spezifischen Anticaline C26, L1 und CL31.....	71
3.1.2	Rationale Mutagenese von CL31 zur Untersuchung von Determinanten der Ligandenaffinität .....	76
3.1.3	Rationale Mutagenese von CL31 zur Erhöhung der Proteinstabilität .....	78
3.1.4	Rationale Mutagenese von CL31 zur Erhöhung der Ligandenaffinität.....	83
3.2	Konstruktion von bifunktionellen Duocalinen mit Affinität für ED-B und Me-DTPA .....	87
3.2.1	Konstruktion von Vektoren zur periplasmatischen Sekretion von Duocalinen mit verschiedenen PAS-Linkern in <i>E. coli</i> .....	87
3.2.2	Periplasmatische Produktion und Reinigung der Duocaline .....	90
3.2.3	Nachweis der bispezifischen Bindungsaktivität im ELISA .....	91
3.2.4	Konstruktion von Vektoren zur cytoplasmatischen Biosynthese von Duocalinen .....	92
3.2.5	Cytoplasmatische Produktion und Reinigung der Duocaline.....	94
3.2.6	Bindungsanalyse der Duocaline hinsichtlich ED-B und Y-DTPA mittels SPR- Spektroskopie .....	96
3.2.7	Konstruktion von Duocalinen mit PAS-Linkern unterschiedlicher Länge .....	97
3.2.8	Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von Duocalinen in der Maus.....	100
3.2.9	Nachweis der Bindungsaktivität auf ED-B-positiven Caco-2 Zellen.....	102
3.3	Konstruktion eines Fusionsproteins aus dem CEA-bindenden scFv-Fragment T84.66 und dem Me-DTPA-bindenden Anticalin CL31 .....	104

---

3.3.1	Konstruktion eines bakteriellen Expressionsvektors für scFv T84.66.....	104
3.3.2	Periplasmatische Produktion und Reinigung des scFv T84.66.....	106
3.3.3	Klonierung und periplasmatische Synthese des Fusionsproteins T84.66-CL31.....	107
3.3.4	Bestimmung der Bindungsaffinität des Fusionsproteins T84.66-CL31 für Y-DTPA und CEA <i>in vitro</i> .....	109
3.3.5	Produktion und funktionelle Charakterisierung von scFv/Anticalin-Fusionsproteinen mit PAS-Linkern unterschiedlicher Länge .....	111
3.3.6	Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von scFv/Anticalin-Fusionsproteinen in der Maus.....	116
3.3.7	<i>In vivo</i> Diagnostik von CEA-positiven Tumoren in der Maus durch Positronen- Emissions-Tomographie (PET) und Biodistributionsanalyse.....	117
3.3.8	<i>In vitro</i> <i>Pretargeting</i> auf CEA-positiven HT-29 Zellen mit mono- und divalentem <sup>177</sup> Lu-DTPA .....	125
3.3.9	Evaluierung des <i>Pretargeting</i> -Verfahrens für die Diagnostik CEA-positiver Tumore durch Biodistributionsanalyse.....	130
3.4	ChromoCaline: Anticaline fusioniert mit einem Fluorophorprotein.....	133
3.4.1	Konstruktion von Vektoren zur genetischen Fusion des EB-D-bindenden Anticalins N7A mit dem <i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> (eGFP) .....	133
3.4.2	Charakterisierung von ChromoCalinen mit N- oder C-terminalem eGFP.....	135
3.4.3	Konstruktion von eGFP/Anticalin-Fusionsproteinen mit PAS-Linker .....	137
3.4.4	Biophysikalische Charakterisierung der ED-B-bindenden ChromoCaline.....	139
3.4.5	Anwendungsbeispiele für ChromoCaline .....	140
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>143</b>
4.1	Optimierung von Anticalinen mit Bindungsspezifität für Me-DTPA.....	143
4.2	Entwicklung eines Duocalins mit einstellbarer Plasma-Halbwertszeit für die Radio- diagnostik und -therapie von ED-B-exprimierenden Tumoren.....	147
4.3	Potential eines scFv/Anticalin-Fusionsproteins für die Radiodiagnostik und -therapie solider Tumore nach dem <i>Pretargeting</i> -Verfahren .....	151
4.4	ChromoCaline zur Detektion von Zelloberflächen-Antigenen <i>in vitro</i> .....	157
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>161</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungen und Symbole .....</b>	<b>163</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>165</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>191</b>



---

# 1 Einleitung

## 1.1 Strategien zur nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie solider Tumore mit Hilfe biomolekularer *Tracer*

In der Nuklearmedizin werden radioaktive Substanzen (Radionuklide/-isotope) am lebenden Organismus appliziert, um anschließend die bei deren Zerfall entstehende Strahlung für diagnostische und therapeutische Zwecke zu nutzen. Mit Hilfe von bildgebenden Verfahren, wie beispielsweise der *Positron Emission Tomography* (PET) und der *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT), kann die räumliche und zeitliche Verteilung eines Radionuklids im gesamten Organismus oder in einem einzelnen Organ über wenige Sekunden bis zu mehreren Stunden verfolgt werden. Sie sind heute wichtige Methoden zur Diagnose von Erkrankungen, vor allem von Tumoren. Im Fall der nuklearmedizinischen Therapie wird der zytotoxische Effekt der Radionuklide genutzt, um entartete Zellen/Gewebe zu zerstören, wobei gleichzeitig gesundes Gewebe im Idealfall davon weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Die Eignung eines Radionuklids für die Diagnostik (PET/SPECT) oder für die Therapie einer Erkrankung hängt in erster Linie von der beim Zerfall entstehenden Strahlungsart ab (Tabelle 1). Für PET werden Positronen ( $\beta^+$ )-Emitter (z.B.  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ) benötigt, welche nach Kollision mit einem Elektron in zwei Photonen zerfallen, die sich daraufhin in einem Winkel von  $180^\circ$  voneinander entfernen. Beide Photonen werden von ringförmig um den Patienten angeordneten Koinzidenzdetektoren erfasst, wodurch anschließend mittels verschiedener Algorithmen ein dreidimensionales Bild rekonstruiert werden kann. SPECT-Untersuchungen werden dagegen mit  $\gamma$ -emittierenden Isotopen (z.B.  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) durchgeführt, deren charakteristische Strahlung mit Hilfe von um den Patienten rotierenden  $\gamma$ -Kameras aufgezeichnet wird. Eine Besonderheit der  $\gamma$ -Kamera ist die darin enthaltene Kollimatorblende, welche ähnlich einer Lochblende nur senkrecht einfallende  $\gamma$ -Strahlen auf einen szintillierenden Natriumiodidkristall treffen lässt, wodurch allerdings nur ein geringer Anteil der Photonen überhaupt registriert wird (Yaghoubi & Gambhir, 2008). Aufgrund dessen ist die Sensitivität von SPECT gegenüber PET zwei- bis dreifach niedriger. Ebenso lässt die bessere räumliche Auflösung von PET-Bildern eine genauere Quantifizierung zu (Alford *et al.*, 2009). Demgegenüber ist die Produktion von  $\beta^+$ -emittierenden Radioisotopen mit einem für den klinischen Einsatz erforderlichen hohen Reinheitsgrad sehr kostenintensiv, so dass für Routineuntersuchungen häufig das SPECT-Verfahren verwendet wird. Beide Bildgebungsverfahren werden heutzutage in Kombination mit *X-ray Computer Tomography* (CT) oder *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) eingesetzt, wodurch anatomische Strukturen, wie Knochen, Gewebe und Organe, sichtbar werden und im Kontext des radioaktiven Signals beurteilt werden können.

**Tabelle 1. Radiochemische und physikalische Eigenschaften etablierter Radioisotope für die Radioimmundiagnostik und -therapie.<sup>a</sup>**

Einsatzgebiet	Nuklid	Zerfall <sup>b</sup>	max. Energie [MeV]	Halbwertszeit	Verfahren	Kopplung an Protein <sup>c</sup>
<i>Diagnostik</i>						
	<sup>18</sup> F	β <sup>+</sup> (97 %) EC (3 %)	0,69 1,7	1,83 h	PET	direkt
	<sup>68</sup> Ga	β <sup>+</sup> (89 %) EC (11 %)	1,88	68,3 min	PET	Chelator
	<sup>123</sup> I	γ EC (Auger)	0,16	13,3 h	SPECT	direkt
	<sup>124</sup> I	β <sup>+</sup> (24 %)	2,14	4,18 d	PET	direkt
	<sup>99m</sup> Tc	γ	0,14	6,02 d	SPECT	Chelator
	<sup>86</sup> Y	β <sup>+</sup> (33 %) EC (66 %)	1,22	14,7 h	PET	Chelator
	<sup>89</sup> Zr	β <sup>+</sup> (23 %) EC (77 %)	0,90	3,27 d	PET	Chelator
<i>Therapie und/oder Diagnostik</i>						
	<sup>212</sup> Bi	α (36 %) β <sup>-</sup> (64 %)	6,05 6,09	60,6 min	—	Chelator
	<sup>213</sup> Bi	α (2 %) β <sup>-</sup> (98 %)	5,55 5,87	45,6 min	—	Chelator
	<sup>64</sup> Cu	β <sup>+</sup> (19 %) β <sup>-</sup> (40 %) EC (Auger)	0,66	12,7 h	PET	Chelator
	<sup>125</sup> I	γ EC (Auger)	0,035	60 d	SPECT	direkt
	<sup>131</sup> I	β <sup>-</sup> γ	0,18 0,37	8,04 d	SPECT	direkt
	<sup>111</sup> In	γ EC (Auger)	0,25; 0,17	2,80 d	SPECT	Chelator
	<sup>177</sup> Lu	β <sup>-</sup> γ	0,50 0,11; 0,21	6,65 d	SPECT	Chelator
	<sup>90</sup> Y	β <sup>-</sup> , γ	2,28	2,67 d	SPECT	Chelator

<sup>a</sup> Angaben wurden aus verschiedenen Referenzen entnommen (Milenic & Brechbiel, 2004; Goldenberg *et al.*, 2006; Eary & Brenner, 2007; Banerjee & Pomper, 2013; Deri *et al.*, 2013; Müller & Schibli, 2013; Sugiura *et al.*, 2014). <sup>b</sup> β<sup>+</sup>; Positron, EC; Electron Capture (Elektroneneinfang), β<sup>-</sup>; Elektron. <sup>c</sup> Direkte Kopplung entspricht der Reaktion mit einer Aminosäure.

Die Wahl eines Radionuklids zur Tumorthherapie erfolgt vor allem in Abhängigkeit von der Größe des zu behandelnden Tumors: während voluminöse Tumore mit Radioisotopen behandelt werden, die hoch energetische α- oder β<sup>-</sup>-Strahlen (z.B. <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>177</sup>Lu) emittieren, werden bei kleineren Tumoren bzw. Metastasen Auger-Elektronen emittierende Radionuklide eingesetzt. Letztere weisen bei hoher Zytotoxizität eine geringere Eindringtiefe ins Gewebe auf (Volkert *et al.*, 1991; Ersahin *et al.*, 2011). Werden für eine Radionuklidtherapie Radioisotope verwendet, die neben der therapeutischen Strahlung einen gewissen Anteil an γ-Strahlung emittieren (Tabelle 1), ist gleichzeitig eine szintigra-

phische Überwachung des Patienten möglich. Sie gibt Aufschluss über die Pharmakokinetik und die Lokalisation des Radionuklids sowie die Strahlenexposition für den Patienten. Weitere wichtige Parameter sowohl für die Therapie als auch die Diagnostik sind die Halbwertszeit des Radionuklids und des zur zielgerichteten Tumoradressierung assoziierten Trägerproteins (siehe nächster Absatz sowie Abschnitt 1.2), einschließlich deren Pharmakokinetik und Biodistribution.

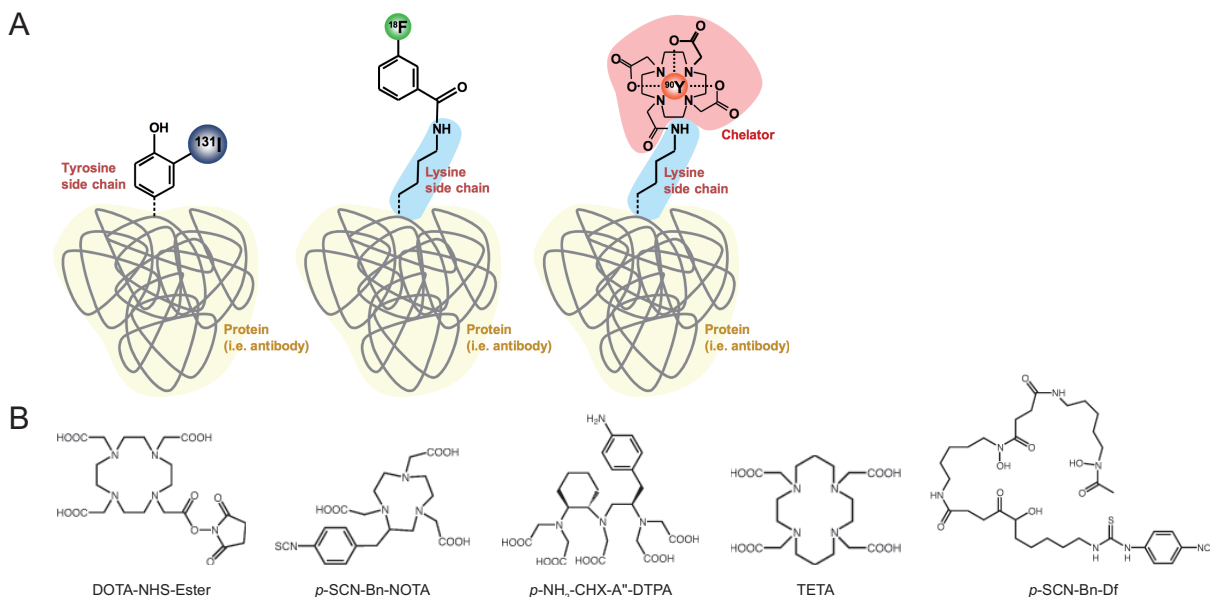
Vor der Anwendung eines Radionuklids wird es häufig an ein kleines chemisches Molekül, ein Peptid oder ein Bindeprotein, wie beispielsweise einen monoklonalen Antikörper bzw. dessen Fragmente oder alternative Gerüststrukturproteine (siehe Abschnitt 1.3), gekoppelt. Das heutzutage in der nuklearmedizinischen Diagnostik am häufigsten eingesetzte Radiopharmakon ist die  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose ( $^{18}\text{FDG}$ ), ein mit  $^{18}\text{F}$  markiertes Zuckeranalogon für die PET-Bildgebung (FDG-PET) (Belhocine *et al.*, 2006). Krebszellen, insbesondere von aggressiven, schnell proliferierenden Tumoren, generieren – bedingt durch die anaeroben Bedingungen im Tumorrinneren – Energie überwiegend durch Glycolyse anstelle von oxidativer Phosphorylierung (Warburg-Hypothese). Dies führt insgesamt zu einer höheren Glucoseaufnahme.  $^{18}\text{FDG}$  eignet sich bei vielen Tumorerkrankungen zur Bestimmung des Krankheitsstadiums, zur Evaluierung des Therapieerfolgs sowie zur post-therapeutischen Kontrolle. Allerdings gehen die in Folge einer Therapie auftretenden Entzündungs- und Immunreaktionen ebenso mit einem erhöhten Glucose-Metabolismus einher, so dass eine Unterscheidung zwischen kranken und gesundem Gewebe nicht immer sicher möglich ist. Auch das Gehirn eignet sich aufgrund des hohen Glucose-Umsatzes für die Radiodiagnostik in der Regel nicht. Zudem können bestimmte Tumore in der Prostata und der Leber sowie langsam wachsende Tumore durch ihren niedrigen Glucose-Umsatz kaum detektiert werden (Hricak, 2007). Als alternative Radiopharmaka gelten für solche Erkrankungen unter anderem  $^{18}\text{F}/^{11}\text{C}$ -Aminosäureanaloga (Pirrotte *et al.*, 2004) und  $^{18}\text{F}$ -Thyminanaloga (Shields, 2006), die jedoch ebenso unspezifisch einen gesteigerten Metabolismus oder eine erhöhte Zellproliferation anzeigen. Ähnlich steht für die Tumorthherapie zur Behandlung von Schilddrüsenkrebs mit  $\text{Na}^{131}\text{I}$  zwar ein gewebespezifischer, jedoch relativ unselektiver Wirkstoff zur Verfügung.

Angesichts dieser Gesamtsituation richtete sich in den letzten Jahren vermehrt das Augenmerk auf Therapie- und Diagnoseansätze mit Bindeproteinen, die spezifisch für Oberflächen-Antigene sind und damit selektiv Tumorzellen erkennen (Hricak, 2007). In diesem Zusammenhang werden grundsätzlich zwei Strategien verfolgt: (i) die direkte Kopplung des Radionuklids an ein antigenspezifisches Bindeprotein, oder (ii) die Verwendung eines bispezifischen Bindeproteins, welches sowohl ein Tumorantigen als auch ein Radionuklid in nicht kovalenter Weise bindet. Bei letzterem Ansatz wird zunächst das unbeladene Protein dem Patienten appliziert und reichert sich am Tumor an. Nach dessen Eliminierung aus der Blutzirkulation erfolgt die Injektion des Radionuklids, welches daraufhin vom Bindeprotein am Tumor festgehalten wird (*Pretargeting*-Konzept; Frampas *et al.*, 2013). Beide Strategien werden im Folgenden im Detail erläutert.

### 1.1.1 Direkte Markierung von therapeutischen Proteinen mit Radionukliden

Für die direkte Beladung eines Proteins mit einem Radionuklid stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (Abbildung 1). Ihr Einsatz ist in erster Linie von der Chemie des verwendeten Radionuklids abhängig. Die radioaktiven Isotope von Iod (siehe Tabelle 1) werden direkt durch elektrophile Substitution unter Verwendung eines Oxidationsmittels, wie Iodogen oder Chloramin T, an Tyr- und His-Seitenketten unter relativ milden Reaktionsbedingungen in das Protein eingeführt (Wilbur, 1992; Tolmachev, 2008). Ein generelles Problem dieser Art von Iodierung ist die Instabilität der markierten Proteine durch Deiodierung *in vivo*, insbesondere aufgrund des natürlichen Katabolismus durch die Iodtyrosin-Deiodinase (Kopp, 2008). In Folge dessen reichert sich radioaktives Iodid in der Schilddrüse und dem Magen an, was letztlich zu toxischen Effekten führt (Amartey *et al.*, 2005). Weitere Limitierungen bestehen zudem darin, dass nicht in allen radiopharmazeutisch relevanten Proteinen oder Peptiden Tyr- bzw. His-Reste für solche Modifikationen zugänglich sind oder aber deren Iodierung die intermolekularen Wechselwirkungen beeinträchtigt und damit die Affinität zum Rezeptor (o.Ä.) vermindert. Dagegen bietet die indirekte gerichteten Iodierung von Proteinen durch chemische Konjugation von primären Aminogruppen ( $\epsilon$ -Aminogruppe von Lys-Seitenketten, N-Terminus) mit einer bifunktionellen Gruppe, wie *N*-Succinimidyl-3-[\*I]iodbenzoat ([\*I]SIB) oder *N*-Succinimidyl-3-(4-hydroxy-5-[\*I]iodophenyl)-propionat (Bolton-Hunter Reagenz), eine geeignete Alternative, da eine höhere *in vivo* Stabilität erreicht und das Risiko oxidativer Schädigung des Proteins eliminiert wird (Sugiura *et al.*, 2014). Bei der Halogenierung von Proteinen mit  $^{18}\text{F}$  (siehe Tabelle 1), dem aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (109,8 min) und günstigen chemischen Eigenschaften (hohe Elektronegativität, Ausbildung stabiler kovalenter Bindung) bevorzugten Radionuklid für die PET-Diagnostik, wird ebenfalls zwischen direkten und indirekten Kopplungsstrategien unterschieden (Jacobson *et al.*, 2015). Direkte Methoden wie der elektrophile bzw. nukleophile Angriff auf Tyr-Reste kommen allerdings seltener zum Einsatz, da entweder die Regioselektivität nicht ausreichend ist (*Electrophilic Fluorination*) oder die Markierung harsche Reaktionsbedingungen (hohe Temperatur, basischer pH) erfordert (*Nucleophilic Fluorination*), unter denen die meisten Proteine nicht stabil sind. Wie bei der Iodierung stehen daher zur indirekten Fluorierung bifunktionelle Gruppen, wie beispielsweise *N*-Succinimidyl-3-(di-*tert*-butyl[ $^{18}\text{F}$ ]fluorsilyl)benzoat ([ $^{18}\text{F}$ ]SiFB) für die chemische Konjugation mit primären Aminogruppen oder *N*-(6-[4-[ $^{18}\text{F}$ ]fluorbenzyliden)aminooxy]hexyl)maleimid ([ $^{18}\text{F}$ ]FBAM) für die Kopplung an Thiolgruppen, zur Verfügung. Darüber hinaus wurden Reagenzien für die Konjugation mittels Click-Chemie entwickelt (Sugiura *et al.*, 2014).





**Abbildung 1. Möglichkeiten zur gerichteten Markierung von Proteinen mit Radionukliden.** (A) Strategien zur radiochemischen Beladung von Proteinen. In Abhängigkeit vom Radionuklid erfolgt die Kopplung entweder direkt an eine Aminosäure (z.B.  $^{131}\text{I}$ -Tyr) oder wird durch eine prosthetische Gruppe (z.B.  $^{18}\text{F}$ [SFB] bzw. einen Chelator (z.B.  $^{90}\text{Y}$ ·DOTA) vermittelt. Die Abbildung wurde verändert aus (Sugiura *et al.*, 2014) übernommen. (B) Strukturformeln der in der Nuklearmedizin etablierten chemisch reaktiven Chelatoren 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (DOTA), 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-Triessigsäure (NOTA), Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-Tetraessigsäure (TETA) sowie Desferrioxamin (Df), welche verschiedene Metallnuklide komplexieren können. Dargestellt ist jeweils ein Derivat des Chelators mit funktioneller Gruppe (NHS-Ester, N-Hydroxysuccinimid-Ester; SCN, Isothiocyanat), die zur Kopplung der Chelatoren an Proteine dienen kann.

Radioaktive Metallionen werden dagegen häufiger indirekt mit Hilfe sogenannter Chelatoren an Proteine gekoppelt, da sie im Gegensatz zu Halogenen keine kovalenten Bindungen eingehen. Chelatoren wie DOTA oder DTPA komplexieren Metalle in Abhängigkeit von deren Ionenradius, Ladung und Elektronenkonfiguration äußerst stabil. Aufgrund der Diversität der zur Verfügung stehenden metallischen Radioisotope gibt es allerdings keinen universellen Chelator, der alle Radiometalle gleichermaßen komplexieren kann. Ausgestattet mit einer reaktiven funktionellen Gruppe (bifunktionaler Chelator) können diese beispielsweise über die Aminogruppe einer Lys-Seitenkette mit einem Protein konjugiert werden (Liu & Edwards, 2001; Brechbiel, 2008). Generell unterscheidet man zwischen makrozyklischen Chelatoren (DOTA, NOTA, TETA), die ein Ringsystem bilden, und azyklischen Chelatoren (DTPA, Df), bei denen die Koordination des Radiometalls über verzweigte Gruppen erfolgt (siehe Abbildung 1B).

DTPA, welches ausgehend von der bekannten Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) entwickelt wurde, ist in der Lage, eine Vielzahl von Metallen der Nebengruppen und seltenen Erden, wie  $^{64}\text{Cu}^{3+}$ ,  $^{86/90}\text{Y}^{3+}$  und  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  unter milden Reaktionsbedingungen zu komplexieren (Jamous *et al.*, 2013). Hierzu verfügt DTPA über insgesamt acht Donoratome (N und O), die je nach Radiometallion eine sechs-

oder achtfache Koordination zulassen (Liu, 2008). Die Vielzahl der Torsionsfreiheitsgrade des klassischen DTPA-Moleküls begrenzt allerdings die Stabilität der Komplexbildung *in vivo*. Deshalb wurden DTPA-Derivate entworfen, in denen das azyklische Molekülrückgrat beispielsweise durch Einfügen eines *trans*-Cyclohexylrings (CHX) in seinen Freiheitsgraden beschränkt ist und damit eine energetische Barriere zur Öffnung des Chelatrings aufgebaut wurde (Fichna & Janecka, 2003). So besitzt CHX-DTPA eine zwei- bis dreifach höhere Komplexstabilität mit dem Metallnuklid als DTPA (Liu & Edwards, 2001). Von CHX-DTPA existieren zwei Isoformen, CHX-A" und CHX-B", wobei CHX-A" eine höhere *in vivo* Stabilität aufweist und damit bevorzugt für radiochemische Zwecke eingesetzt wird (Kobayashi *et al.*, 1998).

Die makrozyklischen Chelatoren gelten als weitere Alternative zu den leicht dissoziationsanfälligeren DTPA-Komplexen. Ihre zentrale Einheit besteht aus einem tetraaza- oder triazamakrozyklischen Ring, welcher die Ausbildung eines kinetisch äußerst stabilen Metallchelate-Komplexes zulässt. DOTA und dessen Derivate komplexieren beispielsweise divalente und trivalente Radiometalle, wie  $^{111}\text{In}^{3+}$ ,  $^{86/90}\text{Y}^{3+}$  und  $^{213}\text{Bi}^{3+}$ . Die höhere *in vivo* Stabilität von DOTA im Vergleich zu DTPA geht allerdings mit härteren, für Proteine oftmals ungünstigeren Reaktionsbedingungen für die Komplexbildung sowie einer geringeren Ausbeute des Metallchelate-Komplexes einher (Sugiura *et al.*, 2014).

Neben diesen klassischen Kopplungsstrategien, die sich an den chemischen Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren bedienen (Baslé *et al.*, 2010), wurden neuerdings Verfahren entwickelt, die die Proteinmodifikation – terminal oder innerhalb der Polypeptidkette – zum Teil selektiver und effizienter erfolgen lässt. Beispiele dafür, wie die sequenzabhängige enzymatische Modifikation oder bioorthogonale Reaktionen mit nicht-kanonischen Aminosäuren, sind in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (Sletten & Bertozzi, 2009).

Neben den oben erwähnten Einschränkungen bestehen – insbesondere bei der Behandlung solider Tumore – Limitierungen durch das Bindeprotein selbst. Die häufig eingesetzten monoklonalen Antikörper werden aufgrund ihrer Molekülmasse von rund 150 kDa nur sehr langsam aus dem Blutkreislauf entfernt. Dadurch wird nicht nur der Tumor sondern auch vor allem das empfindliche Knochenmark kontinuierlich der radiochemischen Zerfallsstrahlung ausgesetzt, was letztlich zu einer dosislimitierenden Myelotoxizität führt (Sharkey *et al.*, 2005b). Zudem hat das resultierende niedrige Tumor/Blut-Verhältnis bei der diagnostischen Anwendung einen schlechten Bildkontrast zur Folge. Durch Verminderung der Antikörperkonzentration im Blut, wie beispielsweise bei Verwendung kleinerer Antikörperfragmente (Schlom *et al.*, 1990) oder der Verabreichung von *Clearing Agents*, die an zirkulierende Antikörper binden und deren Eliminierung über die Leber und Milz fördern (Speer, 2012), können bessere Ergebnisse erzielt werden. Jedoch gehen diese Ansätze oftmals auf Kosten einer geringeren Anreicherung des markierten Proteins im Tumor, was nicht unbedingt durch eine höhere Dosis zu kompensieren ist (Sharkey *et al.*, 2005b). Eine Alternative bietet der *Pretargeting*-Ansatz, bei dem das therapeutische Protein zunächst losgelöst vom Radionuklid verabreicht wird.

### 1.1.2 Der *Pretargeting*-Ansatz unter Verwendung von bispezifischen Bindeproteinen und bifunktionellen Metallchelatoren als Liganden

Voraussetzung für das *Pretargeting*-Verfahren ist ein bispezifisches Bindeprotein, welches sowohl ein tumorassoziiertes Antigen als auch ein radioaktives Hapten erkennt. Zunächst wird dem Patienten das unmarkierte Bindeprotein injiziert und solange abgewartet, bis eine niedrige Blutkonzentration bei gleichzeitig hoher Proteinkonzentration am Tumor erreicht ist. Dann wird dem Patienten das radioaktive Effektormolekül verabreicht, welches von dem am Tumor lokalisierten Bindeprotein abgefangen wird. Überschüssiges radioaktives Hapten wird aufgrund der geringen Molekülgröße schnell über die Nieren ausgeschieden (Frampas *et al.*, 2013). Im weiteren Verlauf entwickelt die am Tumor angereicherte Radioaktivität lokal ihre zerstörerische Wirkung.

Aktuell existieren drei Strategien zur Umsetzung des *Pretargeting*-Konzepts. Diese basieren auf der Bindung von (i) Biotin durch Streptavidin oder Avidin (Hnatowich *et al.*, 1987), (ii) einem Hapten durch einen bispezifischen Antikörper (Reardan *et al.*, 1985) oder (iii) eines DNA-Moleküls durch eine komplementäre DNA (Kuijpers *et al.*, 1993). Letzterer Ansatz spielt allerdings zur Zeit noch eine untergeordnete Rolle und wird daher nicht weiter erläutert.

Die außergewöhnlich hohe Affinität von Avidin, Streptavidin für Biotin ( $10^{-14}$  bis  $10^{-15}$  M) (Hnatowich *et al.*, 1987) bildete die Grundlage für einen der ersten *Pretargeting*-Versuche, bei dem einem Patienten zunächst ein Streptavidin-Antikörper-Konjugat appliziert und ein paar Tage später radioaktiv markiertes Biotin injiziert wurde. Die immense Größe des Streptavidin-Antikörper-Konjugats (ca. 210 kDa) und die damit verbundene lange Zirkulationszeit im Blut machte jedoch den Einsatz eines *Clearing Agents* vor der Radionuklidinjektion unumgänglich (Sharkey *et al.*, 2005b). In einem zweiten deutlich komplexeren Ansatz wurde ein Biotin-Antikörper-Konjugat appliziert. Der nach 2-3 Tagen noch im Blut zirkulierende Anteil wurde durch Gabe von Avidin, welches aufgrund der Glykosylierung schnell renal ausgeschieden wird, eliminiert. Kurze Zeit später folgte die Injektion des metabolisch stabileren Streptavidins, welches an das tumorassoziierte Biotin-Antikörper-Konjugat band und es gestattete das nachfolgend injizierte biotinylierte Radioisotop abzufangen (Frampas *et al.*, 2013).

Trotz erster Erfolge in der Therapie birgt dieser Ansatz einige Nachteile. In erster Linie besteht die Möglichkeit einer Immunreaktion auf das körperfremde Streptavidin, Avidin bzw. dessen Konjugate (Goldenberg *et al.*, 2003). Die nachgewiesene Anreicherung von Streptavidin in den Nieren führt aufgrund der Bindung des biotinylierten Radionuklids zur renalen Toxizität (Forster *et al.*, 2006). Biotinylierte Effektormoleküle zeigen außerdem potentielle Instabilität, da sie mittels der im Plasma vorkommende Biotinidase in Biotin und das Effektormolekül gespalten werden können (Rosebrough, 1993). Zudem besteht die Möglichkeit der irreversiblen Bindung von endogenem Biotin, einem essentiellen Kofaktor diverser Enzyme (Jitrapakdee & Wallace, 2003), an das Streptavidin-Antikörper-Konjugat vor der Injektion des biotinylierten Radionuklids. Da jedoch die Biotinkonzentration im Menschen niedriger als in vielen anderen Organismen ist (Rosebrough & Hartley, 1995), sollte dieser negative Effekt nur in geringem Maße auftreten (Hnatowich, 1994).

Das zweite Erkennungssystem verwendet ein radioaktiv markiertes Hapten sowie ein bispezifisches Bindeprotein, häufig einen bispezifischen Antikörper. In der ersten Generation dieser *Pretargeting*-Strategie lag das Hapten als einfacher Metallchelate-Komplex vor (siehe Abschnitt 1.1.1). Der Antikörper war sowohl mit einer Bindungsaffinität für ein krankheitsrelevantes Antigen als auch einer Spezifität für das radioaktive Hapten ausgestattet (Sharkey *et al.*, 2012). Bei einem solchen bispezifischen Antikörper erfolgt die Bindung des jeweiligen Zielmoleküls nur monovalent, was zur Folge hat, dass insbesondere der kleine Metallchelate-Komplex wieder ins Blut dissoziiert und renal ausgeschieden wird. Aufgrund dessen wurde eine zweite Generation des *Pretargeting*-Verfahrens entwickelt, bei dem zwei durch ein kurzes Peptid verbrückte Metallchelate-Komplexe eingesetzt werden. Durch Bindung eines Arms des divalenten Haptens an den zielgebundenen Antikörper steigt die Wahrscheinlichkeit für die Bindung des zweiten Arms an ein weiteres Antikörpermolekül, da die lokale Konzentration der Bindungspartner erhöht wird (Aviditätseffekt). Dadurch wird sowohl die Affinität zwischen dem Antikörper und dem Hapten als auch indirekt die Bindungsstärke zwischen dem Antikörper und dem Tumorantigen erhöht, was sich *in vivo* in einer gesteigerten Aufnahme von Radioaktivität in den Tumor bei gleichzeitig längerer Retention widerspiegelt (Sharkey *et al.*, 2005b; Frampas *et al.*, 2013). In einer dritten Generation werden derzeit humanisierte Antikörper eingesetzt, die das Tumorantigen in divalenter Form und das Hapten auf monovalente Weise binden. Als Hapten dient hierbei das inerte Histamin-succinyl-glycine (HSG), welches über eine kurze Peptidsequenz an ein zweites HSG-Molekül gekoppelt ist. Dadurch wird bei Erkennung durch zwei benachbarte Antikörper eine Aviditätseffekt ermöglicht. Der Peptidlinker dient zum Einbringen unterschiedlicher Metallchelate-Komplexe, Radioisotope oder auch optischer (fluoreszierender) Reagenzien, die mit diesem auf vielfältige Weise konjugiert werden können (Sharkey *et al.*, 2012).

## 1.2 Zielgerichtete Adressierung solider Tumore

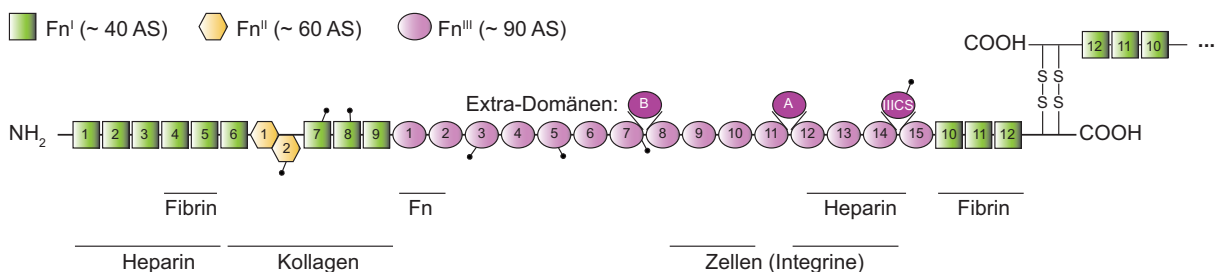
Spätestens seit der Zulassung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Markenname Herceptin<sup>®</sup>, Hersteller Roche) zur Behandlung von metastasierendem, für HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) positivem Brustkrebs durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) im Jahr 1998 erfolgte ein Umdenken auf dem Gebiet der Tumorthherapie (Hudziak *et al.*, 1989). Die bis dahin weit verbreitete traditionelle Chemotherapie basiert auf der ungerichteten Schädigung von sich schnell teilenden Zellen durch Beeinträchtigung von Prozessen wie DNA-Replikation oder Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose (Huang *et al.*, 2014). Demgegenüber zeigt die zielgerichtete biopharmazeutische Therapie einen weniger toxischen und effektiveren Ansatz der Tumorbehandlung, bei dem molekulare Abnormalitäten von Tumorzellen durch Antikörper, alternative Bindeproteine und gar Peptide spezifisch erkannt werden. Derlei therapeutische Proteine aktivieren entweder das Immunsystem oder zerstören nach Kopplung mit Toxinen oder Radionukliden die Tumorzellen. Erkannt werden die Tumorzellen dabei anhand sogenannter Tumormarker – Oberflächen-Antigene oder lokal auftretende lösliche Antigene – die im direkten Zusammenhang mit dem Milieu des Tumors stehen und idealerweise nicht im gesunden Gewebe vorkommen. Mittlerweile wurde eine Vielzahl diagnostischer

und therapeutischer Tumormarker (*Targets*) identifiziert. Darunter befinden sich insbesondere zwei Zelladhäsionsproteine, eine Spleißform von Fibronectin sowie das carcinoembryonale Antigen, die beide durch ihre Fähigkeit zur Modulation von Zell-Zell-Kontakten und Signaltransduktionskaskaden eng mit der Tumorentstehung assoziiert sind und im Folgenden besprochen werden.

### 1.2.1 Fibronectin-Spleißform mit ED-B in der Tumorangiogenese

Ein zentraler Mechanismus der Tumorgenese ist die Neubildung von Blutgefäßen (Vaskularisierung) sowie die Sprossung von neuen Kapillaren aus dem umliegenden, gesunden Gewebe (Angiogenese), da der Diffusionsweg von Sauerstoff im Gewebe auf 100 bis 200 µm limitiert ist (Hanahan & Folkman, 1996; Bergers & Benjamin, 2003; Hoeben *et al.*, 2004). Während diese Prozesse bei der Entwicklung und im gesunden Gewebe zeitlich begrenzt und streng reguliert ablaufen, stimulieren schnell proliferierende Tumorzellen die Ausbildung abnormaler neuer Gefäßstrukturen, in dem sie proangiogene und Wachstumsfaktoren sezernieren. Dazu müssen vaskuläre Endothelzellen und die Extrazelluläre Matrix (ECM) miteinander interagieren (Lu *et al.*, 2012). Proteoglykane und fibrilläre Proteine, wie Kollagen, Elastin, Laminin und Fibronectin sind die Hauptkomponenten der ECM (Järveläinen *et al.*, 2009).

Das von den Gefäßendothelzellen sezernierte Glycoprotein Fibronectin (Fn) interagiert als Dimer innerhalb der ECM mit vielen Oberflächenproteinen, insbesondere mit den heterodimeren Rezeptoren der Integrin-Familie (Astrof & Hynes, 2009). Hier bedingt vor allem die Wechselwirkung mit dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  die Ausbildung einer funktionellen, fibrillären Matrix von Fn-Molekülen (Schwarzbauer & Sechler, 1999; Mao & Schwarzbauer, 2005). Generell ist Fn in viele lebenswichtige physiologische Prozesse involviert, z.B. der Zellmorphologie, Zelladhäsion und -migration, der Differenzierung und Proliferation sowie der Wundheilung und Hämostase (Hynes, 1990). Weiterhin zirkuliert eine lösliche Variante von Fn in hoher Konzentration (300-400 µg/mL) im Blutplasma (Pankov & Yamada, 2002), welche in den Leberzellen produziert wird (To & Midwood, 2011).



**Abbildung 2. Schematischer Aufbau von Fibronectin.** Jede Polypeptidkette eines kovalenten Fn-Dimers ist auf modulare Weise aus den homologen Domänen der drei Typen Fn<sup>I</sup>, Fn<sup>II</sup> und Fn<sup>III</sup> zusammengesetzt, welche mit den unterschiedlichen Komponenten der ECM (Integrine, Kollagen, Heparin, Fibrin) interagieren und auf diese Weise die Fibrillogenese beeinflussen. Dabei ist Fn<sup>III</sup> als häufigste Domäne insbesondere für die integrinvermittelte Zellbindung verantwortlich. Je nach Gewebe bzw. dessen Entwicklungsstadium enthält Fn<sup>III</sup> zusätzliche Domänen (Extra-Domäne

A, ED-A; Extra-Domäne B, ED-B; Typ III *Connecting Segment*, IICS), die auf mRNA-Ebene an drei verschiedenen Spleißstellen inseriert werden. Positionen, an denen N- bzw. O-Glykosylierung auftreten, sind durch schwarze Kopfstriche markiert (White & Muro, 2011).

Zellassoziertes Fn besteht aus zwei nahezu identischen Untereinheiten, welche durch zwei C-terminale Disulfidbrücken kovalent miteinander verknüpft sind (Abbildung 2). Jede Untereinheit mit einer Masse von ca. 250 kDa folgt einem modularen Aufbau aus insgesamt 30-32 Domänen, die sich in repetitiver Weise perlenschnurartig aneinanderreihen (Hynes, 1990; White *et al.*, 2008). Jede Domäne gehört zu einem von drei unterschiedlichen Faltungstypen (Fn<sup>I</sup>, Fn<sup>II</sup> und Fn<sup>III</sup>), deren gemeinsames Strukturmerkmal jeweils ein anti-paralleles  $\beta$ -*Sandwich* darstellt (Fattorusso *et al.*, 1999; Hohenester & Engel, 2002). Während Fn<sup>I</sup> und Fn<sup>II</sup> durch intrachenare Disulfidbindungen stabilisiert werden, bewirkt deren Abwesenheit in Fn<sup>III</sup> eine gewisse strukturelle Elastizität, was insbesondere bei der Reorganisation in der ECM während der Wundheilung von Bedeutung ist (Erickson, 2002). Das Auftreten von Fn<sup>I</sup> beschränkt sich vornehmlich auf die N- und C-terminalen Bereiche des Proteins, während der zentrale und mit bis zu 15 Domänen größte Abschnitt allein durch den Faltungstyp Fn<sup>III</sup> gebildet wird. Fn<sup>II</sup> dagegen ist mit nur zwei Domänen in der Nähe des N-Terminus nur untergeordnet repräsentiert. Von besonderer Bedeutung für den Fn<sup>III</sup>-Abschnitt sind die drei alternativen Exon-Spleißstellen in der mRNA, wodurch im Menschen mehr als 20 verschiedene Fn-Isoformen gebildet werden können (Ffrench-Constant, 1995). Durch die Spleißstelle zwischen Fn<sup>III</sup>14 und Fn<sup>III</sup>15 wird in Abhängigkeit von Spezies und Gewebe die größte Variation in der Polypeptidkette erzeugt, da das Segment IICS in sehr unterschiedlichen Spleißvarianten auftreten kann. Die Bildung von Fn-Isoformen mit inserierter Extra-Domäne (ED)-A oder -B zwischen den Domänen Fn<sup>III</sup>7 und Fn<sup>III</sup>8 bzw. Fn<sup>III</sup>11 und Fn<sup>III</sup>12 korreliert stark mit den angiogenen Prozessen in der Embryonalentwicklung (Fukuda *et al.*, 2002) sowie der Wundheilung und Gewebsneubildung im gesunden adulten Gewebe (White & Muro, 2011). In reifen Geweben und Organen von Erwachsenen sind diese Isoformen dagegen außer im weiblichen Fortpflanzungstrakt kaum zu finden (Menrad & Menssen, 2005).

Allerdings ist die mit der Tumorentwicklung einhergehende Angiogenese und Neovaskularisierung ebenfalls mit der Expression der sogenannten onkofetalen ED-A/B-exprimierenden Fn-Isoformen assoziiert (Khan *et al.*, 2005b). Dabei spielt das aus 91 Aminosäuren bestehende ED-B eine besondere Rolle als diagnostischer Tumormarker, da dessen Auftreten ausschließlich auf pathologisches Gewebe beschränkt und ED-B nicht in gesunden Blutgefäßen zu finden ist. Bisher konnte bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen ED-B-positives Fn nachgewiesen werden, darunter Hirntumore (Castellani *et al.*, 2002), Pankreas- und Leberkarzinome (Wagner *et al.*, 2008), Brustkarzinome (Kaczmarek *et al.*, 1994), Kolorektalkarzinome (Pujuguet *et al.*, 1996), Karzinome des Hals- und Rachenraums (Birchler *et al.*, 2003), nicht-kleinzellige (NSC) Lungenkarzinome (Khan *et al.*, 2005a) sowie hämatologische Neoplasien (Sauer *et al.*, 2009).

Seit der Entdeckung der ED-B Domäne (Zardi *et al.*, 1987) wurde an der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern zum Nachweis von ED-B-positivem Fn in angiogenem Gewebe gearbeitet. Die

Adressierung der Tumervaskulatur bietet dabei im Vergleich zu konventionellen Therapieansätzen, in denen die Tumorzellen direkt angegriffen werden, mehrere Vorteile: (i) das Gefäßendothel und die ECM sind aufgrund ihrer Durchblutung gut für (Protein)Wirkstoffe zu erreichen, wodurch (ii) die häufig in soliden Tumoren limitierte Gewebeporosität keine Rolle spielt; (iii) Endothelzellen unterlaufen selten somatische Mutationen und sind – im Gegensatz zu Tumorzellen – keinem ständigen Selektionsdruck ausgesetzt, wodurch sie weniger Resistenzmechanismen ausbilden; (iv) die Expression der mit der Tumervaskulatur assoziierten Zielmoleküle ist weitaus homogener als die Antigenexpression auf den Tumorzellen (Gerber *et al.*, 2009).

Der erste anti-ED-B Antikörper BC-1 eignete sich bereits sowohl für die immunhistochemische Anfärbung von humanem Gewebe (Castellani *et al.*, 1994) als auch für eine ED-B-spezifische Tumoranreicherung in Mäusen (Mariani *et al.*, 1997), dessen Domäne dieselbe Aminosäuresequenz zeigt. Der Durchbruch gelang allerdings erst mit der Selektion des humanen Antikörper-Fragments L19 aus einer semi-synthetischen scFv-Phagenbibliothek, das – nach zwei aufeinanderfolgenden Affinitätsmaturierungen – vorgeblich mit einer Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 54 pM – an ED-B bindet (Pini *et al.*, 1998). Bei diesen Bindungsstudien blieb jedoch der für scFv-Fragmente typische variable Oligomerenstatus unberücksichtigt, so dass dieser  $K_D$ -Wert die Affinität einer polydispersen Proteinlösung widerspiegelt (Gebauer *et al.*, 2013). Monomeres wie auch nicht kovalent verknüpftes homo-dimeres L19, welche durch Gelfiltration voneinander separiert wurden, führten zu vielversprechenden Ergebnissen in präklinischen Tiermodellen für die Diagnostik und Therapie von unterschiedlichen Erkrankungen mit angiogenem Hintergrund (Viti *et al.*, 1999; Tarli *et al.*, 1999; Birchler *et al.*, 1999). Das galt ebenso für die in den folgenden Jahren durch *Protein Engineering* generierten Derivate von L19, wie das L19 *Small Immunoprotein* (SIP; ein mittels der C<sub>H</sub>4 Domäne eines IgE fusioniertes chimäres scFv-Fragment), das L19-IgG sowie verschiedene bispezifische Formate (Kaspar *et al.*, 2006). Andere L19-Fusionsproteine mit Cytokinen wie IL2 bzw. TNF sowie ein <sup>131</sup>I-markiertes SIP haben bereits die klinische Phase I/II erreicht und werden derzeit hinsichtlich ihres Einsatzes zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen evaluiert (Santimaria *et al.*, 2003; Johannsen *et al.*, 2010; Erba *et al.*, 2012; Papadia *et al.*, 2013; Locher *et al.*, 2014). Trotz der bisherigen Erfolge bleiben scFv-Fragmente vor allem aufgrund ihrer Tendenz, unter bestimmten Bedingungen zu dimerisieren oder sogar zu aggregieren (Arndt *et al.*, 1998) und damit eine Wirkstoffheterogenität zu bedingen, für die biopharmazeutische Industrie eine Herausforderung (Goswami *et al.*, 2013).

Kürzlich wurden im Labor von Prof. Skerra (TU München) alternative Bindeproteine basierend auf dem humanen Lipocalin 2 (siehe Abschnitt 1.3) durch bakterielles *Phage Display* aus einer Zufallsbibliothek selektiert, welche ED-B hochspezifisch und mit einer Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich binden (Gebauer *et al.*, 2013). Diese sogenannten Anticaline erkennen mit einem strikt monomeren Bindungsmodus neben rekombinanten Fn-Fragmenten auch ED-B-positives Fibronectin auf Tumorzellen und werden zur Zeit zur Diagnose und Klassifizierung von Glioblastomen in humanen Gewebeschnitten evaluiert (Albrecht *et al.*, 2016).

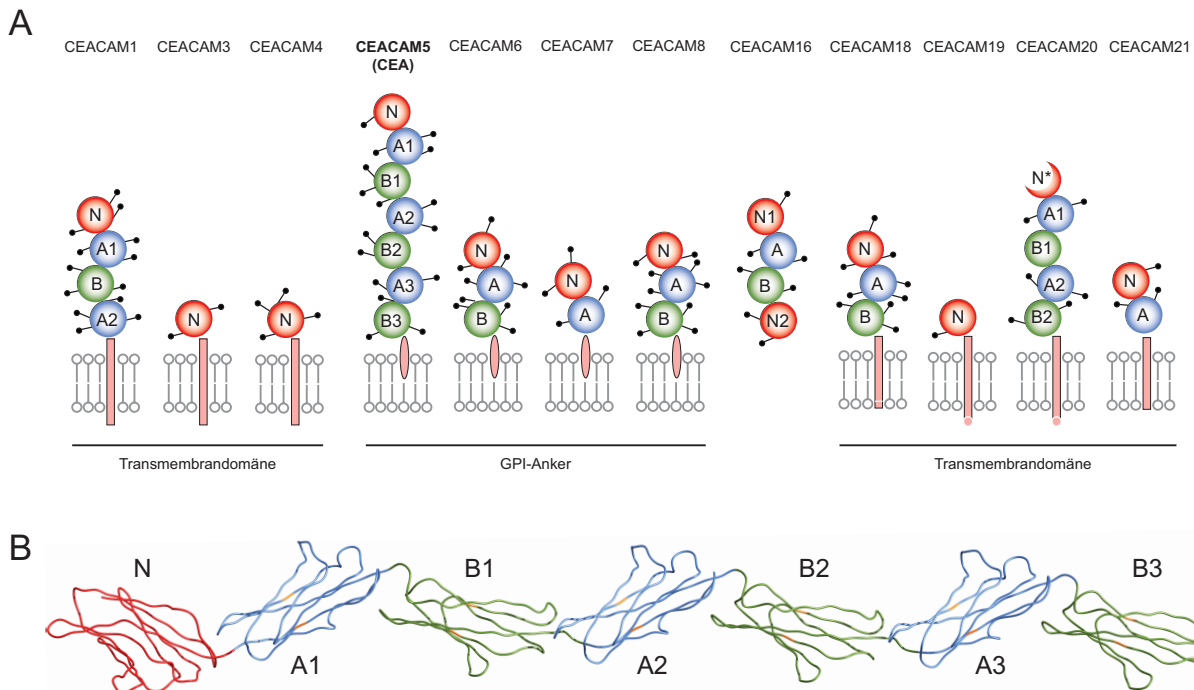
### 1.2.2 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Das *Carcinoembryonic Antigen* (CEA; CEACAM5, CD66) wurde erstmals durch Gold und Freedman beschrieben (Gold & Freedman, 1965a; Gold & Freedman, 1965b). Dieses Protein wurde sowohl in Kolonkarzinomzellen als auch im embryonalen Gewebe des humanen Verdauungstraktes jedoch nicht im gesunden adulten Kolongewebe nachgewiesen. Nach Klonierung der CEA cDNA aus humanen Kolorektalkarzinomzellen konnte auf dem Chromosom 19q13.1-13.2 ein *Cluster* von insgesamt 22 Genen identifiziert werden, das für insgesamt 12 *Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecules* (CEACAMs) sowie für eine Subgruppe aus 10 *Pregnancy-specific Glycoproteins* (PSG) codiert (Oikawa *et al.*, 1987; Zimmermann *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1987; Beauchemin *et al.*, 1987).

CEA besitzt mit ca. 180 kDa (668 AS) die größte Molekülmasse unter den CEACAM-Proteinen und besteht aus einer variablen IgV-ähnlichen Domäne (N Domäne), an die sich sechs konstante IgC2-ähnliche Domänen (Typen A oder B) anschließen (Abbildung 3A; Westwood *et al.*, 1974; Yamashita *et al.*, 1987). Einen erheblichen (bis zu 50 %) Anteil an der Gesamtproteinmasse haben zudem komplexe, in ihrer Zusammensetzung und Länge extrem heterogene Zuckerketten (Oligosaccharide) bestehend aus Fucose, Galactose, Mannose, *N*-Acetylglucosamin sowie *N*-Acetylneuraminsäure, die N-glykosidisch mit den in diesem Bereich liegenden 28 Asn-Seitenketten verknüpft sind (Huang *et al.*, 2015). Wie andere CEACAMs ist auch das normalerweise als Monomer vorliegende CEA durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden (Jean *et al.*, 1988; Hefta *et al.*, 1988). Trotz des hohen Kohlenhydratanteils konnte anhand von Röntgen- und Neutronenbeugungsmessungen ein vollständiges Homologiemodell der sieben extrazellulären CEA-Domänen konstruiert werden (Boehm *et al.*, 1996; Boehm & Perkins, 2000), das auf einer Länge von 27-33 nm zueinander Zick-Zack-artig ausgerichtete Domänen in nahezu gestreckter Konformation zeigt (Abbildung 3B).

Damit stehen viele Epitope von CEA für die Ausbildung stabiler homo- oder heterophiler Zell-Zell-Kontakte zur Verfügung, was sowohl Interaktionen mit den übrigen Vertretern der CEACAM-Familie als auch mit anderen Zelloberflächenproteinen, z.B. dem *Death Receptor 5* (DC5), dem *Tumor Growth Factor* (TGF)- $\beta$  Rezeptor 1 sowie dem  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin, einschließt (Zhou *et al.*, 1993; Voges *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Camacho-Leal *et al.*, 2007). In Folge dessen fungiert CEA als Zelladhäsionsmolekül und ist gleichzeitig in der Lage, verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden der Differenzierung oder des programmierten Zelltods (Eidelman *et al.*, 1993; Ilantzis *et al.*, 2002; Ordonez *et al.*, 2000) sowie der Zellpolarisation und Gewebearchitektur zu beeinflussen (Obrink, 1997). Darüber hinaus konnte für CEA im Fall von Tumorerkrankungen immunmodulatorische Wirkung nachgewiesen werden (van Gisbergen *et al.*, 2005; Engering *et al.*, 2002; Stern *et al.*, 2005).





**Abbildung 3. Vertreter der humanen CEACAM-Familie.** (A) Bis auf CEACAM16 weisen alle Proteine eine variable IgV-ähnliche Domäne (N Domäne; rot) auf und sind entweder durch einen GPI-Linker oder mittels einer Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Dazwischen besitzen die CEACAMs eine unterschiedliche Anzahl von konstanten IgC2-ähnlichen Domänen (A bzw. B; blau bzw. grün), welche jeweils eine intramolekulare Disulfidbrücke aufweisen. Charakteristisch ist außerdem die starke Glycosylierung der extrazellulären Domänen (schwarze Kopfstriche). Die Nomenklatur der gesamten CEA-Familie wurde nachträglich vereinheitlicht (Beauchemin *et al.*, 1999). Abbildung nach (Thomas, 2009). (B) Homologiemodell der extrazellulären Domänen A (blau), B (grün) und N (rot) von CEA (PDB: 1E07); gezeigt ist das Polypeptidrückgrat. Die zwei jeweils pro Domäne an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligten Cys-Seitenketten sind in Orange hervorgehoben. Das Strukturmodell wurde mit Hilfe von Chimera v1.9 erstellt (Pettersen *et al.*, 2004).

Weiterhin existiert eine lösliche Variante von CEA, da die GPI-vermittelte Verankerung in der Zellmembran durch Phospholipasen gespalten werden kann (Sack *et al.*, 1988). Plasma-CEA wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Kupffer-Zellen des Lebergewebes aufgenommen und später lysosomal in den Hepatozyten abgebaut (Toth *et al.*, 1982; Thomas & Zamcheck, 1983; Toth *et al.*, 1985). Plasma-CEA eignet sich jedoch nicht als diagnostischer Tumormarker, da nur eine geringe Korrelation zwischen dessen Konzentration und der Menge an zellassoziertem CEA besteht (Urva & Balthasar, 2010).

Anders als zunächst angenommen, wird zellassoziertes CEA nicht nur in der frühen Embryonal- und Fötalentwicklung exprimiert (Nap *et al.*, 1988; Eades-Perner *et al.*, 1994), sondern ist auch im gesunden Gewebe und Organen, wie dem Magen, der Speiseröhre, den Schweißdrüsen, der Prostata und der Zunge von Erwachsenen nachweisbar (Hammarström, 1999). Die höchste CEA-Expression zeigen allerdings die Epithel- und Becherzellen des Darms. Zudem wurde CEA in Folge maligner Transfor-

mation in Karzinomen der Lunge, des Pankreas, der Gallen- und Harnblase, den Schleimhäuten der Gebärmutter und der Eierstöcke nachgewiesen (Hammarström, 1999) und ist vor allem in Kolorektal- und Magenkarzinomen signifikant überexprimiert (Jothy *et al.*, 1993; Kodera *et al.*, 1993).

CEA fungierte bereits kurz nach seiner Entdeckung als Tumormarker vor allem für Kolorektalkarzinome sowie als Angriffspunkt für die Therapie von Tumorerkrankungen epithelialen Ursprungs (Goldenberg *et al.*, 1978; Mach *et al.*, 1974; Thompson & Zimmermann, 1988; Thompson *et al.*, 1991). Daneben dient CEA heutzutage vor allem für die Radioimmuntherapie und -diagnostik solider Tumore. Hierfür wurden eine Reihe von CEA-spezifischen Antikörpern hergestellt, die entweder direkt oder chelatvermittelt mit einem Nuklid beladen werden können, wie beispielsweise  $^{90}\text{Y}$ -cT84.66 (Wong *et al.*, 2003),  $^{111}\text{In}/^{64}\text{Cu}$ -DO3A-VS-hT84.66 (Li *et al.*, 2008) und  $^{131}\text{I}$ -Labetuzumab (Liersch *et al.*, 2005; Liersch *et al.*, 2007). Ebenso sind eine Vielzahl verschiedener Antikörperformate Gegenstand präklinischer oder klinischer Studien, darunter  $^{125}\text{I}$ -scFv (Monomer, Dimer; (Wu *et al.*, 1996), ein  $^{125}\text{I}$ -scFv-Albuminfusionsprotein (Yazaki *et al.*, 2008),  $^{124/125/131}\text{I}$ - oder Me-DOTA-markierte Minibodies und Diabodies (Yazaki *et al.*, 2001; Sundaresan *et al.*, 2003; Olafsen *et al.*, 2004; Kenanova *et al.*, 2005), ein  $^{18}\text{F}$ -Diabody (Cai *et al.*, 2007) sowie ein  $^{64}\text{Cu}$ -Minibody (Wu *et al.*, 2000). Darüber hinaus existiert das 1996 von der FDA und EMEA (*European Medicines Agency*) zugelassene Fab-Fragment  $^{99\text{mTc}}$ -Arcitumomab (CEA-SCAN™) zur Behandlung von Kolorektalkarzinomen, welches allerdings seit dem Jahr 2005 auf Wunsch des Herstellers Immunomedics aus kommerziellen Gründen nicht mehr auf dem europäischen Markt verfügbar ist (Kaur *et al.*, 2012).

**Tabelle 2. Pretargeting-Studien zur Diagnostik und Therapie CEA-exprimierender Tumore.**

Bispezifisches Radiopharmakon	Referenzen
anti-CEA (ZCE-025) Fab' x anti- $^{111}\text{In}$ -Benzyl-EDTA Fab'	(Stickney <i>et al.</i> , 1991)
anti-CEA (mF6) Fab' x anti- $^{111}\text{In}$ -DTPA (m734) Fab'	(Le Doussal <i>et al.</i> , 1993; Gautherot <i>et al.</i> , 1997; Barbet <i>et al.</i> , 1998; Chatal <i>et al.</i> , 2006)
anti-CEA hT84.66-M5A Antikörper x anti-Me-DOTA (C8.2.5) scFv	(Yazaki <i>et al.</i> , 2013)
anti-CEA (hMN-14; Labetuzumab) Fab' x anti-HSG (Histamin-succinylglycin) Fab' x anti-HSG (Histamin-succinylglycin) Fab' (TF2)	(Gestin <i>et al.</i> , 2001; Sharkey <i>et al.</i> , 2005a; McBride <i>et al.</i> , 2006; Schoffelen <i>et al.</i> , 2010; Schoffelen <i>et al.</i> , 2012)
anti-CEA (hMN-14) Fab' x anti- $^{111}\text{In}$ -DTPA (m734) Fab'	(Kraeber-Bodère <i>et al.</i> , 2006; Chatal <i>et al.</i> , 2006; Salaun <i>et al.</i> , 2012)

Des Weiteren sind Ansätze für das *Pretargeting* von CEA mit bispezifischen Antikörperformaten beschrieben (siehe Tabelle 2), wobei in einigen präklinischen sowie klinischen Studien auch ein bivalenter Metallchelate-Komplex, fusioniert durch einen Dipeptid-Linker, getestet wurde. Hierbei wurde im Vergleich zur Verwendung eines direkt mit einem Radionuklid konjugierten Bindeproteins zwar nur eine niedrigere oder ähnliche Akkumulation im Tumor beobachtet, jedoch waren gleichzeitig die Tumor/Blut- bzw. Tumor/Leber-Verhältnisse signifikant erhöht (Frampas *et al.*, 2013). In Folge dessen konnte eine höhere Radioaktivitätsdosis – bei ähnlicher hämatologischer Toxizität – injiziert werden, wodurch das Tumorstadium deutlich länger inhibiert war als bei der Therapie mit dem direkt markierten Radiopharmakon.

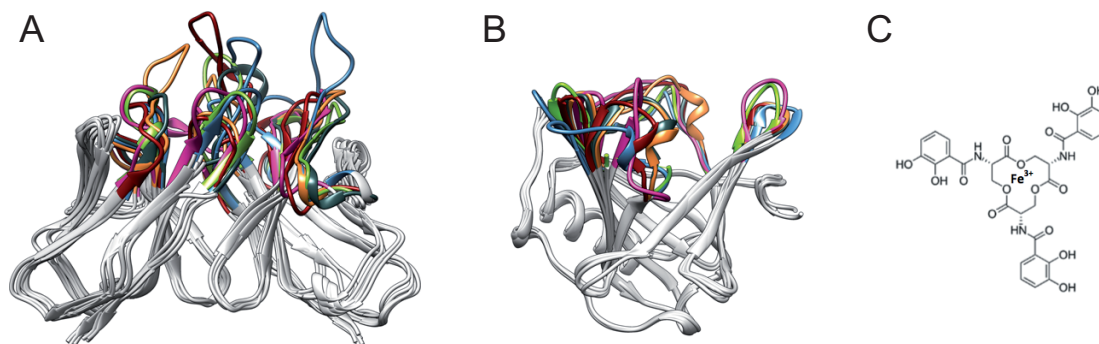
### 1.3 Anticaline als alternative Bindeproteine zu therapeutischen Antikörpern

Antikörper (Immunglobuline; Igs) sowie davon abgeleitete Proteine stellen heutzutage eine etablierte und schnell wachsende Klasse von Biopharmazeutika zur Behandlung verschiedener Erkrankungen dar. Mittlerweile sind ca. 30 therapeutische monoklonale Antikörper sowie drei rekombinante Fab-Fragmente in Europa und den USA zugelassen und mehr als 500 weitere Wirkstoffe befinden sich in der klinischen Entwicklung (Reichert & Dhimolea, 2012). Darunter sind auch Konjugate von Antikörpern mit Toxinen oder Radionukliden, bispezifische Antikörper und Antikörper-Fragmente (z.B. Fab, scFv) sowie abgewandelte Formate (Reichert & Dhimolea, 2012). Den größten Marktanteil haben zur Zeit Antikörper zur Behandlung von Krebs-, Autoimmun- und Entzündungserkrankungen (Elvin *et al.*, 2013). Dieser Erfolg war vor allem der Entwicklung grundlegender Strategien auf dem Gebiet der Proteinproduktion (Plückthun & Skerra, 1989) und des *Protein Engineerings* zu verdanken (Nygren & Skerra, 2004; Bornscheuer & Kazlauskas, 2011). Im Vergleich zur klassischen Immunisierung und Hybridom-Technologie (Köhler & Milstein, 1975) ermöglicht nun der Einsatz von semi-synthetischen oder synthetischen Antikörper-Genbibliotheken in Kombination mit ihrer effizienten Durchmusterung unter Verwendung von *in vitro* Präsentationssystemen (Geyer *et al.*, 2012), wie z.B. der *Phage Display*-Methodiken (Smith, 1985; McCafferty *et al.*, 1990), die Konstruktion diverser Antikörperformate mit nahezu beliebiger Antigenpezifität (Protein, Peptid, Hapten) und deutlich reduzierter Immunogenität im Menschen (Lonberg, 2008).

Nichtdestotrotz sind Antikörper als biopharmazeutisches Reagens nicht unproblematisch. Als Folge ihrer komplexen Molekülarchitektur bestehend aus vier, teilweise glykosylierten Polypeptidketten (zwei leichte und zwei schwere Ketten), die durch zahlreiche Disulfidbrücken zusammengehalten werden, ist die funktionelle Produktion ausschließlich in teuren eukaryotischen Expressionssystemen unter hohem Zeitaufwand möglich. Bedingt durch ihre relativ große Molekülmasse von 150 kDa ist einerseits die Eindringtiefe in das Gewebe solider Tumoren begrenzt, und andererseits ist für einen optimalen diagnostischen Einsatz *in vivo* die Zirkulation der Antikörper im Blut mit 2-3 Wochen zu lang (Ternant & Paintaud, 2005; Carter, 2011; Wurch *et al.*, 2012). Neben der mit steigender Molekülgröße abnehmenden Geschwindigkeit der renale Ausscheidung von Proteinen trägt das durch den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) vermittelte Recycling zu der langen Plasma-Halbwertszeit bei (Roopenian & Akilesh, 2007).

Hinzukommend ist die durch den Fc-Teil vermittelte immunmodulatorische Effektorfunktion bei bestimmten Therapieformen, wie z.B. der Blockade von Ligand-Rezeptor-Interaktionen, unnötig oder gar unerwünscht. Zwar konnten mit Antikörper-Fragmenten (Buss *et al.*, 2012) oder sogenannten *Single Domain* Antikörpern aus Kamelen oder Haien (Eyer & Hruska, 2012) einige dieser Unzulänglichkeiten umgangen werden. Dennoch stellte sich die grundlegende Frage, ob eine hoch-affine und spezifische Erkennung eines Zielmoleküls nicht auch durch alternative nicht Ig-ähnliche Proteinarchitekturen imitiert werden kann (Skerra, 2000a).

In diesem Zusammenhang wurden in den letzten 20 Jahren mehr als 50 sogenannte alternative *Scaffolds* identifiziert und davon etwa 10 auf ihre Eignung als therapeutische oder diagnostische Bindeproteine untersucht (Wurch *et al.*, 2008; Gebauer & Skerra, 2009; Carter, 2011; Löfblom *et al.*, 2011). Unter dem Begriff *Scaffold* (engl.: Gerüst) sind Proteine bestehend aus einer einzigen Polypeptidkette mit weniger als 200 Aminosäuren zusammengefasst, die neben einer stabilen und kompakten Kernregion exponierte variable Bereiche aufweisen, die wiederum Manipulationen in der Primärstruktur zwecks Generierung künstlicher Bindungsstellen zulassen (Skerra, 2000a; Wurch *et al.*, 2012). Damit folgen die alternativen *Scaffolds* im Prinzip dem molekularen Erkennungsmechanismus von Antikörpern (Skerra, 2000b), in denen die Antigenbindungsstelle durch insgesamt sechs hypervariable Schleifenregionen (*Complementarity-Determining Regions*; CDRs) in den variablen Domänen der leichten und schweren Polypeptidkette gebildet wird, die auf einem konservierten Grundgerüst bestehend aus  $\beta$ -Faltblattsträngen mit typischer Ig-Faltung verankert sind (Abbildung 4A).



**Abbildung 4. Prinzip der molekularen Erkennung durch Antikörper und Anticaline.** (A) Die Raumstrukturen der variablen Domänen von sechs Antikörpern mit Bindungsaktivität für Haptene (PDB: 3QCU und 3TV3), Peptide (PDB: 3UJJ und 3UJI) sowie Proteinantigene (PDB: 3TLC und 4JDV) wurden auf Basis ihrer konservierten Gerüststruktur überlagert. (B) Im Vergleich dazu wurde das humane Lipocalin 2 (Lcn2; PDB: 1L6M) mit fünf Lcn2-basierten Anticalinen, welche ebenfalls unterschiedliche Ligandenformate erkennen, anhand der 58 strukturell konservierten  $\alpha$ -Positionen der Lipocalin-Familie überlagert. Die für die Ligandenerkennung verantwortlichen hypervariablen Bereiche (farblich hervorgehoben) werden jeweils durch eine strukturell konservierte Gerüstregion (grau dargestellt) gestützt. (C) Fe<sup>III</sup>-Enterobactin, der natürliche Ligand von Lcn2. Teile der Abbildung aus (Richter *et al.*, 2014).

Die Protein-Familie der Lipocaline (griech.: *Calyx* = Kelch) stellt eine zu diesem Zweck äußerst vorteilhafte Gerüststruktur außerhalb der Immunglobulin-Superfamilie dar. Trotz einer niedrigen Aminosäuresequenzhomologie (15-25 %) zwischen den einzelnen Vertretern der Lipocaline (Flower, 1996) weisen sie mit ihrer kelchförmigen Faßstruktur ( $\beta$ -*Barrel*) sowie einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix eine äußerst konservierte Tertiärstruktur auf (Abbildung 4B). Gebildet wird das  $\beta$ -*Barrel* aus acht anti-parallel  $\beta$ -Faltblattsträngen, welche sich nahezu kreisförmig rechtsgängig um eine zentrale Achse winden und am oberen Ende paarweise durch insgesamt vier strukturell variable Peptidschleifen verbunden sind. Diese bilden – zusammen mit benachbarten Aminosäureresten im oberen Bereich des  $\beta$ -*Barrels* – die natürliche Ligandenbindungsstelle. Im Unterschied zu der eher planaren Interaktionsfläche von

Antikörpern (Padlan, 1994) kann somit die Bindung eines Liganden in Abhängigkeit von seiner Größe und chemischen Konstitution entweder durch tiefes Eindringen in das  $\beta$ -Barrel oder – vermittelt durch die Peptidschleifen – mehr an deren Oberfläche erfolgen (Skerra, 2000b). Dabei ist eine Konformationsänderung in Folge der Ligandenbindung (*Induced Fit*) durchaus möglich (Korndörfer *et al.*, 2003).

Lipocaline sind überwiegend extrazelluläre Proteine bestehend aus 150-200 Aminosäuren (~ 20 kDa), die vermutlich evolutionär aus einem bakteriellen Ur-Lipocalin hervorgegangen und nun in nahezu allen Bereichen des Lebens, darunter Bakterien, Pflanzen, Insekten und Vertebraten zu finden sind (Åkerström *et al.*, 2006). Die meisten Vertreter sind für die Speicherung oder den Transport von kleinen, häufig lipophilen Molekülen mit geringer Löslichkeit oder chemischer Instabilität verantwortlich, wie beispielsweise Vitamine, Steroide, Hormone und Duftstoffe. Andere besitzen enzymatische Aktivität oder sind in die Regulation von Immunantworten involviert. Sie finden sich daher als sekretorische Proteine im Blut und anderen Gewebsflüssigkeiten von Organismen.

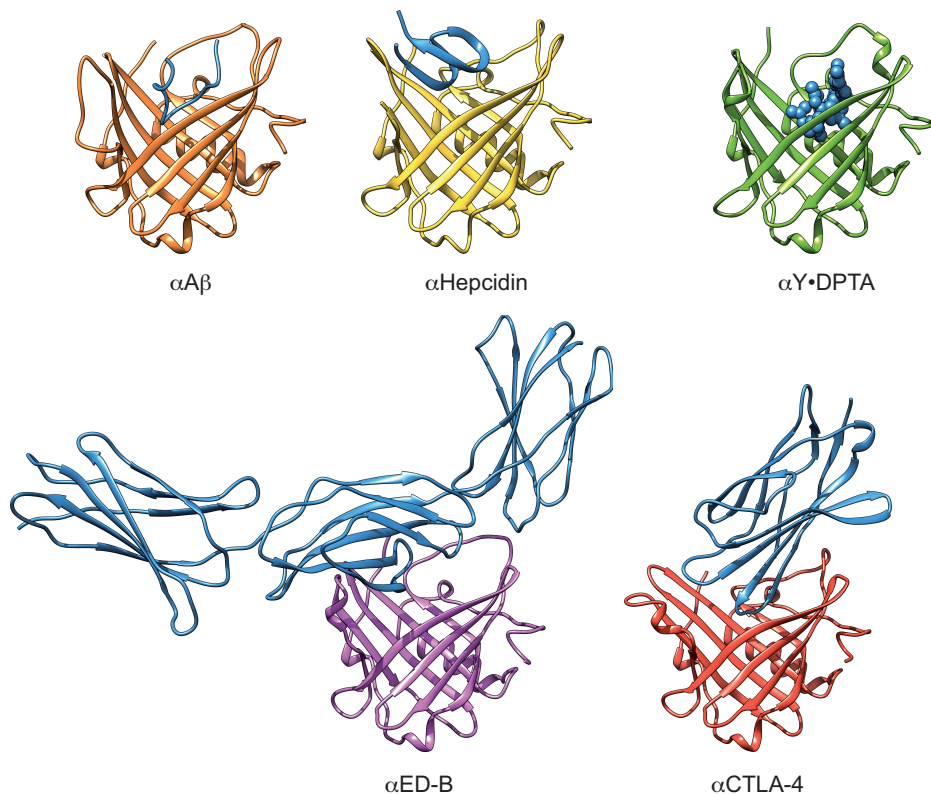
Als „Anticaline“ werden – in Anlehnung an Antikörper – Lipocaline mit neuen Bindungsspezifitäten bezeichnet, die durch Methoden des kombinatorischen *Protein-Designs* mit Fokus auf den vier variablen Schleifenregionen generiert werden (Skerra, 2000b). Mit Anticalinen lassen sich die drei wichtigsten Wirkmechanismen in der Therapie von Erkrankungen realisieren: (i) als Antidot, (ii) als Antagonist und (iii) als ligandenspezifisches Transportmolekül (Schlehuber & Skerra, 2005). Das Bilin-Bindungsprotein (BBP) aus dem Schmetterling *Pieris brassicae* diente als erstes Lipocalin-Grundgerüst zur Etablierung der Anticalin-Technologie. Anhand der BBP-Kristallstruktur wurden zur Konstruktion einer Zufallsbibliothek 16 Aminosäurepositionen in den vier Peptidschleifen und angrenzenden  $\beta$ -Faltblattsträngen ausgewählt, die die Bindung des natürlichen Liganden Biliverdin IX $\gamma$  vermitteln. Durch *Phage Display*-Selektion gegen die immobilisierten haptentartigen Moleküle Fluorescein (Beste *et al.*, 1999), Digoxigenin (Schlehuber *et al.*, 2000) sowie einen Phthalsäureester (Mercader & Skerra, 2002) wurden Anticaline mit nanomolaren Bindungsaffinitäten identifiziert. Im Hinblick auf einen biomedizinischen Einsatz wurde für die Generierung nachfolgender Anticaline auf humane Lipocaline als *Protein-Scaffolds* zurückgegriffen, um die Wahrscheinlichkeit einer Immunreaktion im Menschen zu minimieren. Unter den mindestens zwölf bekannten Lipocalinen humanen Ursprungs (Schiefner & Skerra, 2015) wurden das Apolipoprotein D (ApoD), das Tränenlipocalin (Tlc) und das Lipocalin 2 (Lcn2) (Synonyme: *Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin* bzw. NGAL; Siderocalin) zur Konstruktion neuer Zufallsbibliotheken ausgewählt (Skerra, 2008).

Im Labor von Prof. Skerra (TU München) wurde dabei besonderes Augenmerk auf das Lipocalin-Gerüst von Lcn2 gelegt. Dessen Strukturanalyse mittels Röntgenkristallographie (Goetz *et al.*, 2000) und NMR (Coles *et al.*, 1999) hatte ergeben, dass die Bindungstasche deutlich flacher (ca. 15 Å) und breiter (ca. 20 Å am oberen Rand) angelegt ist als bei anderen humanen Lipocalinen. Zudem sind, abgesehen von dem am Boden des  $\beta$ -Barrel gelegenen hydrophoben Bereich, besonders viele polare und positiv geladene Seitenketten in der Bindungstasche verteilt (Goetz *et al.*, 2002). Wie viele Lipocaline

besitzt Lcn2 bloß eine konservierte Disulfidbrücke, welche den C-terminalen Polypeptidabschnitt am  $\beta$ -Barrel fixiert. Der zusätzliche freie Cys-Rest, normalerweise zur Ausbildung eines kovalenten Homodimers oder eines Heterodimers mit der Matrix-Metalloproteinase IX (MMP-9, auch *Neutrophil Gelatinase*) verantwortlich (Triebel *et al.*, 1992; Kjeldsen *et al.*, 1993), kann ohne Beeinflussung der Ligandenbindungsaktivität durch eine inerte Seitenkette ersetzt werden, um unerwünschte Wechselwirkungen zu vermeiden (Gebauer & Skerra, 2012).

Lcn2 wurde ursprünglich als Produkt der Neutrophilen Granulozyten identifiziert (Triebel *et al.*, 1992); allerdings wird es auch im Verlauf von Entzündungsreaktionen von Epithelzellen der Niere, der Haut und des Darms exprimiert (Kjeldsen *et al.*, 2000; Borregaard & Cowland, 2006). In diesem Zusammenhang spielen die zuerst beschriebenen Liganden von Lcn2, die bakteriellen Eisen(III)-Siderophore aus der Gruppe der Catecholate, wie beispielsweise Enterobactin (siehe Abbildung 4C), eine entscheidende Rolle (Goetz *et al.*, 2002). Diese werden von pathogenen oder symbiontischen Bakterien zwecks Versorgung mit Eisen sezerniert und nach Komplexierung der bloß in sehr geringer Konzentration zirkulierenden Eisen(III)-Ionen mit Hilfe eines speziellen Mechanismus resorbiert (Sia *et al.*, 2013). Die bakteriostatische Wirkung von Lcn2 liegt in der hoch-affinen ( $K_D = 0,4 \text{ nM}$ ) Bindung des Eisen(III)-Enterobactin-Komplexes begründet (Goetz *et al.*, 2002).

Weitere für Lcn2 beschriebene Funktionen im Menschen sind unter anderem der Transport bestimmter Fettsäuren (Chu *et al.*, 1998), die Induktion von Apoptose (Devireddy *et al.*, 2001) und die Modulation von Entzündungsreaktionen (Cowland & Borregaard, 1997). Von Bedeutung für die Aufnahme und/oder Signaltransduktion sind vermutlich Zelloberflächen-Rezeptoren wie Megalin (Hvidberg *et al.*, 2005), die mit dem Eisen(III)-Siderophor beladenes Lcn2 binden können. Lcn2 gilt mittlerweile nicht nur als diagnostischer und prognostischer Biomarker für verschiedene Entzündungserkrankungen, sondern dieses Lipocalin wurde auch in erhöhter Konzentration bei Stoffwechselerkrankungen, Herz-Kreislauf- und Durchblutungsstörungen, bei Nierendysfunktionen sowie in einigen Tumorerkrankungen gefunden (Chakraborty *et al.*, 2012).



**Abbildung 5. Raumstrukturen von fünf Anticalinen im Komplex mit ihren Liganden (blau).** Bisher wurden auf Grundlage des humanen Lcn2-Grundgerüsts unter anderem Anticaline mit Spezifität für die Peptidliganden A $\beta$ 40 (orange, PDB: 4MVI) und Hepcidin (gelb, PDB: 4QAE), das kleine haptentähnliche Y-DTPA (grün, PDB: 4IAX) und die beiden Proteinliganden ED-B (violett, PDB: 4GH7) und CTLA-4 (rot, PDB: 3BX7) generiert. Abbildung aus (Richter *et al.*, 2014).

Bis heute wurden drei Generationen von Zufallsbibliotheken basierend auf dem Lcn2-Grundgerüst entwickelt, aus denen hoch-affine Anticaline mit Spezifitäten für die drei grundlegenden Ligandenformate Hapten, Peptid, Protein selektiert werden konnten (Abbildung 5). Die erste Lcn2-Bibliothek diente – wie bereits zuvor beim BBP – zur Selektion von Anticalinen für die Erkennung von kleinen haptentartigen Molekülen. Als Ligand wurde ein Derivat des (Radio)Metallchelators DTPA (siehe Abschnitt 1.1.1) ausgewählt, was dieses Anticalin – fusioniert mit einem gegen ein Tumorantigen gerichtetes Bindeprotein – für die nuklearmedizinische Therapie und Diagnostik im Sinne des *Pretargetings* nutzbar macht (Kim *et al.*, 2009). Mit Hilfe der zweiten Lcn2-Bibliothek wurden Anticaline generiert, die die extrazelluläre Domäne des zytotoxischen T-Lymphozyten-assoziierten Antigens 4 (CTLA-4) und damit ein großes proteinogenes Zielmolekül binden (Schönfeld *et al.*, 2009). Diese Anticaline haben immunmodulatorische Wirkung, da sie das während einer Immunantwort überexprimierte CTLA-4 durch Bindung blockieren und damit dessen negativen regulatorischen Einfluss auf die T-Zellaktivierung entgegenwirken.

Die Erfahrungen auf dem Gebiet der Konstruktion von kombinatorischen Proteinbibliotheken sowie die Röntgenstrukturinformationen über die Ligand-Anticalin-Komplexbildung aus den ersten beiden

Bibliotheksgenerationen wurden verwendet, um eine dritte Lcn2-Bibliothek für die Selektion von Anticalinen mit allgemeiner Spezifität für Zielmoleküle zu konzipieren. Tatsächlich gelang es damit, Anticaline gegen mehrere krankheitsassoziierte Proteine und Peptide, wie beispielsweise die tumorsassoziierten Proteine ED-B in Fibronectin (Gebauer *et al.*, 2013), VEGFR-3 (Richter & Skerra, 2016) und Hsp70 (Friedrich *et al.*, unveröffentlicht), das A $\beta$ 40 Peptid in der Alzheimer-Krankheit (Rauth *et al.*, 2016) und Heparin bei Anämie zu entwickeln und ihre Wirksamkeit *in vivo* unter Beweis zu stellen.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten bifunktionelle Anticalin-Fusionsproteine für die gerichtete Diagnostik und Therapie solider Tumorerkrankungen entwickelt werden. Dazu sollte zunächst das in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra selektierte Anticalin CL31, welches den (Radio)Metallchelator DTPA spezifisch erkennt (Kim *et al.*, 2009), mit Hilfe von strukturbasierter Mutagenese hinsichtlich seiner Ligandenbindungsaffinität sowie der Proteinstabilität optimiert werden. Anschließend sollte das maturierte Anticalin mit einem ED-B-bindenden Anticalin bzw. einem CEA-spezifischen scFv-Fragment fusioniert werden. Beide Fusionproteine sollten in *E. coli* produziert, proteinbiochemisch charakterisiert und hinsichtlich ihrer Eignung zur *in vivo* Radiodiagnostik/-therapie nach dem *Pretargeting*-Verfahren evaluiert werden. Zudem sollte mit einem sogenannten ChromoCalin – einem Fusionsprotein aus einem antigenspezifischen Anticalin und dem *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) – ein Reagenz entwickelt werden, welches die Evaluierung von Tumorantigenen *in vitro* und möglicherweise auch *in vivo* ermöglicht.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme, Tumorzelllinien und Versuchstiere

##### E. coli-Stämme

Es wurden ausschließlich *E. coli*-Stämme aus dem Labor von Prof. Skerra, TU München verwendet.

BL21	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
JM83	<i>ara</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), <i>rpsL</i> (= <i>strA</i> ), $\phi$ 80, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
Origami B	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>ahpC</i> , <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> ) (Prinz <i>et al.</i> , 1997)
TG1-F <sup>-</sup>	<i>supE</i> , $\Delta$ ( <i>hsdSM-mcrB</i> )5, <i>thi-1</i> , $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) (Gibson, 1984; Kim <i>et al.</i> , 2009)
W3110	F <sup>-</sup> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , <i>INV</i> ( <i>rrnD-rrnE</i> ) (Bachmann, 1990)
XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> <sup>-</sup> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac[F': proAB, lacI<sup>q</sup>ZAM15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)]</i> (Bullock <i>et al.</i> , 1987)

##### Humane Tumorzelllinien

Caco-2	isoliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom; epithelial, adhären (Fogh <i>et al.</i> , 1977), von Prof. Daniel, TU München
HT-29	isoliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom; epithelial, adhären (Fogh <i>et al.</i> , 1977), von Prof. Küster, TU München
LS-174T	isoliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom; epithelial, adhären (Tom <i>et al.</i> , 1976), von Prof. Hermeking, LMU München

##### Mäuse

Für die pharmakokinetischen Studien wurden 6-8 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse (18-20 g) von den Charles River Laboratories, Sulzfeld verwendet. Die Tiere wurden im keimfreien Tierstall am Lehrstuhl für Biofunktionalität der Lebensmittel, TU München (Prof. Haller) gehalten und für Versuche gemäß der Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Lizenz-Nr.: 55.2-1-54-2532-40-09) eingesetzt.

Für die Bildgebungs- und Biodistributionsstudien wurden 6-8 Wochen alte weibliche CD1 Nacktmäuse (CrI:NU-*Foxn1<sup>mm</sup>*) ohne Thymus (= immundefizient) verwendet, die ebenfalls von den Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen wurden. Die Mäuse wurden im Tierstall des Klinikums rechts der

Isar, TU München (Prof. Schwaiger) gehalten und überwacht. Die dortigen Experimente waren mit der Lizenz-Nr.: 55.2-1-54-2532-46-12 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### 2.1.2 Plasmide

#### Zur Verfügung gestellte Plasmide

pASK75- <i>StrepII</i>	(Skerra, 1994; Voss & Skerra, 1997), von Prof. Skerra, TU München
pASK75-T7RBS-mBiaacyt	von Prof. Skerra, TU München
pNGAL15	(Kim <i>et al.</i> , 2009), von Prof. Skerra, TU München
pNGAL98	(Gebauer & Skerra, 2012), von Prof. Skerra, TU München
pCR4-Blunt-T84.66scFv	(Wu <i>et al.</i> , 1996) von Dr. Yazaki, Beckman Research Institute, City of Hope, CA
pASK37-eGFP	(Kuhn <i>et al.</i> , 2010), von Prof. Skerra, TU München
pNGAL134	Duocalinexpressionsvektor für N7A-GGAVDAANS-CL31* von Prof. Skerra, TU München
pCR2.1-PAS#1.2(200)duoSapI	Klonierungsvektor von GeneArt für PAS#1.2(200) Genkassette, von Uli Binder, XL-protein
pTUM4	(Schlapschy <i>et al.</i> , 2006), von Prof. Skerra, TU München

### 2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Sämtliche Oligodesoxynukleotide wurden von Thermo Fisher Scientific, Ulm in lyophilisierter HPLC-gereinigter Form bezogen, in bidest. Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung

D20	5'-CCA CTC CCT ATC AGT GAT-3'
F83	5'-AGA CAG CTA TCG CGA TTG CA-3'
PR1	5'-CGC AGT AGC GGT AAA CG-3'

#### Oligodesoxynukleotide zur Amplifizierung mittels PCR

EB6_for	5'-CCG ACA TTG TGC TGA CCC AAT C-3'
EB6_rev	5'-GCT GCC GTC GAC TGC ACC TGA GGA GAC GGT GAC TGA-3'
EE_29for	5'-TCT TCA GCC CAG GAC TCC ACC TCA GAC-3'
EE38_for	5'-GTA GCG CAT ATG CAG GAC TCC ACC-3'
EE40_for	5'- GTC GAG GCT CTT CAG CCT CTA AAG GTG AAG AAC-3'
EE41_for	5'- GGG CAA CAT ATG TCT AAA GGT GAA G-3'

EE42\_rev 5'-CGG GTG GGC TGA AGA GCT TTG GTA CAG TTC ATC-3'  
EE50\_scFv\_rev 5'-CGA CTG CAC CGG CTG AAG AGC TTG AGG AGA CGG TG-3'

Oligodesoxynukleotide zur Synthese von PAS#1-Genkassetten

PAS#1\_for 5'-GCC TCT CCA GCT GCA CCT GCT CCA GCA AGC CCT GCT GCA  
CCA GCT CCG TCT GCT CCT GCT-3'  
PAS#1\_rev 5'-GGC AGC AGG AGC AGA CGG AGC TGG TGC AGC AGG GCT TGC  
TGG AGC AGG TGC AGC TGG AGA-3'

Oligodesoxynukleotide für die Quik-Change Mutagenese

C26\_TAG\_for 5'-GAT GAC CGC CCA GAC TTA TGA GCT G-3'  
C26\_TAG\_rev 5'-CAG CTC ATA AGT CTG GGC GGT CAT C-3'  
CL31\_TAG\_for 5'-CTC TTG ACC GCC CAG ACT TAC GAG CTG-3'  
CL31\_TAG\_rev 5'-CAG CTC GTA AGT CTG GGC GGT CAA GAG-3'  
CM1 5'-GCA AAG CCG GAA ATC GTG ACC TGC GTG AGG-3'  
CM1\_as 5'-CCT CAC GCA GGT CAC GAT TTC CGG CTT TGC-3'  
CM4 5'-CTG CGT GAG GAT AAG TAT CCG CGT AAA ATG C-3'  
CM4\_as 5'-GCA TTT TAC GCG GAT ACT TAT CCT CAC GCA G-3'  
CM10 5'-CTT CAA GCG TGT GTA CCG CAA CCG CGA GCT GTT TG-3'  
CM10\_as 5'-CAA ACA GCT CGC GGT TGC GGT ACA CAC GCT TGA AG-3'  
CM14 5'-CTT TGT GCC GGG GGA CCA GCC GGG CGA G-3'  
CM14\_as 5'-CTC GCC CGG CTG GTC CCC CGG CAC AAA G-3'  
EB7\_for 5'-CTT GAC CGC CCA GAC TTA TGA GCT G-3'  
EB7\_rev 5'-CAG CTC ATA AGT CTG GGC GGT CAA G-3'  
EB8\_for 5'-CAG CTC CAC CGa TGG ACC CCG AG-3'  
EB8\_rev 5'-CTC GGG GTC CA<sub>t</sub> CGG TGG AGC TG-3'  
EB9\_for 5'-GGC AAC ATT AAG AAT TAC CCT GGA TTA AC-3'  
EB9\_rev 5'-GTT AAT CCA GGG TAA t<sub>TC</sub> TTA ATG TTG CC-3'  
EB10\_for 5'-GAA GAT AAA AGC TAC GAT GTC ACA GCG-3'  
EB10\_rev 5'-CGC TGT GAC ATC GTA GCT TTT ATC TTC-3'  
EB11\_for 5'-GAT TAA CGA GTT ACT TCG TCC GAG TGG-3'  
EB11\_rev 5'-CCA CTC GGA CGA AGT AAC TCG TTA ATC-3'  
EE13\_for 5'-CCA TGA CTT TTG TTC CAG GTT CCC AGC CAG GTG AG-3'  
EE13\_rev 5'-CTC ACC TGG CTG GGA ACC TGG AAC AAA AGT CAT GG-3'

EE15_for	5'-GCA GCT CCA CCG GAA GAC CCC GAG CTG-3'
EE15_rev	5'-CAG CTC GGG GTC TTC CGG TGG AGC TGC-3'
EE16_for	5'-GTA TCA GGT AGG TCA GGC AGG GAA TG-3'
EE16_rev	5'-CAT TCC CTG CCT GAC CTA CCT GAT AC-3'
EE17_for	5'-GGT ATC AGG TAG GTA AGG CAG GGA ATG C-3'
EE17_rev	5'-GCA TTC CCT GCC TTA CCT ACC TGA TAC C-3'
EE18_for	5'-CAG GGA ATA CTT CAA AAT CAG CCT CCT C-3'
EE18_rev	5'-GAG GAG GCT GAT TTT GAA GTA TTC CCT G-3'
EE19_for	5'-GCT ATG GTG TTT TAT AAG AAG GTT CAG-3'
EE19_rev	5'-CTG AAC CTT CTT ATA AAA CAC CAT AGC-3'
EE30_for	5'-CAG GTT TAG GAA AAG CCA GTG TGA GTA CC-3'
EE30_rev	5'-GGT ACT CAC ACT GGC TTT TCC TAA ACC TG-3'
EE31_for	5'-CTC CAC CGG AAG AGC CCG AGC TGC TAC-3'
EE31_rev	5'-GTA GCA GCT CGG GCT CTT CCG GTG GAG-3'
EE32_for	5'-GGC AGG GAA TCA AGC TCC ACC GGA A-3'
EE32_rev	5'-TTC CGG TGG AGC TTG ATT CCC TGC C-3'
EE33_for	5'-CCA GTG TGA GTA CCG CAC CAT GAC TTT TG-3'
EE33_rev	5'-CAA AAG TCA TGG TGC GGT ACT CAC ACT GG-3'
EE34_for	5'-GTC ACA GCG GTC CTG TTT AGG AAA AGC CAG-3'
EE34_rev	5'-CTG GCT TTT CCT AAA CAG GAC CGC TGT GAC-3'
EE35_for	5'-GGC AGG GAA TAA AGC TCC ACC GGA A-3'
EE35_rev	5'-TTC CGG TGG AGC TTT ATT CCC TGC C-3'
EE36_for	5'-GGG CAG GGA ATC GCG CTC CAC CGG AA-3'
EE36_rev	5'-TTC CGG TGG AGC GCG ATT CCC TGC CC-3'
EE37_for	5'-CTT TTG TTC CAG GTG ACC AGC CAG GTG-3'
EE37_rev	5'-CAC CTG GCT GGT CAC CTG GAA CAA AAG-3'
EE39_for	5'-GTC ACA GCG GTC CGC TTT CGC AAA AAG ATG TGT GAG-3'
EE39_rev	5'-CTC ACA CAT CTT TTT GCG AAA GCG GAC CGC TGT GAC-3'
EE43_for	5'- GAT ACC CGG ATC ACA TGA AAC GGC ATG-3'
EE43_rev	5'-CAT GCC GTT TCA TGT GAT CCG GGT ATC-3'

#### Oligodesoxynukleotide zum Nachweis von Mycoplasmen

Mix 1:

Myco-F1                    5'-ACA CCA TGG GAG CTG GTA AT-3'

Myco-F1t	5'-ACA CCA TGG GAG TTG GTA AT-3'
Myco-R1	5'-CTT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT-3'
Myco-R1tt	5'-CTT CTT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT-3'
Myco-R1cat	5'-CCT CAT CGACTT TCA GAC CCA AGG CAT-3'
Myco-R1ac	5'-CTT CAT CGA CTT CCA GAC CCA AGG CAT-3'

Mix 2:

Myco-F2	5'-GTT CTT TGA AAA CTG AAT-3'
Myco-F2a	5'-ATT CTT TGA AAA CTG AAT-3'
Myco-F2cc	5'-GCT CTT TCA AAA CTG AAT-3'
Myco-R2	5'-GCA TCC ACC AAA AAC TCT-3'
Myco-R2ca	5'-GCA TCC ACC ACA AAC TCT-3'
Myco-R2at	5'-GCA TCC ACC AAA TAC TCT-3'

#### 2.1.4 Enzyme und sonstige Proteinreagenzien

##### Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Garnelen (SAP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Benzonase	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Pfu</i> Ultra II DNA-Polymerase	Stratagene Inc., La Jolla, CA, USA
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot oder New England Biolabs GmbH, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4 DNA-Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lysozym (Huhn)	AppliChem GmbH, Darmstadt

##### Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugate

anti-Maus IgG (Fc-spezifisch)-AP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
anti-Digoxigenin Fab-AP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

##### Sonstige Proteine

anti-Maus (Fab) <sub>2</sub> -AlexaFluor488	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-His <sub>6</sub> IgG	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
BSA (Rinderserumalbumin)	AppliChem GmbH, Darmstadt
rekombinantes CEA (Mensch)	Sino Biological Inc., Beijing, China
Ribonuklease A (RNase A, Rind)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

*Molecular Biology Grade)*

Streptavidin	eigene Herstellung (Schmidt & Skerra, 2007)
<i>Strep</i> -Tactin	eigene Herstellung (Voss & Skerra, 1997)
<i>Strep</i> MAB-Classic	IBA GmbH, Göttingen
<i>Strep</i> MAB-Immo	IBA GmbH, Göttingen

**2.1.5 Standards und Kits**Proteine zur Kalibrierung von SEC-Säulen

Aprotinin (6,5 kDa, Rind)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Cytochrom C (12,4 kDa, Pferd)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Carboanhydrase (29 kDa, Schwein)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Serumalbumin (66 kDa, Rind)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa, Hefe)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
$\beta$ -Amylase (200 kDa, Süßkartoffel)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Apoferritin (443 kDa, Pferd)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Thyroglobulin (669 kDa, Schwein)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Blue Dextran (> 2000 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

DNA- und Protein-Größenstandards

100 bp und 1 kb DNA Leiter	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Kits zur Isolierung und Reinigung von DNA

QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Kit zur Sequenzierung von DNA

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
--	--------------------------------------

Amin-Kopplungskit (SPR)

N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid (EDC)	GE Healthcare, Freiburg
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	GE Healthcare, Freiburg
Ethanolamin, 1 M Lösung	GE Healthcare, Freiburg

### 2.1.6 Chemikalien

Zur Herstellung von Lösungen und Puffern wurden im allgemeinen Chemikalien der Firmen Carl Roth GmbH, AppliChem GmbH, Sigma-Aldrich Chemie GmbH und Fluka Chemie verwendet. Spezialchemikalien sind im folgenden aufgelistet.

Aceton	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Acetonitril, <i>LC-MS grade</i> (ACN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Acrylamid-Stammlösung, 30 %ig, mit 2,6 % Bisacrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agarose für Gelelektrophorese	BIO&SELL GmbH, Feucht b. Nürnberg
Ameisensäure, p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ammoniak, 25 %ige (w/v) Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumacetat (> 99,9 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniummolybdat, Tetrahydrat (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Formedium Ltd, Hunstanton, UK
Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	Acros Organics, Geel, Belgien
Antifoam A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ATP (Adenosin-5'-triphosphat)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- 4-Toluidinsalz (BCIP)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Yeast Extract (Hefeextrakt)	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Borsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid, Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloramphenicol (Cam)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Cobalt(II)chlorid, Hexahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem GmbH, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
D-Desthiobiotin	IBA GmbH, Göttingen
Dichlormethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Digoxigenin-3- <i>O</i> -methylcarbonyl- $\epsilon$ -aminocapron- säure- <i>N</i> -hydroxysuccinimid-ester (DIG-NHS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
dNTP-Mix (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
[(R)-2-amino-3-(4-isothiocyanatophenyl) propyl]- <i>trans</i> -(S,S)-cyclo-hexan-1,2-diamin- pentaessigsäure ( <i>p</i> -SCN-Bn-CHX-A"-DTPA)	Macrocyclics, Dallas, TX, USA
[(R)-2-amino-3-(4-aminophenyl)propyl]- <i>trans</i> - (S,S)-cyclohexan-1,2-diaminpentaessigsäure ( <i>p</i> -NH <sub>2</sub> -Bn-CHX-A"-DTPA)	Macrocyclics, Dallas, TX, USA
Eisen(III)chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Essigsäure, 99,9 % (AcOH)	Honeywell Riedel-de Haën AG, Seelze
Essigsäure, <i>LC-MS grade</i> (AcOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol, p.a.	VWR GmbH, Darmstadt
Ethanol, technisch, 96 % DAB	CLN GmbH, Niederhummel
Ethidiumbromid, 1 %ige (w/v) Lösung	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
D(+)-Glucose, Monohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Gentisinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Glycerin, 99 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Guanidiniumchlorid, <i>Molecular Biology Grade</i> , Ultrapure (LQ)	NIGU Chemie, Waldkraiburg
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Alfa Aesar, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure (Hepes)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Imidazol	Merck KGaA, Darmstadt
Iodogen ( <i>Pierce Iodination Reagent</i> )	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Isopropanol, p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropanol, technisch	CLN GmbH, Niederhummel
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumsulfat, p.a.	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kupfer(II)chlorid, Hexahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lanthanid-Chloride (> 99,99 %; YCl <sub>3</sub> , LuCl <sub>3</sub> , TbCl <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Hydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Mangan(II)chlorid, Tetrahydrat	Merck KGaA, Darmstadt



2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Methanol, <i>LC-MS grade</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol, technisch	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumacetat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumhydrogencarbonat (> 99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Nickelsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
<i>p</i> -Nitrophenylphosphat (pNPP)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Referenzlösungen für pH-Meter	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Reinstwasser	Merck KGaA, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure, konz. 37 %ige (w/v) Lösung	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tissue-Tek (Einbettmedium)	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL
D(+)-Trehalose, Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trinatriumcitrat, Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylencyanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zinkacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
<b>Radionuklide</b>	
Iod-124 ( $\text{Na}^{124}\text{I}$ ; $\tau_{1/2}$ : 4,18 d)	IBA Molecular, VU Amsterdam, NL
Iod-125 ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ ; $\tau_{1/2}$ : 59,41 d)	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Lutetium-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ; $\tau_{1/2}$ : 6,65 d)	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau

### 2.1.7 Geräte und Zubehör

Die Grundausstattung des Labors im molekularbiologischen und Zellkultur-Bereich entsprach dem in den Dissertationen von Dr. M. Schlapschy, Dr. J. P. Mayer und Dr. M. Gebauer beschriebenen Umfang. Geräte für Spezialanwendungen, auch für Arbeiten am Klinikum rechts der Isar, sind im folgenden aufgelistet.

Brutschränke und Schüttelinkubatoren

Friocell und Incucell

MMM Medcenter Einrichtungen GmbH,  
Planegg

ITE, Multitron, Multitron II

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

Innova 43

New Brunswick/Eppendorf AG, Hamburg

Elektrophorese

HE33 Submarine (DNA-Auftrennung)

Hofer Inc. Holliston, MA, USA

Minigel-Twin (Protein-Auftrennung)

Biometra GmbH, Göttingen

Niedrigspannungsquelle Power Pack P25

Biometra GmbH, Göttingen

Hochspannungsquelle PS3003

Biometra GmbH, Göttingen

Elektroblot-Apparatur (Western Blot)

Eigenbau, Carl Roth GmbH &amp; Co., Karlsruhe

UV-Transilluminator TI 3 (254 nm)

Biometra GmbH, Göttingen

Fermentation

10 L-Fermentersystem mit Umwurfzylinder

Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen

C Flow Durchfluß-Regelmodul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

C pH Meß- und Regelmodul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

C pO<sub>2</sub> Meß- und Regelmodul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

C Pump D Schlauchpumpen-Modul

BCC Spezialgeräte GmbH, Göttingen

O<sub>2</sub>-Sensor (12/320 A-Type)

Mettler-Toledo GmbH, Steinbach

pH-Elektrode (Typ 465)

Ingold Messtechnik GmbH, Steinbach

Wasserbad Haake F6/C25

Thermo Haake GmbH, Karlsruhe

Säulenmaterial und Chromatographiesäulen

Ni-Sepharose High Performance™ (IMAC)

GE Healthcare, Freiburg

*Strep*-Tactin Superflow

IBA GmbH, Göttingen

Resource™ S/Q, 1 mL und 6 mL

GE Healthcare, Freiburg

Bettvolumen (IEX)

Superdex 200 10/300 GL (Tricorn S200),

GE Healthcare, Freiburg

24 mL Bettvolumen

Spektroskopie

Axiovert 40 CFL Mikroskop mit AxioCam MRm

Carl Zeiss Microscopy, Jena

BIAcore 2000

BIAcore AB, Uppsala, Schweden

CD-Spektropolarimeter J-810

Jasco Deutschland GmbH, Gross-Umstadt

FACS Aria Cell-Sorting System

Biosciences, Heidelberg

FluoroMax-3 Fluoreszenzspektrometer

HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching

NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
SpectraMax 250 ELISA-Photometer	Molecular Devices GmbH, Biberach a.d. Riss
Synergy 2 Multi-Mode Reader	BioTek Instruments, Bad Friedrichhall
Ultrospec 3000 Spektrophotometer	GE Healthcare, Freiburg
<u>Sterilisierung und steriles Arbeiten</u>	
Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Bi-destillierapparat aus Glas 2304	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Reinstwasseranlage Purelab Ultra	ELGA LabWater Holding GmbH, Celle
<u>Temperaturregulierung</u>	
F12-ED Kälte-Umwälzthermostat	JULABO GmbH, Seelbach
Metallblockthermostat Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux GmbH, Wertheim
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler T-Personal	Biometra GmbH, Göttingen
<u>Pipetten und Pipettierhilfen</u>	
Gilson Pipetten P20 bis P1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Accu-jet	Brand GmbH, Wertheim
Pipetboy acu	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
<u>Proteinreinigung</u>	
ÄKTA Purifier P-10, Explorer P-100	GE Healthcare, Freiburg
Fraktionssammler RadiFrac	GE Healthcare, Freiburg
Fraktionssammler MultiRac und SuperRac	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing
Peristaltische Pumpe P-1	GE Healthcare, Freiburg
Signalschreiber REC 112	GE Healthcare, Freiburg
Signalschreiber SE120	ABB Goerz AG, Mannheim
<u>Waagen</u>	
Feinwaage 125A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Laborwaage XB22C	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Laborwaage PE620	Gebr. Bosch, Jungingen

Zellkultur

Brutschrank Galaxy R	R S Biotech Lab. Equipment Ltd, Irvine, UK
Brutschrank NU-5500	Integra Bioscience GmbH, Fernwald
CASY <sup>®</sup> -Zellzähler	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Kryo-Behälter Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Laminar Flow Class II Silver Line	Kojair Tech Oy, Vilppula, Finnland
Neubauer-Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim

Zentrifugen

Sigma 4K10 und Sigma 4K15	Sigma GmbH, Osterode
Sorvall RC 3B Plus mit Rotor H-6000 A/HBB-6	Kendro Laboratory Products, München
Sorvall RC 6 Plus mit den Rotoren SS-24, SLA-1500, F10-4x1000 LEX	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Tischzentrifuge Heraeus Biofuge Pico	Heraeus Christ GmbH, Osterode
Tischzentrifuge Eppendorf 5415R	Eppendorf AG, Hamburg

Sonstige Geräte

ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
CR 35 BIO Autoradiographie-Scanner	Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt
CRC-15R Dosiskalibriergerät	Capentic Inc, Ramsey, New York, USA
ELISA-Plattenwascher	BioTek Instruments, Bad Friedrichhall
French Press Zellhomogenisator	Spectronic Unicam, Cambridge, UK
Inveon Kleintier-PET/CT	Siemens Medical Solutions, Erlangen
Kryo-Mikrotom CM1950	Leika Biosystems, Nussloch
Mini-Scan Radioaktivitätsdetektor (TLC)	Bioscan Inc, Washington, DC, USA
maXis Q-TOF (ESI-MS)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
PANDA Plus 2000 Zellhomogenisator	GEA Niro Soavi, Parma, Italien
Wallac 1480 Wizard 3" $\gamma$ -Zähler	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau

**2.1.8 Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmaterialien für molekularbiologische sowie zellbiologische Arbeiten wurden üblicherweise von Sarstedt AG & Co., Greiner Bio-One GmbH, Brand GmbH, VWR GmbH, GE Healthcare, IBA GmbH, und Fisher Scientific GmbH bezogen und können im Detail in den Dissertationen von Dr. M. Schlapschy, Dr. S. Schlehuber und Dr. M. Gebauer nachgeschlagen werden. Verbrauchsmaterialien für Spezialanwendungen sind im folgenden aufgelistet.

Dialyseschläuche und Konzentratoren

Slide-A-Lyzer 0,5 mL Mini, MWCO 10 kDa	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm
Dialyseschlauch Spectra/Por (MWCO: 6-8 kDa)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dialyseschlauch Typ 27 (MWCO: 12-16 kDa)	Biomol GmbH, Hamburg
Amicon Konzentratoren 4 und 15 (MWCO: 10, 30 kDa)	Millipore, Eschborn

Folien und Membranen

iTLC-SG-Platten (Kieselsäure beschichtet)	Agilent Technologies, Waldbronn
Kodak Phosphorscreen GP Bildplatte	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Nitrocellulose(NC)-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
OHP-Folienrolle (klar, 29,7 cm breit)	Stabilo International GmbH, Heroldsberg
Whatman-Filterpapier 3MM	VWR GmbH, Darmstadt

Kunststoffröhrchen

Kulturröhrchen mit Deckel, 13 mL	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
PP-Schraubbecher mit Deckel, 100 mL	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
PP-Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PP-Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

Küvetten

Halb-Mikro-Kunststoffküvetten, PS	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Typ 108.002-QS (Absorption)	Hellma GmbH, Müllheim
Typ 110-QS (CD)	Hellma GmbH, Müllheim
Typ 111-QS (Fluoreszenz)	Hellma GmbH, Müllheim

Zellkultur

Nunc LabTek II <i>Chamber Slide</i> (8 Kammern)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
TPP-Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Biochrom AG, Berlin
8-, 24-Well TPP-Kulturplatten	Biochrom AG, Berlin
Kryo-Konservierungsröhrchen (1,5 mL)	Biochrom AG, Berlin
FACS-Messröhrchen mit Filtersieb	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Sonstige Verbrauchsartikel

CM5 Sensorchip	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
CMD200M oder CMD200L Sensorchip	XanTec Bioanalytics GmbH, Düsseldorf

Nunc 96-Well MaxiSorp-Mikrotiterplatten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
PD-10 Gelfiltrationssäulen	GE Healthcare, Freiburg

### 2.1.9 Antibiotika, Medien und allgemeine Lösungen

#### Antibiotika-Stammlösung

Zur Präparation von Selektivmedien wurde folgende Antibiotika-Stammlösung (sterilfiltriert 0,45 µm) im Verhältnis 1:1000 zugesetzt.

Ampicillin (Amp)	100 mg/mL in dest. H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/mL in 70 % (v/v) Ethanol
Lagerung bei -20 °C	

#### Induktor-Stammlösung

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/mL, 5 mg/mL in DMF (1:10.000 zum Medium)
--------------------------	--

Lagerung bei -20 °C

#### Zellkulturmedium und Zusätze

Alle Zellkulturmedien wie DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) *with high Glucose with Sodium Pyruvate and L-Glutamine* und MEM (Minimal Essential Medium) *with Earle's Salt and L-Glutamine*, Zusätze wie fötales Kälberserum und nicht-essentielle Aminosäuren sowie andere Lösungen wie PBS mit/ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (= PBSw bzw. PBSwo), Trypsin/EDTA, Accutase und CryoMaxx S Einfriermedium wurden als fertige, sterile Lösungen von PAA Laboratories GmbH, Cölbe sowie GE Healthcare, Freiburg bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

#### *LB-Medium (Sambrook et al., 1989)*

Bacto Tryptone	10 g/L
Bacto Yeast Extract	5 g/L
NaCl	5 g/L
Bacto Agar	15 g/L (nur für Kulturplatten)

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

#### *2xYT-Medium*

Bacto Tryptone	16 g/L
Bacto Yeast Extract	10 g/L
NaCl	5 g/L

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

Medien und Lösungen für die Fermentation*Mineralsalzlösung*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	31 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	19 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	25 mM
$\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5 mM

pH 6,9 stellt sich nach dem Autoklavieren ein.

*Glucoselösungen (autoklaviert)*

Glucose	20 % (w/v)
Glucose	50 % (w/v)

*Spurenelemente-Stammlösung (sterilfiltriert)*

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	3 g/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,6 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,5 g/L
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,2 g/L
EDTA	4 mM

*Weitere Stammlösungen*

$\text{MgSO}_4$	1 M (separat autoklaviert)
Thiaminhydrochlorid	10 mg/mL (sterilfiltriert)
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	35 g/L (bis zur kräftigen Gelbfärbung mit konz. HCl angesäuert; sterilfiltriert)
$\text{Zn-Acetat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	8 g/L (sterilfiltriert)

*Weitere Lösungen für die Fermentation*

$\text{NH}_3$	12,5 % (v/v)
Antifoam A	30 %ige wässrige Lösung

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese*TAE-Puffer*

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

*10x Probenauftragspuffer*

Bromphenolblau	1 mg/mL
Xylencyanol	1 mg/mL
Glycerin	50 % (v/v)

Puffer für die SDS-PAGE*1x SDS-Laufpuffer (Fling & Gregerson, 1986)*

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

*4x Lower-Tris*

Tris/HCl (pH 8,85)	3 M
SDS	4 g/L

*4x Upper-Tris*

Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 M
SDS	4 g/L

*5x Probenauftragspuffer*

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

*Coomassie-Färbelösung*

Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)
Coomassie Brilliantblau R-250	0,1 % (w/v)

*Entfärbelösung 1*

Wie Coomassie-Färbelösung ohne Coomassie Brilliantblau.

*Entfärbelösung 2*

Essigsäure	10 % (v/v)
------------	------------



Sonstige Puffer

Alle Puffer wurden vor der Verwendung sterilfiltriert (0,45 µm bzw. 0,2 µm) bzw., sofern möglich, autoklaviert und falls erforderlich entgast.

*AP-Puffer*

Tris/HCl (pH 8)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

*Periplasma-Aufschlusspuffer*

Saccharose	500 mM
Tris/HCl (pH 8)	100 mM
EDTA (pH 8 )	1 mM

*Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Puffer, autoklaviert)*

Tris/HCl (pH 8)	100 mM
NaCl	50 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

*PBS (autoklaviert)*

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
NaCl	115 mM
pH 7,4 stellt sich ein.	

*HBS-Puffer*

Hepes/NaOH (pH 7,5)	20 mM
NaCl	150 mM

*TBS-Puffer (autoklaviert)*

Tris/HCl (pH 7,5)	40 mM
NaCl	115 mM

*HBS-E oder TBS-E*

HBS oder TBS mit 1 mM EDTA

*Benzonase-Puffer (autoklaviert)*

Tris/HCl (pH 8)	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

*FACS-Puffer*

PBSwo versetzt mit 10 % FCS

*CD-Puffer*

K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mM
pH 7,5 mit KOH einstellen.	

*Waschpuffer für ELISA und Western Blot*

Puffer (HBS, PBS, TBS oder TBS-E) versetzt mit 0,1 % (v/v) Tween 20  
(= PBS/0,1T, HBS/0,1T, TBS/0,1T, TBS-E/0,1T)

*Laufpuffer für die SPR-Spektroskopie*

Puffer (HBS-E oder PBS) versetzt mit 0,05 % (v/v) Tween 20  
(= HBS-E/0,05T, PBS/0,05T)

*HTT-Puffer zur Reinigung iodierter Proteine (abgeleitet von der Formulierung für Herceptin)*

L-Histidin/HCl (pH 6)	5.2 mM
D(+)-Trehalose, Dihydrat	2 % (w/v)
Tween 20	0,009 % (v/v)
NaCl	0,9 % (w/v)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden entsprechend den im Labor von Prof. Skerra entwickelten Standardmethoden durchgeführt. Daher wurden Dissertationen früherer Doktoranden (Dr. D. Breustedt, Dr. M. Gebauer, Dr. A. D. Holla, Dr. J. P. Mayer, Dr. M. Schlapschy, Dr. S. Schlehuber) als Vorlage verwendet, zum Teil übernommen, aber im Detail an die Gegebenheiten dieser Arbeit angepasst.

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

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Die Selektion auf plasmidtragende Zellen erfolgte durch Zusatz des geeigneten Antibiotikums zum Nährmedium (siehe Abschnitt 2.1.9). Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden bei 4 °C aufbewahrt und bis zu 2 Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

Flüssigkulturen wurden typischerweise mit LB-Medium unter Zusatz des geeigneten Antibiotikums angesetzt. Dafür wurden 13 mL-Kulturröhrchen für kleine Volumina (4-5 mL) bzw. 100 mL-Kulturkolben mit Verschluss aus Aluminiumfolie für größere Volumina (50 mL) verwendet. Bis zu einem Volumen von 50 mL wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 30 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 550 nm (OD<sub>550</sub>) mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt. Ab OD<sub>550</sub> > 1 wurden geeignete Verdünnungen

der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium korrigiert.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen oder ihrer Transformanden wurden 0,5 mL einer stationären Übernachtskultur bei niedriger Drehzahl sedimentiert, der Überstand abgezogen und die Zellen in 1 mL hitzesterilisiertem 87 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Lagerung erfolgte daraufhin bei -80 °C.

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

Zur Aufnahme von Plasmid-DNA müssen *E. coli*-Zellen in einen transformationskompetenten Zustand überführt werden. Durch die hier verwendete klassische  $\text{CaCl}_2$ -Methode (Sambrook *et al.*, 1989) können in Abhängigkeit vom *E. coli*-Stamm ca.  $10^5$  bis  $10^6$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  Plasmid erhalten werden.

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde 50 mL LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Bei Erreichen einer Zelldichte von  $\text{OD}_{550} = 0,5$  wurde die Kultur in ein steriles 50 mL-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 4K15, 4416 g, 4 °C, 10 min) sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellsediment in 40 mL eiskalter 100 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 20 mL eiskalter 50 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Zellen in 2 mL 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und die 100  $\mu\text{L}$  Aliquots entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven dampfsterilisiert und vor der Verwendung abgekühlt.

Zur Transformation wurden 100  $\mu\text{L}$  der frisch hergestellten oder auf Eis aufgetauten Zellsuspension mit 1  $\mu\text{L}$  Plasmid-DNA oder 5-10  $\mu\text{L}$  eines Ligierungsansatzes (siehe Abschnitt 2.2.5.6) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min auf 37 °C erwärmt und die Zellen nach Zugabe von 1 mL LB-Medium für 45 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde kurz zentrifugiert (Sigma 4K15, 3000 g, 4 °C, 1 min), 800  $\mu\text{L}$  des Überstandes abgezogen, die Zellen in der verbleibenden Kulturflüssigkeit resuspendiert und davon 30  $\mu\text{L}$  bzw. die übrige Zellsuspension auf einem das geeignete Antibiotikum enthaltenen LB-Agar ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

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

Die Identifizierung positiver Transformanden bei der Neukonstruktion von Plasmiden oder der ortsgerichteten Mutagenese erforderte die Präparation von zirkulärer Plasmid-DNA aus *E. coli*, bei der nach alkalischer Lyse der Bakterienzelle (Birnboim & Doly, 1979) die Plasmid-DNA durch Adsorption an einem Trägermaterial (z.B. Silicagel) isoliert wurde. Hierzu wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* im

analytischen Maßstab (4 mL Kulturvolumen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde 50 µL 10 mM Tris/HCl pH 8,5 verwendet und so je nach *E. coli*-Stamm und Plasmid 5-10 µg DNA gewonnen, welche dann bei -20 °C gelagert wurde. Die auf diese Weise isolierte Plasmid-DNA wurde direkt zur Spaltung mit Restriktionsendonukleasen im analytischen sowie präparativen Maßstab und für die DNA-Sequenzierung eingesetzt.

#### **2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA**

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Länge wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt. Dieses Verfahren diente im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden und im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten nach einem präparativen Restriktionsverdau oder einer PCR (siehe Abschnitte 2.2.5.2 und 2.2.5.3).

##### Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurden je nach Größe der DNA-Fragmente Gele mit 0,8-1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.9) verwendet. Die Agarose wurde in der Siedehitze gelöst, die nun klare Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt und nach Zugabe von 1/10.000 Volumen einer 1 % (w/v) Ethidiumbromidlösung in eine horizontale Gelkammer (Länge 10,5 cm x Breite 7,5 cm x Höhe 0,5 cm) gegossen. Nach dem Einsetzen eines Geltaschenformers (mit 12 Zähnen) und dem Erkalten des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer gelegt und mit TAE überschichtet. Der Geltaschenformer wurden vorsichtig entfernt und je Gelspur 1-2 µg DNA unter Zusatz von 1/10 Volumen des 10x Auftragspuffers (siehe Abschnitt 2.1.9) in einem Gesamtvolumen von 10 µL eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 40 min durchgeführt und anschließend die aufgetrennten DNA-Fragmente durch Bestrahlen mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht sowie zur Dokumentation fotografiert.

##### Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur Reinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten im präparativen Maßstab wurde die Agarose-Gelelektrophorese analog zur analytischen Gelelektrophorese durchgeführt, wobei jedoch eine Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt (*Low Melting Point*-Agarose) verwendet wurde. Zudem ermöglichte die Verwendung von breiteren Geltaschenformern eine Beladung des meist 1 %igen (w/v) Agarosegels mit einem größeren Volumen (50-100 µL). Nach Auftrennung der DNA-Fragmente bei einer konstanten Spannung von 70 V für 90 min wurde die DNA — zur Vermeidung von Strahlenschäden — mit UV-Licht mittlerer Wellenlänge (312 nm) bei möglichst kurzer Expositionszeit sichtbar gemacht, und die relevanten DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die DNA wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Herstellerangaben aus den Gelstücken extrahiert, gereinigt und in 30 µL 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen. Die DNA-Konzen-

tration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm in einem NanoDrop 2000 Spektrometer bestimmt. Die Lagerung der DNA-Fragmente bis zu ihrer Verwendung erfolgte bei 4 °C.

## **2.2.5 *In vitro* Modifizierung von DNA**

### **2.2.5.1 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden bzw. Dephosphorylierung**

Sollte ein PCR-Produkt direkt zur Ligierung eingesetzt werden, wurde eine 5'-Phosphorylierung der PCR-Oligodesoxynukleotide durchgeführt, um die kovalente Verknüpfung durch die T4 DNA-Ligase mit den freien 3'-Ende eines Vektorrückgrats zu ermöglichen. Typischerweise wurden hierzu in einem 30 µL-Reaktionsansatz 200 pmol eines Oligodesoxynukleotids durch Zugabe von 0,5 µL T4 DNA-Polynukleotidkinase (PNK; 5 U/µL), 3 µL 10x T4 PNK-Puffer sowie 1,2 µL 10 mM ATP für 45 min bei 37 °C phosphoryliert. Nach Hitzeinaktivierung der PNK (10 min, 65 °C) wurden die Oligodesoxynukleotide anschließend direkt dem PCR-Ansatz hinzugefügt.

Während der Plasmidkonstruktion wurde die Ligierungseffizienz erhöht, in dem die 5'-Termini von linearisierten Vektor-Fragmenten dephosphoryliert wurden, um so eine intramolekulare Ligierung zu verhindern. Dazu wurden zu einem präparativen Restriktionsansatz (siehe Abschnitt 2.2.5.2) nach einstündiger Inkubation 2 µL der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (SAP; 1 U/µL) pipettiert und nach weiteren 60 min bei 37 °C die SAP durch Hitzeschock (15 min, 65 °C) inaktiviert. Die Reinigung der DNA-Fragmente erfolgte entweder durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion (siehe Abschnitt 2.2.4) oder mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kits* nach Herstellerangaben.

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

Die Präparation von DNA-Fragmenten zur Konstruktion von Plasmiden sowie deren anschließender Restriktionsanalyse erforderte den Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Die optimalen Reaktionsbedingungen (Temperatur, Inkubationszeit, Reaktionspuffer) für die enzymatische Spaltung wurden gemäß den Herstellerangaben angepasst. Sah die Klonierungsstrategie eine Behandlung der DNA mit mehreren Restriktionsendonukleasen vor, wurden die Reaktionsbedingungen nach Möglichkeit so eingestellt, dass alle Enzyme die maximale Aktivität besaßen oder – falls unterschiedliche Puffer oder Temperaturoptima vorlagen – wurden die Reaktionen nacheinander durchgeführt. Im letzteren Fall wurde die DNA zwischen den enzymatischen Spaltungen mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* gereinigt.

### **2.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro* Vervielfältigung und Manipulation von Strukturgenen verwendet (Saiki *et al.*, 1988). Dabei wurde die Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide durch eine 13-18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Region am 3'-Terminus sicher-

gestellt, während am 5'-Ende zusätzliche Basen(-Triplets) oder Restriktionserkennungsstellen durch Anhängen bzw. Einfügen von nicht- oder nur teilweise komplementären Basenabfolgen generiert wurden. Im letzteren Fall verfügten die Oligodesoxynukleotide am 5'-Ende über mindestens sechs zusätzliche Basen, um eine effiziente Spaltung durch Restriktionsendonukleasen zu gewährleisten. Der Einsatz der *Pfu* DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991), die im Gegensatz zur *Taq* DNA-Polymerase über eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität und damit über eine niedrigere Fehlerrate verfügt, erforderte eine Modifizierung der Oligodesoxynukleotide am 3'-Ende. Statt einer Phosphorsäurediester-Bindung wurde dazu eine Phosphothioat-Bindung synthetisiert (Skerra, 1992).

Die PCR wurde standardmäßig in einem Gesamtvolumen von 50 µL durchgeführt. Dazu wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß 10-100 ng DNA als Matrize, je 25 pmol der beiden Desoxynukleotide, 4 µL dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP) und 3 µL 25 mM MgCl<sub>2</sub> pipettiert. Beim Einsatz der *Taq* DNA-Polymerase (1-2 U pro PCR-Ansatz) wurden 5 µL des mitgelieferten 10x *Taq*-Puffers (mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und für die *Pfu* DNA-Polymerase (1-2 U pro PCR-Ansatz) das entsprechende Volumen des 10x *Pfu*-Puffers verwendet. Zum Erreichen des Gesamtvolumens wurde der PCR-Ansatz mit bidest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 3 min erfolgte die DNA-Synthese für gewöhnlich in 25 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus den folgenden Schritten: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 30 s, 2. Hybridisierung (*Annealing*) der Oligodesoxynukleotide an die einzelsträngige DNA-Matrix bei 45-65 °C (je nach Schmelztemperatur des gebildeten Hybrids) für 30 s, 3. DNA-Synthese bei 72 °C für 1 min je kb (*Taq* DNA-Polymerase) bzw. 2 min je kb (*Pfu* DNA-Polymerase). Nach Beendigung wurde der PCR-Ansatz schließlich für 5 min bei 72 °C inkubiert, um die Syntheseprodukte zu vervollständigen und danach bis zur Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese bei 4 °C gelagert.

#### 2.2.5.4 Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren

Der gezielte Austausch einzelner Basen (Punktmutation) einschließlich bis zu zwei aufeinander folgender Basen-Triplets wurde durch QuikChange-Mutagenese (Papworth *et al.*, 1996) realisiert. In einer PCR-ähnlichen Reaktion repliziert dabei die mit einer *Proof-Reading*-Aktivität ausgestattete *Pfu* Ultra II DNA-Polymerase ausgehend von zwei komplementären Oligodesoxynukleotiden, die die gewünschte Mutation tragen, beide Plasmidstränge, welche nicht-kovalent zirkularisieren können. Die im Mutagenese-Ansatz enthaltenen nicht mutierten Elternstränge, welche *dam*-Methylierung aufweisen, werden anschließend durch die Endonuklease *DpnI* abgebaut, während die Strangbrüche in der neu synthetisierten mutierten DNA nach der Transformation von *E. coli* XL1-Blue *in vivo* repariert werden.

Die Länge der Oligodesoxynukleotide wurde jeweils so geplant, dass in 5'- und 3'-Richtung ausgehend von der Mutationsstelle eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur erreicht wurde. Bestimmt nach der Wallace-Regel (Sambrook *et al.*, 1989) lag diese typischerweise zwischen 38 und 46 °C. Einem

50  $\mu\text{L}$  Standard-Reaktionsansatz wurden neben 50 ng des zu mutierenden Plasmids, isoliert aus einem *dam<sup>+</sup> E. coli*-Stamm (z.B. XL1-Blue), 5  $\mu\text{L}$  10x *Pfu* Ultra II Puffer, jeweils 10 pmol der beiden Mutageneseprimer, 4  $\mu\text{L}$  dNTP-Mix (je 2,5 mM) sowie bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben. Nach Zugabe von 1  $\mu\text{L}$  *Pfu* Ultra II DNA-Polymerase (2,5 U/ $\mu\text{L}$ ) erfolgte die Amplifizierung des Plasmids in einem Thermo-Cycler, wobei nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 30 s folgende Schritte insgesamt 18x durchlaufen wurden: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C für 30 s, 2. Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide an die einzelsträngige DNA-Matrix bei 55 °C für 1 min, 3. DNA-Synthese bei 68 °C für 1 min je kb des Plasmids. Anschließend wurde 1,5  $\mu\text{L}$  (10 U/ $\mu\text{L}$ ) *DpnI* direkt zum PCR-Produkt pipettiert, für 1 h bei 37 °C inkubiert und 4  $\mu\text{L}$  dieses Gemisches zur Transformation von chemisch kompetenten XL1-Blue Zellen nach der  $\text{CaCl}_2$ -Methode eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.2).

### 2.2.5.5 Konstruktion von PAS-Genkassetten verschiedener Länge

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Fusion zweier Bindeproteine unter anderem ein sogenanntes PAS-Polypeptid bestehend aus den Aminosäuren Pro, Ala und Ser (Schlapschy *et al.*, 2013) eingesetzt. Dazu wurden die Strukturgene der Bindeproteine auf genetischer Ebene mit der PAS-Genkassette ligiert. Im einfachsten Fall besteht ein solches synthetisches DNA-Fragment aus 60 bp kodierend für 20 Aminosäuren, wobei die 5'-GCC/GGC-Überhänge die gerichtete Ligierung und damit eine Verlängerung um ein Vielfaches der PAS-Grundeinheit ermöglichen. In Abhängigkeit von der benötigten PAS-Länge wurden zwei unterschiedliche Synthesestrategien verfolgt.

Für die Herstellung von PAS-Polypeptiden bis zu einer Länge von 100 Aminosäuren (300 bp) wurden zunächst zwecks 5'-Phosphorylierung 20  $\mu\text{L}$  der mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese (Skerra, 1989) gereinigten Oligodesoxynukleotide PAS#1\_for und PAS#1\_rev (je 10  $\mu\text{M}$ ), 10  $\mu\text{L}$  10x PNK-Puffer, 1  $\mu\text{L}$  PNK (5 U/ $\mu\text{L}$ ) sowie 10  $\mu\text{L}$  einer 10 mM ATP-Lösung gemischt und bis auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{L}$  mit bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Die Ansatz wurde zunächst bei 37 °C für 30 min inkubiert (PNK-Reaktion), anschließend bei 80 °C für 10 min im Heizblock denaturiert und zur Hybridisierung langsam (über Nacht) abgekühlt. Die so erhaltenen PAS(20)-Kassetten mit jeweils 5'-GCC/GGC-Überhängen wurden in dem 100  $\mu\text{L}$  Ansatz unter Zugabe der T4 DNA-Ligase (siehe Abschnitt 2.2.5.6) für 30 min auf Eis unter Bildung von Konkatemeren kovalent miteinander verknüpft. In einer abschließenden präparativen Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4) wurden dann PAS-Genkassetten bestehend aus dem Vielfachen der PAS(20)-Basiseinheit, d.h. (PAS(40), PAS(60), PAS(80) und PAS(100)) isoliert. Die 5'-GCC/GGC-Überhänge der PAS-Genkassetten ermöglichten deren Ligierung mit Vektor-Fragmenten, die zuvor mit der Restriktionsendonuklease *SapI* behandelt worden waren (unter Bildung eines für Ala kodierenden 5'-GCC/GGC *Sticky Ends*).

Für 200 (oder mehr) Aminosäuren kodierende PAS-Genkassetten wurden aus dem Vektor pCR2.1-PAS#1.2(200)duoSapI (siehe Abschnitt 2.1.2) durch Restriktionsverdau mit *SapI* und präparativer Agarose-Gelelektrophorese erhalten. Bei der anschließenden Ligierung (siehe Abschnitt 2.2.5.6) wur-

de das Vektorrückgrat erst nach 1 min Reaktionszeit zugegeben, wodurch Konkatemere der PAS(200)-Genkassetten inseriert wurden, deren Anzahl durch analytischen Restriktionsverdau der entstandenen Plasmide (siehe Abschnitt 2.2.5.2) identifiziert wurde.

### 2.2.5.6 Ligierung von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion neuer Strukturgene oder Vektoren war die kovalente Verknüpfung isolierter DNA-Fragmente mit Hilfe der T4 DNA-Ligase notwendig. Typischerweise wurden die durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigten DNA-Fragment (siehe Abschnitt 2.2.4) in einem 20  $\mu\text{L}$ -Reaktionsansatz nach Zugabe von 2  $\mu\text{L}$  10x T4 Ligase-Puffer, 1  $\mu\text{L}$  T4 Ligase (1 U/ $\mu\text{L}$ ) und, falls nötig, bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei betrug das molare Verhältnis von Vektor-Fragment zu Insert ungefähr 1:3. Anschließend wurde 3  $\mu\text{L}$  des Ansatzes zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2.2). Zur Kontrolle wurde ein Ligierungsansatz hergestellt, der ausschließlich das Vektor-Fragment enthielt, und ebenfalls zur Transformation verwendet.

### 2.2.5.7 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch PCR amplifizierte DNA wurde einer Sequenzanalyse in einem ABI PRISM 310 Sequenzierautomaten unterworfen (Sanger *et al.*, 1977). Der zu diesem Zweck angebotene ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix* enthält eine modifizierte *AmpliTag* DNA-Polymerase (Tabor & Richardson, 1995) sowie Didesoxyribonukleosid-Triphosphat-Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), die jeweils mit unterschiedlichen fluoreszenzaktiven Dichlorrhodamin-Farbstoffen gekoppelt sind (Rosenblum *et al.*, 1997). Nach Einbau einer Terminatorbase wird die Polymerisation gestoppt und gleichzeitig die basenspezifische Fluoreszenzmarkierung eingefügt. Die so entstandenen DNA-Fragmente werden im Sequenziergerät mittels Kapillar-Elektrophorese in einem geeigneten Polymer (*Performance Optimized Polymer 6*; POP-6) entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und ihr 3'-terminales Fluorophor durch einen Argonionen-Laser angeregt. Die Fluoreszenzemission wird von einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera registriert und als digitales Signal weiterverarbeitet.

#### Allgemeine Arbeitsvorschrift

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 4  $\mu\text{L}$  *BigDye Ready Reaction Mix*, 2  $\mu\text{L}$  gereinigte Plasmid-DNA (siehe Abschnitt 2.2.3), 2  $\mu\text{L}$  eines geeigneten Oligodesoxynukleotids (1,6  $\mu\text{M}$ ; gelöst in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 2  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gemischt und nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C und 5 min 25x folgendem PCR-Zyklus unterworfen: 1. Denaturierung bei 95 °C für 30 s, 2. Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide bei 50 °C für 30 s, 3. DNA-Synthese bei 60 °C für 1 min. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch Zugabe von 2,5  $\mu\text{L}$  125 mM EDTA und 30  $\mu\text{L}$  100 % Ethanol (p. a.) für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und anschließend zentrifugiert (Eppendorf 5415R, 13.200 rpm, 4 °C, 30 min). Nach sofortigem Abnehmen des Überstandes und Waschen der DNA mit 125  $\mu\text{L}$  70 % (v/v)



Ethanol (p. a.) folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (Eppendorf 5415R, 13.200 rpm, 4 °C, 15 min). Das PCR-Produkt wurde schließlich durch Stehenlassen des Reaktionsgefäßes mit geöffnetem Deckel bei RT getrocknet und in 14 µL des im Kit enthaltenen TSR-Puffers resuspendiert. Die Probe wurde in ein passendes Reaktionsgefäß überführt und die Sequenzierung nach Herstellerangaben im ABI PRISM 310 Sequenzierautomaten gestartet. Die Rohdaten wurden von dem ABI PRISM DNA *Sequencing Analysis* Programm als Elektropherogramm bzw. als Textdatei ausgegeben. Zur weiteren Analyse bzw. zum Abgleich der Sequenz wurde das Programm *ApE* v1.17 (M. Wayne Davis) verwendet.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

Alle proteinbiochemischen Arbeiten wurden entsprechend der im Labor von Prof. Skerra entwickelten Standardmethoden durchgeführt. Daher wurden Dissertationen früherer Doktoranden des Labors AG (Dr. D. Breustedt, Dr. M. Gebauer, Dr. A. D. Holla, Dr. J. P. Mayer, Dr. M. Schlapschy, Dr. S. Schlehuber) als Vorlage verwendet, zum Teil wortwörtlich übernommen und im Detail angepasst.

### 2.3.1 Funktionelle Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

#### 2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben

##### Produktion im Periplasma von *E. coli*

Zur bakteriellen Produktion von Lcn2 bzw. Anticalinen und scFv T84.66 sowie der unmodifizierten und PASylierten Anticalin-Fusionsproteine T84.66-CL31 und des Duocalins N7A-CL31 wurden Expressionsvektoren verwendet, auf denen das jeweilige Strukturgen mit dem Gen für die bakterielle Signalsequenz des OmpA (*Outer Membran Protein A*) fusioniert vorlag. Die durch die OmpA-Signalsequenz vermittelte Translokation des rekombinanten Proteins in das oxidierende Milieu des periplasmatischen Raums ermöglicht die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die korrekte Faltung der Proteine. Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran unter Komplexierung zweiwertiger Ionen mittels EDTA kann die Periplasmafraktion gewonnen werden, während die Sphäroplasten durch die hypertonen Bedingungen – mit der im Aufschlusspuffer enthaltenen hohen Konzentration an Saccharose – stabilisiert werden (Skerra, 1989).

50 mL LB/Amp-Medium (Medium versetzt mit 100 mg/L Ampicillin) wurde mit einer Einzelkolonie der *E. coli*-Stämme JM83 oder TG1-F<sup>-</sup> (siehe Abschnitt 2.1.1), die zuvor mit dem entsprechenden Plasmid transformiert worden waren (siehe Abschnitt 2.2.2), beimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Danach wurde 2 L LB/Amp-Medium im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft, bei 22 °C und 200 rpm geschüttelt und die Genexpression nach Erreichen von OD<sub>550</sub> = 0,5 durch Zugabe von 200 µL aTc (2 mg/mL) für 3 h induziert. Insbesondere bei der Produktion von Lcn2 bzw. Anticalinen konnte eine signifikante Erhöhung der Proteinausbeute durch Induktion der Genexpression bei OD<sub>550</sub> = 2,5 erzielt werden. Dazu wurde 2 mL LB/Amp-Medium in einem

13 mL-Kulturröhrchen mit einer Einzelkolonie eines mit dem entsprechenden Vektor transformierten *E. coli*-Stammes inokuliert und für 6-8 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 2 L LB/Amp-Medium wurde dann mit 1 mL der Vorkultur beimpft und die Zellen über Nacht bei 22 °C und 200 rpm kultiviert, so dass typischerweise am nächsten Morgen bei  $OD_{550} = 2,5$  die Genexpression, wie oben beschrieben, induziert werden konnte. Die Induktionsdauer betrug hier 5 h. Die *E. coli*-Kultur wurde durch Zentrifugation (F10-4x1000 LEX, 5000 rpm, 4 °C, 15 min) geerntet, das Kulturmedium verworfen und noch vorhandene Restflüssigkeit sorgfältig mit einer Pipette abgezogen.

Zur Präparation der periplasmatischen Zellfraktion wurde das Sediment in 20 mL (nach Induktion bei  $OD_{550} = 0,5$ ) bzw. 40 mL (nach Induktion bei  $OD_{550} = 2,5$ ) eiskaltem Periplasma-Aufschlusspuffer zügig resuspendiert und für 30 min bei 4 °C rollend inkubiert, bevor die Sphäroplasten durch Zentrifugation abgetrennt wurden (Sigma 4K15, 4420 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde einem weiteren Zentrifugationsschritt unterzogen (SS-34, 17.000 rpm, 4 °C, 15 min), woraufhin der nun geklärte Periplasma-Extrakt über Nacht bei 4 °C gegen das 100-fache Volumen SA-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.9) dialysiert wurde. Unmittelbar vor der Reinigung der rekombinanten Proteine mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.3.2) wurde der Extrakt sterilfiltriert (0,45 µm).

#### Produktion im Cytoplasma von *E. coli*

Zur Produktion von ChromoCalinen und Duocalinen (mit oder ohne PAS-Linker) wurde der *E. coli*-Stamm Origami B (siehe Abschnitt 2.1.1) eingesetzt, der durch Mutationen in den Genen für die Thio-redoxin-Reduktase (*trxB*) und die Glutathion-Reduktase (*gor*) über ein weniger reduzierendes Milieu im Cytoplasma verfügt, so dass die Ausbildung von strukturellen Disulfidbrücken ermöglicht wird.

Origami B-Zellen wurden mit dem entsprechenden Expressionsvektor transformiert, 50 mL 2xYT/Amp-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und die Kultur für 16 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. 40 mL dieser stationären Vorkultur wurden in 2 L vorgewärmtes 2xYT/Amp-Medium überführt und die Zellen bis  $OD_{550} = 0,5$  (ChromoCaline) bzw.  $OD_{550} = 1$  (Duocaline) bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Durch Einstellen der Induktorkonzentration auf 200 µg/L aTc wurde die Genexpression für 4-5 h induziert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (F10-4x1000 LEX, 5000 rpm, 4 °C, 15 min) sedimentiert, das Kulturmedium dekantiert und die Zellen nach kurzem Kälteschock (15 min, -20 °C) für die Streptavidin-Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.3.2) in 20 mL SA-Puffer resuspendiert. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte im PANDA Zellhomogenisator (GEA Niro Soavi, Parma, Italien) bei kontinuierlichem Fluß für 5 min bei 1500 bar, wobei die Probe durch eine Rückflußkühlung auf 4 °C temperiert wurde. Nach Abtrennung von Zelltrümmern durch Zentrifugation (SS-34, 17.000 rpm, 4 °C, 30 min) wurde der Zellextrakt sterilfiltriert (0,45 µm) und sofort zur chromatographischen Reinigung eingesetzt.

Zur Analyse der Proteinproduktion in Abhängigkeit von der Induktionsdauer wurden Gesamtzell-extrakte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultivierung präpariert. Dazu wurde jeweils 1 mL der Kultur zentrifugiert (Eppendorf 5415R, 13.200 rpm, 4 °C, 2 min) und der Überstand sorgfältig abgezogen. Nach Resuspendieren der Zellen in 80 µL Benzonase-Lösung (12,5 U/mL in Benzonase-Puf-

fer) und Zugabe von 20  $\mu\text{L}$  5x reduzierenden Auftragspuffer für die SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.3.5) wurde die Probe für 1 h bei 4 °C inkubiert und nach Hitzebehandlung (95 °C, 5 min) mittels SDS-PAGE analysiert.

### 2.3.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Laborfermenter

Vor allem für *in vivo* Experimente wurden größere Mengen eines rekombinanten Proteins benötigt, die durch ein diskontinuierliches Fermentationsverfahren von *E. coli* im 8 L-Maßstab hergestellt wurden (Schiweck & Skerra, 1995). Dabei wurden die Bakterienzellen in einem Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde, und durch Kontrolle der Temperatur, des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdrucks homöostatische Wachstumsbedingungen eingestellt.

Als Vorvorkultur wurde 2 mL LB/Amp-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie angeimpft und für 8 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Eine Vorkultur bestehend aus 360 mL Mineralsalzmedium, 40 mL 20 % (w/v) Glucose, 4 mL 1 M  $\text{MgSO}_4$ , 400  $\mu\text{L}$  Antibiotika-Stammlösung und 400  $\mu\text{L}$  Thiamin-Stammlösung wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur beimpft und für 24-26 h bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt. Typischerweise betrug die Zelldichte der stationären Vorkultur  $\text{OD}_{550} = 1,5-2,0$ . Für die Hauptkultur wurde ein 10 L-Kulturgefäß mit Rührereinheit mit 7 L Mineralsalzmedium autoklaviert und über einen Trichter mit 800 mL 20 % (w/v) Glucose, 80 mL 1 M  $\text{MgSO}_4$ , je 8 mL Antibiotika- sowie Thiamin-Stammlösung, je 4 mL  $\text{FeCl}_3$ - und Zn-Acetat-Lösung, 10 mL Spurenelement-Lösung sowie 1-2 mL 30 % (v/v) Antifoam A befüllt. Das Medium wurde zunächst durch Druckluft begast und dem Sauerstoffpartialdruck vor Inokulation mit der Vorkultur der relative Wert „100 %“ zugeordnet. Im Verlauf der Fermentation wurde eine ausreichende Versorgung der Kultur mit Sauerstoff durch gesteuerte Begasung mit Druckluft und reinem Sauerstoff gewährleistet. Ein konstanter pH-Wert ergab sich durch gesteuerte Titration von 12,5 % (w/v) Ammoniak-Lösung. Mit Hilfe eines Wasserbades wurde das Medium auf 25 °C temperiert und unter Rühren (470 rpm) mit 400 mL der stationären Vorkultur angeimpft. Nach typischerweise 12-14 h Kultivierungszeit hatten die Zellen die exponentielle Wachstumsphase erreicht, ab der die Kohlenstoffversorgung durch Zudosierung von 50 % (w/v) Glucose gewährleistet wurde, welche ab  $\text{OD}_{550} = 7,5$  mit 14 mL/h, ab  $\text{OD}_{550} = 12,5$  mit 20 mL/h, ab  $\text{OD}_{550} = 18,5$  mit 30 mL/h und ab  $\text{OD}_{550} = 22,5$  mit 40 mL/h erfolgte. Weiterhin wurden der Kultur bei  $\text{OD}_{550} = 13$  nochmals je 4 mL  $\text{FeCl}_3$ - bzw. Zn-Stammlösung und 10 mL der Spurenelement-Lösung zugesetzt. Bei einer Zelldichte von  $\text{OD}_{550} = 20$  wurde die Genexpression durch Zugabe von 800  $\mu\text{L}$  5 mg/mL aTc induziert und die Kultivierung für ca. 2,5 h fortgesetzt. Zur Zellernte wurde die Kultur zunächst auf 4 °C gekühlt und dann zügig durch Zentrifugation (H-6000 A und F10-4x1000 LEX, 5000 rpm, 4 °C, 25 min) sedimentiert.

Zur Präparation des Periplasma-Extrakts wurde die gesamte Zellmasse in vorgekühltem Periplasma-Aufschlusspuffer in einem Volumen von 2 mL  $\text{L}^{-1} \text{OD}^{-1}$  zunächst mit den Händen grob zerkleinert und für 10 min bei 4 °C unter Rühren bis zur vollständigen Homogenisierung inkubiert, und dann die Zell-

suspension auf 15 mM EDTA (0,5 M EDTA-Stammlösung pH 8) und 250 µg Lysozym/mL (20 mg/mL Lysozym-Stammlösung in Aufschlusspuffer) eingestellt und für weitere 20 min gerührt. Die grobe Abtrennung der Sphäroplasten erfolgte in einem ersten Zentrifugationsschritt (SLA-1500, 11.500 rpm, 4 °C, 25 min), dem sich ein zweiter, sowie bei Bedarf, ein dritter Zentrifugationsschritt anschloss.

Für die folgende Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose (siehe Abschnitt 2.3.2) wurde der gesamte geklärte Extrakt bei 4 °C unter Rühren 3x gegen 5 L SA-Puffer dialysiert und vor dem Säulenauftrag durch Filtration (0,45 µm) von ausgefallenem Protein und anderen Partikeln befreit.

### 2.3.2 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose (SA-Chromatographie)

Die Reinigung aller in dieser Arbeit produzierten Proteine erfolgte zunächst mit Hilfe des *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels an *Strep*-Tactin-Sepharose (Schmidt & Skerra, 2007). Dazu wurde eine *Strep*-Tactin-Superflow Säule mit einer Bindungskapazität von 50-100 nmol/mL Bettvolumen (Produktbeschreibung von IBA GmbH, Göttingen) bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie – anhand der Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ) detektiert – mit SA-Puffer gespült. Je nach Gehalt des Periplasma-Extrakts an *Strep*-tag II-Fusionsprotein wurden Säulen mit 4 mL, 8 mL oder 25 mL Bettvolumen verwendet, die bei Flussraten von ca. 40 mL/h, 80 mL/h bzw. 200 mL/h betrieben wurden. Die wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben präparierte Periplasmafraktion wurde auf die Säule aufgetragen und anschließend mit SA-Puffer gewaschen, bis der  $A_{280}$ -Wert annähernd den Ausgangswert erreicht hatte. Dann wurde das rekombinante Protein durch Spülen mit 2,5 mM D-Desthiobiotin in SA-Puffer kompetitiv eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen und nach Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.3.5) je nach Reinheitsgrad entweder sofort der Größenausschlusschromatographie (siehe Abschnitt 2.3.4) oder, nach Dialyse, zunächst einer Ionenaustauschchromatographie (siehe Abschnitt 2.3.3) unterzogen. Das *Strep*-Tactin-Säulenmaterial wurde durch Spülen mit dem 5-fachen Säulenvolumen (SV) 5 mM HABA in SA-Puffer regeneriert. Vor der nächsten Verwendung wurde die Säule kurz mit SA-Puffer gewaschen, dann mit 1 SV 100 mM Tris gespült und anschließend mit SA-Puffer äquilibriert.

Zur Reinigung von aus dem bakteriellen Cytoplasma extrahierten (siehe Abschnitt 2.3.1.1) bzw. im Laborfermenter (siehe Abschnitt 2.3.1.2) produzierten *Strep*-tag II-Fusionsproteinen wurde der Gesamtzell- bzw. Periplasma-Extrakt 15 min vor der Säulenapplikation mit 1 nmol Streptavidin (hergestellt im Labor von Prof. Skerra) pro Liter Kultur mit  $OD_{550} = 1$  versetzt. Die Reinigung an *Strep*-Tactin Sepharose erfolgte wie oben erläutert.

### 2.3.3 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Konnten rekombinante Proteine durch SA-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.3.2) nicht vollständig von Wirtszellproteinen oder Disulfidisomeren getrennt werden, wurde das SA-Eluat einer Ionenaustauschchromatographie (*Ion Exchange Chromatography*; IEX) unterzogen. Dabei werden Moleküle

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 ausschließlich Anionen-EX (AEX) eingesetzt, bei der die Säulenmatrix eine positive Nettoladung trägt und der pH-Wert des verwendeten Puffers oberhalb des kalkulierten pI-Wertes (ermittelt mit ProtParam; [www.expasy.org](http://www.expasy.org)) des Proteins liegt, wodurch es eine negative Nettoladung trägt. Das SA-Eluat wurde zunächst 2-3-mal gegen das 40-fache Volumen eines salzfreien Puffers mit geeignetem pH bei 4 °C dialysiert und filtriert (0,45 µm). Je nach Proteinmenge wurde das Dialysat auf eine mit dem entsprechenden Puffer äquilibrierte 1 mL bzw. 6 mL Resource Q Säule (GE Healthcare, Freiburg) mit quaternären Ammoniumgruppen bei einer Flussrate von 1-2 mL/min aufgetragen und die Säule bis zum Erreichen des Basislinie mit Laufpuffer gespült. Die Elution der adsorbierten Proteine erfolgte bei einem Fluss von 1-1,5 mL/min mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 1 M NaCl in einem für das jeweilige Protein optimierten Säulenvolumen. Durch SDS-PAGE wurde die Proteinspezies sowie der Reinheitsgrad der gesammelten Elutionsfraktionen bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.5). Die Säule wurde zwischen den Läufen durch Spülen mit 2-3 SV Elutionspuffer (Laufpuffer mit 1 M NaCl) regeneriert.

#### 2.3.4 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Mittels Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*; SEC) können Moleküle nach ihrer Größe und Form aufgetrennt und analysiert werden. Daher diente dieses Verfahren hauptsächlich zur Abtrennung der rekombinanten Zielproteine von proteinogenen und niedermolekularen Kontaminanten, Proteinaggregat, zur Untersuchung ihrer Oligomerisierungseigenschaften sowie zum schnellen und effektiven Pufferwechsel.

Die Chromatographie wurde an dem HPLC-System Äkta Purifier unter Verfolgung der Absorption bei 280 nm betrieben, wobei soweit möglich die Puffer und Lösungen vor der Verwendung filtriert (0,45 µm) und autoklaviert wurden (siehe Abschnitt 2.1.9). Für Proteine mit einer Molekülmasse < 75 kDa wurden Superdex 75 Säulen verwendet, während größere Proteine oder solche mit einem vergrößerten hydrodynamischen Volumen in Folge der PASylierung mit Superdex 200 Säulen analysiert wurden. Die SEC erfolgte sowohl im analytischen (Bettvolumen: 24 mL) als auch im präparativen Maßstab (Bettvolumen: 124 mL). Das dabei über eine Probenschleife applizierte Probenvolumen betrug maximal 1 % des Bettvolumens der verwendeten Säule. Die Flussrate und der Maximaldruck der Säulen sind durch den Hersteller vorgegeben. Nach Äquilibrierung der Säule mit dem jeweiligen Puffer wurde die Proben injiziert und über ein SV hinweg Fraktionen gesammelt, die anschließend mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.3.5) analysiert wurden. Zur Regenerierung wurden die Säulen mit einem SV 0,5 M NaOH gespült und anschließend mit 2 SV Wasser unter Zusatz von 1 mM EDTA und 0,02 % NaN<sub>3</sub> gewaschen, um bakterieller Kontamination entgegenzuwirken. Zur Abschätzung der

Molekülmasse der Proteine anhand ihres Elutionsvolumens erfolgte die Kalibrierung einer Säule mit Hilfe von Standardproteinen nach Angaben des Herstellers (siehe Abschnitt 2.1.5).

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

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von (Fling & Gregerson, 1986) wurden Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wird die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamidgels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der proteineigenen Molekülmasse.

In Abhängigkeit von der Größe des zu analysierenden Proteins wurden 12 %ige oder 15 %ige SDS-PAGE Gele verwendet, die in ein Minigel-Twin Glasplattensystem (10,5 cm x 9,8 cm; Biometra Analytik, Göttingen) gegossen wurden. Zur Herstellung zweier Trenngele wurden 4 mL (für 12 %ige Gele) bzw. 5 mL (für 15 %ige Gele) einer Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung mit 2,5 mL 4x *Lower Tris* gemischt und mit dest. H<sub>2</sub>O auf 10 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 5 µL TEMED und 80 µL 10 % (w/v) APS gestartet. Zwischen die abgedichteten Glasplatten wurden sofort je 5 mL der Lösung pipettiert und mit 70 % Isopropanol überschichtet. Nach ca. 45 min war das Gel erstarrt, so dass das Isopropanol entfernt und das 5 %ige Sammelgel, bestehend aus 1 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 1,5 mL 4x *Upper Tris* und 3,5 mL dest. H<sub>2</sub>O, nach Zugabe von 5 µL TEMED und 80 µL 10 % (w/v) APS, auf das Trenngel gegossen sowie der Taschenformer eingesetzt werden konnte.

Nach der Polymerisation (ca. 15 min) wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer luftblasenfrei eingespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt. Die zu analysierenden Proteine wurden mit 5x Probenauftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach kurzer Zentrifugation wurden je Geltasche maximal 20 µL Probe geladen. Die Elektrophorese wurde durch Anlegen einer Spannung von 120-140 V durchgeführt, bis der im Auftragspuffer enthaltene negativ geladene Farbstoff Bromphenolblau gerade aus dem Gel herausgelaufen war. Das Gel wurde aus dem Glasplattenset gelöst, für 20 min in Coomassie Brilliantblau Färbelösung geschwenkt und die Proteinbanden durch anschließende Entfärbung des Hintergrunds mittels Entfärbelösung 1 (maximal 20 min) und Entfärbelösung 2 sichtbar gemacht (siehe Abschnitt 2.1.9).

### 2.3.6 Western Blotting

Für den Nachweis eines Proteins innerhalb eines Proteingemisches wurde das Verfahren des Western Blotting verwendet. Hierfür wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische durch Elektrottransfer auf eine hydrophobe Membran überführt, auf der das gewünschte Protein in einem immunchemischen Verfahren anhand seines *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels selektiv angefärbt wurde.

Nach der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.3.5) wurde das Trenngel für 20 min in Transferlösung (20 % (v/v) Methanol in 1x SDS-Laufpuffer) geschwenkt und anschließend auf einen 3-lagigen Stapel von

mit Transferlösung getränktem Whatman-Filterpapier (8,5 cm x 5,5 cm; VWR, Darmstadt) gelegt, der sich auf der Edelstahl-Kathodenplatte einer Elektroblotapparatur befand. Darauf wurde eine mit Transferlösung befeuchtete Nitrocellulose-Membran (NC-Membran; 8,5 cm x 5,5 cm; Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel) platziert, auf die der Proteintransfer erfolgte, sowie ein weiterer 3-lagiger Stapel angefeuchtetes Whatman-Filterpapier. Verbliebene Luftblasen zwischen den Lagen wurden aus dem Stapel entfernt, bevor der Elektrotransfer nach Aufsetzen der Anodenplatte und Anlegen einer konstanten Stromstärke von 50 mA (ca. 1 mA/cm<sup>2</sup>) für ca. 1,5 h betrieben wurde.

Für den anschließenden immunchemischen Nachweis wurde die NC-Membran dreimal für jeweils 10 min mit PBS/0,1T gewaschen, freie Bindungsstellen für 1 h mit 3 % (w/v) BSA in PBS/0,1T blockiert und erneut gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit 2 µg des Maus-Antikörpers *StrepMAB-Classic* in 0,2 % (w/v) BSA in PBS/0,1T für 1 h unter Schwenken, dem nach einem weiteren Waschschritt ein anti-Maus IgG-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (1:2000 in PBS/0,1T; 1 h) folgte. Zum selektiven Anfärben des rekombinanten *Strep*-tag II-Fusionsproteins wurde die NC-Membran daraufhin je einmal mit PBS/0,1T und PBS gewaschen und abschließend kurz in AP-Puffer geschwenkt. Durch Inkubation in 15 mL AP-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.9) unter Zusatz von 45 µL BCIP (50 mg/mL in DMF) sowie 7,5 µL NBT (75 mg/mL in 70 % DMF) wurde die Farbentwicklung gestartet (Blake *et al.*, 1984), welche durch mehrmaliges Waschen mit dest. H<sub>2</sub>O bei Erreichen der gewünschten Intensität der Proteinbanden gestoppt wurde.

### 2.3.7 Konzentrieren von Proteinen

Zur Herstellung hochkonzentrierter Proteinlösungen, wie sie beispielsweise für pharmakokinetische Studien (siehe Abschnitt 2.7.1) notwendig sind, wurde das Volumen der Proteinlösung durch Zentrifugation (Sigma 4K15, 3000 g, 4 °C) in einer Konzentratoreinheit (siehe Abschnitt 2.1.8) mit geeigneter Ausschlussgröße (10 kDa oder 30 kDa) bis zum Erreichen der benötigten Konzentration (siehe Abschnitt 2.3.8) eingengt. Um Proteinaggregation zu vermeiden, wurde das Konzentrat zwischen den 5-10 minütigen Zentrifugationsschritten gründlich durch Schwenken oder Auf- und Abpipettieren durchmischt.

### 2.3.8 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration  $c$  einer Proteinlösung wurde – mit Ausnahme für eGFP-Fusionsproteine – durch Messung von  $A_{280}$  in einer Quarzküvette (Schichtdicke:  $d = 1$  cm), korrigiert um den Eigenabsorptionsanteil des Puffers, mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ( $A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$ ) ermittelt. Der dafür benötigte molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ; Tabelle 3) wurde für jedes Protein nach einem Algorithmus kalkuliert, der die Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren, und gegebenenfalls Cystin, einer vollständig entfalteten Polypeptidkette bestimmt (Gill & von Hippel, 1989). Zu diesem Zweck wurde das Programm ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005) auf dem Server [www.expasy.org](http://www.expasy.org) verwendet.

**Tabelle 3. Molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) von in dieser Arbeit produzierten Proteinen.**

Protein	$\epsilon_{280}$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
Lcn2	31525
C26 <sup>a</sup>	23045
L1 <sup>a</sup>	23045
CL31 <sup>a</sup>	23045
CL31d(M75Q/K74S/D45E/F123Y) <sup>b</sup>	24535
N7A-CL31d <sup>c</sup>	55600
CL31d-N7A <sup>d</sup>	55600
N7A.19-CL31d <sup>c</sup>	57090
scFv T84.66	48610
T84.66-CL31	66155
T84.66-CL31d <sup>f</sup>	66155

<sup>a</sup> Wenn nicht explizit angegeben, ist  $\epsilon_{280}$  für alle daraus hervorgegangenen Varianten identisch. <sup>b</sup>  $\epsilon_{280}$  identisch für CL31d(M75Q/K74S/F123Y).  
<sup>c, d, e, f</sup>  $\epsilon_{280}$  ist für PASylierte Fusionsproteine identisch.

Zur Konzentrationbestimmung von eGFP sowie der eGFP-Fusionsproteine wurde dagegen das für eGFP charakteristische Absorptionsmaximum bei 488 nm sowie der molare Extinktionskoeffizient von 55.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Heim *et al.*, 1995) berücksichtigt.

### 2.3.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wurde sowohl zum Nachweis der Bindungsaktivität von gereinigten Anticalinen und Anticalin-Fusionsproteinen als auch zur Quantifizierung von Proteinen in Plasmaproben verwendet. Dabei kamen zwei verschiedene Formate zum Einsatz – ein indirekter und ein *Sandwich*-ELISA – die beide ein Me-DTPA-Doppelkonjugat bestehend aus dem Trägerprotein RNase (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) gekoppelt mit Y-DTPA und dem Steroid Digoxigenin (DIG) verwendeten (Kim *et al.*, 2009).

Zur Herstellung dieses Konjugats wurde 183 nmol RNase in 1 mL Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 (> 99,9 %) gelöst und nach Zugabe von 915 nmol (5-fach molarer Überschuss) *p*-SCN-Bn-CHX<sup>2</sup>-A-DTPA (SCN-DTPA; Macrocyclics, Dallas, TX) in 10  $\mu$ L DMF über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Anschließend wurde 366 nmol DIG-NHS gelöst in 20  $\mu$ L DMF zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Durch Gelfiltration an einer PD-10 Säule wurde das Konjugat in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5 (> 99,9 %) umgepuffert, wobei gleichzeitig überschüssige Reagenzien abgetrennt wurden. Die Beladung des Chelators mit einem Metall erfolgte durch Zugabe einer äquimolaren Lösung von YCl<sub>3</sub> oder LuCl<sub>3</sub>, ebenfalls gelöst in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5, und 10-minütiger Inkubation bei RT. Bis zur Verwendung wurde das beladene Doppelkonjugat bei -80 °C aufbewahrt. Im ELISA wurde Y-DTPA-RNase-DIG schließlich durch ein DIG-spezifisches Fab-AP-Konjugat nachgewiesen, dessen enzymatische Aktivität (siehe unten) zur Quantifizierung der Bindungsakti-



vität zwischen den Anticalinen bzw. Anticalin-Fusionsproteinen und dem Metallchelate-Liganden verwendet wurde.

#### Nachweis der Bindungsaktivität von Anticalinen und deren Fusionsproteinen im indirekten ELISA

Für die Bestimmung der Affinität für den Me-DTPA-Komplex wurden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (MaxiSorp; 96-Vertiefungen) mit jeweils 50 µL einer 2,5 µg/mL Lösung des *Strep*-tag II-bindenden Antikörpers *Strep*MAB-Immo beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden verbliebene Bindungsstellen in den Vertiefungen mit 200 µL einer 3 % (w/v) BSA-Lösung in PBS/0,1T abgesättigt, und nach 1 h bei RT wurde 5-mal mit je 300 µL PBS/0,1T im ELISA-Plattenwascher gespült. Je Vertiefung wurde dann 50 µL des gereinigten Anticalins bzw. Anticalin-Fusionsproteins in einer Konzentration von 100 nM in PBS/0,1T appliziert, für 1 h bei RT inkubiert und die Platte wie oben gewaschen. Eine Verdünnungsreihe von Y-DTPA-RNase-DIG wurde hergestellt, indem je Vertiefung 50 µL PBS/0,1T vorgelegt und dazu 50 µL Y-DTPA-RNase-DIG pipettiert wurden. Nach sorgfältigem Mischen wurden davon wieder 50 µL entnommen und in die darauffolgende Vertiefung überführt, so dass auf diese Weise iterativ weitere 1:1 Verdünnungsstufen entstanden. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde die Platte gewaschen und zum Nachweis gebundener Ligand-Konjugate in jede Vertiefung 50 µL des DIG-bindenden Fab-AP-Konjugats (1:1000 in PBS/0,1T) pipettiert. Nach 1 h bei RT wurde die Platte erst wie oben mit PBS/0,1T und dann mit PBS gewaschen, bevor 100 µL einer 0,5 mg/mL *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP)-Lösung in AP-Puffer zugegeben wurde. Nach 3-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die enzymatische Hydrolyse des farblosen pNPP zum gelben *p*-Nitrophenolat bei einer Wellenlänge von 405 nm in dem ELISA-Photometer SpectraMax 250 (Molecular Devices, Biberach a.d. Riss) für 15 min bei 37 °C verfolgt, wobei vor jeder minutlichen Messung die Platte für 3 s linear geschüttelt wurde.

#### Nachweis der bispezifischen Bindungsaktivität von Duocalinen im Sandwich-ELISA

Die Fähigkeit von Duocalinen zur simultanen Bindung zweier unterschiedlicher Liganden wurde in einem *Sandwich*-ELISA nachgewiesen. Dazu wurde in jede Vertiefung einer MaxiSorp-Platte mit 96-Vertiefungen 50 µL des gereinigten Fibronectin-Fragments Fn7B8-His<sub>6</sub> – nachfolgend als Fn7B8 bezeichnet (Gebauer *et al.*, 2013) – in einer Konzentration von 50 µg/mL in TBS gegeben und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Blockieren jeder Vertiefung mit 200 µL 3 % (w/v) BSA in TBS/0,1T wurde die Platte wie oben mit TBS/0,1T gewaschen, bevor analog zum indirekten ELISA 50 µL einer Verdünnungsreihe des Duocalins für 1 h bei RT appliziert wurde. Durch Waschen mit TBS/0,1T wurden ungebundene Proteine entfernt, und daraufhin wurde in jede Vertiefung 50 µL der 100 nM Y-DTPA-RNase-DIG-Lösung in TBS/0,1T pipettiert, die für 1 h bei RT inkubiert wurde. Der Nachweis des gebundenen Metallchelate-Konjugats erfolgte anschließend analog zum indirekten ELISA.

### Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante $K_D$ mittels ELISA

Für die beobachtete Protein-Ligand-Komplexbildung wurde eine einfache monovalente Gleichgewichtsreaktion angenommen. Die gemessene Anfangsgeschwindigkeit der Farbreaktion ( $\Delta A/\Delta t$ ) aus dem indirekten ELISA wurde gegen die jeweilige Ligandenkonzentration der Verdünnungsstufe  $[L]_{tot}$  aufgetragen und unter Verwendung des Programms *KaleidaGraph* (Synergy Software Inc. Reading, PA) die Dissoziationskonstante  $K_D$  nach der Gleichung

$$[P \cdot L] = [P]_{tot} \frac{[L]_{tot}}{K_D + [L]_{tot}}$$

durch nicht-lineare Regression bestimmt (Voss & Skerra, 1997). Dabei entspricht die Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes  $[P \cdot L]$  indirekt der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase, während die konstante Gesamtkonzentration des immobilisierten Proteins  $[P]_{tot}$  – dem asymptotischen Maximalwert  $\Delta A/\Delta t$  entsprechend – durch Kurvenanpassung ermittelt wurde.

### Bestimmung der Plasma-Konzentration von therapeutischen Proteinen durch quantitativen *Sandwich*-ELISA

Zur Untersuchung der pharmakokinetischen Parameter von unmodifizierten und PASylierten Anticalin-Fusionsproteinen war die Bestimmung der entsprechenden Proteinkonzentrationen in Plasmaproben der Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Proteininjektion erforderlich (siehe Abschnitt 2.7.1). Dazu wurde ebenfalls das oben beschriebene *Sandwich*-ELISA Format verwendet, um selektiv das intakte funktionelle Fusionsproteine nachzuweisen.

Im Fall der Duocalin-Varianten wurde in jede Vertiefung einer MaxiSorp-Platte mit 96-Vertiefungen 50  $\mu$ L Fn7B8 mit einer Konzentration von 50  $\mu$ g/mL in TBS-E gegeben und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Blockieren mit 200  $\mu$ L 3 % (w/v) BSA in TBS-E/0,1T wurden die Vertiefungen wie oben mit TBS-5/0,1T gewaschen, und anschließend in 50  $\mu$ L eine Verdünnungsreihe der bereits im Verhältnis 1:200 in TBS/0,1T verdünnten Plasmaproben (siehe Abschnitt 2.7.1) für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem Waschschriff mit TBS/0,1T wurde 50  $\mu$ L einer 100 nM Y-DTPA-RNase-DIG-Lösung in TBS/0,1T in die Vertiefungen gegeben. Der Inkubation für 1 h bei RT folgte ein weiterer Waschschriff sowie der Nachweis des gebundenen Metallchelate-Komplexes mit Hilfe von 50  $\mu$ L des DIG-bindenden Fab-AP-Konjugats (1:1000 in TBS/0,1T), das ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert wurde. Die Farbreaktion erfolgte wie bereits beim indirekten ELISA beschrieben.

Zur Untersuchung der scFv/Anticalin-Fusionsproteine wurde 50  $\mu$ L einer 2,5  $\mu$ g/mL Lösung des rekombinanten CEA (Sino Biological, Beijing, China) in TBS auf einer MaxiSorp-Platte immobilisiert. Die Vertiefungen wurden mit 200  $\mu$ L 3 % (w/v) BSA in TBS/0,1T blockiert und mit TBS/0,1T wie oben gewaschen, bevor 50  $\mu$ L eine Verdünnungsreihe der bereits im Verhältnis 1:200 in TBS/0,1T verdünnten Plasmaproben (siehe Abschnitt 2.7.1) für 1 h bei RT appliziert wurden. Der weitere Nachweis der scFv/Anticalin-Fusionsproteine erfolgte danach analog zu den Duocalin-Varianten.

In beiden Fällen wurde je MaxiSorp-Platte ebenfalls eine Verdünnungsreihe des jeweiligen gereinigten Fusionsproteins – versetzt mit 0,5 % (v/v) Plasma von unbehandelten Mäusen – angesetzt, um mit Hilfe der daraus resultierenden Standardkurve auf die Proteinkonzentration in den Plasmaproben schließen zu können. Dazu wurde mit Hilfe der Kurvenanpassung obiger Gleichung an die Datenpunkte des jeweiligen Standardproteins der  $K_D$ -Wert sowie  $[P]_{tot}$  ermittelt, um nach Umformung derselben Gleichung zu

$$[L]_{tot} = \frac{[P \cdot L] \cdot K_D}{[P]_{tot} - [P \cdot L]}$$

die Konzentration des in der jeweiligen Plasmaprobe enthaltenen Anticalin-Fusionsproteins  $[L]_{tot}$  zu errechnen.

## 2.4 Biophysikalische Methoden

Alle biophysikalischen Arbeiten wurden entsprechend der im Labor von Prof. Skerra entwickelten Standardmethoden durchgeführt. Daher wurden Dissertationen früherer Doktoranden (Dr. D. Breustedt, Dr. M. Gebauer, Dr. A. D. Holla, Dr. J. P. Mayer, Dr. M. Schlapschy, Dr. S. Schlehuber) als Vorlage verwendet, zum Teil übernommen, aber im Detail an die Gegebenheiten dieser Arbeit angepasst.

### 2.4.1 Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR)-Spektroskopie

Die *Surface Plasmon Resonance* (SPR)-Spektroskopie erlaubt die quantitative Analyse einer bimolekularen Reaktion zwischen einem kovalent immobilisierten (Ligand) und einem in Lösung befindlichen vorbeiströmenden Bindungspartner (Analyt) in Echtzeit, wobei zudem Informationen über die kinetischen Konstanten der Assoziation und Dissoziation erhalten werden (Liedberg *et al.*, 1995). Die Immobilisierung des Liganden erfolgt auf einem Sensorchip, der aus einer Glasoberfläche mit dünnem Goldfilm und aufgelagerter Hydrogel-Matrix – oftmals carboxymethyliertes Dextran – besteht. Eine Lösung des Analyten wird anschließend in einem kontinuierlichen Flusssystem über die derivatisierte Chipoberfläche geleitet, wobei Änderungen in den Bedingungen für die Oberflächenplasmonresonanz, unter Bestrahlung der Goldoberfläche mit monochromatischem linear-polarisiertem Licht, in Folge der Komplexbildung zwischen Ligand und Analyt und damit lokaler Änderung des Brechungsindex detektiert werden, was in Resonanz-Einheiten (*Resonance Units*, RU) ausgedrückt wird (Malmqvist, 1999; Szabo *et al.*, 1995).

Die Bindungseigenschaften von Anticalinen und Anticalin-Fusionsproteinen wurden für den Me-DTPA-Komplex (als RNase-Konjugat; siehe Abschnitt 2.3.9) sowie für Fn7B8 (siehe unten) in einem BIAcore 2000 System bei 25 °C untersucht. Zunächst wurde ein Sensorchip (siehe Abschnitt 2.1.8) mit filtriertem (0,2 µm) und entgastem Laufpuffer bis zum Erreichen eines konstanten Resonanzsignals auf allen vier Messkanälen äquilibriert. Im Fall von Me-DTPA-RNase erfolgte zunächst

die Aktivierung der Carboxymethyl-Dextranoberfläche eines BIAcore CM5 Sensorchips im Messkanal 2 bzw. 4 durch Derivatisierung mit 35  $\mu\text{L}$  einer 1:1 Mischung von 75 mg/mL EDC und 11,5 mg/mL NHS (*Amine Coupling Kit*; BIAcore, Uppsala) bei einer Flussrate von 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  PBS/0,05T. Hierbei wurden N-Hydroxysuccinimid-Ester auf der Sensorchip-Oberfläche generiert, die direkt im Anschluss zur kovalenten Immobilisierung von ca. 150-300 RU Me-DTPA-RNase über Lys-Seitenketten dienten. Dazu wurde 10-50  $\mu\text{L}$  einer 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Me-DTPA-RNase-Lösung in 10 mM Natriumacetat pH 5 injiziert.

Für die effiziente kovalente Beladung – durch Ausbildung von Amidgruppen zwischen freien Amino-  
gruppen (hauptsächlich Lys-Seitenketten) des Liganden und den Carboxygruppen der Sensorchip-  
Oberfläche – ist die vorherige lokale Anreicherung des Liganden durch ionische Wechselwirkung mit  
der negativ geladenen Chip-Oberfläche essentiell (*Pre-concentration Effect*). Deshalb wurde das  
Me-DTPA-RNase-Konjugat in einem Puffer verdünnt, bei dessen pH-Wert die RNase ( $pI = 9,6$ ) posi-  
tiv geladen vorlag. Zur Absättigung verbliebener NHS-Estergruppen wurde schließlich 35  $\mu\text{L}$  1 M  
Ethanolamin (*Amine Coupling Kit*; BIAcore, Uppsala) appliziert. Als Referenzoberfläche wurde der  
Messkanal 1 bzw. 3 durch Injektion von 35  $\mu\text{L}$  EDC/NHS aktiviert und, ohne Immobilisierung eines  
Liganden, durch Injektion von 35  $\mu\text{L}$  1 M Ethanolamin blockiert. Bei der späteren Messung diente  
dieser Referenzkanal zur Korrektur des Messsignals, um Signaländerungen, die allein aus Puffer-  
wechseln im Verlauf der Injektion bzw. Waschschriffe oder unspezifischen Wechselwirkungen resul-  
tierten, zu eliminieren. Beide Kanäle wurden anschließend mit Laufpuffer über Nacht bis zum Errei-  
chen einer konstanten Basislinie äquilibriert.

Für die Interaktionsanalyse wurden je 95  $\mu\text{L}$  aus einer Konzentrationsreihe von gereinigtem  
Me-DTPA-spezifischem Anticalin bzw. Anticalin-Fusionsprotein, verdünnt in Laufpuffer, bei einer  
Flussrate von 25  $\mu\text{L}/\text{min}$  in die in Reihe geschalteten Kanäle injiziert, und daraufhin wurde die Disso-  
ziation für 900-1200 s unter Spülen mit Laufpuffer beobachtet. In der Regel wurden mindestens fünf  
Verdünnungsstufen in aufsteigender Reihenfolge analysiert. Die Regenerierung der Matrix wurde  
durch drei kurze Pulse (5  $\mu\text{L}$ ) 6 M Guanidinium-Chlorid und gründliches Waschen des Kanalsystems  
erreicht.

Zur Untersuchung der Anticalin-Fusionsproteine auf ihr Bindungsverhalten gegenüber Fn7B8 wurde  
ein XanTec CMD200M oder CMD200L Chip mit ca. 150-300 RU Fn7B8 in 10 mM Natriumacetat pH  
4 (mit HBS-E/0,05T als Laufpuffer) beladen, indem 5-10  $\mu\text{L}$  der 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Proteinlösung nach Akti-  
vierung der Sensorchip-Oberfläche über den Messkanal geleitet und anschließend durch Injektion von  
1 M Ethanolamin blockiert wurde. Der Referenzkanal wurde wie oben durch Aktivierung und sofor-  
tige Blockierung vorbereitet, und nach Erreichen einer stabilen Basislinie in beiden Kanälen wurde  
35  $\mu\text{L}$  einer in Laufpuffer verdünnten Konzentrationsreihe des zu untersuchenden Bindeproteins bei  
einer Flussrate von 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  injiziert. Die Dissoziation wurde für 450 s (N7A) bzw. 900 s (N7A.19)  
verfolgt. Die Regenerierung der Matrix erfolgte bei N7A-Fusionsproteinen durch intensives Spülen

mit Laufpuffer, wohingegen Fusionsproteine von N7A.19 vor einer neuen Messung durch einmalige Injektion von 5  $\mu\text{L}$  10 mM Glycin/HCl pH 2,0 von der Chip-Oberfläche verdrängt wurden.

Zur Bestimmung der Bindungskonstante wurde die Sensorgramme zunächst mit Hilfe des Programms *BIAevaluation* v4.1 (GE Healthcare, Freiburg) durch Subtraktion des Signals für den Referenzkanal und eines gemittelten Sensorgramms von vier Pufferinjektionen, welche vor und nach der Konzentrationsreihe gemessen wurden, korrigiert (*Double Referencing*; Myszka, 1999). Nach Überlagerung der resultierenden Sensorgramme für die Konzentrationsreihe wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ( $k_{\text{on}}$ ) und Dissoziation ( $k_{\text{off}}$ ) durch Anpassung an das 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir ermittelt (Karlsson *et al.*, 1991). Zeigten die Analyten, wie im Fall der Me-DTPA-spezifischen Bindeproteine, eine sehr niedrige Dissoziationsrate ( $< 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ), wurde alternativ eine einzelne Messung bei der höchsten Konzentration mit einer 3600 s währenden Dissoziation ( $k_{\text{off}}^{\infty}$ ) bestimmt (Katsamba *et al.*, 2006). Die Dissoziationskonstante  $K_D$  ergab sich aus dem Quotienten  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  bzw.  $k_{\text{off}}^{\infty}/k_{\text{on}}$ .

#### 2.4.2 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde verwendet, um die thermische Stabilität der Me-DTPA-bindenden Anticaline sowie deren Entfaltungsübergang zu analysieren. Dazu wurden die während eines Temperaturwechsels auftretenden Konformationsänderungen in den Sekundärstrukturelementen der Proteine im Wellenlängenbereich zwischen 190 und 250 nm verfolgt. Dies ist möglich, da sich die Absorptionseigenschaften der Peptidbindung in Bezug auf das rechts- und linkshändig zirkular-polarisierte Licht in Folge der Entfaltung differenziell ändern (Elliptizität).

Zunächst wurde diejenige Wellenlänge bestimmt, bei der die maximale CD-Signaldifferenz zwischen dem nativen und dem vollständig entfalteten Protein zu beobachten war. Dazu wurden in einem Jasco Spektropolarimeter J-810 mit Peltier-Element PT-423S CD-Spektren von einer gereinigten in CD-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.9) befindlichen 10  $\mu\text{M}$ -Proteinlösung ( $V = 350 \mu\text{L}$ ) zwischen 190-250 nm bei jeweils 20 °C und 95 °C aufgenommen. Folgende Messparameter wurden dazu eingestellt: *Response*: 4 s, *Band Width*: 1 nm, *Data Pitch*: 0,1 nm, *Scan Speed*: 100 nm/min, Akkumulation von 10 Einzelspektren. Die CD-Spektren wurden in dem Steuerungs- und Analyseprogramm *Spectra Manager* v1.53.05 (Jasco, Groß-Umstadt) – jeweils um das Pufferspektrum korrigiert – voneinander subtrahiert, wodurch sich ein Differenzmaximum bei 210 nm ergab. Bei dieser Wellenlänge wurde mit einer frischen Proteinlösung die Schmelztemperatur  $T_m$  bestimmt, in dem die Temperatur von 20 °C bis 95 °C mit einem Gradienten von 60 K/h erhöht und die Rohdaten gemäß dem Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung (Schlehuber & Skerra, 2002) ausgewertet wurden. Dabei wurden lineare Signaländerungen im prä- und postransitionellen Bereich entsprechend mit dem Programm *KaleidaGraph* v4.02 (Synergy Software Inc. Reading, PA) korrigiert. Um die Denaturierungsübergänge der Me-DTPA-bindenden Anticaline miteinander vergleichen zu können, wurden die einzelnen Entfaltungskurven anschließend auf den Anteil an ungefaltetem Protein  $f(u)$  umgerechnet.

### 2.4.3 Fluoreszenztitration

Die Ligandenbindungsaktivität von Me-DTPA-spezifischen Anticalinen in Lösung wurde durch Fluoreszenztitration ermittelt. Hierfür wurde die Abnahme der intrinsischen Tyr/Trp-Fluoreszenz des Proteins bei Komplexbildung mit dem Liganden (*Quenching*) gemessen. Die Ligandenpräparation erfolgte, indem 300 nmol *p*-NH<sub>2</sub>-Bn-CHX-A"-DTPA (DTPA-NH<sub>2</sub>; Macrocyclics, Dallas, TX) in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5 (> 99,9 %) gelöst und nach Zugabe von 300 nmol YCl<sub>3</sub> für 10 min bei RT inkubiert wurde. Zur Messung wurde 2 mL einer 1 µM Proteinlösung in PBS in eine Quarz-Küvette (Schichtdicke:  $d = 1$  cm) überführt und im Probenraum eines FluoroMax-3 Spektrofluorimeters (HORIBA Jobin Yvon, Unterhaching) unter Rühren auf 25 °C temperiert. Dann wurde die Tyr/Trp-Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 280 nm (Spaltbreite: 6 nm) angeregt und bei 333 nm (Spaltbreite: 2 nm) – entsprechend dem Emissionsmaximum – detektiert, wobei für das Fluoreszenzsignal eine Integrationszeit von 1 s gewählt wurde. Die Zugabe einer 100 µM Y·DTPA-NH<sub>2</sub>-Lösung in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5 erfolgte in Schritten von 0,5-2 µL bis maximal 40 µL (entsprechend 2 % Gesamtvolumen), woraufhin jeweils nach 3-minütiger Inkubation – im Gleichgewichtszustand der Komplexbildung – die Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde bestimmt, indem die Fluoreszenzsignale normiert auf einen Anfangswert von 100 % gegen die entsprechende Ligandenkonzentration aufgetragen und durch nicht-lineare Regression basierend auf dem Massenwirkungsgesetz für eine bimolekulare Komplexbildung mit Hilfe des Programms *KaleidaGraph* v4.02 (Synergy Software Inc. Reading, PA) angepasst wurden (Breustedt *et al.*, 2006).

Darüber hinaus wurde die Fluoreszenztitration verwendet, um im Anschluss an die Herstellung des DTPA-RNase-Konjugats nachzuweisen, dass nach Zugabe eines Metallions eine 1:1:1 Stöchiometrie vorlag (siehe Abschnitt 2.3.9). Dazu wurde 2 mL des mittels Gelfiltration an einer PD-10 Säule gereinigten DTPA-RNase-Konjugats in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5 mit einer Konzentration von 10 µM in einer Quarz-Küvette (Schichtdicke:  $d = 1$  cm) vorgelegt und im FluoroMax-3 Spektrofluorimeter unter Rühren auf 25 °C temperiert. Die Fluoreszenz wurde bei 295 nm (Spaltbreite: 4 nm) angeregt und bei 545 nm (Spaltbreite: 4 nm) mit einer Integrationszeit von 2 s aufgezeichnet. Eine 1 mM bzw. 10 mM TbCl<sub>3</sub>-Lösung in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure pH 5 wurde in Schritten von 2-4 µL bis maximal 40 µL (entsprechend 2 % Gesamtvolumen) zugegeben, 2 min inkubiert und anschließend die Fluoreszenz wie oben aufgezeichnet. Infolge der nicht kovalenten Bindung des Lanthanids Terbium an den Chelator DTPA erfolgte eine konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals unter anderem bei 545 nm (Hauptpeak). Hierbei fungiert DTPA als die Lichtenergie absorbierende Antenne, woraufhin ein Energietransfer zum Terbium stattfindet, welches wiederum Licht bei dieser für das Element charakteristischen Wellenlängen emittiert (Hermanson, 2008). Die graphische Auftragung des Fluoreszenzsignals gegen die jeweilige TbCl<sub>3</sub>-Konzentration ergab einen Äquivalenzpunkt bei 10 µM TbCl<sub>3</sub> entsprechend der im Experiment eingesetzten Chelator-Konzentration.

#### 2.4.4 Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Zur Analyse der Molekülmassen wurden die gereinigten Proteine mit einer Konzentration von 5-10  $\mu\text{M}$  dreimal gegen das 10.000-fache Volumen 10 mM Ammoniumacetat pH 6,7 (in der Regel ca. 50-100  $\mu\text{L}$  Probe gegen 500 mL Puffer) dialysiert und anschließend filtriert (0,45  $\mu\text{m}$ ). Kurz vor der Messung wurde die Probe mit 20 % (v/v) Acetonitril (*LC-MS grade*) und 0,1 % Ameisensäure (*LC-MS grade*) versetzt und mit Ammoniumacetat-Puffer zu einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Die Massenanalyse erfolgte im positiven Ionisierungsmodus in einem Bruker Daltonics maXis Q-TOF (*Quadrupol-Time of Flight*) Massenspektrometer ausgestattet mit einer ESI (*Electrospray Ionization*)-Quelle unter folgenden Bedingungen: *Capillary Voltage*: 4,5 kV, *End Plate Offset*: -500 V, *Nebulizer Pressure*: 0,4 bar, *Dry Gas Flow*: 4,0 L/min, *Dry Temperature*: 180 °C, *Flow Rate*: 180  $\mu\text{L/h}$ . Die Dekonvolution der Rohdaten erfolgte mit Hilfe des geräteeigenen Programms *Compass Data Analysis* v4.0 (Bruker Daltonics, Bremen).

### 2.5 Radiochemische Methoden

#### 2.5.1 Markierung von DTPA mit radioaktivem $^{177}\text{Lu}$

Zur Markierung von DTPA-NH<sub>2</sub> bzw. dessen divalentem Molekülformat (DTPA)<sub>2</sub> (synthetisiert von Dr. M. Dauner am Lehrstuhl von Prof. Skerra; siehe Abschnitt 3.3.8.2) wurde in einem 50  $\mu\text{L}$  Reaktionsansatz der jeweilige Chelator (gelöst in bidest. H<sub>2</sub>O) und  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  (in 0,05 M HCl, pH 1,3; Spezifische Aktivität: 131 MBq/nmol) im äquimolaren Verhältnis eingesetzt und nach Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  3 M Natriumacetat (gelöst in bidest. H<sub>2</sub>O) und 5  $\mu\text{L}$  1 M Gentisinsäure (gelöst in 3 M Natriumacetat) für 10 min bei RT inkubiert. Gentisinsäure fungiert hier als Schutz der Chelatoren vor freien Radikalen, die beim radioaktiven Zerfall frei werden.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz bzw. zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurde 0,5-1  $\mu\text{L}$  des Ansatzes auf eine mit Kieselsäure beschichtete Dünnschichtchromatographieplatte (iTLC-SG; Agilent Technologies, Waldbronn) aufgetragen und mit 1 M Ammoniumacetat und Methanol im Verhältnis 2:1 als Laufmittel chromatographisch aufgetrennt. Die Lokalisierung und Quantifizierung der Radioaktivität auf der Dünnschichtplatte erfolgte in einem Mini-Scan Radioaktivitätsdetektor (Bioscan Inc, Washington, DC), der aus einem beweglichen Schlitten und einem Kollimator (Natriumiodid-Kristalldetektor) besteht. Während die Dünnschichtplatte mit konstanter Geschwindigkeit am Detektor vorbeigeschoben wird, zeichnet das computergesteuerte *PEARL Interface* (LabLogic, Sheffield) die detektierte Radioaktivität (*Counts*) gegen die Laufstrecke auf. Die Evaluierung der Kurvenflächen sowie der Retentionsfaktoren erfolgte mit Hilfe des Programms *LauraLite* (LabLogic, Sheffield). Der  $^{177}\text{Lu}$ -Chelat-Komplex wanderte unter den angegebenen Bedingungen mit der Laufmittelfront, während freies überschüssiges  $^{177}\text{Lu}^{3+}$  am Startpunkt zurückblieb. Typischerweise wurde sowohl für DTPA-NH<sub>2</sub> als auch (DTPA)<sub>2</sub> eine radiochemische Reinheit von > 99 % erzielt.

## 2.5.2 Kalte und radioaktive Iodierung von Proteinen

### Herstellung von Iodogen beschichteten Reaktionsgefäßen

Die Iodierung von Proteinen wird üblicherweise in Anwesenheit eines Oxidationsmittels durchgeführt, welches zunächst mit Iodidionen (I<sup>-</sup>) zu dem hoch reaktiven Interhalogen ICl<sub>2</sub> reagieren kann. Letzteres bewirkt dann in einer elektrophilen Substitutionsreaktion die Einführung von Iodatomen am Phenylring von Tyrosin oder dem Imidazolring von Histidin. Iodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycouril) hat sich zu diesem Zweck bewährt (Fraker & Speck, 1978). Auf die Innenwand eines Eppendorf-Reaktionsgefäßes als Niederschlag aufgebracht, fungiert es als eine Art Festphasen-Iodierungsreagens.

Zur praktischen Umsetzung wurde 1 mg Iodogen in 1 mL Dichlormethan gelöst und davon jeweils 150  $\mu$ L zügig in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter Argonatmosphäre vollständig abgedampft. Die Reaktionsgefäße wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### Kalte Iodierung von Proteinen mit NaI

Zunächst wurde eine Mischung aus 80  $\mu$ L 62,5  $\mu$ M NaI (gelöst in 1 mM NaOH) und 20  $\mu$ L 1 mM NaOH hergestellt. Dann wurden in einem Iodogen-Reaktionsgefäß 5 nmol Proteinlösung in PBS sowie obige Iodmischung vereinigt (max. Gesamtvolumen: 250  $\mu$ L), so dass die Iodierung bei pH 7-8 für 15 min bei RT erfolgen konnte. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 10  $\mu$ L 25 mg/mL Ascorbinsäure/NaOH pH 5 zugegeben, der Ansatz in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Spin-Filtration (0,45  $\mu$ m) einer analytischen SEC (siehe Abschnitt 2.3.4) unterzogen.

### Iodierung von Proteinen mit <sup>124</sup>I und <sup>125</sup>I

Je Markierungsansatz wurde eine Iodmischung ähnlich wie oben hergestellt, welche ca. 1-1,2 mCi radioaktives Iod (Na<sup>124</sup>I, IBA Molecular, VU Amsterdam; Spezifische Aktivität: ~1.1 MBq/pmol bzw. Na<sup>125</sup>I, Hartman Analytic, Braunschweig; Spezifische Aktivität: 74 MBq/nmol) enthielt und mit 1 mM NaOH auf ein Volumen von 100  $\mu$ L gebracht wurde. In einem Iodogen-Reaktionsgefäß wurde dieses mit 0,5 nmol der Proteinlösung in PBS in einem Gesamtvolumen von 220-250  $\mu$ L gemischt (pH 7-8), für 15 min bei RT inkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 10  $\mu$ L 25 mg/mL Ascorbinsäure/NaOH pH 5 gestoppt. Der Markierungsansatz wurde sofort auf eine mit HTT-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.9) äquilibrierte PD-10 Säule gegeben und das iodierter Protein durch portionsweise Pufferzugabe eluiert.

Zur Bestimmung der Iodierungseffizienz bzw. der radiochemischen Reinheit wurde 0,5  $\mu$ L einer radioaktiven Elutionsfraktion dünn-schichtchromatographisch untersucht. Dazu wurde die mit Kieselsäure beschichtete iTLC-SG Platte nach dem Probenauftrag in 0,9 % (w/v) NaCl als Laufmittel gestellt und nach Beendigung der Chromatographie die Radioaktivität am Start sowie an der Laufmittelfront im Wallac 1480 Wizard 3"  $\gamma$ -Zähler (Perkin Elmer LAS, Rodgau) quantifiziert. Das iodierter Protein wanderte unter diesen Bedingungen nicht und verblieb am Startpunkt, wohingegen freies Iodid an der



Laufmittelfront detektiert wurde. Die radiochemische Reinheit der iodierten Proteine nach der Gel-filtration lag üblicherweise bei > 96 %.

## 2.6 Zellbiologische Methoden

### 2.6.1 Kultivieren und Konservieren humaner Zelllinien

Zum Auftauen wurden die kryo-konservierten Zellen zunächst bei 37 °C im Wasserbad erwärmt, zügig in 10 mL warmes Vollmedium (Kulturmedium inkl. Zusätze) überführt und anschließend schonend in einem 15 mL Falcon-Röhrchen sedimentiert (Eppendorf 5430R, 300 g, 3 min, RT). Nach sofortigem Abziehen des Überstandes wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen und je nach Dichte und Vitalität in T25- oder T75-Zellkulturflaschen (Biochrom AG, Berlin) ausgesät.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem auf 37 °C temperierten Begasungsbrutschrank (siehe Abschnitt 2.1.7) unter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (5 Vol.-%) und erhöhter Luftfeuchte (rel. 95 %). Die humanen Tumorzelllinien HT-29 und LS-174T (siehe Abschnitt 2.1.1) wurden in DMEM („with high Glucose (4,5 g/L) and L-Glutamine“) kultiviert, das mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde. Die humanen Caco-2 Zellen (siehe Abschnitt 2.1.1) wurden dagegen in MEM („with Earle’s Salt and L-Glutamine“) mit 10 % (v/v) FCS und 1x nicht-essentiellen Aminosäuren kultiviert.

Beim Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % in der Zellkulturflasche (kontrolliert unter einem Axiovert 40 CFL Mikroskop; Carl Zeiss Microscopy, Jena) wurden die adhärennten Zellen mit warmem (37 °C) PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>; PBSwo; PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen sowie gleichmäßig mit einer warmen (37 °C) 1x Trypsin/EDTA-Lösung (PAA Laboratories, Cölbe) überschichtet, die nach 1 min wieder abgezogen wurde. Je nach Zelllinie konnten die Zellen nach ca. 5-15 minütiger Inkubation im Brutschrank durch leichtes Klopfen an den Flaschenrand vom Boden der Kulturflasche gelöst, in frischem warmen Vollmedium aufgenommen und im gewünschten Verhältnis zur weiteren Kultivierung auf neue Kulturflaschen aufgeteilt werden. Nach maximal 30 Passagen wurden die Zellen verworfen. Eine definierte Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) oder eines CASY<sup>®</sup>-Zellzählers (Schärfe System, Reutlingen) eingestellt.

Zur Konservierung wurden die Zellen bei Erreichen von 90 % Konfluenz in einer T75-Zellkulturflasche wie oben beschrieben abgelöst, anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (Eppendorf 5430R, 300 g, 5 min, RT) und in 5 mL Kryo-Konservierungsmedium (10 % steriles DMSO in Vollmedium) resuspendiert. Die Zellen wurden zügig in sterile Kryo-Konservierungsröhrchen (Biochrom AG, Berlin) aliquotiert (je ca. 750 µL) und dann stufenweise in dem Kryo-Behälter Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, Ulm) für 2-4 h bei -20 °C, und dann für ca. 24-36 h bei -80 °C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

### 2.6.2 Nachweis von Mycoplasmen

Alle verwendeten Zelllinien wurden auf Kontamination durch Mycoplasmen untersucht. Hierfür wurde ein *nested* PCR-Protokoll (TaKaRa BIO, Shiga) verwendet, welches den gleichzeitigen Nachweis verschiedener Mycoplasmenstämme ermöglicht (Uemori *et al.*, 1992).

Die Zellen wurden nach dem Auftauen oder direkt nach externer Übernahme mindestens drei Tage bis zu 90 % Konfluenz kultiviert. Dann wurde 100 µL des Medienüberstandes aus der Zellkulturflasche entnommen, für 5 min auf 95 °C im Thermoblock erhitzt und anschließend zentrifugiert (Eppendorf 5415R, 13.200 rpm, 1 min). Davon wurde 10 µL mit 24,5 µL bidest. H<sub>2</sub>O, 5 µL 10x *Taq*-Puffer (mit MgCl<sub>2</sub>), 8 µL dNTP-Mix (je 1,25 mM) und 2 µL Oligodesoxynukleotid-Mix 1 (bestehend aus den Primern Myco-F1 und -F1t, Myco-R1, -R1tt, -R1cat und -R1ac, je 20 µM; siehe Abschnitt 2.1.3) in einem PCR-Reaktionsgefäß gemischt und nach Zugabe von 0,5 µL *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µL) die erste Amplifizierung gestartet: 1. initiale Denaturierung bei 94 °C für 4 min, 2. Denaturierung bei 94 °C für 30 s, 3. Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide bei 55 °C für 2 min, und 4. DNA-Synthese bei 72 °C für 1 min, wobei die Schritte 2.-4. 35-mal durchlaufen wurden. Nach einem abschließenden DNA-Elongationsschritt bei 72 °C für 7 min wurde 1 µL aus diesem PCR-Ansatz für eine zweite PCR verwendet, in der nun 2 µL des Oligodesoxynukleotid-Mixes 2 (bestehend aus den Primern Myco-F2, -F2a, -F2cc, -R2, -R2ca, und -R2at, je 20 µM; siehe Abschnitt 2.1.3) eingesetzt und mit 33,5 µL bidest. H<sub>2</sub>O auf 50 µL Gesamtvolumen aufgefüllt wurde. Die Amplifizierung erfolgte unter obigen Bedingungen im Thermozykler Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg). Zur Funktionskontrolle des Mycoplasmentests wurde der Medienüberstand entweder durch bidest. H<sub>2</sub>O oder eine mycoplasmenpositive Probe ersetzt. Je 10 µL der PCR-Ansätze 1 und 2 sowie der mitgeführten Kontrollen wurden mit 5x DNA-Auftragspuffer gemischt und mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.4) analysiert. Bei einem positiven Testergebnis (DNA-Banden im Gel; siehe Tabelle 4) wurden die Zellen durch Autoklavieren vernichtet.

**Tabelle 4. Charakteristische Amplikons häufiger Mycoplasmen-Stämme nach der ersten bzw. zweiten PCR.**

Mycoplasmen-Stamm	1. PCR [bp]	2. PCR [bp]
<i>M. hyopneumoniae</i>	681	237
<i>M. neurolyticum</i>	501	196
<i>M. fermentans</i>	491	195
<i>M. hyorhinae</i>	448	211
<i>M. orale</i>	423	179
<i>M. arthritis</i>	408	157
<i>M. salivarium</i>	403	151
<i>M. hominis</i>	370, 369	147, 148
<i>M. arginini</i>	369	145

### 2.6.3 Fluoreszenzmarkierung von ED-B-exprimierenden Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen wurden in den Kammern eines Glasobjektträgers (Nunc LabTek II *Chamber Slides*, Fisher Scientific, Schwerte) in je 1 mL Vollmedium bis zu 70-80 % Konfluenz kultiviert. Dem dreimaligen Waschen mit 1 mL PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ; PBSw; PAA Laboratories, Cölbe) folgte eine 5-minütige Inkubation in 500  $\mu\text{L}$  kaltem ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) Methanol, wodurch die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBSw wurde der Zellrasen mit 500  $\mu\text{L}$  einer 5  $\mu\text{M}$  ChromoCalin-Lösung (siehe Abschnitt 3.4) in PBSw überschichtet und für 45 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Die Proteinlösung war zuvor zur Färbung der Zellkerne mit 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (Otto, 1990) versetzt worden.

Nach Waschen mit PBSw und bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  zum Entfernen der Reagenzien wurden die Zellen unter einem Axiovert 40 CFL Mikroskop mit 10x oder 20x Objektiv betrachtet, welches an eine AxioCam MRm Kamera angeschlossen war. Nach Anregung der Fluoreszenz mit Hilfe einer Xenonlampe wurden unter Verwendung geeigneter Bandpass-Filter (BP470/40 nm: eGFP, BP365/12 nm: DAPI) die Zellfärbungen separat aufgezeichnet, wobei identische Expositionszeiten und Blendeneinstellungen verwendet wurden. Mit Hilfe des geräteeigenen Programms *AxioVision* v4.8 (Carl Zeiss Microscopy, Jena) wurden anschließend die Bilder der spezifischen Antigen- und Zellkernfärbung überlagert.

### 2.6.4 Bindungsstudien auf antigenexprimierenden Zellen

#### Nachweis der Bindungsaktivität von T84.66-CL31 Fusionsproteinen durch Durchflusszytofluorimetrie

In Zellkulturflaschen kultivierte HT-29 Zellen wurden beim Erreichen eines 80-90 % konfluenten Rasens zunächst mit PBSwo (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen und dann für 30-40 min mit 5 mL einer 0,48 mM EDTA/PBS-Lösung überschichtet. Die durch leichtes Klopfen abgelösten Zellen wurden in 5-6 mL  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem FACS-Puffer (siehe Abschnitt 2.1.9) resuspendiert, die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) bestimmt und dann je 300.000 Zellen in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Eppendorf 5430R, 300 g, 5 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), in 700  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung resuspendiert und für 1 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die hierfür verwendeten Proteinlösungen stammten aus einer in FACS-Puffer hergestellten Verdünnungsreihe des zu analysierenden Fusionsproteins ausgehend von einer Startkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  und mit einer Endkonzentration von 0,015 nM. Als Negativkontrolle wurde statt der Proteinlösung 700  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer eingesetzt. Danach wurden die Zellen wie oben zentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit 500  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer für 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in je 50  $\mu\text{L}$  einer 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *StrepMAB*-Immo-Lösung (in FACS-Puffer) inkubiert. Einem weiteren Waschschrift schloss sich eine 20-minütige Inkubation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 50  $\mu\text{L}$  anti-Maus (Fab)<sub>2</sub>-AlexaFluor488-Konjugat (1:500 in FACS-Puffer) an. Nach einer finalen Waschschrift mit 500  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer wurden die Zellen in 350  $\mu\text{L}$  FACS-Puffer aufgenommen, in ein FACS-Messröhrchen (5 mL) mit Filtersieb (BD Biosciences, San Jose, CA) überführt und sofort der durchflusszytofluorimetrischen Analyse an einem FACS Aria Cell-Sorting System (Biosciences, Heidelberg) mit einem blauen (488 nm) Laser unterzogen. Die Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  einer 0,1 mg/mL Pro-

pidiumiodid(PI)-Lösung direkt vor einer Messung erlaubte die Diskriminierung zwischen der lebenden und toten Zellpopulation, da intakte Membranen vitaler Zellen für diesen DNA-bindenden Farbstoff undurchlässig sind. Je Verdünnungsstufe wurden 20.000 lebende Zellen analysiert, wobei die Datenauswertung zur Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) mit dem Programm *FlowJo* v8.8.6 (Tree Star, Ashland, OR) durchgeführt wurde. Hierfür wurde zunächst in einem *Dot Plot* die mit Hilfe eines 695/40 nm Bandpass-Filters detektierte PI-Fluoreszenz gegen das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*; SSC) aufgetragen, welches von der Granularität der Zelle, ihrer Vesikelanzahl sowie der Größe und Struktur ihres Zellkerns beeinflusst wird. Durch Anlegen eines elliptischen *Gates* wurde die lebende Zellpopulation (typischerweise > 85 % der gesamten Zellpopulation) selektiert, und von dieser Subpopulation wurde mit Hilfe eines 502 nm Langpass-Filters sowie einem 530/30 nm Bandpass-Filter das AlexaFluor488 Fluoreszenzsignal analysiert, um für jede Verdünnungsstufe den MFI-Wert zu erhalten. Zur Ermittlung der  $K_D$  wurden die MFI-Werte dann gegen die entsprechende Proteinkonzentration aufgetragen und die Daten nach dem Massenwirkungsgesetz mit folgender Gleichung ausgewertet:

$$MFI_{tot} = (MFI_{max} - MFI_{min}) \frac{[P]_{tot}}{K_D + [P]_{tot}} + MFI_{min}$$

#### Nachweis der Bindungsaktivität von Fusionsproteinen anhand zellassoziierter $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität

In einer 24-Well Platte wurden Zellen in 1 mL Vollmedium so ausgesät, dass sie nach ca. 72 h 70-80 % Konfluenz erreicht hatten. Das Medium wurde gründlich abgenommen und die Zellen mit 500  $\mu\text{L}$  kaltem (4 °C) PBSw (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Anschließend wurde je Vertiefung 250  $\mu\text{L}$  aus einer Konzentrationsreihe des Bindeproteins (Versionen von T84.66-CL31 bzw. eines Duocalins), hergestellt in DMEM/0,1 % (v/v) FCS ausgehend von 1  $\mu\text{M}$  (1:4 Verdünnungsschritte), appliziert. Nach einer Inkubation für 1 h auf Eis wurden nicht gebundene Proteine durch zweimaliges Waschen mit PBSw entfernt, bevor die Zellen für eine weitere Stunde auf Eis mit ca. 220  $\mu\text{L}$  100.000 cpm  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> (Spezifische Aktivität: 131 MBq/nmol; siehe Abschnitt 2.5.1) in DMEM/0,1 % (v/v) FCS überschichtet und inkubiert wurden. Danach wurde der Überstand gründlich entfernt, die Zellen zweimal mit 500  $\mu\text{L}$  kaltem PBS/w gewaschen und durch Zugabe von 400  $\mu\text{L}$  1 M NaOH für ca. 5 min lysiert. Nach mehrmaligem Resuspendieren sowie Spülen der Vertiefungen mit PBSw wurde die zellassozierte Radioaktivität als Lysat im Wallac 1480 Wizard 3"  $\gamma$ -Zähler analysiert. Für jede Konzentrationsstufe des Bindeproteins wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Bestimmung des  $K_D$ -Wertes erfolgte wie im Abschnitt zuvor beschrieben anhand des Massenwirkungsgesetzes, wobei die gemessene  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität statt der MFI-Werte eingesetzt wurde.

#### Bestimmung der Bindungsaktivität des scFv/Anticalin-Fusionsproteins durch kompetitive Verdrängung des Metallchelate-Liganden

Die Zellen wurden wie oben beschrieben in einer 24-Well Platte mit 1 mL Vollmedium für ca. 72 h kultiviert, bis sich ein nahezu konfluenter Zellrasen gebildet hatte. Nach Entfernen des Überstandes

und einem Waschschrift mit kaltem (4 °C) PBSw wurde in jede Vertiefung 250 µL einer 50 nM T84.66-CL31d-Lösung in DMEM/0,1 % (v/v) FCS gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die ungebundene Proteinfraction durch zweimaliges Waschen mit kaltem PBSw entfernt. Dann erfolgte die Inkubation der Zellen mit 250 µL 1 nM radioaktivem  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  bzw.  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  in DMEM/0,1 % (v/v) FCS (siehe Abschnitt 2.5.1) in Gegenwart einer Konzentrationsreihe von kaltem  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  für 1 h auf Eis, wobei die Startkonzentration von 400 nM schrittweise im Verhältnis 1:4 bis auf 0,0015 nM verringert wurde. Die Analyse der zellassozierten Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben im  $\gamma$ -Zähler. Zur Ermittlung des  $\text{IC}_{50}$  (*Inhibitory Concentration*), entsprechend der Konzentration an kaltem  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$ , die zu halb-maximaler zellassoziierter Radioaktivität führt, wurden die erhaltenen Radioaktivitätswerte (R) gegen die entsprechenden Konzentrationen an kaltem  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  aufgetragen und an folgende Gleichung angepasst:

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

Dabei entspricht  $[\text{L}]_{\text{tot}}$  der eingesetzten Konzentration an kaltem  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  und  $p$  dem Hill-Koeffizienten (Kurvensteigung). Um daraus eine von experimentellen Parametern unabhängige Gleichgewichtskonstante ( $K_D$ ) der Bindung von  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  zu ermitteln, wurde die Cheng-Prusoff-Gleichung (Cheng & Prusoff, 1973) angewandt:

$$K_D = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[\text{L}^*]}{\text{EC}_{50}}}$$

$[\text{L}^*]$  entspricht hier der konstanten Konzentration der radioaktiven Komponente im Verdrängungsexperiment und  $\text{EC}_{50}$  (*Effective Concentration*) der halb-maximalen Sättigungskonzentration der radioaktiven Komponente im Fall des direkten Bindungsexperiments (ohne Konkurrenz).

## 2.7 *In vivo* Versuche in Mäusen

### 2.7.1 Pharmakokinetische (PK) Studien

Zur Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von unmodifizierten und PASylierten Fusionsproteinen wurden je Proteinkonstrukt insgesamt neun weibliche BALB/c Mäuse (Gewicht: 18-20 g) verwendet. Die Proteininjektion erfolgte in die Schwanzvene (ohne vorherige Betäubung der Versuchstiere) in einer Dosis von 5 mg Protein in PBS je kg Körpergewicht bezogen auf den Anteil des unmodifizierten Proteins. Typischerweise wurde bei einer Maus mit 20 g ein Injektionsvolumen von ca. 100 µL mit einer 1 mg/mL Lösung des unmodifizierten Proteins eingesetzt. Im Fall des PASylierten Proteins wurde die Konzentration der Proteinstammlösung entsprechend der größeren Molekülmasse erhöht.

Die insgesamt neun Mäuse wurden in drei Gruppen (N = 3) aufgeteilt, wobei allen Mäusen einer Gruppe zum gleichen Zeitpunkt Blut über die Schwanzvene entnommen wurde. Dies erfolgte in der Regel nach 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h (Gruppe 1: 0,5 h, 2 h, 6 h, 24 h; Gruppe 2: 1 h, 4 h, 8 h, 36 h; Gruppe 3: 3 h, 12 h, 48 h). Dabei wurde 20-100  $\mu\text{L}$  Blut entnommen, aus dem durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 20 min) das Blutplasma zwecks anschließender Bestimmung der Test-Proteinkonzentration mittels quantitativem ELISA (siehe Abschnitt 2.3.9) abgetrennt wurde.

Zur Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit wurden die ermittelten Proteinkonzentrationen gegen die Probenahmezeitpunkte aufgetragen. Die Kurvenanpassung zur Beschreibung des zweiphasigen Konzentrationsabfalls erfolgte mit dem Programm *WinNonlin* v6.1 (Pharsight, St. Louis, MO) gemäß der Gleichung:

$$c(t) = A \cdot e^{(-\alpha t)} + B \cdot e^{(-\beta t)}$$

Dabei ist  $c(t)$  die Proteinkonzentration im Blutplasma (in nM) in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  (in h) nach der Injektion,  $A$  der relative Achsenabschnitt (in nM) sowie  $\alpha$  die kinetische Konstante (in  $\text{h}^{-1}$ ) in der Verteilungsphase, während  $B$  und  $\beta$  den jeweiligen Parametern in der Eliminierungsphase entsprechen. Weitere wichtige pharmakokinetische Parameter, wie die *Area Under the Curve* (AUC; in  $\text{h} \cdot \text{nM}$ ) sowie die *Clearance* (CL; in  $\text{mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) konnten dabei ebenfalls bestimmt werden.

### 2.7.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Weiblichen CD1 Nacktmäusen (Alter: 6-8 Wochen) ohne Thymus (Charles River Laboratories, Sulzfeld) wurden 5 Mio. CEA-exprimierende LS-174T Zellen (Tom *et al.*, 1976) in DMEM subkutan in die rechte Schulter injiziert, so dass sich in der Regel nach 10 Tagen ein solider Tumor (Gewicht: 100-300 mg) bildete.

Den Mäusen (N = 3) wurden dann unter Isofluran-Anästhesie 100  $\mu\text{L}$  5,6-7,1 MBq  $^{124}\text{I}$  markiertes Protein (T84.66-CL31d sowie dessen PASylierte Versionen; Spezifische Aktivität von  $\text{Na}^{124}\text{I}$ :  $\sim 1.1 \text{ MBq/pmol}$ ; siehe Abschnitt 2.5.2) in 100  $\mu\text{L}$  HTT-Puffer in die Schwanzvene injiziert. Zur Berechnung der tatsächlich injizierten Dosis wurde die Radioaktivität der Spritzen vor und nach der Injektion (in Bq) mit Hilfe eines CRC-15R Dosiskalibriergeräts (Capentic, Ramsey, New York) bestimmt. Nach 4 h, 24 h bzw. 48 h wurden von jeder Maus unter Isofluran-Narkose für je 40 min dynamische Bilder in einem Inveon Kleintier-PET/CT Scanner (Siemens Medical Solutions, Erlangen) aufgenommen. Nach iterativer Rekonstruktion der Daten mit Hilfe des Algorithmus 3D-OSEM (*3D Ordered-Subsets Expectation Maximum Algorithm*) wurden die Bilder zur Quantifizierung der prozentual injizierten Dosis pro Organgewicht (% ID/g) im geräteeigenen *Inveon Research Workplace* v4.2 Programm (Siemens Medical Solutions, Erlangen) analysiert. Zum besseren direkten Vergleich des Tumor/Hintergrund-Verhältnisses wurden die Bilder – dargestellt als *Maximum Intensity Projection* (MIP) – auf ein ähnliches Intensitätssignal im Tumor skaliert. Diese Experimente wurden in der Nuklearmedizin am Klinikum Rechts der Isar, München durchgeführt.

### 2.7.3 Biodistributionsanalyse

Die spezifische Tumoranreicherung radioaktiv markierter Proteine oder Liganden (5,6-7,1 MBq  $^{124}\text{I}$ -markiertes T84.66-CL31d; Spezifische Aktivität von  $\text{Na}^{124}\text{I}$ :  $\sim 1.1$  MBq/pmol sowie dessen PASylierte Versionen bzw. 1,0-1,3 MBq  $^{125}\text{I}$ -markiertes T84.66-PAS(400)-CL31d; Spezifische Aktivität von  $\text{Na}^{125}\text{I}$ : 74 MBq/nmol und 3,3-7,3 MBq  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA- $\text{NH}_2$  oder  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$ ; Spezifische Aktivität von  $^{177}\text{Lu}$ : 131 MBq/mol; siehe Abschnitte 2.5.1 und 2.5.2) wurde 48 h nach Injektion in die Schwanzvene durch quantitative Biodistributionsanalyse untersucht. Die Mäuse ( $N = 3$ ) wurden dazu in einer  $\text{CO}_2$ -gesättigten Kammer eingeschlafert und die Organe in folgender Reihenfolge entnommen und in 20 mL  $\gamma$ -Zähler Messdöschen (Perkin Elmer LAS, Rodgau) überführt: Blut, Herz, Lunge, Schilddrüse, Tumor, Leber, Pankreas, Milz, Magen (entleert), Dünndarm (entleert), Dickdarm (entleert), Niere, Nebenniere, Muskel, Knochen, Haut, Schwanz und Hirn. Nach Bestimmung der Organgewichte auf einer Feinwaage wurde die Radioaktivität des jeweiligen Organs im Wallac 1480 Wizard 3"  $\gamma$ -Zähler quantifiziert. Den Organen im  $\gamma$ -Zähler vorangestellt wurden fünf Radioaktivitätsstandards, welche zur Umrechnung der Zerfälle pro Minute (cpm) — als Ausgabe des  $\gamma$ -Zählers — in Bq dienten. Diese wurden hergestellt, indem der Inhalt einer Spritze mit radioaktiv markiertem Protein (siehe Abschnitt 2.7.2) in 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und davon je 1 mL (1 %) in ein Messdöschen pipettiert wurde. Der prozentuale Anteil der injizierten Dosis (% ID) ergab sich aus der Differenz der auf den Zeitpunkt  $t_0$  (Zeitpunkt der ersten Proteininjektion) nach folgender Formel normierten Radioaktivität der Spritzen vor und nach der Injektion

$$R_n(t_0) = R_t \cdot e^{\frac{\ln(2) \cdot t}{\tau_{1/2}}}$$

wobei  $R_n(t_0)$  der zerfallskorrigierten Radioaktivität (in MBq) normiert auf den Zeitpunkt  $t_0$ ,  $R_t$  der Radioaktivität einer Spritze vor bzw. nach der Injektion zum Zeitpunkt  $t$ , sowie  $\tau_{1/2}$  der Zerfallshalbwertszeit des Radionuklids entspricht. Diese normierte Radioaktivität wurde zudem um die bei der Injektion in die Schwanzvene verbliebene Radioaktivität korrigiert. Um den prozentualen Anteil der injizierten Dosis pro Gramm Organ (% ID/g) zu erhalten, wurde die % ID durch das Gewicht des jeweiligen Organs geteilt.

### 2.7.4 Autoradiographische Analyse von Gewebeschnitten

Die Verteilung der Radioaktivität innerhalb eines Organs wurde durch die autoradiographische Analyse von Gewebeschnitten visualisiert. Dazu wurde direkt nach der Entnahme aus einem Versuchstier einer Mausgruppe (vgl. Abschnitt 2.7.2) das jeweilige Gewebe (Tumor bzw. Leber) mit *Tissue-Tek* Einbettmedium (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn) überschichtet und auf Trockeneis bis zum Erstarren gelagert. Der Gewebblock wurde dann in ein Kryomikrotom CM1950 (Leika Biosystems, Nussloch) eingespannt. Im Anschluss wurden aus verschiedenen Bereichen des Organs ca. 10  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte abgetragen und auf einen Glas-Objektträger transferiert. Dieser Objektträger wurde in einer Fotokassette zusammen mit einer *Phosphor Screen GP Digital Imaging* Bildplatte (beides East-

man Kodak, Rochester, NY) über Nacht inkubiert. Die Intensität der durch die Strahlung des Iod-Radioisotops erzielten Schwärzung des photographischen Films wurde in dem laseroptischen Densitometer CR 35 BIO (Raytest Isotopenmessgeräte, Straubenhardt) mit einer internen Auflösung von 25 µm digitalisiert.

### 2.7.5 Computer-Programme und Datenbanken

Für die Analyse von DNA-Sequenzen sowie zur Planung von Oligonukleotidsequenzen wurde das Programm *ApE (A plasmid Editor v1.17*, M. Wayne Davis) verwendet. Zur Analyse von Proteinsequenzen stand das am Lehrstuhl von Prof. Skerra entwickelte Programm *ANTICALiGN* zur Verfügung (Jarasch *et al.*, 2016). Die Berechnung der Molekülmasse bzw. weiterer physikalischer und chemischer Parameter eines Proteins wie z.B. des molaren Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des ProtParam-Algorithmus (Gasteiger *et al.*, 2003) auf dem ExPASy Server ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

Die Visualisierung und Analyse von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde mit dem Programm *Chimera v1.9* und den implementierten Funktionen durchgeführt (Pettersen *et al.*, 2004). Proteinkristallstrukturinformationen wurden aus der *Protein Data Bank* (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb>) bezogen. Chemische Strukturformeln wurden im Programm *ChemDraw Ultra 8.0* (CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA) gezeichnet.

Die Steuerung von Geräten und Apparaturen sowie die anschließende Datenauswertung erfolgte durch herstellereigene Programme:

SPR-Spektroskopie: *BIAevaluation v4.1* (GE Healthcare, Freiburg)

CD-Spektroskopie: *Spectra Manager v1.53.05* (Jasco, Groß-Umstadt)

ESI-MS: *Compass Data Analysis v4.0* (Bruker Daltonics, Bremen)

Durchflussszytometrie: *FlowJo v8.8.6* (Tree Star, Ashland, OR)

Fluoreszenzmikroskopie: *AxioVision v4.8* (Carl Zeiss Microscopy, Jena)

Dünnschichtchromatographie (radioaktiv): *PEARL & LauraLite* (LabLogic, Sheffield)

Biodistribution: *Inveon Research Workplace v4.2* (Siemens Medical Solutions, Erlangen)

Pharmakokinetische Studien: *WinNonlin v6.1* (Pharsight, St. Louis, MO)

Die graphische Auswertung und Umsetzung der erhaltenen Daten erfolgte anschließend mit dem Programm *KaleidaGraph v4.02* (Synergy Software Inc. Reading, PA).

SDS-PAGE Gele wurden digitalisiert und mit Hilfe des Programms *Adobe Photoshop CS4 v11.0* (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA) in Kontrast und Helligkeit optimiert. Abbildungen bestehend aus mehreren Teilabbildungen wurden im Programm *Adobe Illustrator CS4 v14.0.0* (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA) erstellt.

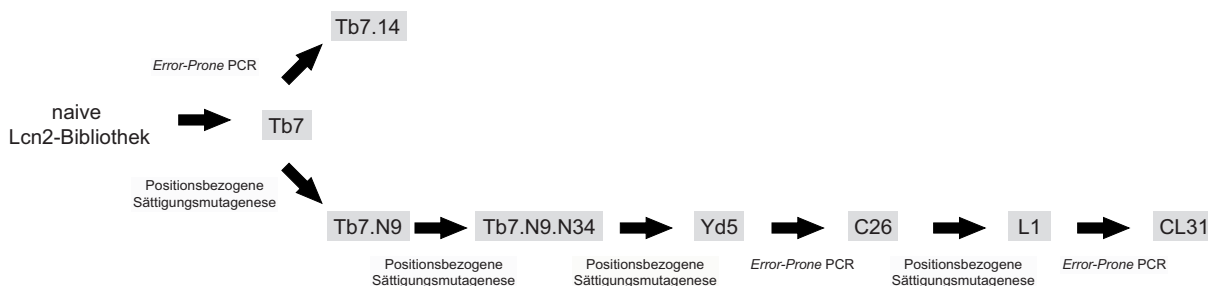
Wissenschaftliche Literatur wurde aus der Pubmed Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) bezogen.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Optimierung der Bindungseigenschaften Me-DTPA-spezifischer Anticaline

Zu Beginn dieser Arbeit lagen bereits Anticaline (C26, L1, CL31) mit niedrig nanomolarer Bindungsaktivität für den Metallchelate-Komplex zwischen der [(*R*)-2-amino-3-(4-aminophenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclohexan-1,2-diaminopentaessigsäure (DTPA-NH<sub>2</sub>) und Lanthanidionen (insbesondere Y<sup>3+</sup> und Lu<sup>3+</sup>) in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra vor. Dr. H.-J. Kim (Kim *et al.*, 2009) hatte aus einer naiven Lcn2-Bibliothek mit 12 randomisierten Positionen durch *Phage Display* zunächst die Lcn2-Variante Tb7 mit einer Affinität von 88,3 nM – ermittelt durch SPR-Messung – für Y·DTPA (konjugiert an RNase A als Trägerprotein) selektiert (Abbildung 6). In einem anschließenden *in vitro* Affinitätsmaturierungsprozess bestehend aus schrittweiser Zufallsmutagenese – sowohl an ausgewählten Aminosäurepositionen als auch innerhalb der gesamten *Bst*XI-Genkassette – gefolgt von *Phage Display*-Selektion und Kolonie-Filterstapel-Test konnten die Bindungseigenschaften von Tb7 weiter optimiert werden. Die mittels SPR-Spektroskopie ermittelte Dissoziationskonstante des zunächst aus diesem Prozess resultierenden Anticalins C26 für Y·DTPA-RNase wurde zu  $K_D = 418$  pM bestimmt (Kim *et al.*, 2009).



**Abbildung 6. Entwicklung von Anticalinen mit Spezifität für Me-DTPA (Kim *et al.*, 2009).** Zunächst wurde ausgehend von dem Lcn2-Grundgerüst durch Einsatz von NNS-Codons eine kombinatorische Anticalin-Bibliothek erzeugt. Nach *Phage Display*-Selektion und anschließendem Kolonie-Filterstapel-Test unter Verwendung von Tb·DTPA-RNase als Ligand wurde die Lcn2-Variante Tb7 selektiert. Zur Affinitätsmaturierung wurde entweder an ausgewählten Aminosäurepositionen eine Sättigungsmutagenese oder über die gesamte zentrale *Bst*XI-Kassette eine Zufallsmutagenese durchgeführt (*Error-Prone PCR*). Aus den darauffolgenden Selektionsschritten resultierten die drei Anticaline C26, L1 und CL31, die Ligandenaffinität im niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen.

Die Kristallstrukturen von Tb7.14 in der apo-Form (PDB: 3DTQ) sowie von Tb7.N9 (PDB: 3DSZ) und C26 (PDB: 4IAW), beide in Komplex mit dem Liganden Y·DTPA, wurden gelöst (Kim *et al.*, 2009; Eggenstein *et al.*, 2014). Insbesondere durch die Strukturanalyse der beiden Anticaline Tb7.N9 und C26 in der holo-Form konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Ligandenaffinität und einer Konformationsänderung des Loops #1 festgestellt werden (Abbildung 7A). Auf Grundlage des-



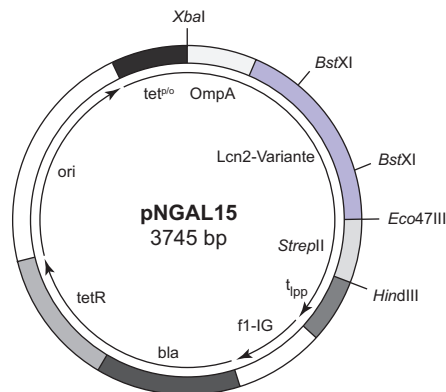
staben kennzeichnen Aminosäureaustausche zum Einführen zweier *Bst*XI-Restriktionsschnittstellen (H28Q, A145T) sowie zum Entfernen des freien Cysteins (C87S) in Lcn2.

CL31 zeigte eine nochmals langsamere Dissoziationskinetik für Y·DTPA-RNase in der SPR-Spektroskopie (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2). Zum besseren Verständnis der affinitätsvermittelnden Protein-Ligand-Interaktionen wurde auch dieses Anticalin proteinkristallographisch untersucht. Die Überlagerung der Kristallstrukturen aller Me·DTPA-spezifischen Anticaline mit der des Wildtypproteins Lcn2 (PDB: 1L6M) anhand der 58 konservierten C $\alpha$ -Positionen der Lipocalin-Proteinfamilie (Skerra, 2000b) illustriert die Funktion des Loops #1 als einen die Bindungstasche verschließenden Deckel in Folge der Konformationsänderung des Proteinrückgrats im Verlauf des Affinitätsmaturierungsprozesses (Abbildung 7A). Aufgründessen wird der einmal in die Bindungstasche eingedrungene Me·DTPA-Komplex an der Dissoziation sterisch gehindert, was sich in einer langsameren Dissoziationskinetik widerspiegelt (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die Ausgangsvarianten C26, L1 und CL31 proteinbiochemisch charakterisiert werden. Anhand von Sequenzunterschieden sollten diejenigen Aminosäurepositionen identifiziert werden, die zur Verbesserung der Dissoziationskinetik – vor allem zwischen L1 und CL31 – geführt hatten. Anschließend sollte das Anticalin CL31 durch rationale Mutagenese basierend auf Kristallstrukturinformationen hinsichtlich seiner proteinbiochemischen Eigenschaften (Ausbeute, Homogenität, Stabilität) und Bindungskinetik (langsamere Dissoziation) optimiert werden.

### **3.1.1 Charakterisierung der Me·DTPA-spezifischen Anticaline C26, L1 und CL31**

Die Anticaline C26, L1 und CL31 wurden – wie auch alle im Verlauf dieser Arbeit generierten Varianten – unter Verwendung des Vektors pNGAL15 mit einem C-terminalen *Strep*-tag II in das Periplasma von *E. coli* sekretiert (Abbildung 8). Dadurch wurde sichergestellt, dass sich die strukturell konservierte Disulfidbrücke Cys76–Cys175 der Anticaline unter den oxidierenden Bedingungen dieses Zellkompartiments korrekt ausbilden kann. Die Translokation des naszierenden Polypeptids wird dabei durch die N-terminale OmpA-Signalsequenz über den Sec-Transportweg vermittelt, welche anschließend abgespalten wird. Die Genexpression erfolgte unter der Transkriptionskontrolle des stringent regulierten *tet*-Promotor/Operator-Systems (Skerra, 1994), wodurch die Basalsynthese des rekombinanten Proteins effizient unterdrückt wird.

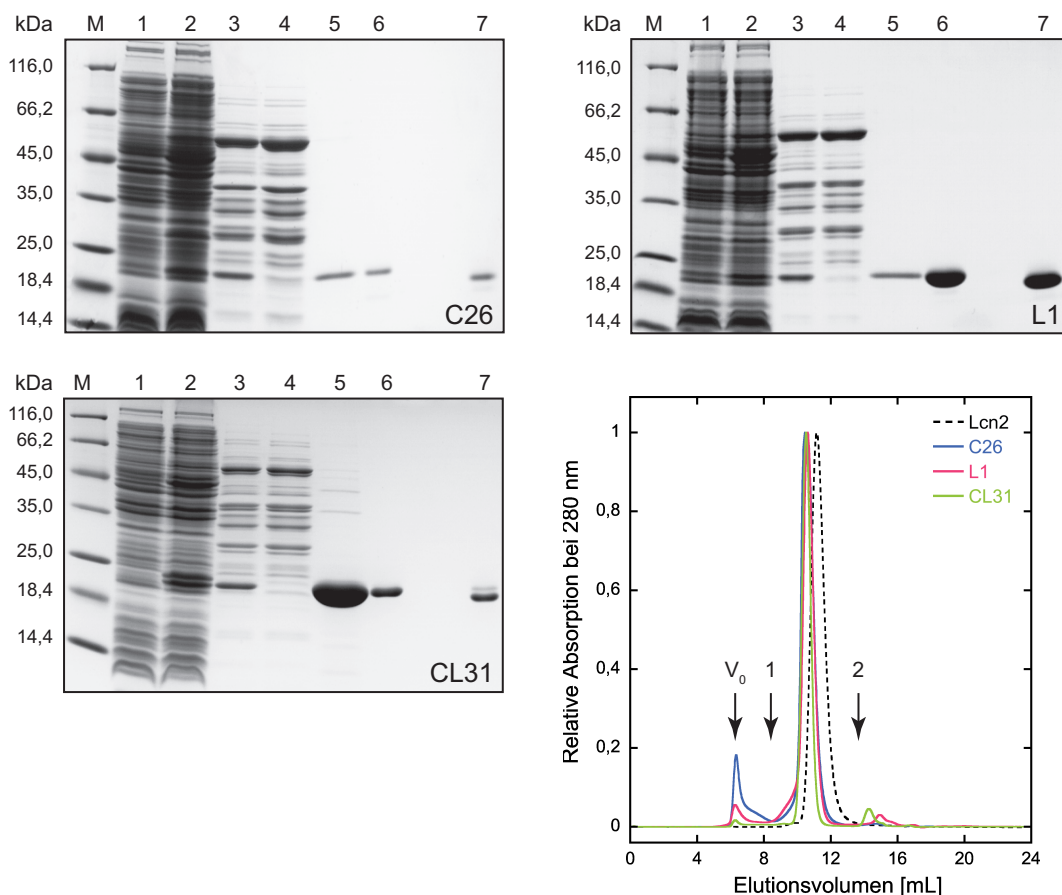


**Abbildung 8. Schematische Darstellung des Vektor pNGAL15 zur Produktion von Me-DTPA-bindenden Anticalinen im Periplasma von *E. coli*.** Die Regulation der Transkription des Fusionsproteins bestehend aus der bakteriellen Signalsequenz OmpA, der jeweiligen Lcn2-Variante und dem *Strep*-tag II erfolgt durch das Tetracyclin Promotor/Operator-System ( $tet^{P/O}$ ), wobei dessen dichte Repression durch konstitutive Expression des *tet*-Repressors (*tetR*) sichergestellt wird. Im bicistronischen Operon des *tet*-Repressors befindet sich ebenfalls das Ampicillin-Resistenz vermittelnde Strukturgen der  $\beta$ -Lactamase (*bla*). Weitere Elemente sind die intergenische Region des filamentösen Phagen f1 (*f1-IG*) sowie der Replikationsursprung der pUC-Plasmidfamilie (*ori*). Angegeben sind außerdem die Schnittstellen relevanter Restriktionsendonukleasen.

Zunächst wurde jeweils in den kodierenden Regionen von C26, L1 und CL31 das Amber-Stoppocodon an der Aminosäureposition 54 entfernt, welches im Verlauf der zufallsbasierten Affinitätsmaturierung aufgetreten war. Dazu wurde die ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren angewandt (siehe Abschnitt 2.2.5.4). Mit Hilfe der Oligodesoxynukleotid-Paare C26\_TAG\_for/rev für C26, EB7\_for/rev für L1 sowie CL31\_TAG\_for/rev für CL31 wurde stattdessen das für Glutamin codierende Basentriplett CAG inseriert, was dem Einbau eines Gln-Restes durch den *E. coli supE* Amber-Suppressorstamm TG1-F<sup>-</sup> entspricht (Miller, 1992).

Die bakterielle Produktion der Anticaline erfolgte im 2 L-Maßstab in *E. coli* TG1-F<sup>-</sup>/pNGAL15 (siehe Abschnitt 2.3.1.1). Die Genexpression wurde stets bei einer Zelldichte von  $OD_{550} = 2$  durch Einstellen einer aTc-Konzentration von 200  $\mu\text{g/L}$  induziert. Am Ende der fünfstündigen Induktion – bei Zelldichten von 3,5 bis 4 – wiesen die Kulturen keine Anzeichen von Zelllyse auf. Bei Analyse von Gesamtzellextrakten mittels SDS-PAGE wurde nach der Induktion eine Bande bei 21 kDa sichtbar, was der Molmasse einer Lcn2-Variante mit C-terminalen *Strep*-tag II (188 Aminosäuren) entspricht (Abbildung 9; Spuren 1, 2). Nach Zentrifugation der Bakterienkulturen wurde der periplasmatische Extrakt präpariert, und die Anticaline wurden anschließend mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (SA-Chromatographie) gereinigt. Die SDS-PAGE-Analyse bestätigte, dass die Anticalin-*Strep*-tag II Fusionsproteine vollständig an die Säulenmatrix gebunden, und nach Waschen mit SA-Puffer (siehe Abschnitt 2.3.2), durch Zugabe von D-Desthiobiotin eluiert wurden (Abbildung 9; Spuren 3, 4, 5). Das Volumen der SA-Eluatfraktion wurde durch Zentrifugation in 10 kDa-Cutoff Konzen-

tratoren (siehe Abschnitt 2.3.7) auf ein Volumen von 2-3 mL ohne sichtbare Aggregatbildung eingengt.



**Abbildung 9. Periplasmatische Produktion von C26, L1 und CL31 in *E. coli* TG1-F/pNGAL15 und Zweischritt-Reinigung.** Die SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt jeweils den Gesamtzellextrakt vor (Spur 1) und 5 h nach Induktion (Spur 2) der Proteinproduktion, den periplasmatischen Extrakt (Spur 3), den Durchlauf der SA-Chromatographie (Spur 4), das Eluat der SA-Chromatographie (Spur 5), und das Protein nach der analytischen SEC (Spur 6) sowie unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Spur 7). M: Größenstandard. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Brilliant Blau gefärbt. Zu der abgebildeten SEC wurde eine mit PBS äquilibrierte Superdex 75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Bettvolumen: 24 mL) verwendet. Als Vergleich dient das Elutionsprofil von Lcn2. C26, L1 und CL31 eluieren bei ca. 11 mL, wobei die Proteinpräparationen einen unterschiedlichen Anteil an aggregiertem Protein ( $V_0$ ) aufwiesen. Weitere Größenstandards sind mit Pfeilen markiert: 1 = BSA (66 kDa), 2 = Cytochrom C (12,4 kDa).

In einem zweiten Reinigungsschritt wurden Proteinaggregate sowie niedermolekulare Verunreinigungen mittels SEC abgetrennt (Abbildung 9, unten rechts). Hier zeigten die Anticaline in der Reihenfolge C26 > L1 > CL31 eine leichte Tendenz zur Aggregatbildung (siehe Tabelle 5). Die Elution der Lcn2-Varianten erfolgte hauptsächlich in einem scharf abgegrenzten, symmetrischen Peak bei einem dem Wildtyp-Lipocalin nahezu identischen Volumen, welches im Einklang mit der apparenten Molekülmasse des Monomers stand. Die jeweiligen Peakfraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht,

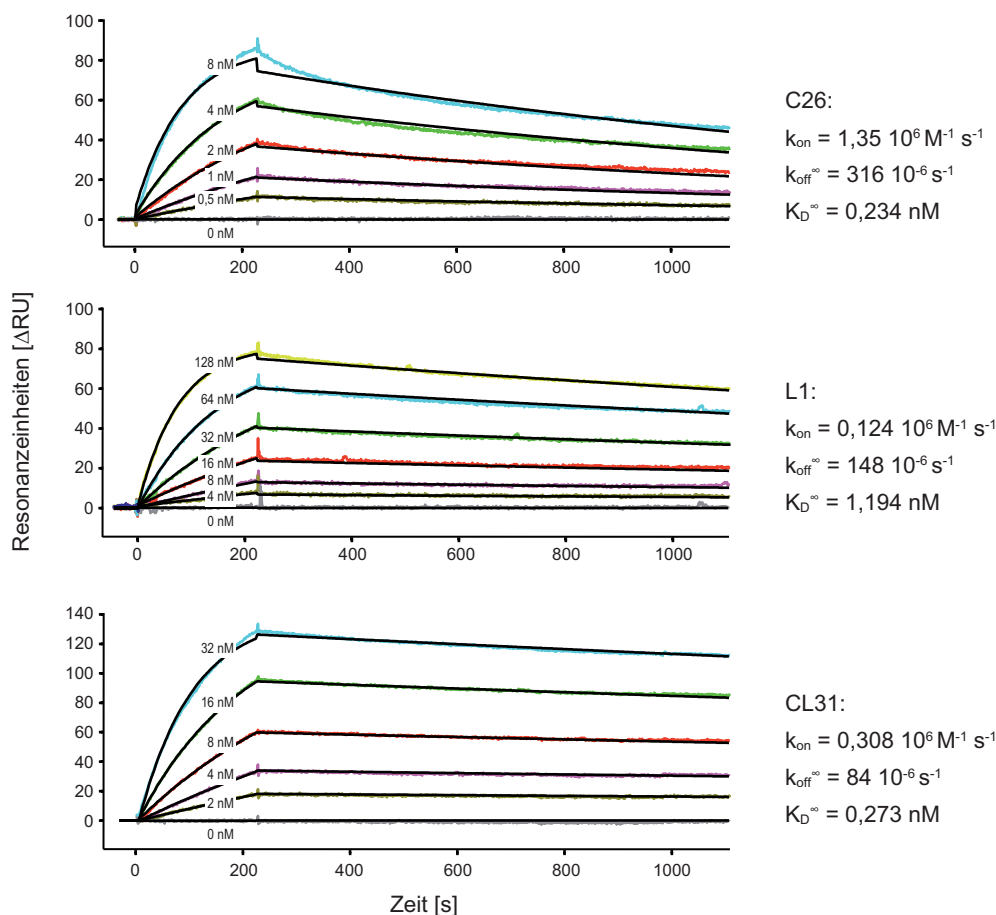
wobei die leicht erhöhte Mobilität der Hauptproteinbande nach Reduktion durch  $\beta$ -Mercaptoethanol ein Hinweis auf die ausgebildete Disulfidbrücke ist (Abbildung 9; Spuren 6, 7). Einzig CL31 wies unter diesen Bedingungen eine zusätzlich schwache Bande oberhalb auf, auf die in Abschnitt 3.1.2 eingegangen wird. Die pro 2 L Kulturvolumen erzielten Ausbeuten an gereinigtem Protein betragen je nach Aggregationsneigung zwischen 3 und 5 mg.

Zur Bestimmung der Affinität sowie der kinetischen Konstanten der Assoziation ( $k_{on}$ ) und Dissoziation ( $k_{off}$ ) von C26, L1 und CL31 für den Liganden Y-DTPA wurde die SPR-Spektroskopie verwendet. Die Immobilisierung des Liganden Y-DTPA auf der Sensorchip-Oberfläche wurde durch ein Trägerprotein vermittelt. Als typische Trägerproteine gelten zu diesem Zweck üblicherweise Rinderserumalbumin (BSA) sowie Ribonuklease A (RNase) aus Rinderpankreas, wobei letzteres als kleines hydrophiles Protein im Gegensatz zu BSA keine intrinsische Bindungsaktivität gegenüber niedermolekularen Liganden aufweist (He & Carter, 1992). Aus diesem Grund erhielt es hier den Vorzug. Zur Kopplung wurde ein mit einer funktionellen Gruppe ausgestattetes DTPA-Derivat [(*R*)-2-amino-3-(4-isothiocyanatophenyl)propyl]-*trans*-(*S,S*)-cyclo-hexan-1,2-diaminpentaessigsäure (DTPA-SCN) verwendet. Die Isothiocyanatgruppe reagiert mit Nucleophilen, insbesondere den  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysin-Seitenketten und auch dem N-Terminus der RNase, unter Ausbildung einer Thioharnstoffbindung. Dies gelingt bevorzugt unter leicht basischen Reaktionsbedingungen, da die Aminogruppen dann überwiegend deprotoniert vorliegen (siehe Abschnitt 2.4.1). Kim *et al.* (2009) konnte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) zeigen, dass dabei typischerweise pro RNase Molekül eine aktivierte DTPA-Gruppe vorliegen. Zudem wurde eine Fluoreszenztitration mit einer  $Tb^{3+}$ -Lösung durchgeführt, die das Vorliegen einer Stöchiometrie von 1:1:1 im Me-DTPA-RNase-Konjugat bestätigte (siehe Abschnitt 2.4.3). Anschließend wurde das DTPA-RNase Konjugat mit dem gewünschten Metallion beladen (siehe Abschnitt 2.4.1).

Zur kovalenten Kopplung mit dem Sensorchip (Carboxymethyl-dextran-Matrix) wurden dessen Carboxylgruppen zunächst chemisch als N-Hydroxysuccinimid-Ester aktiviert, um anschließend das Y-DTPA-RNase-Konjugat unter Ausbildung stabiler Säureamid-Bindungen über seine noch freien Lys-Seitenketten zu immobilisieren. In dem Messkanal wurden unter leicht sauren Bedingungen (pH 5) auf diese Weise ca. 250 RU des positiv geladenen Proteinkonjugats ( $pI_{RNase} = 9,6$ ) gebunden, während ein zweiter, als Referenz dienender Flusskanal, nur aktiviert und blockiert wurde (siehe Abschnitt 2.4.1).

Zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der Assoziation und Dissoziation wurden in einem BIAcore 2000 System die gereinigten Anticaline in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe auf den beladenen Chip appliziert (Abbildung 10). Zur Auswertung der erhaltenen Sensorgramme wurde die Rohdaten sowohl durch das Signal des Referenzkanals als auch durch den Mittelwert von vier Pufferinjektionen vor und nach der Proteinverdünnungsreihe korrigiert (*Double Referencing*; Myszka, 1999). Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation ( $k_{on}$ ) wurde durch eine globale Kurvenanpassung (*Global Fitting*) nach dem 1:1 Bindungsmodell von Langmuir mit Hilfe des geräteeigenen Programms *BIA*

*evaluation* v4.1 angepasst. Die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ( $k_{\text{off}}^{\infty}$ ) dagegen wurde aus einer Messung bei der höchsten Proteinkonzentration mit verlängerter Dissoziationszeit (3600 s statt 900 s) ermittelt (nicht gezeigt; Katsamba *et al.*, 2006). Die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation ( $K_D$ ) ergab sich aus dem Quotienten  $k_{\text{off}}^{\infty}/k_{\text{on}}$ .



**Abbildung 10. SPR-Analyse zur Bestimmung der Affinität von C26, L1 und CL31 für Y-DTPA-RNase.** Nach Derivatisierung eines CM5 Sensorchips mit Y-DTPA-RNase (ca. 250 RU) durch Amin-Kopplungschemie (siehe Abschnitt 2.4.1) wurde jeweils eine Konzentrationsreihe des Anticalins in das BIAcore 2000 System injiziert. Die Sensoroberfläche wurde nach jeder Proteininjektion mit Hilfe von 6 M Guanidinium-Chlorid regeneriert. Die korrigierten Sensorgramme (farbige Kurven) wurden global an das 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir angepasst (schwarze Kurven).

Für alle drei hier untersuchten Anticaline wurde eine konzentrationsabhängige Komplexbildung mit Y-DTPA-RNase beobachtet. Die nur minimalen Abweichungen zwischen den korrigierten Sensorgrammen und den Kurvenanpassungen zeigten, dass das verwendete bimolekulare Bindungsmodell die Komplexbildung äußerst gut beschreibt. Interessanterweise wurde die Bindungsaktivität im Verlauf der Affinitätsmaturierung von C26 zu CL31 offensichtlich nicht schrittweise verbessert. So waren die  $K_D$ -Werte von C26 und CL31 mit 234 bzw. 273 pM nahezu identisch, während das Anticalin L1 sogar einen vierfach höheren  $K_D$ -Wert (1,19 nM) aufwies (Abbildung 10). Von größerer Bedeutung

war, dass die durch die Affinitätsmaturierung bedingten Änderungen der Primärsequenz von C26 zu CL31 (Abbildung 7B) zu einer Verlangsamung der Dissoziation des Protein·Ligand-Komplexes geführt hatten. So wurde durch die Sättigungsmutagenese in Loop #1, aus der L1 hervorging, die Halbwertszeit der Komplexdissoziation ( $\tau_{1/2}^{\infty}$ ) gegenüber C26 auf 78 min verdoppelt und schließlich im weiteren Verlauf in CL31 auf 2,3 h vervierfacht (Tabelle 5). Eine hohe kinetische Stabilität zwischen dem Anticalin und dem Hapten ist insofern erwünscht, als dass sie für eine effektive Akkumulation und Retention von Me·DTPA am Tumor verantwortlich ist.

### 3.1.2 Rationale Mutagenese von CL31 zur Untersuchung von Determinanten der Ligandenaffinität

Die gefundene Erhöhung der kinetischen Stabilität des Protein·Ligand-Komplexes der Anticaline L1 und CL31 lässt sich auf insgesamt sechs Aminosäureaustausche in L1 im Vergleich zu C26 und sechs zusätzliche Aminosäuresubstitutionen in CL31 zurückführen (Abbildung 7B). Die Mutationen in L1 (Arg43Pro, Glu44Val, Lys46Pro, Asp47Glu, Lys50Leu, Met51Leu), die sich auf den Loop #1 beschränken, scheinen im Kontext der Kristallstrukturanalyse von C26 und CL31 einen wichtigen Beitrag zur Bindung des Metallchelate-Komplex zu leisten (siehe Abschnitt 3.1). Dagegen ist der Einfluss der sechs Mutationen in CL31 (Val44Met, Asn65Asp, Gly86Ser, Ser87Pro, Ser99Asn, Leu107Phe), die weit über die *Bst*XI-Genkassette verstreut sind, weniger ausgeprägt, da sich die betroffenen Positionen entfernt von der Bindungstasche und sogar in einem Loop (Ser87/Pro88) an der Unterseite des  $\beta$ -Barrels befinden (Abbildung 7A).

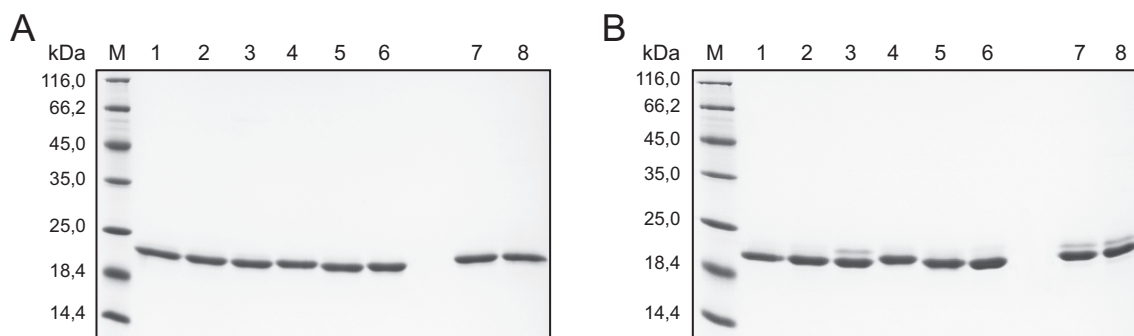
Da jede Abweichung von der humanen wtLcn2-Sequenz die Gefahr einer Immunreaktion bei einer späteren Applikation der Anticaline am Menschen erhöht, sollten die für eine Affinitätsmaturierung notwendigen Aminosäuresubstitutionen zudem auf ein Minimum beschränkt bleiben. In diesem Sinne wurde eine sogenannte „Vorwärts“-Mutagenese-Strategie auf Grundlage der vorangegangenen Variante L1 verfolgt, um diejenige(n) Aminosäureposition(en) in CL31 zu identifizieren, die keinen Einfluss auf die verbesserte Bindungskinetik haben. Dazu wurden Einzelmutanten an den sechs oben genannten Positionen hergestellt und die Proteine vor allem hinsichtlich ihrer Ligandenbindung untersucht. Die entfernten Positionen Ser87/Pro88 blieben dabei zunächst unberücksichtigt und wurde stattdessen später im Hinblick auf die Proteinstabilität untersucht (siehe Abschnitt 3.1.3).

Die Herstellung der vier Einzelmutanten von L1 (Val44Met, Asn65Asp, Ser99Asn, Leu107Phe) erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren (siehe Abschnitt 2.2.5.4). Der erfolgreiche Aminosäureaustausch wurde anschließend durch Sequenzierung der gesamten *Bst*XI-Kassette mit den Oligodesoxynukleotiden D20 und PR1 verifiziert. Zudem wurde L1 sowie jede dieser Einzelmutanten mit einer zusätzlichen Mutation (Ala145Thr) versehen, denn die im Rahmen der Konstruktion der hier verwendeten Lcn2-Bibliothek erforderliche zweite *Bst*XI-Restriktionsschnittstelle, welche die einfache Klonierung der zentralen Anticalin-Genkassette ermöglicht (Gebauer & Skerra, 2012), war unter Inkaufnahme des Aminosäureaustausches Thr145Ala realisiert worden (Kim *et al.*,



2009). Diese aus proteinchemischer Sicht unnötige Substitution wurde daher im Zuge des *Protein Engineering* der Me-DTPA-spezifischen Anticaline rückgängig gemacht.

Die Mutanten wurden erneut periplasmatisch produziert und mittels SA-Chromatographie sowie SEC bis zur Homogenität gereinigt (Abbildung 11). In der SDS-PAGE-Analyse der konzentrierten Proteinfractionen aus der SEC konnte unter reduzierenden Bedingungen jeweils eine Bande bei ca. 21 kDa beobachtet werden (Abbildung 11A). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wies allein die Mutante L1(A145T/V44M), wie schon CL31 bzw. CL31(A145T), ein heterogenes Migrationsverhalten auf (Abbildung 11B). Die SEC-Elutionsprofile aller L1-Mutanten zeigten eine hohe Übereinstimmung mit dem von L1, wenngleich der prozentuale Anteil an Proteinaggregat – mit Ausnahme von L1(A145T/N65D) – auf etwa die Hälfte reduziert war (Tabelle 5). Dieser günstige Effekt und die deutliche Erhöhung der Proteinausbeute bei drei der vier L1-Doppelmutanten ist auf den Aminosäureaustausch Ala145Thr zurückzuführen, da beides bereits bei der Einzelmutante L1(A145T) beobachtet wurde (Tabelle 5). Die nahe der C-terminalen  $\alpha$ -Helix lokalisierte Substitution Thr145Ala hatte offenbar zu einer leichten Destabilisierung des Proteins geführt, die durch den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe von Thr145 und dem Amid-Stickstoff der Peptidbindung an Position 148 in der Kristallstruktur von Lcn2 (Goetz *et al.*, 2002) erklärt werden kann.



**Abbildung 11. SDS-PAGE gereinigter Anticaline nach SA-Chromatographie und SEC.** 15 %ige SDS-PAGE unter (A) reduzierenden und (B) nicht-reduzierenden Bedingungen: L1 (Spur 1), L1(A145T) (Spur 2), L1(A145T/V44M) (Spur 3), L1(A145T/N65D) (Spur 4), L1(A145T/S99N) (Spur 5), L1(A145T/L107F) (Spur 6), CL31 (Spur 7), CL31(A145T) (Spur 8). Anticaline, die an der Aminosäureposition 44 ein Methionin aufweisen (Spuren 3, 7, 8), zeigen ein leicht heterogenes Migrationsverhalten unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

Die gereinigten L1-Mutanten wurden anschließend mittels SPR-Spektroskopie analysiert, um ihre Bindungskinetik für Y-DTPA-RNase zu bestimmen (entsprechend Abschnitt 3.1.1). Interessanterweise wies keine der L1-Doppelmutanten eine ähnlich langsame Dissoziationsrate wie CL31 auf (Tabelle 5). Durch in die in L1(A145T) eingeführten Einzelmutationen wurde  $\tau_{1/2}^{\infty}$  nur minimal um 18 min (Asn65Asp), 6 min (Ser99Asn) bzw. 22 min (Leu107Phe) erhöht. Die einzige innerhalb des Loops #1 gelegene Mutation Val44Met führte sogar zu einer Verdopplung des  $K_D$ -Wertes auf 2,1 nM, da die Assoziation mit Y-DTPA-RNase deutlich langsamer erfolgte.

**Tabelle 5. Durch SPR-Spektroskopie ermittelte Bindungskinetik für Y-DTPA-RNase sowie Ausbeute bei der bakteriellen Produktion von Anticalinen.**

Lcn2-Variante	$k_{on}$ [ $10^6 M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{off}^{\infty}$ [ $10^{-6} s^{-1}$ ]	$K_D^{\infty}$ [nM] <sup>a</sup>	$\tau_{1/2}^{\infty}$ [min] <sup>b</sup>	Ausbeute [mg] <sup>c</sup>	Aggregat [%] <sup>d</sup>
<b>C26</b>	1,35 ± 0,002	316 ± 1,2	0,234 ± 0,001	37	3,9	11,9
<b>L1</b>	0,124 ± 0,001	148 ± 0,4	1,19 ± 0,01	78	5,8	6,4
<b>L1(A145T)</b>	0,141 ± 0,001	170 ± 0,4	1,21 ± 0,01	68	15	3,1
<b>L1(A145T/V44M)</b>	0,070 ± 0,001	146 ± 0,9	2,09 ± 0,03	79	14	3,1
<b>L1(A145T/N65D)</b>	0,234 ± 0,001	135 ± 1,1	0,577 ± 0,005	86	n.d.	10,7
<b>L1(A145T/S99N)</b>	0,197 ± 0,001	157 ± 0,4	0,797 ± 0,005	74	30	3,6
<b>L1(A145T/L107F)</b>	0,076 ± 0,003	128 ± 0,5	1,68 ± 0,07	90	5,7	2,9
<b>CL31</b>	0,308 ± 0,001	84 ± 0,2	0,273 ± 0,001	138	4,4	1,6
<b>CL31(A145T)</b>	0,364 ± 0,001	78 ± 0,1	0,215 ± 0,001	148	7,2	7,1

<sup>a</sup>  $K_D^{\infty}$  wurde aus dem Quotienten  $k_{off}^{\infty}/k_{on}$  kalkuliert. <sup>b</sup>  $\tau_{1/2}^{\infty}$  berechnet sich aus  $\ln(2)/k_{off}^{\infty}$ . <sup>c</sup> Proteinausbeute pro 2 L Kulturvolumen nach der SA-Chromatographie kalkuliert aus dem Absorptionswert der Proteinlösung bei 280 nm. <sup>d</sup> Bestimmt im Verhältnis zum monomeren Anteil der Proteinpräparation in der SEC, der auf 100 % gesetzt wurde.

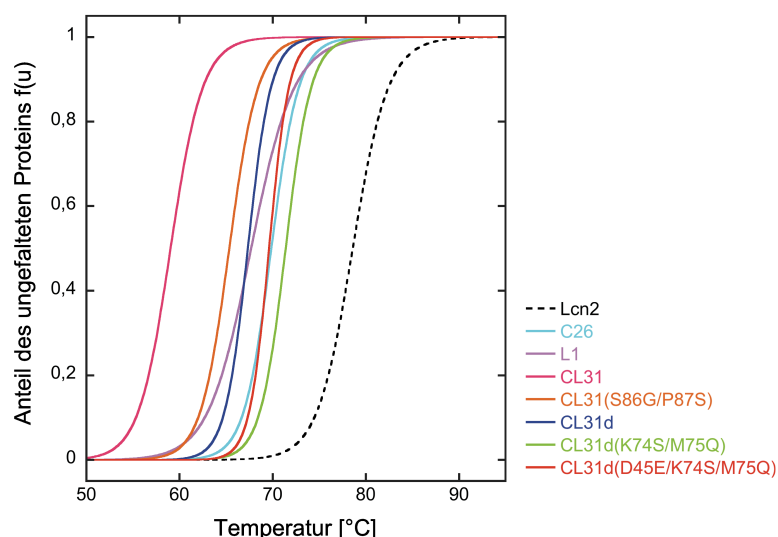
Als Ergebnis der „Vorwärts-Mutagenese“ von L1 kann somit zusammengefasst werden, dass das verbesserte Bindungsverhalten von CL31 auf einen additiven Effekt der Aminosäuresubstitutionen an den Positionen 65, 99 und 107 zurückzuführen ist. Dagegen wurde Met44, dessen Seitenkette in der Kristallstruktur von CL31 ins umgebende Lösungsmittel ragt, gegen Glu als Aminosäure des wtLcn2 substituiert, um mögliche chemische Modifikationen, wie z.B. durch Oxidation, in CL31 zu vermeiden (siehe Abschnitt 3.1.3). Die minimale Erhöhung des  $K_D$ -Wertes dabei wurde für eine verbesserte Proteinstabilität in Kauf genommen, zumal dadurch die unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE bei CL31 beobachtete zusätzliche Proteinbande beseitigt wurde (Eggenstein *et al.*, 2014). Zudem hatte die Wiedereinführung der wtLcn2-Aminosäure Thr an Position 145 eine deutlich verbesserte Proteinausbeute zur Folge.

### 3.1.3 Rationale Mutagenese von CL31 zur Erhöhung der Proteinstabilität

Da im Verlauf der Affinitätsmaturierung von C26 zu CL31, wie oben ausführlich dargestellt, ebenfalls Aminosäuresubstitutionen im Anticalin-Grundgerüst weit entfernt von der Ligandenbindungstasche auftraten (Positionen 86/87), wurde deren Einfluss auf die thermodynamische Faltungsstabilität der Proteine untersucht. Diese spiegelt sich in der Schmelztemperatur sowie in dem Unterschied der freien Enthalpie zwischen dem nativen und dem vollständig denaturierten Zustand eines Proteins wider. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie können Veränderungen in Sekundärstrukturelementen – und damit der Proteinkonformation – in Abhängigkeit von der Temperatur durch Elliptizitätsmessungen bei einer für die jeweilige Sekundärstruktur charakteristischen Wellenlänge verfolgt werden. Lcn2 zeigt bei 25 °C im CD-Spektrum typische Merkmale eines Proteins mit überwiegendem Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen – im Einklang mit dem  $\beta$ -Barrel-Grundgerüst der Lipocalin-Familie – mit einem lokalen Minimum bei 215 nm (Breustedt *et al.*, 2006). Die Lcn2-Varianten C26, L1 und CL31 lieferten unter ent-

sprechenden Bedingungen nahezu identische Spektren, während das Aufheizen der Proteinlösung auf 95 °C zur sichtbaren Aggregation führte. Die größte Änderung des CD-Signals wurde dabei bei 210 nm registriert.

Zur Ermittlung der thermischen Stabilität wurden Lcn2 bzw. seine Varianten unter Aufnahme des CD-Signals bei 210 nm stetig von 20 °C auf 95 °C erhitzt. Dabei zeigten alle Proteine im Rohspektrum zu Beginn der Temperaturerhöhung eine nahezu konstante negative Elliptizität, die im Bereich der jeweiligen Schmelztemperatur ( $T_m$ ) sprunghaft anstieg, und danach wieder konstant verlief. Dieser sigmoide Kurvenverlauf ist charakteristisch für einen einstufigen Entfaltungsübergang nach dem Zwei-Zustands-Modell, dessen Kooperativität durch den Wert der van't Hoff'schen Enthalpie ( $\Delta H_m$ ) – also hier der Steigung an  $T_m$  – widergegeben wird (Lumry & Biltonen, 1966). Zur besseren Übersicht wurden die Entfaltungskurven jeweils auf den Anteil des ungefalteten Proteins normiert (Schlehuber & Skerra, 2002) (Abbildung 12) und nach der Methode von Cohen & Pielak (1994) ausgewertet. Auf diese Weise wurde, neben  $T_m$  und  $\Delta H_m$ , auch die freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen  $\Delta G_U$  (25 °C) extrapoliert.



**Abbildung 12. Normierte Entfaltungskurven von Lcn2 und Me-DTPA-spezifischen Anticalinen ermittelt durch thermische Denaturierung.** Die gereinigten Proteine (10  $\mu$ M) in 20 mM  $KP_i$  pH 7,5, 50 mM  $K_2SO_4$  wurden in einem Spektropolarimeter kontinuierlich erhitzt und dabei die Elliptizität in Abhängigkeit von der Temperatur bei 210 nm aufgezeichnet. Die so erhaltenen Rohdaten wurden anschließend an das Zwei-Zustands-Modell der Proteinfaltung angepasst, und daraus ermittelte Parameter verwendet, um jeweils den apparenten Anteil des ungefalteten Proteins  $f(u)$  zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.4.2).

Die Anticaline C26 und L1 wiesen eine im Vergleich zu Lcn2 ( $T_m = 78,6$  °C) um ca. 10 °C niedrigere  $T_m$  auf. Die thermische Stabilität von CL31 lag mit  $T_m = 59,1$  °C nochmals deutlich darunter (Tabelle 6 und Abbildung 12). Interessanterweise konnte in der Doppelmutante CL31(S86G/P87S) durch Einführen der wtLcn2 Aminosäure an den Positionen Ser86/Pro87 (siehe Abbildung 7B) die Schmelztem-

peratur wieder um 6 °C erhöht und damit die Faltungstabilität von L1 nahezu wiederhergestellt werden.

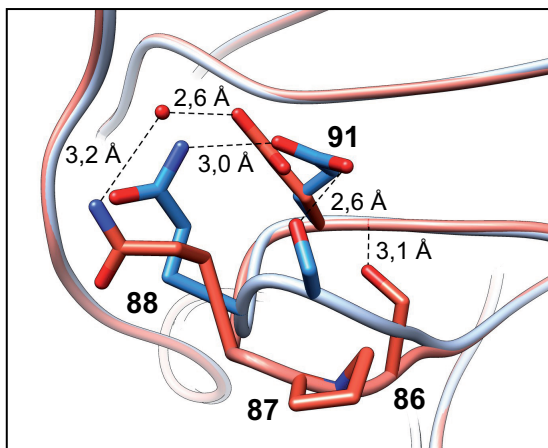
**Tabelle 6. Ermittelte Schmelztemperatur ( $T_m$ ), Enthalpie des Entfaltungsüberganges ( $\Delta H_m$ ) sowie freie Enthalpie der Denaturierung unter Standardbedingungen ( $\Delta G_U$ , 25 °C) von Lcn2 und dessen Me-DTPA-spezifischen Varianten.**

Lcn2-Variante	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_U$ (25 °C) [kJ mol <sup>-1</sup> ]
Lcn2	78,6 ± 0,2	541,3 ± 49,3	82,5 ± 7,5
C26	69,9 ± 0,3	668,2 ± 100,2	87,4 ± 13,1
L1	67,7 ± 0,3	420,3 ± 39,7	52,6 ± 5,0
CL31	59,1 ± 0,2	535,1 ± 48,5	54,8 ± 5,0
CL31(A145T)	60,8 ± 0,1	559,8 ± 34,6	60,0 ± 3,7
CL31(A145T/M44E)	61,4 ± 0,1	656,7 ± 28,4	71,5 ± 3,1
CL31(S86G/P87S)	65,4 ± 0,1	620,4 ± 34,5	73,9 ± 4,1
CL31d <sup>a</sup>	67,3 ± 0,1	781,6 ± 44,6	97,2 ± 5,5
CL31x <sup>b</sup>	71,4 ± 0,1	724,4 ± 32,3	97,5 ± 4,3
CL31x(D45E)	69,6 ± 0,1	924,1 ± 50,6	120,3 ± 6,6

<sup>a</sup> = CL31(M44E/S86G/P87S/A145T) <sup>b</sup> = CL31(M44E/K74S/M75Q/S86G/P87S/A145T)

Die Destabilisierung der Proteinfaltung bei CL31 wird offenbar durch die Aminosäuresubstitutionen Gly86Ser und Ser87Pro selbst verursacht, da beide erheblichen Einfluss auf die Konformation des kurzen Schleifenbereichs am unteren Ende der  $\beta$ -Barrel-Faltblattstruktur haben (siehe Abbildung 7A). Mit Gly86 wurde eine kleine, besonders flexible Aminosäure ohne Seitenkette entfernt, wohingegen die starre Iminosäure Prolin an nachfolgender Position eingefügt und damit die Rigidität an dieser Stelle – wenn auch bei insgesamt veränderter Rückgratkonformation – erhöht wurde.

Anhand der überlagerten Kristallstrukturen von C26 und CL31 wird der Einfluss der mit diesen Aminosäuresubstitutionen einhergehenden Konformationsänderung auf die intramolekularen Interaktionen der Seitenketten deutlich (Abbildung 13). Die den kurzen Loop in C26 stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ser87 und Glu91 sowie Gln88 und Glu91 gingen in CL31 verloren und wurden stattdessen durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser86 und dem Polypeptidrückgrat sowie durch eine indirekte, über ein Wassermolekül vermittelte Interaktion zwischen Gln88 und Glu91 ersetzt.



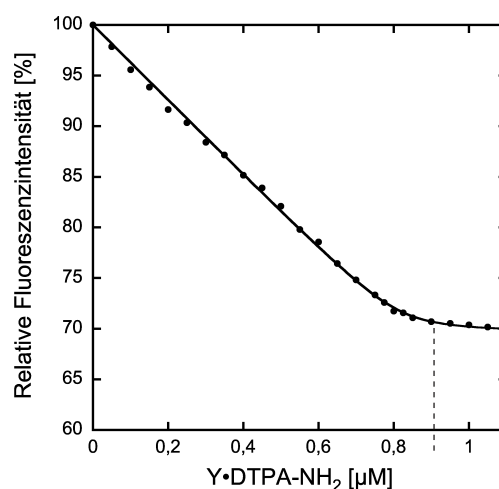
**Abbildung 13.** Detailansicht der Aminosäurepositionen 86/87 in C26 (Kette B; blau) und CL31 (rot), die die thermische Faltungsstabilität der hier untersuchten Anticaline bestimmen. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien angedeutet.

In den darauffolgenden Experimenten wurden die ebenfalls positiven Effekte der Mutationen Ala145Thr und Met44Glu zur thermischen Stabilität aufgegriffen und in der Mutante CL31(M44E/S86G/P87S/A145T) – von nun als CL31d bezeichnet – zusammengeführt (siehe Tabelle 6). Daraus resultierte mit  $T_m = 67,3\text{ °C}$  nicht nur eine dem Anticalin L1 ähnliche Faltungsstabilität, sondern CL31d zeigte zudem eine deutlich höhere Kooperativität des Entfaltungsüberganges und damit sogar höhere Werte für  $\Delta H_m$  und  $\Delta G_U(25\text{ °C})$  als L1.

Schließlich wurde der Einfluss von drei weiteren Aminosäurepositionen auf die Faltungsstabilität von CL31 untersucht. Asp45, Lys74 und Met75 befinden sich im Bereich der Bindungstasche in Loop #1 bzw. Loop #2 (siehe Abbildung 7B) und zeigen – laut der Kristallstruktur von CL31 – ins umgebende Lösungsmittel. Lys74 ist außerdem Teil einer kleinen Gruppe von positiv geladenen Seitenketten (zusammen mit Arg72 und Lys73), die bei der Proteinbiosynthese als potentielle Stopp-Transfersequenz fungieren und damit die Translokation der neu synthetisierten Polypeptidkette über die innere Membranen von *E. coli* behindern können (Fujita *et al.*, 2011). Da die Seitenkette von Lys74 nicht direkt in die Ligandenbindung oder andere stabilisierende Interaktionen involviert ist, wurde stattdessen das ungeladene hydrophile Serin eingefügt. Durch die zusätzliche Substitution der benachbarten Aminosäure Met75 durch Gln sollten zum einen chemische Modifikationen durch Oxidation, wie für lösungsmittel-exponierte Met-Seitenketten bekannt (Pan *et al.*, 2009), und zum anderen unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen vermieden werden. Ausserdem wurde Asp45 gegen Glu substituiert, um ionische Interaktionen mit Arg72 und Lys73 in Folge deren längerer Kohlenwasserstoffkette zu begünstigen. Beide Mutanten, CL31x (CL31(M44E/K74S/M75Q/S86G/P87S/A145T)) und CL31x(D45E), zeigten in thermischen Denaturierungsstudien eine höhere Faltungsstabilität im Vergleich zu CL31d, was sich in einer erhöhten  $T_m$  und, im Fall der Dreifachmutante, sogar in einer deutlich höheren freien Entfaltungsenthalpie äußerte (Tabelle 6).

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie wurden anschließend die Bindungskinetiken der stabilitätsmaturierten Varianten von CL31 – CL31d, CL31x sowie CL31x(D45E) – gegenüber dem Y-DTPA-RNase Konjugat untersucht (Tabelle 7). Der  $K_D$ -Wert von CL31d zeigte sich im Vergleich zu CL31 nur marginal erhöht (Faktor 2). Weiterhin wurde die Affinität von CL31d zum freien, unkonjugierten Liganden Y-DTPA-NH<sub>2</sub> durch Fluoreszenztitration bestimmt. Hierbei nimmt die intrinsische Proteinfluoreszenz, welche hauptsächlich von den aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin herrührt, in Folge der Komplexbildung mit dem Liganden in konzentrationsabhängiger Weise ab und liefert so einen Wert für die Dissoziationskonstante (*Quenching*-Effekt). Die Trp-Seitenketten können selektiv bei einer Wellenlänge von 295 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Für CL31d ergab sich dabei allerdings ein so schwaches Emissionssignal, dass eine Anregungswellenlänge von 280 nm gewählt wurde, bei der sowohl Trp- als auch Tyr-Reste angeregt werden. Anhand des aufgenommenen Emissionsspektrums wurde ein Fluoreszenzmaximum bei 333 nm ermittelt.

Die durch den *Quenching*-Effekt bedingte Abnahme des Fluoreszenzsignals von CL31d erfolgte zunächst linear und zeigte bei einer hohen Ligandenkonzentration ein charakteristisches Sättigungsverhalten bei ca. 30 % der Anfangsfluoreszenz (Abbildung 14). Der durch Kurvenanpassung (Breustedt *et al.*, 2006) ermittelte  $K_D$ -Wert von  $4,6 \pm 1,6$  nM entsprach einer 10-fach geringeren Affinität für das freie Y-DTPA-NH<sub>2</sub> als für das RNase-Konjugat in der SPR-Spektroskopie. Dies ist möglicherweise durch stabilisierende Interaktionen des Anticalins mit dem Trägerprotein RNase bedingt. Ein ähnlicher Effekt wurde für C26 beobachtet ( $K_D = 7,6 \pm 3,2$  nM).



**Abbildung 14. Fluoreszenztitration von CL31d mit Y-DTPA-NH<sub>2</sub>.** Eine gereinigte Proteinlösung (1 µM) in PBS wurde mit dem Liganden – als konzentrierte Stammlösung in 100 mM Ammoniumacetat/Essigsäure-Puffer – schrittweise titriert und die Abnahme der Tyr/Trp Proteinfluoreszenz bei 333 nm nach Anregung bei 280 nm in einem FluoroMax-3 Spektrofluorimeter verfolgt. Zur Bestimmung des  $K_D$ -Wertes wurde die Anfangsfluoreszenz auf 100 % normiert, und die Messwerte wurden durch nicht-lineare Regression angepasst (siehe Abschnitt 2.4.3). Der mathematische Äquivalenzpunkt der Titration ist durch die gestrichelte, senkrechte Linie angedeutet. Die Abweichung vom Sollwert

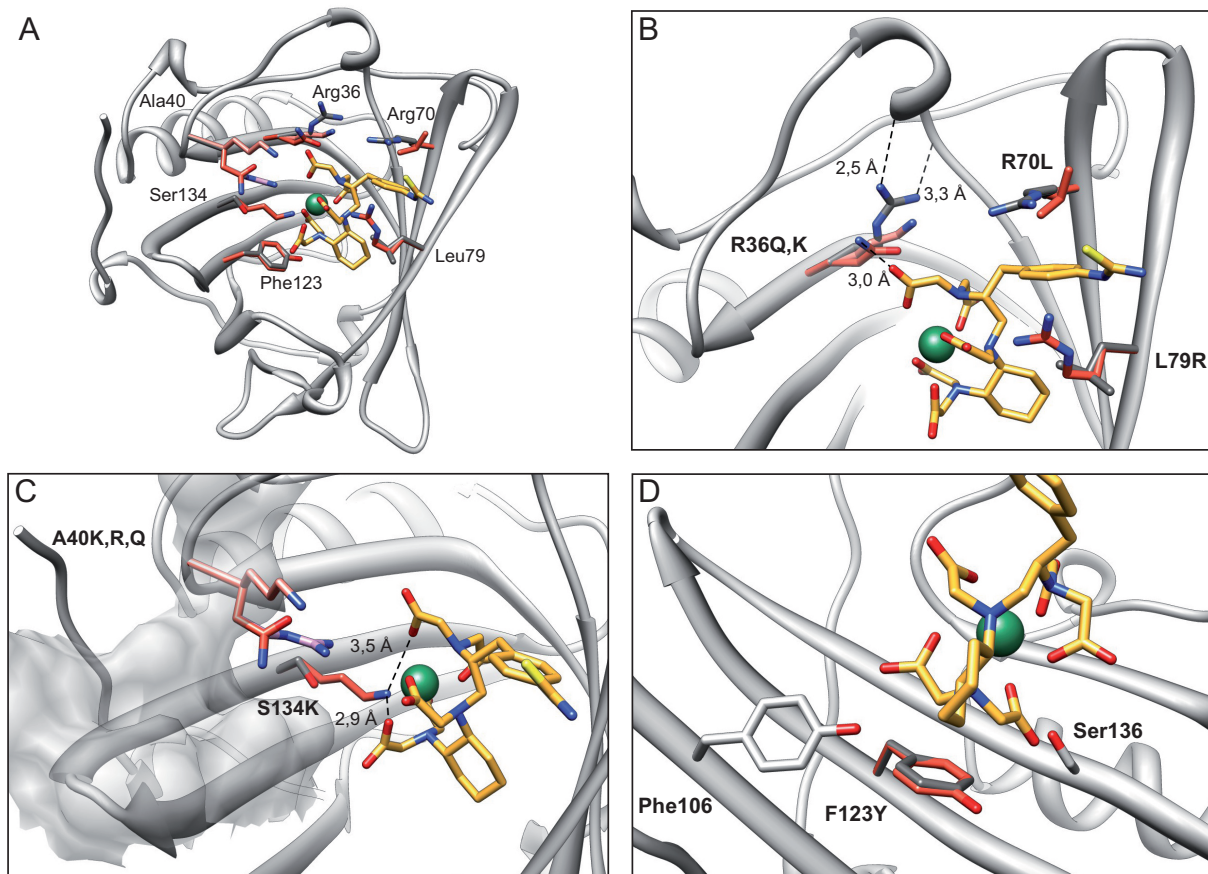
1  $\mu\text{M}$  lässt sich durch kleine Fehler bei der Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen für Protein und/oder Ligand erklären.

Die beiden Mutanten CL31x und CL31x(D45E) zeigten gegenüber CL31d insgesamt eine leichte Erhöhung der Dissoziationsrate in der SPR-Spektroskopie, wobei im Fall der Dreifachmutante ebenfalls die Assoziationsrate vermindert war (Tabelle 7). Eine mögliche Ursache könnte eine veränderte Konformation des Loops #1 durch die Mutation D45E sein, wodurch die Zugänglichkeit der Bindungstasche für den Liganden behindert wäre. Aus diesem Grund wurde die Variante CL31x für den im folgenden beschriebenen rationalen Ansatz zur Verbesserung der Bindungseigenschaften gegenüber Y·DTPA verwendet.

### 3.1.4 Rationale Mutagenese von CL31 zur Erhöhung der Ligandenaffinität

Auf Basis der Kristallstruktur von CL31 und der vorangegangenen Analyse der Struktur/Funktions-Beziehungen der Ligandenbindung wurden sechs Aminosäurepositionen ausgewählt, die durch ihre unmittelbare räumliche Nähe zum Y·DTPA-Komplex in der Lage sind, die Bindungseigenschaften von CL31x zu verbessern (Abbildung 15).

Die Aminosäure Leucin an Position 36 war als Teil der naiven Lcn2-Zufallsbibliothek (Kim *et al.*, 2009) schon sehr früh im Zuge des Selektionsprozesses – nämlich in der Lcn2-Variante Tb7 – durch die geladene Seitenkette Arginin substituiert worden (Abbildung 7B). Überraschenderweise zeigte Arg36 in der apo-Struktur von Tb7.14 in die Anticalin-Bindungstasche hinein. Dagegen wurde diese Seitenkette in den übrigen holo-Anticalinstrukturen regelrecht zur Seite gedrängt und scheint damit nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt sein. Der Austausch von Arg gegen die zwei etwas kürzeren sowie flexibleren Seitenketten Lys bzw. Gln sollte die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen sowie ionische Interaktionen mit dem Liganden ermöglichen (Abbildung 15B). Die Mutanten CL31x(R36K) und CL31x(R36Q) zeigten während der bakteriellen Produktion und Reinigung vergleichbare Eigenschaften wie die Ausgangsvariante CL31x (Tabelle 7). Dagegen offenbarten beide Anticaline in der SPR-Analyse einen erheblichen Affinitätsverlust gegenüber Y·DTPA-RNase. Dieser resultierte hauptsächlich aus einer um den Faktor 12 (R36K) bzw. sogar um den Faktor 137 (R36Q) schnelleren Dissoziationskinetik, während die Assoziationsrate von den Aminosäuresubstitutionen weitgehend unbeeinflusst blieb. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass Arg36 – wenn auch nicht direkt – in stabilisierende Wechselwirkungen für den Ligandenkomplex involviert ist. Der Verlust der beiden Wasserstoffbrückenbindungen zum Polypeptidrückgrat an den Positionen 48 bzw. 50 im Knick des Loops #1 könnte in diesem Zusammenhang zur einer partiellen Loop-Öffnung führen, wodurch die Ligandenfreisetzung erleichtert würde (Abbildung 15B).



**Abbildung 15. Varianten des Anticalins CL31x zur Verbesserung der Bindungseigenschaften gegenüber Y-DTPA.** (A) Blick in die Ligandenbindungstasche von CL31 (grau) mit dem gebundenen Y-DTPA (gelb; Yttrium, grün). Die zur Mutagenese ausgewählten Aminosäurepositionen sind als Stabmodell dargestellt (grau). An diesen Positionen wurden mit der in Chimera implementierten rückgratsabhängigen Rotamerbibliothek (Shapovalov & Dunbrack, 2011) die entsprechende Seitenketten eingefügt. (B) Detailansicht der Positionen Arg36, Arg70 und Leu79. (C) Detailansicht der Positionen Ala40 und Ser134. (D) Detailansicht der Position 123 mit den benachbarten Seitenketten Phe106 und Ser136. Potentielle Wasserstoff- und Salzbrücken sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Des Weiteren ist an Position 70, welche am Rand des Loops #2 und damit am Eingang der Bindungstasche liegt, eine Arg-Seitenkette an der Ligandenbindung beteiligt (Abbildung 15B). Sie ist mit Hilfe ihrer Guanidiniumgruppe in der Lage, durch Kation/ $\pi$ -Interaktion mit der Benzylgruppe des DTPA zu wechselwirken (Dougherty, 1996). Beim Versuch diesen Kontakt durch Einbringen einer Leucin-Seitenkette in eine hydrophobe Wechselwirkung umzuwandeln, verschlechterten sich jedoch sowohl die Produktions- als auch die Ligandenbindungseigenschaften des Anticalins erheblich (Tabelle 7). CL31x(R70L) zeigte vor allem schnellere Dissoziation von Y-DTPA-RNase, wohingegen die Assoziationsrate nahezu unverändert blieb. Diese Beobachtung ist konsistent mit der Tatsache, dass eine schnelle Assoziation im allgemeinen durch intensive elektrostatische Interaktionen gefördert wird. Der Verlust der einzelnen positiven Ladung von Arginin innerhalb der insgesamt stark basischen Ligandenbindungstasche hat offenbar keinen messbaren Effekt.



**Tabelle 7. Bindungskinetiken und biochemischen Charakteristika der CL31-Mutanten aus der rationalen Mutagenese zur Erhöhung von Proteinstabilität und Ligandenaffinität.**

Lcn2-Variante	$k_{on}$ [ $10^6 M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{off}^{\infty}$ [ $10^{-6} s^{-1}$ ]	$K_D^{\infty}$ [nM] <sup>b</sup>	$\tau_{1/2}^{\infty}$ [min] <sup>c</sup>	Ausbeute [mg] <sup>d</sup>	% Aggregat <sup>e</sup>
CL31d	0,195 ± 0,001	106 ± 0,5	0,543 ± 0,003	109	13,5	2,9
CL31x	0,210 ± 0,001	178 ± 0,6	0,848 ± 0,005	65	12,0	1,8
CL31x(D45E)	0,115 ± 0,001	192 ± 0,6	1,67 ± 0,02	60	11,5	1,0
CL31x(R36K)	0,121 ± 0,001	2160 <sup>a</sup> ± 7,9	17,9 ± 0,2	5	9,8	2,0
CL31x(R36Q)	0,162 ± 0,004	24400 <sup>a</sup> ± 264	150,6 ± 4,1	0,5	14,2	1,6
CL31x(A40Q)	0,207 ± 0,001	245 ± 0,3	1,183 ± 0,006	47	36,2	0,8
CL31x(A40K)	0,246 ± 0,001	120 ± 0,3	0,488 ± 0,002	96	14,2	1,8
CL31x(A40R)	0,180 ± 0,001	126 ± 0,2	0,621 ± 0,004	92	8,3	2,6
CL31x(R70L)	0,112 ± 0,001	3800 <sup>a</sup> ± 8,6	33,9 ± 0,3	3	4,6	1,9
CL31x(L79R)	0,239 ± 0,001	342 ± 0,6	1,43 ± 0,01	34	41,1	0,7
CL31x(F123Y)	0,390 ± 0,006	350 ± 1,7	0,897 ± 0,014	33	10,4	2,4
CL31x(S134K)	0,115 ± 0,001	334 ± 0,9	2,90 ± 0,03	35	6,5	2,2

<sup>a</sup> Dissoziationskonstante aus Messungen mit einer Dissoziationszeit von 900 s. <sup>b</sup>  $K_D^{\infty}$  als Quotienten  $k_{off}^{\infty}/k_{on}$ . <sup>c</sup>  $\tau_{1/2}^{\infty}$  aus  $\ln(2)/k_{off}^{\infty}$ . <sup>d</sup> Proteinausbeute pro 2 L Kulturvolumen nach der SA-Chromatographie aus dem Absorptionswert der Proteinlösung bei 280 nm. <sup>e</sup> Verhältnis in der SEC zum monomeren Anteil (= 100 %).

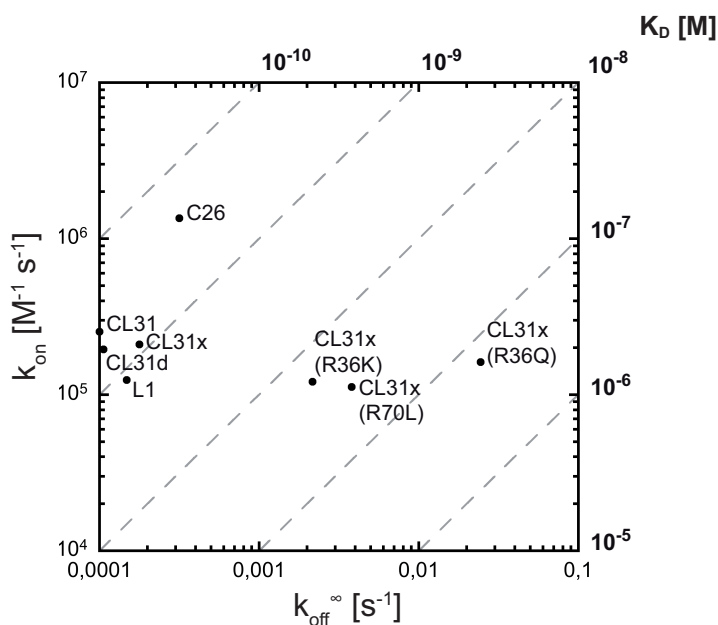
Eine weitere Möglichkeit die Bindung von Y·DTPA anhand von Wechselwirkungen mit dessen Benzylgruppe zu stabilisieren, liegt auf dessen anderer Seite, gegenüber Arg70, an Position Leu79 (Abbildung 15B). Durch Einbringen der basischen Arg-Seitenkette an dieser Stelle sollte eine neue Kation/ $\pi$ -Interaktion erzeugt werden. Dies gelang jedoch nicht, da CL31x(L79R) in der SPR-Analyse eine im Vergleich zu CL31x halbierte  $\tau_{1/2}^{\infty}$  aufwies (Tabelle 7). Interessanterweise begünstigte diese Mutation die bakterielle Proteinsynthese, da eine vierfach höhere Ausbeute bei äußerst geringem Aggregatanteil erzielt wurde.

Wie bei den ersten Me·DTPA-spezifischen Anticalinen (Kim *et al.*, 2009) wurde auch bei der Kristallstruktur von CL31 in unmittelbarer Nähe zur Position 40 eine große Lücke zwischen der Proteinoberfläche und dem gebundenen Y·DTPA beobachtet (Abbildung 15C). In dem natürlichen Lipocalin Lcn2 ist dieser Raum durch den wesentlich größeren Liganden Fe<sup>3+</sup>-Enterobactin besetzt (Goetz *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2003). Die im Vergleich zu Ala40 voluminöseren Seitenketten von Gln, Arg und Lys könnten Wasserstoffbrückenbindungen zu den Carboxylatgruppen des Liganden und, im Fall von Lys, auch van der Waals Wechselwirkungen der aliphatischen Kohlenwasserstoffkette mit den benachbarten Seitenketten hervorrufen. Tatsächlich bewirkten die positiven Ladungen von Arg und Lys im Vergleich zu CL31x eine leichte Verbesserung der Dissoziationskinetik. Im Gegensatz dazu dissoziierte der Komplex aus CL31x(A40Q) und Y·DTPA-RNase doppelt so schnell, wenngleich bei dieser Mutante die Proteinausbeute fast verdreifacht war (Tabelle 7).

An Position 134 sollte, wie auch schon bei Ala40, eine längere Seitenkette den direkten Kontakt zu Y·DTPA – hier durch Wasserstoffbrückenbindungen zu zwei Carboxylatgruppen – herstellen und so

die Bindung stabilisieren (Abbildung 15C). Die Mutante CL31x(S134K) wies jedoch eine schnellere Dissoziation und einen um den Faktor 3,6 erhöhten  $K_D$ -Wert auf (Tabelle 7).

Abschließend wurde an der Position Phe123 durch die konservative Mutation zu Tyr eine funktionelle Hydroxylgruppe nahe der hydrophoben Kernregion des Anticalins eingefügt (Abbildung 15D). Erstaunlicherweise hatte diese Substitution eine geringfügig schnellere Assoziationskinetik zur Folge. Da aber die Dissoziation gleichermaßen beschleunigt wurde, hatte dies praktisch keinen positiven Effekt auf den  $K_D$ -Wert (Tabelle 7).



**Abbildung 16. Graphische Darstellung von Bindungskinetiken ausgewählter Y-DTPA-spezifischer Anticaline ermittelt durch SPR-Spektroskopie.** Sowohl  $k_{on}$  und  $k_{off}^{\infty}$  als auch der sich aus dem Quotienten  $k_{off}^{\infty}/k_{on}$  ergebende  $K_D$ -Wert wurden unter Verwendung von logarithmisch skalierten Achsen gegeneinander aufgetragen.

Zusammenfassend betrachtet führte leider keiner der Aminosäureaustausche in CL31x zur Erhöhung der kinetischen Stabilität zwischen dem Anticalin und Y-DTPA. Dennoch lieferte die rationale Mutagenese zusammen mit der vergleichenden Strukturanalyse von C26 und CL31 (siehe Abschnitt 3.1.4) wertvolle Informationen über die Bedeutung einzelner Seitenketten für die Ligandenbindung wie auch für die Proteinsynthese. Diese können möglicherweise auf Anticaline mit anderer Ligandenspezifität übertragen werden. Das aus dem zufallsbasierten Selektionsprozess hervorgegangene Anticalin CL31 wies somit – insbesondere im Hinblick auf eine langsame Dissoziationskinetik – praktisch optimale Bindungseigenschaften auf (Abbildung 16). Diese konnten mittels rationaler Mutagenese um eine höhere thermische Faltungsstabilität sowie günstigere biochemische Eigenschaften (Homogenität, höhere Ausbeute, wenig Aggregat) ergänzt werden. Zur Konstruktion bifunktioneller Fusionsproteine für die zielgerichtete Tumoradressierung mit dem Ziel des *Pretargetings* (siehe Abschnitte 3.2 und 3.3) wur-

de daher CL31d verwendet, da es über eine etwas bessere Komplexstabilität als CL31x bei ähnlicher Proteinstabilität verfügt (Abbildung 16).

### **3.2 Konstruktion von bifunktionellen Duocalinen mit Affinität für ED-B und Me-DTPA**

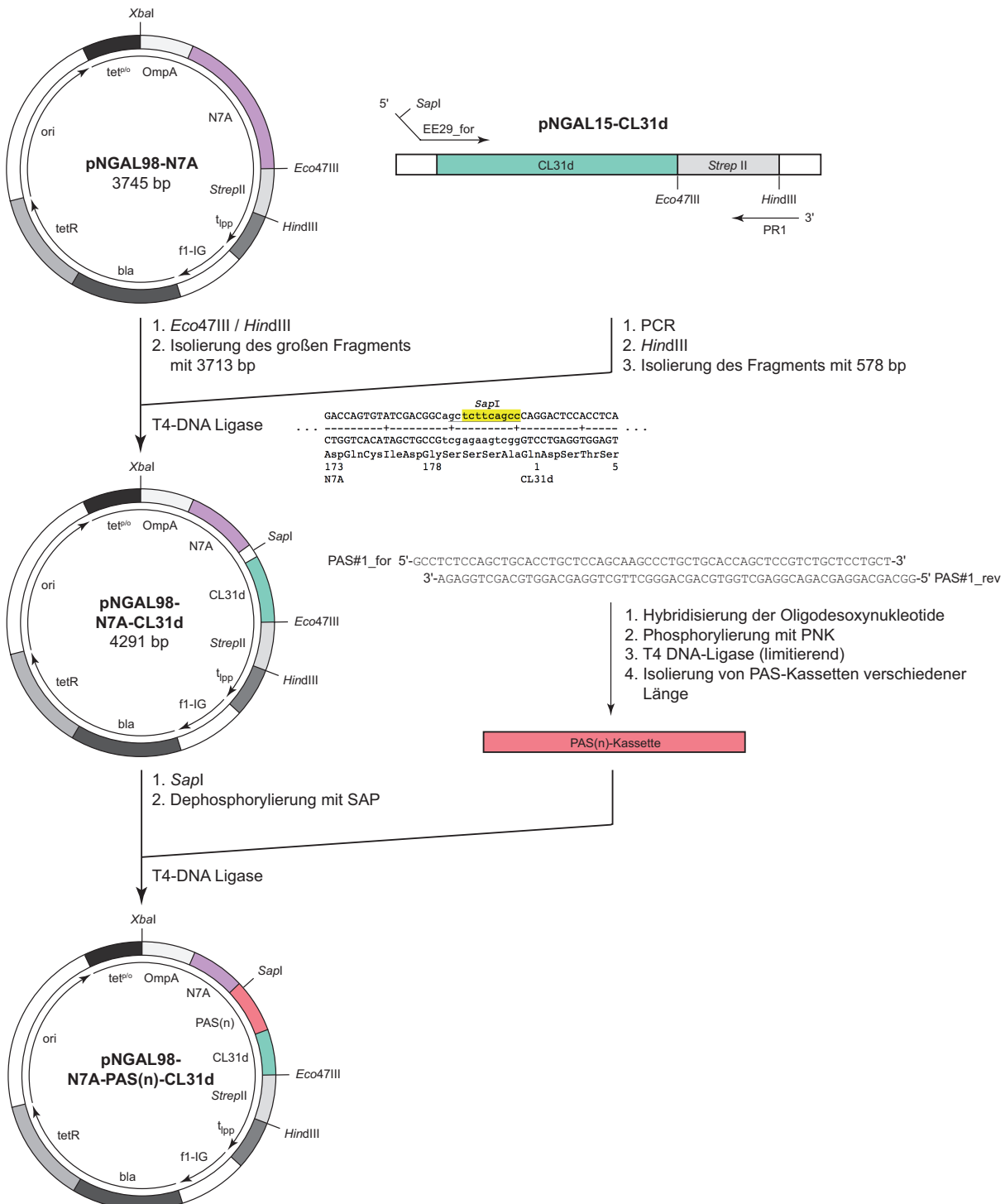
Die Anwendung des Me-DTPA-bindenden Anticalins CL31d in der Nuklearmedizin sollte unter anderem in Form eines Duocalins realisiert werden. Als Fusionspartner wurde das im Labor von Prof. Skerra generierte Anticalin N7A ausgewählt (Gebauer *et al.*, 2013), welches mit nanomolarer Affinität die Spleißform von Fibronectin mit dem ED-B erkennt. Das während der Neoangiogenese verstärkt exprimierte ED-B-positive Fibronectin konnte immunhistochemisch bereits in diversen soliden Tumoren nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 1.2.1) und gilt damit als vielversprechender diagnostischer und therapeutischer Tumormarker.

Die beiden Duocaline N7A-CL31 und CL31-N7A, jeweils verknüpft durch einen Linker bestehend aus den Aminosäuren Gly-Ala-Val-Asp-Ala-Asn-Ser (GAVDANS), waren bereits zuvor konstruiert, periplasmatisch in *E. coli* produziert und mittels *Sandwich*-ELISA auf die Fähigkeit zur simultanen Bindung beider Liganden geprüft worden (Gebauer, 2013). Beide Duocaline konnten allerdings nur in geringer Konzentration – bei gleichzeitigem Auftreten von Disulfidisomeren – aus *E. coli* gewonnen werden (ca. 100 µg pro L Kultur; persönliche Mitteilung von Dr. M. Gebauer). Daher sollte hier der Einfluss eines flexiblen Linkerpeptids bestehend aus den Aminosäuren Pro, Ala und Ser (PAS-Polypeptid) auf die Proteinausbeute, biochemische Reinheit und Ligandenbindungsfähigkeit untersucht werden. Dieses konformationell ungeordnete Polypeptid wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Skerra entwickelt und erhöht als N- oder C-terminaler Fusionspartner mit einem biologisch aktiven Bindeprotein dessen Plasma-Halbwertszeit *in vivo* (Schlapschy *et al.*, 2013). Ein Vorteil des biologischen PAS-Polypeptids liegt in seinem repetitiven Aufbau, wodurch mittels einfacher Klonierungstechniken die Länge des Linkers variiert werden kann.

#### **3.2.1 Konstruktion von Vektoren zur periplasmatischen Sekretion von Duocalinen mit verschiedenen PAS-Linkern in *E. coli***

Zur Produktion der Duocaline N7A-CL31d und CL31d-N7A mit verschiedenen PAS-Linkern war die Konstruktion neuer Expressionsvektoren erforderlich, da die zur Verfügung stehenden Plasmide keine zur Insertion der PAS-Sequenzen geeignete Restriktionsschnittstelle trugen. Als Vektorrückgrat für N7A-CL31d wurde pNGAL98-N7A verwendet, aus dem zunächst durch Restriktionsverdau mit *Eco*47III und *Hind*III das *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel herausgeschnitten wurde (Abbildung 17). Das Strukturgen für CL31d als Fusionsprotein mit dem *Strep*-tag II wurde durch PCR mit den Oligodesoxynukleotiden EE29\_for und PR1 mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase aus dem Expressionsvektor pNGAL15-CL31d amplifiziert. Das anschließend durch einen *Hind*III-Restriktionsverdau verkürzte PCR-Fragment mit 578 bp wurde mit dem Vektorfragment ligiert. Mit dem PCR-Primer, der zur Li-

gierung an der *Eco47III*-Schnittstelle diente, wurde dabei eine *SapI*-Schnittstelle generiert (Abbildung 17). Das erhaltene Expressionskonstrukt pNGAL98-N7A-CL31d wurde durch Sequenzanalyse überprüft.



**Abbildung 17. Konstruktion der Vektoren zur periplasmatischen Produktion des Duocalins N7A-CL31d mit verschiedenen PAS-Linkern.** Die *SapI*-Erkennungssequenz (unterstrichen) wird aus dem 5'-Rest der *Eco47III*-Erkennungssequenz (agc) und dem überhängenden 5'-Ende des Oligodesoxynukleotids EE29\_for (gelb markiert) gebildet.

Durch Linearisierung des Vektors an der *SapI*-Schnittstelle konnten anschließend Genkassetten für PAS-Linker der Länge  $n = 0, 60, 100$  inseriert werden. Die Konstruktion des Expressionsvektors für CL31d-PAS(n)-N7A erfolgte nach gleichem Schema, wobei N7A mit Hilfe von EE29\_for und PR1 aus pNGAL98-N7A durch PCR amplifiziert und nach *HindIII*-Verdau in pNGAL15-CL31d inseriert wurde. Für Erläuterungen zu den regulatorischen Elementen siehe **Abbildung 8**. (Der Buchstabe n repräsentiert die Anzahl der Aminosäuren einer PAS-Kassette.)

Der auf diese Weise entstandene PAS(0)-Linker zwischen den Anticalin-Strukturgenen von N7A-CL31d wird durch die von der *SapI*-Erkennungssequenz codierten Aminosäuren Ser<sub>3</sub>Ala gebildet (Abbildung 18, pink) und umfasst zudem die ersten drei Aminosäuren von CL31d (Gln-Asp-Ser) (Abbildung 18, grün). Aufgrund ihrer konformationellen Flexibilität war für diese drei Aminosäuren keine Elektronendichte in der Kristallstruktur von CL31 (PDB: 4IAX) detektierbar. Im Fall des Duocalins CL31d-N7A besteht der flexible PAS(0)-Linker im Prinzip nicht nur aus sieben sondern sogar acht Aminosäuren, da im Proteinkristall von N7A (PDB: 4GH7) die ersten vier Aminosäuren flexibel erscheinen (Abbildung 18, blau).



**Abbildung 18. Aminosäuresequenz des Duocalins N7A-CL31d.** Markiert sind die Bereiche der acht konservierten  $\beta$ -Faltblattstränge (A-H), der vier strukturell variablen Loops (#1-4) sowie des *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels. Der kurze Peptidlinker Ser<sub>3</sub>Ala (pink) zwischen den Anticalinen entsteht durch Einfügen der *SapI*-Restriktionsschnittstelle, die zur Insertion der PAS-Genkassette diente. Die drei bzw. vier Aminosäuren, die aufgrund ihrer Flexibilität keine Elektronendichte in den Kristallstrukturen von N7A (PDB: 4GH7) und CL31 (PDB: 4IAX) zeigten und damit ebenfalls zum PAS(0)-Linker von N7A-CL31d bzw. CL31d-N7A gehören, sind in grün bzw. blau dargestellt.

Nach Linearisierung des Vektors pNGAL98-N7A-CL31d durch *SapI*-Restriktionsverdau und anschließende Dephosphorylierung mit der Alkalischen Phosphatase aus Garnelen (SAP) wurden PAS-Genkassetten verschiedener Längen ( $n = 60, 100$ ) inseriert. Diese waren aus einem Hybridisierungsansatz entsprechender Oligodesoxynukleotide isoliert worden (siehe Abschnitt 2.2.5.5). Zur Identifizierung positiver Klone mit dem gewünschten PAS-Linker wurde ein analytischer Restriktionsverdau durchgeführt. Positive Kandidaten wurden zudem einer Sequenzanalyse unterzogen (siehe Abschnitt 2.2.5.7). Die Konstruktion des Vektors zur Expression von CL31d-PAS(n)-N7A erfolgte analog, wo-

bei pNGAL15-CL31d als Vektorrückgrat diente und die genetische Information von N7A aus dem Vektor pNGAL98-N7A amplifiziert wurde.

### 3.2.2 Periplasmatische Produktion und Reinigung der Duocaline

Die insgesamt sechs Duocaline wurden bei 22 °C in *E. coli* TG1-F<sup>-</sup> im 2 L-Schüttelkolben nach Induktion bei OD<sub>550</sub> = 0,5 mit aTc für 3 h produziert. Nach Präparation des periplasmatischen Zellextrakts wurde der lösliche Anteil durch SA-Chromatographie bis zur Homogenität gereinigt. Ein Vergleich der erzielten Ausbeuten zeigte, dass weniger die Anordnung der Anticaline im Duocalin sondern vielmehr die jeweilige Linkerlänge einen deutlichen Einfluss auf die Proteinproduktion hat (Tabelle 8). Bei beiden Duocalin-Orientierungen konnte durch den PAS(60)-Linker die Ausbeute im Vergleich zu den unmodifizierten Duocalinen um das ca. 2,5-fache auf ca. 800 µg pro 2 L Kulturvolumen gesteigert werden. Die Verlängerung des PAS-Polypeptids auf 100 Aminosäuren führte dagegen zu keiner weiteren Verbesserung der Ausbeute.

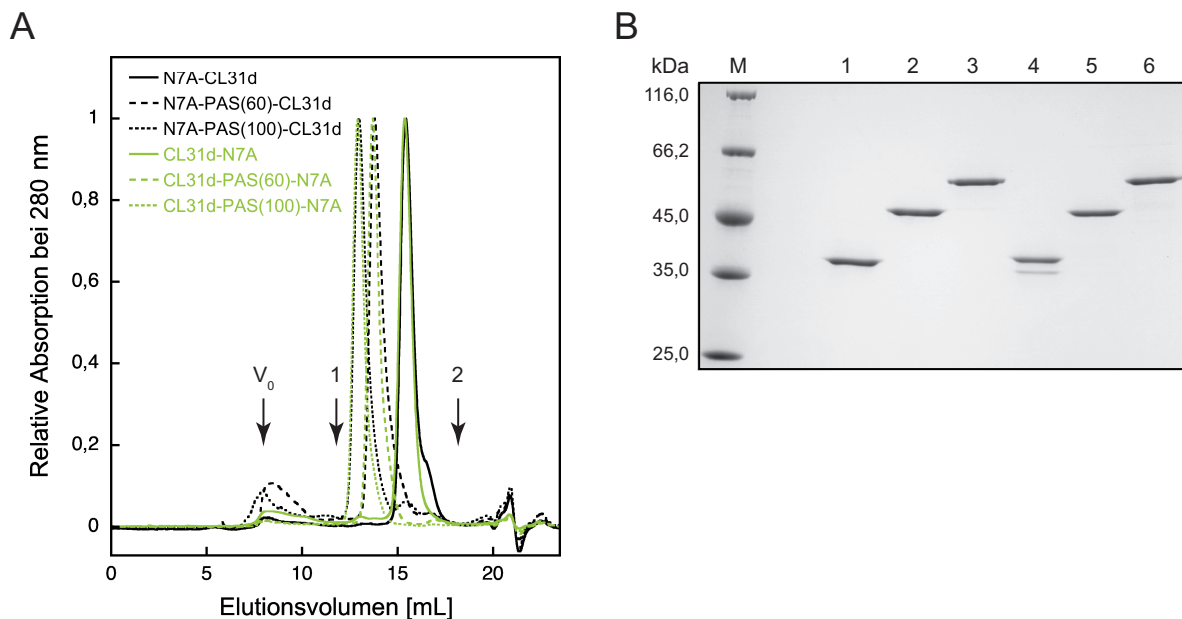
**Tabelle 8. Proteinbiochemische Charakteristika der periplasmatisch produzierten Duocaline.**

	MM [kDa] <sup>a</sup>	MM-SEC [kDa] <sup>b</sup>	Ausbeute [nmol / mg] <sup>c</sup>
<b>N7A-CL31d</b>	42609,3	43,3	8,4 / 0,36
<b>N7A-PAS(60)-CL31d</b>	47564,8	87,6	15,8 / 0,75
<b>N7A-PAS(100)-CL31d</b>	50868,5	124,7	9,0 / 0,46
<b>CL31d-N7A</b>	42609,3	44,3	6,6 / 0,28
<b>CL31d-PAS(60)-N7A</b>	47564,8	91,8	17,0 / 0,81
<b>CL31d-PAS(100)-N7A</b>	50868,5	128,6	9,4 / 0,48

<sup>a</sup> Molekülmasse (MM) ermittelt aus der Primärsequenz des Proteins (ProtParam; [www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

<sup>b</sup> Anhand des Elutionsvolumens in der SEC kalkulierte apparente MM. <sup>c</sup> Berechnet für 2 L Kulturvolumen nach SA-Chromatographie auf Basis der A<sub>280</sub> der Proteinlösung.

Die SEC-Analyse der mittels SA-Chromatographie gereinigten Duocaline ergab, dass lediglich 5–10 % der Proteinpräparation als Aggregat und der Hauptteil als Monomer vorlag (Abbildung 19). Des Weiteren wurde die Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens infolge der ungeordneten Struktur des PAS-Linkers deutlich. Die Duocaline zeigten eine von der Anordnung der Anticaline unabhängige apparente Molekülmasse, welche für PAS(60) um den Faktor 2 und für PAS(100) um den Faktor 2,5 im Vergleich zur jeweiligen rechnerischen Masse erhöht war (Tabelle 8). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden in der SDS-PAGE leichte Anzeichen von Disulfidisomerbildung insbesondere bei den CL31-N7A Duocalin-Varianten in Form von mehreren, schwachen Banden mit leicht erhöhter Mobilität beobachtet (Abbildung 19B).



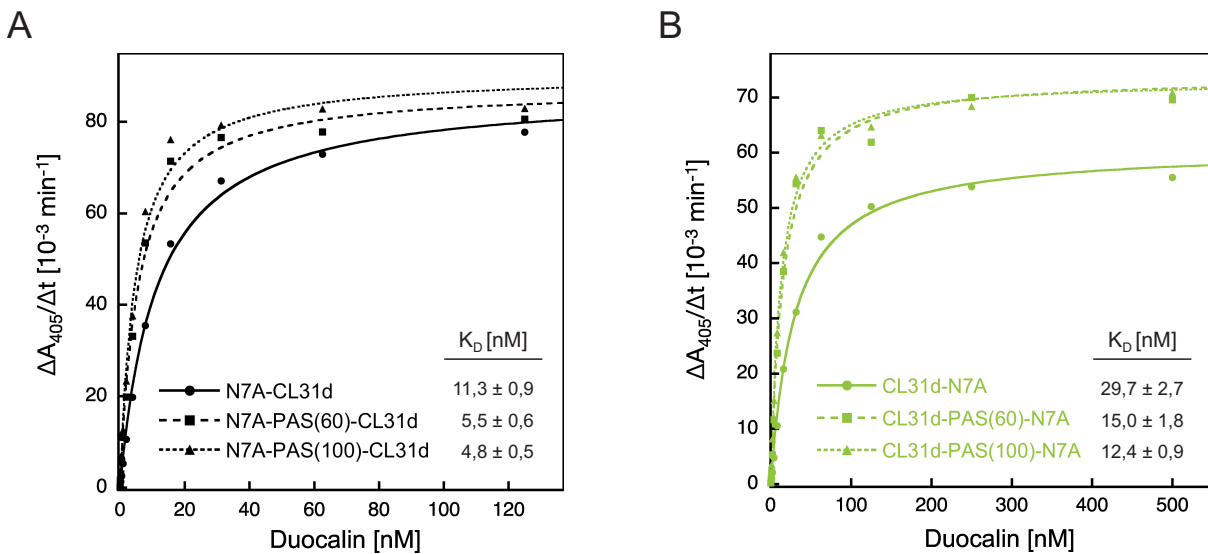
**Abbildung 19. Biochemische Analyse der in *E. coli* produzierten Duocaline.** (A) Nach Isolierung der Proteine durch SA-Chromatographie wurde eine SEC an einer Superdex 200 HR 10/30 (Bettvolumen: 24 mL) in 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA durchgeführt. Standardproteine: 1 = ADH (150 kDa), 2 = Carboanhydrase (29 kDa).  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (B) SDS-PAGE der gereinigten Proteine nach der SEC: N7A-CL31d (Spur 1), N7A-PAS(60)-CL31d (Spur 2) und N7A-PAS(100)-CL31d (Spur 3) sowie CL31d-N7A (Spur 4), CL31d-PAS(60)-N7A (Spur 5) bzw. CL31d-PAS(100)-N7A (Spur 6), alle unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

### 3.2.3 Nachweis der bispezifischen Bindungsaktivität im ELISA

Die gereinigten Proteine wurden in einem *Sandwich*-ELISA im Hinblick auf ihr bispezifisches Ligandenbindungsverhalten untersucht. Das rekombinante Fibronectin-Fragment Fn7B8-His<sub>6</sub> (Gebauer *et al.*, 2013), kurz Fn7B8, wurde dafür auf einer MaxiSorp-Platte adsorbiert. Nach Blockierung wurden die Duocaline jeweils in einer Konzentrationsreihe appliziert, und anschließend deren Bindung durch Zugabe des Doppelkonjugats Y·DTPA-RNase-DIG nachgewiesen (siehe Abschnitt 2.3.9). Zur Quantifizierung wurde ein DIG-bindendes Fab-Fragment als Konjugat mit Alkalischer Phosphatase zugegeben, welche schließlich die chromogene Reaktion von *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) zum gelben *p*-Nitrophenolat katalysierte.

Für alle sechs Duocaline wurde eine zeitabhängige Signalentwicklung beobachtet, die einer ELISA-typischen Sättigungskurve entsprach (Abbildung 20). Damit zeigten alle Proteine bispezifische Bindungsaktivität, wobei die drei N7A-CL31d-Varianten im direkten Vergleich zu der jeweiligen CL31d-N7A-Variante eine ca. dreifach höhere Affinität gegenüber Fn7B8 aufwiesen, wie durch Kurvenanpassung der Konzentrationsreihe ermittelt wurde (siehe Abschnitt 2.3.9). Unabhängig von der Anordnung der verknüpften Anticaline ergab sich zudem eine positive Korrelation zwischen der Ligandenaffinität und der PAS-Länge. So bewirkte der PAS(100)-Linker jeweils eine Erhöhung der Duocalin-Affinität gegenüber Fn7B8 um den Faktor 2,4. Die Dissoziationskonstanten von N7A-PAS(60)-CL31d

und N7A-PAS(100)-CL31d zur Erkennung von Fn7B8 entsprachen nahezu dem Wert des isolierten Anticalins N7A ( $K_D = 1,76 \text{ nM}$ ) (Gebauer *et al.*, 2013).



**Abbildung 20. Sandwich-ELISA zur Untersuchung der simultanen Ligandenbindung der Duocaline.** Nach Beschichtung der Vertiefungen einer MaxiSorp-Platte mit Fn7B8 erfolgte die Applikation einer Konzentrationsreihe des jeweiligen Duocalins. Gebundenes Protein wurde durch Zugabe des Liganden für CL31d als Doppelkonjugat Y-DTPA-RNase-DIG sowie eines anti-DIG Fab-AP-Konjugats anschließend nachgewiesen. Die chromogene Reaktion wurde bei 405 nm über 15 min verfolgt und die Signaländerung gegen die eingesetzte Duocalin-Konzentration aufgetragen. Die Kurvenanpassung zur Ermittlung der Duocalin-Konzentration bei halb-maximaler Sättigung erfolgte wie in Abschnitt 2.3.9 beschrieben.

Aufgrund dessen sowie der im vorherigen Abschnitt 3.2.2 beobachteten Tendenz der CL31d-N7A-Varianten zur Ausbildung von Disulfidisomeren wurden die nachfolgenden Studien mit den Varianten von N7A-CL31d durchgeführt.

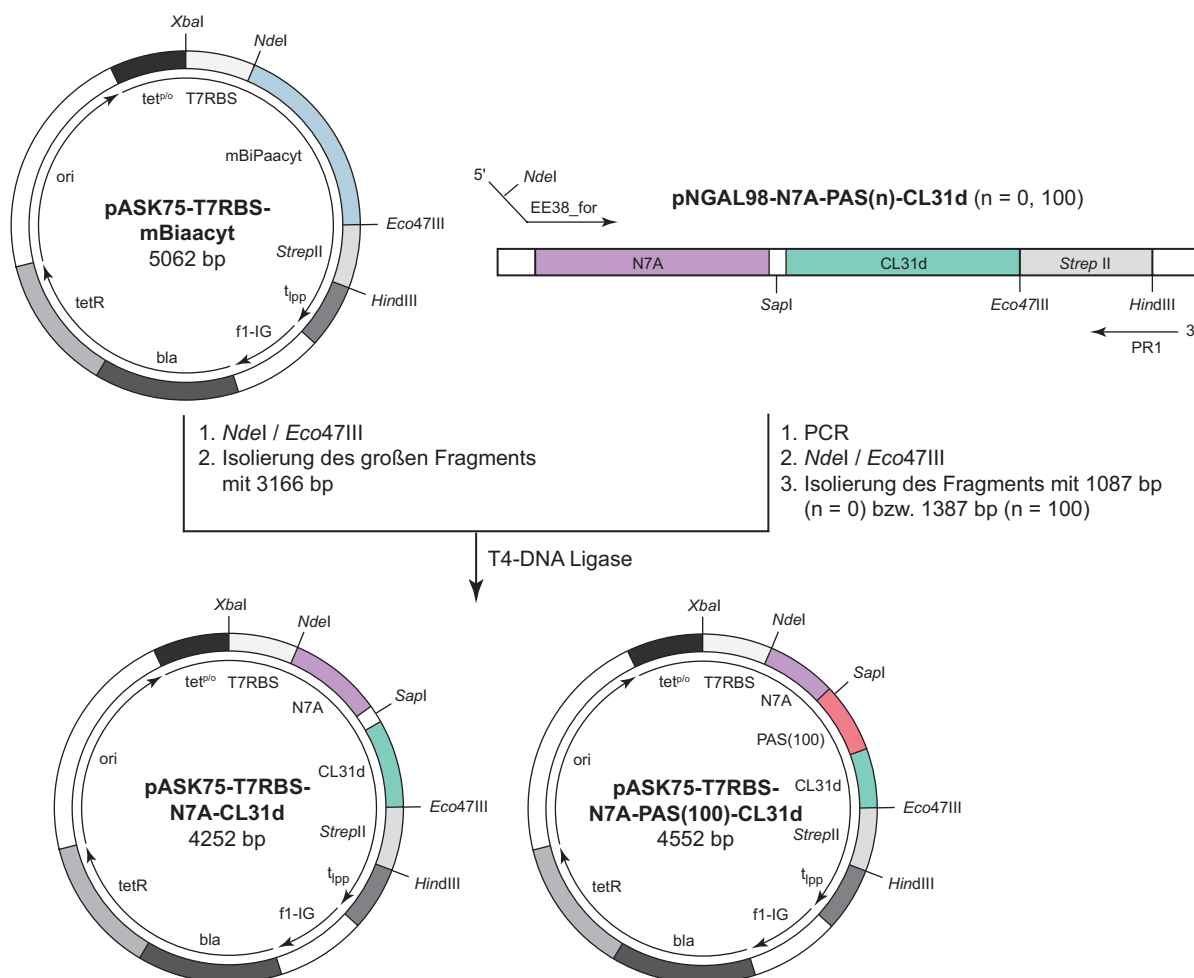
### 3.2.4 Konstruktion von Vektoren zur cytoplasmatischen Biosynthese von Duocalinen

Zwar konnte die Ausbeute an monodispersen und bindungsaktivem Duocalin durch Verwendung eines PAS-Linkers erhöht werden (siehe Abschnitt 3.2.2), jedoch lag dieser Effekt gerade im Hinblick auf die Evaluierung der Proteinwirksamkeit *in vivo*, bei der in der Regel größere Mengen benötigt werden, hinter den Erwartungen zurück. Möglicherweise ist die bisher verfolgte Sekretion der Polypeptidkette ins Periplasma ein ausbeutelimitierender Faktor, weshalb nun das bakterielle Cytoplasma als Kompartiment zur Produktion der Duocaline verwendet wurde.

Zur cytoplasmatischen Produktion wurde ein Derivat des Vektors pASK75 (Skerra, 1994) verwendet, das statt dem Genabschnitt für das OmpA-Signalpeptid nur das für die Aminosäure Methionin codierende Startkodon ATG vor der Klonierungsschnittstelle enthält. Zudem schließt sich bei diesem pASK75-Derivat nach dem *tetA* Promotor die Erkennungssequenz der Ribosomenbindungsstelle für



die T7 RNA-Polymerase (T7RBS) an, um eine effizientere Translationsinitiation zu erreichen (Olins *et al.*, 1988).



**Abbildung 21.** Klonierung der Vektoren zur cytoplasmatischen Produktion der Duocaline N7A-CL31d und N7A-PAS(100)-CL31d. Die regulatorischen Elemente der Vektoren mit Ausnahme der Ribosomenbindungsstelle für die T7 RNA-Polymerase (T7RBS) wurden bereits in **Abbildung 8** erläutert.

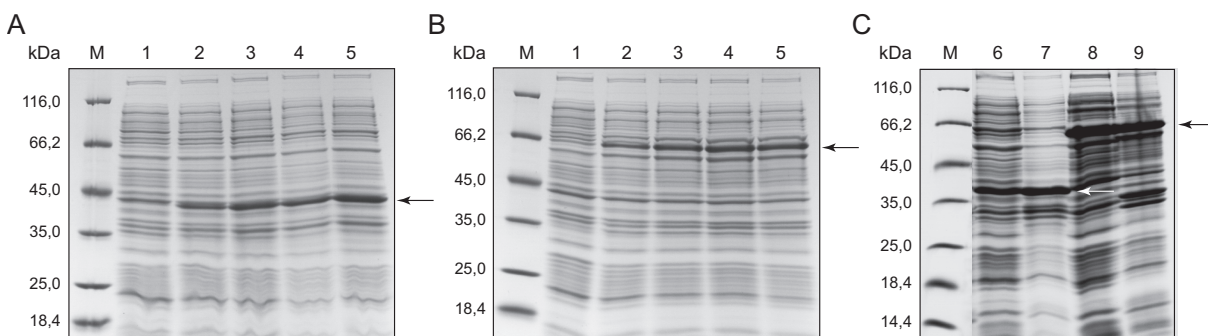
Die kodierenden Regionen für N7A-CL31d bzw. N7A-PAS(100)-CL31d mit C-terminalem *Strep*-tag II wurden aus den in Abschnitt 3.2.1 klonierten periplasmatischen Expressionsvektoren mit den Oligodesoxynukleotiden EE38\_for und PR1 mit Hilfe der *Taq* DNA-Polymerase amplifiziert. Dabei wurde jeweils am 5'-Ende eine *NdeI*-Restriktionsschnittstelle zur anschließenden Subklonierung auf pASK75-T7RBS eingeführt (Abbildung 21). Da EE38\_for zu den ersten 12 Basen der beiden im Tandem angeordneten Anticalin-Genabschnitte komplementär ist, führte die PCR-Amplifikation zu einem DNA-Fragment entsprechend dem Duocalin (1087 bp) sowie einem weiteren, kleineren DNA-Fragment (550 bp), welches bloß dem Genabschnitt von CL31d entsprach. Das durch Agarose-Gelelektrophorese isolierte größere Duocalin-Genfragment wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit

*NdeI* und *Eco47III* unterzogen und dann mit dem ebenso geschnittenen Vektor ligiert. Die resultierenden Expressionsplasmide wurden im codierenden Bereich durch DNA-Sequenzierung analysiert.

### 3.2.5 Cytoplasmatische Produktion und Reinigung der Duocaline

Das typischerweise im Cytoplasma von *E. coli* vorherrschende reduzierende Milieu verhindert die effiziente Ausbildung von Disulfidbrücken in der sich faltenden Polypeptidkette. Für die korrekte Faltung und damit für die Ligandenbindungsfähigkeit der Anticaline ist jedoch die Anwesenheit der strukturell konservierten Disulfidbrücken unabdingbar. Daher erfolgte die Produktion der Duocaline in *E. coli* Origami B-Zellen, in denen die Gene für die Thioredoxin-Reduktase (*trxB*) und die Glutathion-Reduktase (*gor*) mutiert waren, was zu einem oxidierenden cytoplasmatischen Milieu führt (Prinz *et al.*, 1997).

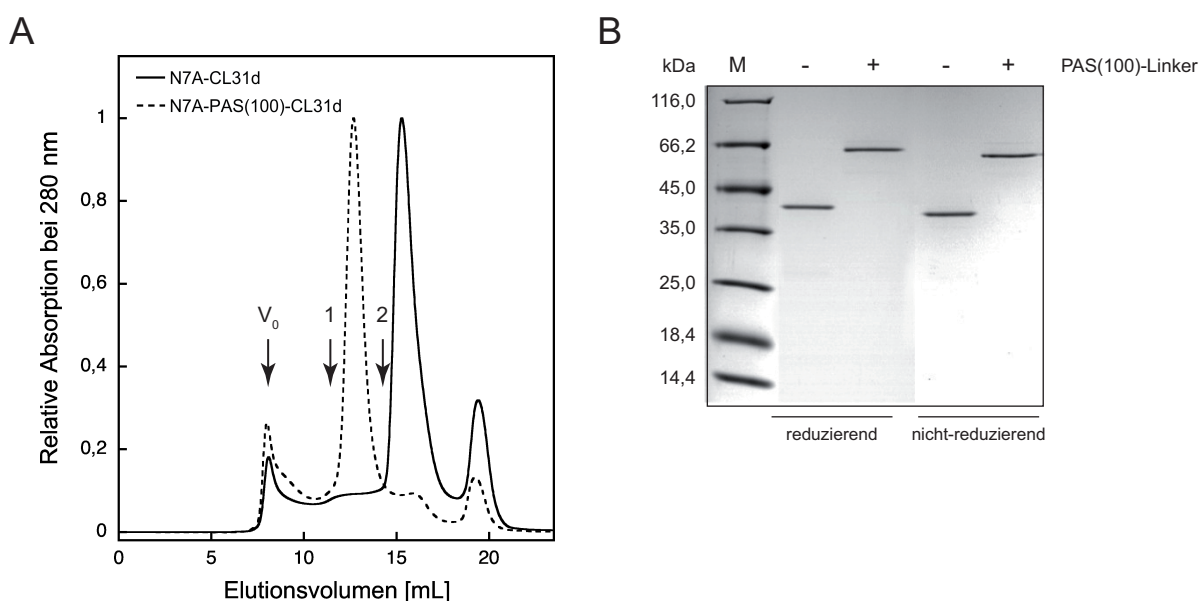
In einem Pilotexperiment wurden die mit dem jeweiligen Duocalin-Expressionsplasmid transformierten Origami B-Zellen in 50 mL 2xYT/Amp-Medium bis  $OD_{550} = 0,5$  bei 30 °C kultiviert und anschließend die Proteinproduktion für 4 h induziert. Dabei konnte im zeitlichen Verlauf die Intensitätszunahme einer Proteinbande bei ca. 43 kDa für N7A-CL31d bzw. bei ca. 60 kDa für N7A-PAS(100)-CL31d in der SDS-PAGE-Analyse der Gesamtzellextrakte von Origami B beobachtet werden (Abbildung 22).



**Abbildung 22. SDS-PAGE-Analyse der cytoplasmatischen Produktion von N7A-CL31d (A) und N7A-PAS(100)-CL31d (B) in *E. coli* Origami B.** (A, B) Es wurden Gesamtzellextrakte vor der Induktion (Spur 1), sowie 1 h (Spur 2), 2 h (Spur 3), 3 h (Spur 4) und 4 h (Spur 5) nach der Induktion analysiert. (C) Die Zellen wurden mechanisch aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde ein Aliquot des Überstandes von N7A-CL31d (Spur 6) und N7A-PAS(100)-CL31d (Spur 8) sowie des Zellsediments (Spur 7 bzw. Spur 9) unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE untersucht, um so den löslichen Proteinanteil im Verhältnis zur Gesamtmenge des rekombinanten Proteins abzuschätzen. Die Pfeile markieren die Laufweite der durch Induktion mit aTc entstandenen jeweiligen Produktbande.

Nach mechanischem Gesamtzellaufschluss in einem *French Press*-Homogenisator und Zentrifugation wurden Aliquots des Zellsediments, welches Zelltrümmer und unlösliche Proteine enthält, sowie des Überstandes in äquivalenter Menge durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 22C). Bei beiden Duocalinen konnte in der Fraktion des löslichen Proteinanteils (Spuren 6, 8) eine prominente Bande bei ent-

sprechender Molekülmasse von 43 kDa (N7A-CL31d) bzw. 51 kDa (N7A-PAS(100)-CL31d) nachgewiesen werden. Ca. 50 % des Proteins lag jedoch in Form von Einschlußkörpern (*Inclusion Bodies*) vor (Spuren 7, 9) und wurde für die Aufarbeitung vernachlässigt. In der SA-Chromatographie unter Verwendung der Streptavidin-Mutante 1.6 konnten die Duocaline größtenteils von den Wirtszellproteinen abgetrennt werden. Die Ausbeute wurde durch Messung der Absorption der SA-Eluatfraktion bei 280 nm bestimmt und betrug für beide Duocalin-Konstrukte ca. 20 mg pro 1 L Kulturvolumen. Im Vergleich zum periplasmatisch produzierten N7A-CL31d (0,18 mg/L Kulturvolumen) wie auch N7A-PAS(100)-CL31d (0,23 mg/L Kulturvolumen) entspricht dies einer 100-fachen Steigerung der Ausbeute.



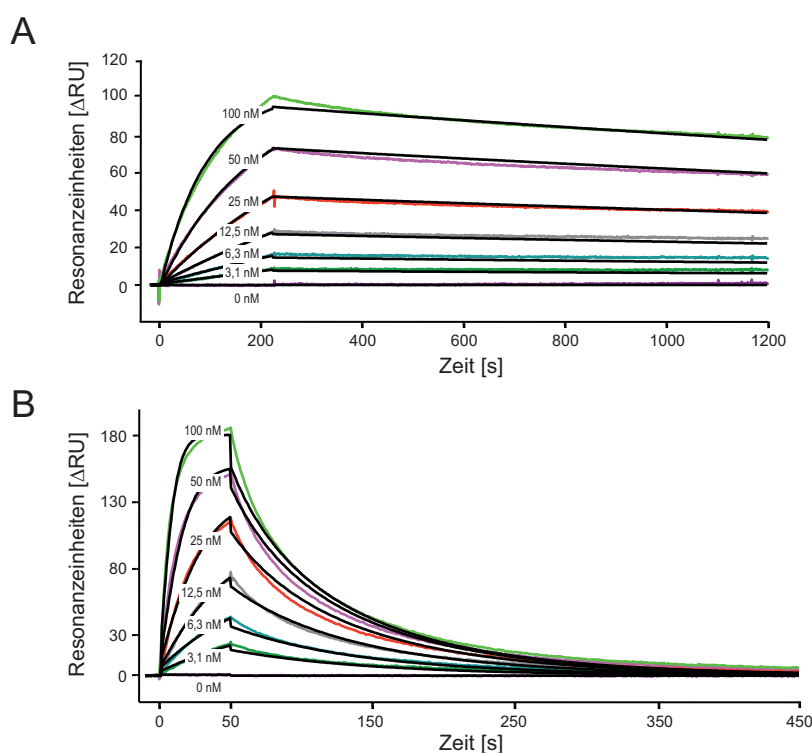
**Abbildung 23. Analyse des cytoplasmatisch produzierten Duocalins N7A-CL31d mit PAS(0)- und PAS(100)-Linker.** (A) Die mittels SA-Chromatographie isolierten Duocalin-Versionen wurden einer SEC an einer analytischen Superdex 200 HR 10/30 Säule in PBS als Laufpuffer unterzogen. Standardproteine: 1 = ADH (150 kDa), 2 = Ovalbumin (43 kDa).  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (B) Die SEC-Hauptfraktionen von N7A-CL31d (zwischen 14,5 und 17,5 mL) und N7A-PAS(100)-CL31d (zwischen 12 und 14 mL) wurden durch SDS-PAGE analysiert.

Die Analyse der beiden Duocaline mittels SEC (Abbildung 23) ergab, dass der Anteil an multimeren/aggregierten Duocalinen in den Eluatfraktionen der vorangegangenen Affinitätschromatographie ca. 25-30 % betrug. Die monodisperse Proteinfraction konnte jedoch in einem symmetrischen Peak bei einem Elutionsvolumen von 15,3 mL (N7A-CL31d) bzw. 12,7 mL (N7A-PAS(100)-CL31d) isoliert werden. Die so gereinigten Duocaline zeigten dementsprechend in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen ein homogenes Verhalten und keine nachweisbaren Verunreinigungen (Abbildung 23B). Ohne Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol zum Probenauftragspuffer war die Mobilität der Proteine leicht erhöht, was auf die kompaktere Form der Polypeptidkette durch Ausbildung der beiden Disulfidbrücken zurückzuführen ist. Unter diesen Bedingungen wurden nur äußerst schwache auf das Vor-

liegen von Disulfidisomeren hindeutende Banden unterhalb der Hauptproteinbande beobachtet. Das oxidierende Milieu des Origami B-Stammes hat demnach mehrheitlich die Ausbildung von korrekten Disulfidbrücken innerhalb des Duocalins bewirkt.

### 3.2.6 Bindungsanalyse der Duocaline hinsichtlich ED-B und Y-DTPA mittels SPR-Spektroskopie

Die Fähigkeit der bispezifischen Duocaline zur simultanen Erkennung der beiden Liganden ED-B und Y-DTPA wurde bereits in Abschnitt 3.2.3 demonstriert. Hier sollte nun der Einfluss der Anticalin-Fusion auf die kinetischen Bindungskonstanten für das jeweilige Zielmolekül untersucht werden.



**Abbildung 24.** Ermittlung der Bindungskinetik von N7A-PAS(100)-CL31d für Y-DTPA-RNase und ED-B durch SPR-Spektroskopie. (A) 250 RU des Y-DTPA-RNase-Konjugats wurden auf einer Sensorchip-Oberfläche immobilisiert und die Bindung des Duocalins durch Injektion einer Konzentrationsreihe in PBS/0,05T verfolgt. Die Regenerierung der Sensorchip-Oberfläche wurde nach einer Dissoziationszeit von 1100 s durch Injektion kurzer Pulse 6 M Guanidinium-Chlorid erreicht. (B) Auf einer Sensorchip-Oberfläche wurden 240 RU Fn7B8 immobilisiert und die Bindung einer Konzentrationsreihe des Duocalins in HBS/0,05T verfolgt. Nach einer Dissoziationszeit von 400 s konnte ohne Regeneration jeweils eine weitere Konzentration appliziert werden. Die  $K_D$ -Werte wurde jeweils durch eine 1:1 Kurvenanpassung nach Langmuir erhalten. Für weitere Erläuterungen siehe **Abbildung 10**.

Die für die Bindung von ED-B und Y-DTPA-RNase erhaltenen Sensorgramme von N7A-CL31d (nicht gezeigt) bzw. N7A-PAS(100)-CL31d (Abbildung 24) konnten mit großer Übereinstimmung gemäß dem 1:1 Bindungsmodell nach Langmuir angepasst werden. Dabei folgten die Duocaline der je-

weils typischen Bindungskinetik der Anticaline CL31d bzw. N7A: Die Bindung von Y-DTPA-RNase zeigte eine moderate Assoziations- und sehr langsame Dissoziationsrate (Abbildung 24A), wohingegen der Protein-Ligand-Komplex im Fall von Fn7B8 schnell assoziierte, aber auch relativ schnell dissoziierte (Abbildung 24B).

Im Vergleich zu den isolierten Anticalinen war die Bindungsaktivität dieser Duocaline für den jeweiligen Liganden nur marginal beeinflusst (Tabelle 9). Der  $K_D$ -Wert von N7A-CL31d für die Bindung von Y-DTPA-RNase wurde – vor allem durch eine schnellere Dissoziation – um den Faktor 2 auf 1,55 nM erhöht, während für N7A-PAS(100)-CL31d zusätzlich noch eine leicht verlangsamte Assoziation beobachtet wurde (Abbildung 24A). Dagegen verlief die Komplexbildung der Duocaline mit Fn7B8 praktisch unabhängig vom PAS(100)-Linker (Tabelle 9). Für beide Duocalinversionen wurde dabei eine Dissoziationskonstante von 10 nM ermittelt, was im Vergleich zu N7A zweifach erhöht ist.

**Tabelle 9. Bindungskonstanten von N7A-CL31d und N7A-PAS(100)-CL31d für Y-DTPA-RNase und Fn7B8.**

	Y-DTPA-RNase			Fn7B8		
	$k_{on}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM] <sup>a</sup>	$k_{on}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM] <sup>a</sup>
N7A <sup>b</sup>	–	–	–	4,54 ± 0,03	26,2 ± 0,16	5,8 ± 0,1
CL31d	0,20 ± 0,01	146 ± 0,50	0,75 ± 0,01	–	–	–
N7A-CL31d	0,14 ± 0,01	218 ± 1,02	1,55 ± 0,01	1,63 ± 0,02	16,3 ± 0,22	10,0 ± 0,2
N7A-PAS(100)-CL31d	0,08 ± 0,01	237 ± 2,19	2,71 ± 0,04	1,96 ± 0,03	19,8 ± 0,38	10,1 ± 0,3

<sup>a</sup> Der  $K_D$ -Wert wurde aus dem Quotienten  $k_{off}/k_{on}$  berechnet. <sup>b</sup> Bindungskinetik von N7A nach Gebauer *et al.*, (2013).

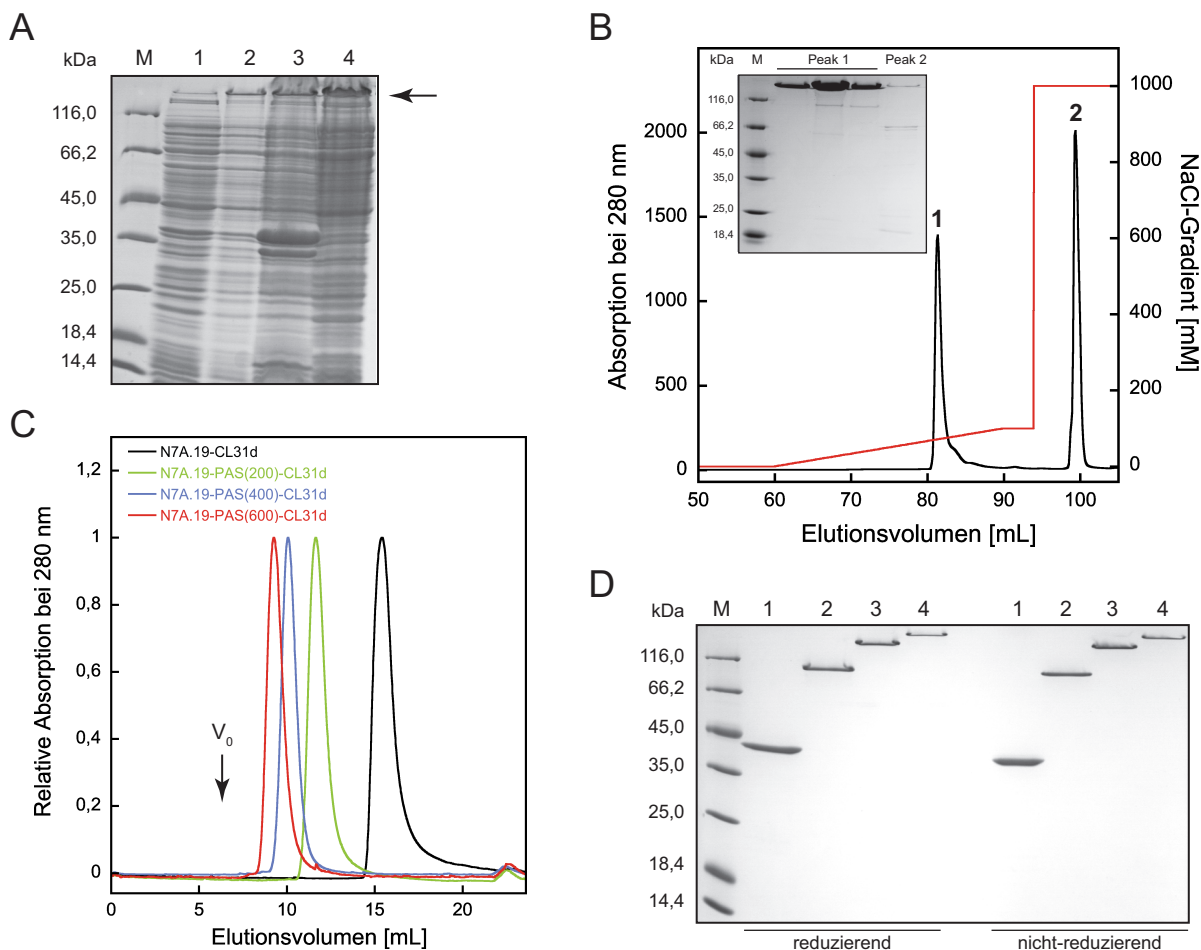
### 3.2.7 Konstruktion von Duocalinen mit PAS-Linkern unterschiedlicher Länge

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Duocaline N7A-CL31d und N7A-PAS(100)-CL31d im Vergleich zu den isolierten Anticalinen ähnliche Ligandenbindungseigenschaften aufweisen, bot sich die Konstruktion von Duocalinen mit deutlich längeren PAS-Linkern an. Die damit einhergehende Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit (Schlupschy *et al.*, 2013) sollte zu einer erhöhten Akkumulation des Proteins im Tumor führen, was im Hinblick auf ihren Einsatz im Bereich der nuklearmedizinischen Diagnostik/Therapie vorteilhaft erscheint.

Da eine hohe Bindungsaktivität für das tumorassoziierte Antigen (hier ED-B) zusätzlich von Vorteil für die Tumorakkumulation des Proteins ist, wurde statt N7A die affinitätsmaturierte Variante N7A.19 (= N7A(H40R/D47Y/Q128R/S87D)) in das Duocalin integriert. Diese weist mit einem  $K_D$ -Wert von 50 pM eine 100-fach höhere Affinität für ED-B auf (Mendler *et al.*, unveröffentlicht). Eine einfache Subklonierung der *Bst*XI-Kassette von N7A.19 auf dem Expressionsvektor pASK75-T7RBS-N7A-CL31d (siehe Abschnitt 3.2.4) war aufgrund der zusätzlichen *Bst*XI-Erkennungssequenz im CL31d-Gen jedoch nicht möglich. Daher wurden die Mutationen für N7A.19 sukzessiv durch QuikChange-Mutagenese mit den Primern CM1/CM1\_as, CM4/CM4\_as, CM10/CM10\_as sowie CM14/CM14\_as in das N7A-Genfragment auf dem Vektor pASK75-T7RBS-N7A-CL31d eingeführt und mittels Se-

quenzanalyse verifiziert. Der für CL31d-codierende Genabschnitt wurde zudem auf genetischer Ebene optimiert, indem das seltene Arg-Codon AGG an den Positionen 70 und 72 durch QuikChange-Mutagenese mit dem Primerpaar EE39\_for/EE39\_rev jeweils durch das häufiger auftretende Basentriplett CGC ersetzt wurden. Im Anschluss an diese Mutageneschritte wurde der erhaltene Duocalin-Expressionsvektor durch Restriktionsverdau mit *SapI* linearisiert und mit der Genkassette für das PAS-Polypeptide der Länge 200, welche aus dem Vektor pCR2.1-PAS#1.2(200)duoSapI (erhalten von Uli Binder, XL-protein) präpariert worden war, ligiert. Da während dieser Ligierung auch PAS-Genkassetten miteinander verknüpft werden, wurden hierbei auch Duocalin-Versionen mit PAS-Polypeptiden der Länge 400 and 600 erhalten.

N7A.19-CL31d sowie die PASylierten Varianten dieses Duocalins wurden im Cytoplasma von *E. coli* Origami B im 2 L-Maßstab bei 30 °C produziert, wobei bei Erreichen von  $OD_{550} = 1,0$  die Induktion der Genexpression für 4 h erfolgte. Danach zeigte sich in der SDS-PAGE des Gesamtzellextrakts eine Produktbande, die im Fall der Duocaline mit PAS-Linker verglichen mit der berechneten Proteinmasse eine geringere elektrophoretische Mobilität aufwies (Abbildung 25). Grund dafür ist eine durch die PAS-Sequenz verminderte Bindung der negativ geladenen SDS-Moleküle, was die Triebkraft der Elektrophorese verringert (Schlapschy *et al.*, 2013). Die Zellen wurden im PANDA-Homogenisator aufgeschlossen und die Zelltrümmer sowie unlösliche Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Der überwiegende Anteil der Duocaline befand sich in löslicher Form im Überstand (Abbildung 25A) und wurde durch SA-Chromatographie vom Großteil der Wirtszellproteine getrennt.



**Abbildung 25. Cytoplasmatische Produktion und Reinigung des Duocalins N7A.19-CL31d mit PAS-Linkern unterschiedlicher Länge.** (A) SDS-PAGE der Produktion von N7A.19-PAS(400)-CL31d in Origami B-Zellen vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Induktion sowie des unlöslichen (Spur 3) und löslichen (Spur 4) Proteinanteils nach dem mechanischen Zellaufschluss. (B) Auf die SA-Chromatographie folgte eine AEX in 20 mM CHES/NaOH pH 9,5 an einer Resource Q Säule, bei der weitere Verunreinigungen von N7A-PAS(400)-CL31d durch einen linearen NaCl-Gradienten separiert werden konnten. Inset: SDS-PAGE der Hauptfraktionen unter nicht-reduzierenden Bedingungen. (C) Nach einer weiteren AEX in 20 mM Tris/HCl pH 7,5, die zur Abtrennung von Disulfidisomeren diente, erfolgte eine analytische SEC an einer Superdex 200 HR 10/30 in PBS.  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (D) Vergleichende SDS-PAGE der Duocaline N7A.19-CL31d (Spur 1), N7A.19-PAS(200)-CL31d (Spur 2), N7A.19-PAS(400)-CL31d (Spur 3) und N7A.19-PAS(600)-CL31d (Spur 4) nach der SEC.

Zur weiteren Reinigung wurden die Duocaline einer Anionenaustauschchromatographie (AEX) bei pH 9,5 unterzogen (Abbildung 25B). Dabei werden die Wechselwirkungen mit den quartären Ammoniumgruppen der Säulenmatrix offenbar hauptsächlich durch das Anticalin CL31d mit pI 6,5 vermittelt, da das Duocalin insgesamt einen leicht basischen pI-Wert von 8,9 aufweist. Die Duocalin-Varianten wurden unabhängig von der PAS-Länge in einem linearen NaCl-Konzentrationsgradienten bei ca. 80 mM in einem scharfen symmetrischen Peak eluiert und so effizient von weiteren Verunreinigungen getrennt. Generell ermöglicht die AEX auch eine Abreicherung des negativ geladenen Endo-

toxins (Lipopolysaccharid; LPS), eines Bestandteils der Zellwand Gram-negativer Bakterien (Lee *et al.*, 2002). Das Entfernen von Endotoxin bei der Präparation von Proteinwirkstoffen ist notwendig, da es im Versuchstier oder später im Menschen Fieber auslösen („Pyrogen) bzw. eine Immunreaktion hervorrufen kann (Heumann & Roger, 2002). Zur Abtrennung nicht-physiologischer Disulfidisomere, die in der SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen als schwache Banden der AEX-Hauptfraktionen sichtbar waren (Abbildung 25B), wurden die Duocaline einer zweiten AEX unterzogen. Dabei wurde der Puffer 20 mM Tris/HCl pH 7,5 verwendet, wodurch die Isomere auf der Säulenmatrix zurückgehalten wurden, wohingegen das korrekt gefaltete Duocalin im Durchlauf der Chromatographie erschien.

In der analytischen SEC zeigte N7A.19-CL31d eine im Vergleich zur berechneten Masse leicht reduzierte apparente Molekülmasse von 37 kDa (Tabelle 11), was vermutlich auf seine nicht globuläre Form zurückzuführen ist. Demgegenüber wiesen die PASylierten Duocaline in Abhängigkeit von der Länge des PAS-Linkers ein vergrößertes hydrodynamisches Volumen auf (Abbildung 25C). Im Fall des Duocalins mit dem PAS(600)-Linker wurde eine 7-fache Volumenvergrößerung beobachtet (Tabelle 11). Alle vier produzierten Duocalinversionen lagen damit als reine monomere Spezies vor, wie auch durch SDS-PAGE bestätigt wurde (Abbildung 25D).

Der Einfluss der PAS-Länge auf die Bindungsaktivität der Duocaline für die Liganden ED-B und Y·DTPA wurde mittels SPR-Spektroskopie untersucht (Tabelle 10). Dabei nahm die Affinität für Fn7B8 mit steigender Linkerlänge – vor allem bedingt durch eine langsamere Assoziationskinetik – ab. Nichtsdestotrotz weist das Duocalin mit dem längsten PAS-Linker, N7A.19-PAS(600)-CL31d, immer noch eine hohe Bindungsaktivität gegenüber Fn7B8 ( $K_D = 686$  pM) auf. Die Affinität für Y·DTPA-RNase wurde mit zunehmender PAS-Länge ebenfalls vermindert; hier führte aber sowohl die Verlangsamung der Komplexbildung als auch die Beschleunigung der Dissoziation gleichermaßen zur Reduktion der Bindungsaktivität.

**Tabelle 10. Einfluss der Länge des PAS-Linkers auf die Bindungskinetik des Duocalins für die Liganden Y·DTPA-RNase und ED-B ermittelt durch SPR-Spektroskopie.**

	Y·DTPA-RNase			Fn7B8		
	$k_{on}$ [ $10^6 M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-6} s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM] <sup>a</sup>	$k_{on}$ [ $10^6 M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-3} s^{-1}$ ]	$K_D$ [pM] <sup>a</sup>
<b>N7A.19-CL31d</b>	0,69 ± 0,01	80,6 ± 0,99	0,12 ± 0,01	14,1 ± 0,03	0,58 ± 0,01	41 ± 0,7
<b>N7A.19-PAS(200)-CL31d</b>	0,40 ± 0,01	179 ± 0,01	0,45 ± 0,01	6,70 ± 0,01	0,78 ± 0,01	117 ± 2
<b>N7A.19-PAS(400)-CL31d</b>	0,15 ± 0,01	106 ± 0,69	0,93 ± 0,01	5,53 ± 0,01	0,93 ± 0,01	167 ± 2
<b>N7A.19-PAS(600)-CL31d</b>	0,13 ± 0,01	156 ± 1,39	1,22 ± 0,01	1,39 ± 0,01	0,96 ± 0,01	686 ± 9

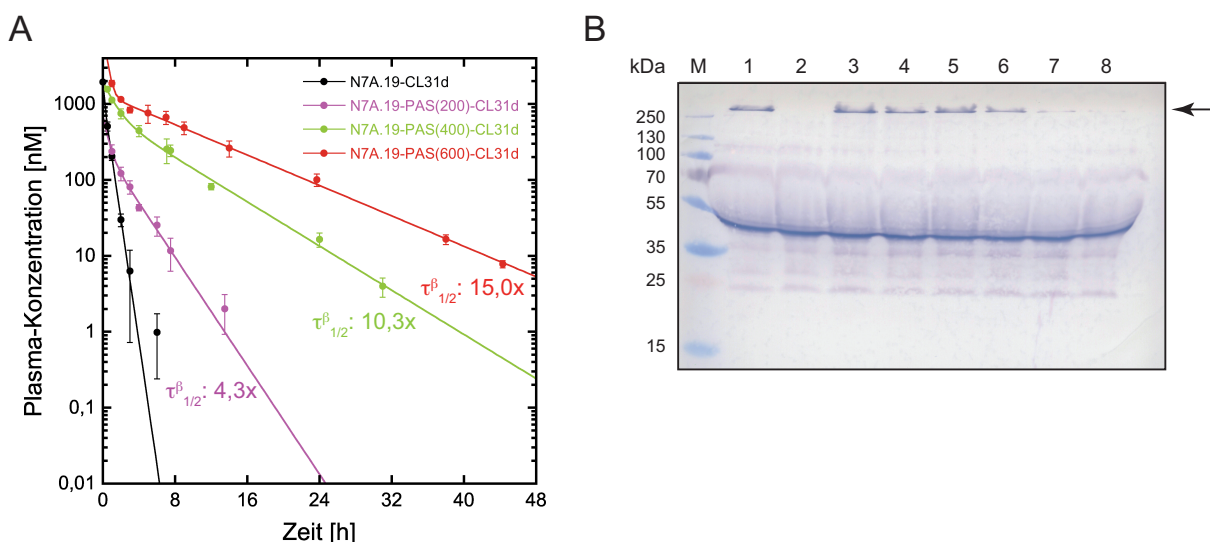
<sup>a</sup>  $K_D$  aus dem Quotienten  $k_{off}/k_{on}$ .

### 3.2.8 Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von Duocalinen in der Maus

Im Labor von Prof. Skerra konnte bereits an einer Reihe therapeutischer Proteine gezeigt werden, dass durch die Vergrößerung ihres hydrodynamischen Volumens in Folge einer Fusion mit einem PAS-Po-



lypeptid die Plasma-Halbwertszeit erheblich erhöht wird (Schlapschy *et al.*, 2013; Harari *et al.*, 2014; Morath *et al.*, 2015; Bolze *et al.*, 2016). Im Zusammenhang mit der möglichen Anwendung von Duocalinen zur *in vivo* Diagnostik sollte nun erstmals der Einfluss von PAS-Polypeptiden als Linker auf die Pharmakokinetik (PK) in Mäusen untersucht werden (Abbildung 26; Tabelle 11).



**Abbildung 26. Einfluss des PAS-Linkers auf die Plasma-Halbwertszeit eines Duocalins in Mäusen.** (A) Weiblichen BALB/c Mäusen wurde intravenös das Duocalin N7A.19-CL31d (Dosis: 5 mg/kg Körpergewicht) sowie dessen PASylierte Varianten (äquimolare Dosis) injiziert (siehe Abschnitt 2.7.1). Die anschließend in einem *Sandwich*-ELISA quantifizierte Plasma-Konzentration (siehe Abschnitt 2.3.9) wurde gegen den Zeitpunkt der Probenahme aufgetragen und die Daten mit Hilfe des Programms *WinNonlin* v6.1 angepasst. Die ermittelten Parameter sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Als  $\tau^{\beta}_{1/2}$  ist jeweils der Faktor angegeben, um den die Plasma-Halbwertszeit in Relation zum unmodifizierten Duocalin verlängert war. (B) Immunchemischer Nachweis von N7A.19-PAS(600)-CL31d in Plasmaprobe durch Western Blotting. Ein Gemisch aus gereinigtem Duocalin und vor der Proteininjektion gewonnenem Maus-Plasma (Spur 1) bzw. Plasma von vor der Proteininjektion (Spur 2) sowie Plasmaprobe nach 1 h (Spur 3), 3 h (Spur 4), 7 h (Spur 5), 12 h (Spur 6), 38 h (Spur 7) und 47,3 h (Spur 8) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zum spezifischen Nachweis der Duocaline wurde die Membran mit den Antikörpern *StrepMAB*-Classic (1. AK) und anti-Maus IgG-AP (2. AK) inkubiert und eine Farbreaktion mit BCIP und NBT durchgeführt.

Für die hier untersuchten Duocaline mit den Linkern PAS(0)-, PAS(200)-, PAS(400)- und PAS(600) ließ sich die Änderung der Plasma-Konzentration über die Zeit mit einer bi-exponentiellen Funktion beschreiben. Der Kurvenverlauf setzte sich aus einer Verteilungsphase mit großer negativer Steigung gleich nach der intravenösen Proteininjektion sowie einer darauffolgenden kontinuierlichen Eliminationsphase zusammen (Abbildung 26A). Dies entspricht der üblichen Pharmakokinetik eines Proteintherapeutikums (DiPiro, 2010). Während der Verteilungsphase gelangt das Protein vom Blut bzw. blutführenden Organen in die peripheren Kompartimente wie Haut, Muskel und Fett, was mit einem Verdünnungseffekt einhergeht, und wird anschließend während der Eliminationsphase allmählich

über die Niere ausgeschieden. Das unmodifizierte Duocalin N7A.19-CL31d wies in der Eliminationsphase eine Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}^{\beta}$ ) von 22 min auf. Für die PASylierten Duocaline hingegen konnte eine signifikante Steigerung von  $\tau_{1/2}^{\beta}$  in Abhängigkeit von der PAS-Länge beobachtet werden (Tabelle 11). Beispielsweise zeigte N7A.19-PAS(600)-CL31d mit  $\tau_{1/2}^{\beta} = 6$  h eine 15-fach höhere Plasma-Halbwertszeit. Die Ursache dafür ist eine verlangsamte Proteinfiltration über die Poren der Basalmembran in den Nieren-Glomeruli, da die durchschnittliche Porengröße von 60 Å – entsprechend etwa einem globulären Protein mit 70 kDa – in Folge des durch die PASylierung vergrößerten hydrodynamischen Moleküldurchmessers überschritten wird (Binder & Skerra, 2015). Darüber hinaus war mit zunehmender PAS-Länge eine deutliche Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Proteine, ausgedrückt als *Area Under the Curve* (AUC), zu beobachten, die im Fall von N7A.19-PAS(600)-CL31d auf den 20-fachen Wert des unmodifizierten Duocalins anstieg (Tabelle 11). Damit einhergehend nahm die *Clearance* (CL), welche die zeitabhängige Eliminierung eines Proteins anzeigt, im Zuge der Verlängerung des PAS-Linkers deutlich um den Faktor 20 für N7A.19-PAS(600)-CL31d ab.

**Tabelle 11. Biochemische und PK-Parameter des Duocalins N7A.19-CL31d mit PAS(0)-, PAS(200)-, PAS(400)- und PAS(600)-Linkern.**

	MM [kDa] <sup>a</sup>	MM-SEC [kDa] <sup>b</sup>	$\tau_{1/2}^{\beta}$ [h] <sup>c</sup>	AUC [h nM] <sup>d</sup>	CL [mL h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> ] <sup>e</sup>
<b>N7A.19-CL31d</b>	42,7	37	0,37	736	159
<b>N7A.19-PAS(200)-CL31d</b>	59,3	207	1,7	864	135
<b>N7A.19-PAS(400)-CL31d</b>	75,8	421	4,1	5959	20
<b>N7A.19-PAS(600)-CL31d</b>	92,3	610	6,0	15255	7,7

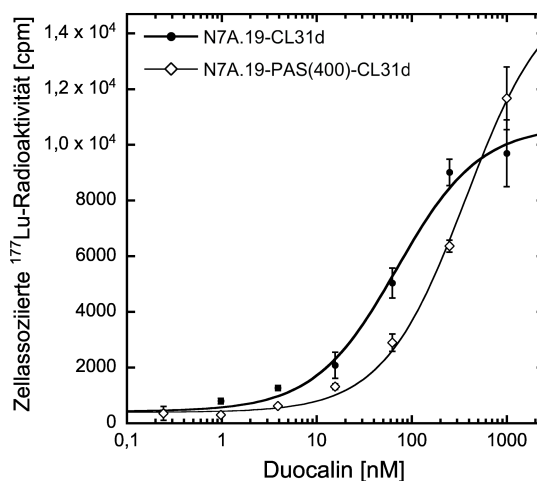
<sup>a</sup> Ermittelt aus der Primärsequenz des Proteins (ProtParam; www.expasy.org). <sup>b</sup> Anhand des Elutionsvolumens in der SEC kalkuliert. <sup>c</sup> Plasma-Halbwertszeit in der Eliminationsphase. <sup>d</sup> Flächenintegral unter der Kurve (*Area Under the Curve*). <sup>e</sup> Zeitabhängige Eliminierung des Proteins je Körpergewicht (*Clearance*). <sup>c,d,e</sup> Ermittelt aus der bi-exponentiellen Kurvenanpassung mit *WinNonlin* v6.1.

Der zur Quantifizierung der Proteinkonzentration eingesetzte *Sandwich*-ELISA wurde so konzipiert, dass ausschließlich funktionelle Duocalinmoleküle detektiert wurden, die in der Lage sind, beide Liganden zu erkennen. Zudem wurden die Plasmaproben von N7A.19-PAS(600)-CL31d einer Western Blot-Analyse unterzogen, um zu überprüfen, ob das injizierte Protein durch mauseigene Proteasen angegriffen wurde (Abbildung 26B). Im zeitlichen Verlauf der PK nahm in Übereinstimmung mit dem *Sandwich*-ELISA die Intensität der Proteinbande für das Duocalin N7A.19-PAS(600)-CL31d kontinuierlich ab. Das übrige Bandenmuster war dabei allein auf eine Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper mit im Plasma enthaltenen Proteinen zurückzuführen (Abbildung 26B, Spur 2). Hinweise auf etwaige Spaltprodukte des Duocalins waren in keiner der Plasmaproben erkennbar.

### 3.2.9 Nachweis der Bindungsaktivität auf ED-B-positiven Caco-2 Zellen

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung eines Bindeproteins für Applikationen *in vivo* ist die Bestimmung der Affinität für den Proteinliganden im Kontext seiner natürlichen Umgebung auf der Zell-

oberfläche. Daher wurde die Bindungsaktivität von N7A.19-CL31d sowie des PASylierten Duocalins N7A.19-PAS(400)-CL31d auf ED-B-exprimierenden Caco-2 Zellen untersucht. Der hier verwendete PAS-Linker mit 400 Resten gilt als vielversprechender Kandidat für Pilotstudien *in vivo*, da Untersuchungen an PASylierten Fab-Fragmenten (Mendler *et al.*, 2015) sowie einem weiteren Anticalin-Fusionsprotein (siehe Abschnitt 3.3) im Xenograft-Tiermodell daraufhin deuten, dass eine Plasma-Halbwertszeit von 4 h – wie bei N7A.19-PAS(400)-CL31d gegeben – zum besten Tumor/Blut-Verhältnis führt.



**Abbildung 27. Bestimmung der Affinität von N7A.19-CL31d und N7A.19-PAS(400)-CL31d zu ED-B-exprimierenden Caco-2 Zellen.** Die Zellen wurden zunächst für 1 h mit einer Konzentrationsreihe der Duocaline und anschließend mit 100.000 cpm  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  (Spezifische Aktivität: 131 MBq/mol) inkubiert. Die zellgebundene Radioaktivität wurde in einem  $\gamma$ -Zähler quantifiziert und gegen die eingesetzte Duocalin-Konzentration aufgetragen. Angegeben ist der Mittelwert mit Standardabweichung (SD) aus drei unabhängigen Verdünnungsreihen. Der jeweilige  $K_D$ -Wert wurde nach Kurvenanpassung anhand des Massenwirkungsgesetzes ermittelt (siehe Abschnitt 2.6.4).

In der halb-logarithmischen Auftragung der gemessenen zellassozierten Radioaktivität – aufgrund des gebundenen  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  – gegen die jeweils eingesetzte Duocalin-Konzentration wurde für beide Proteine eine sigmoidale Signalzunahme beobachtet (Abbildung 27). Die Duocalin-Konzentration bei halb-maximaler Signalintensität wurde durch Kurvenanpassung bestimmt (N7A.19-CL31d:  $69,8 \pm 10,9$  nM; N7A.19-PAS(400)-CL31d:  $368,4 \pm 40,6$  nM). Im Fall des unmodifizierten Duocalins lag der  $K_D$ -Wert ca. 1000-fach über dem mittels SPR-Spektroskopie bestimmten Wert von 41 pM (siehe Abschnitt 3.2.7). Grund hierfür könnten Interaktionen des ED-B-enthaltenen Fibronektins auf lebenden Zellen mit anderen Proteinen der ECM sein, wodurch die Zugänglichkeit des Epitops für N7A.19 eingeschränkt wäre. Dadurch wären sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationskinetik im Vergleich zu Experimenten mit dem isolierten Protein negativ beeinflusst. Im Fall des PASylierten Duocalins ist die im Vergleich zu N7A.19-CL31d noch einmal um den Faktor 4-5 verminderte Affinität vermutlich auf eine langsamere Assoziationsrate zurückzuführen, da das vergrößerte hydrodynamische Volumen ein Eindringen in die ECM erschwert.

Dennoch konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass eine spezifische Erkennung von ED-B auf einer Tumorzelle möglich ist. Damit ist die Voraussetzung für Experimente zur Adressierung ED-B-exprimierender Tumore im Xenograft-Tiermodell gegeben.

### **3.3 Konstruktion eines Fusionsproteins aus dem CEA-bindenden scFv-Fragment T84.66 und dem Me-DTPA-bindenden Anticalin CL31**

Das onkofetale Zelloberflächen-Antigen CEA stellt einen potenten Biomarker für die Diagnostik und Therapie zahlreicher solider Tumore dar (siehe Abschnitt 1.2.2). Ein durch Immunisierung von Mäusen generierter anti-CEA Antikörper ist mT84.66 (Wagener *et al.*, 1983; Neumaier *et al.*, 1985). Dieser erkennt spezifisch die C2-ähnliche Ig-Domäne A3 von CEA mit picomolarer Affinität (Hefta *et al.*, 1998). Eine chimäre (Maus/Mensch) Variante des mAk (cT84.66) wurde bereits in klinischen Studien der Phase 1 zur Diagnostik und Therapie von Kolorektalkarzinomen untersucht (Neumaier *et al.*, 1990; Wong *et al.*, 1995; Wong *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden verschiedene Formate des mT84.66 Antikörpers hergestellt, wie beispielsweise scFv (Wu *et al.*, 1996), Diabody (scFv-Dimer) (Holliger *et al.*, 1993), Cys-Diabody (Olafsen *et al.*, 2004), Minibody (scFv-C<sub>H3</sub>) (Hu *et al.*, 1996), und durch Markierung mit Radionukliden bzw. einem Me-Chelat-Komplex hinsichtlich nuklearmedizinischer Anwendungen getestet (Hong *et al.*, 2008). Auch das *Pretargeting*-Konzept wurde mit dem humanisierten mAk T84.66 (hT84.66) (Yazaki *et al.*, 2004) als Fusionsprotein mit einem Me-DOTA-bindenden scFv-Fragment (Yazaki *et al.*, 2013) bzw. mit einem Streptavidin-Konjugat von cT84.66 in präklinischen Modellen untersucht (Jia *et al.*, 2007).

Im Hinblick auf neue nuklearmedizinische Anwendungen wurde zur Umsetzung des *Pretargeting*-Konzepts in dieser Arbeit das scFv-Fragment von T84.66 (in V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> Orientierung) als Fusionspartner für das Me-DTPA-spezifische Anticalin CL31 (bzw. CL31d) verwendet und mit der PAS-Technologie kombiniert.

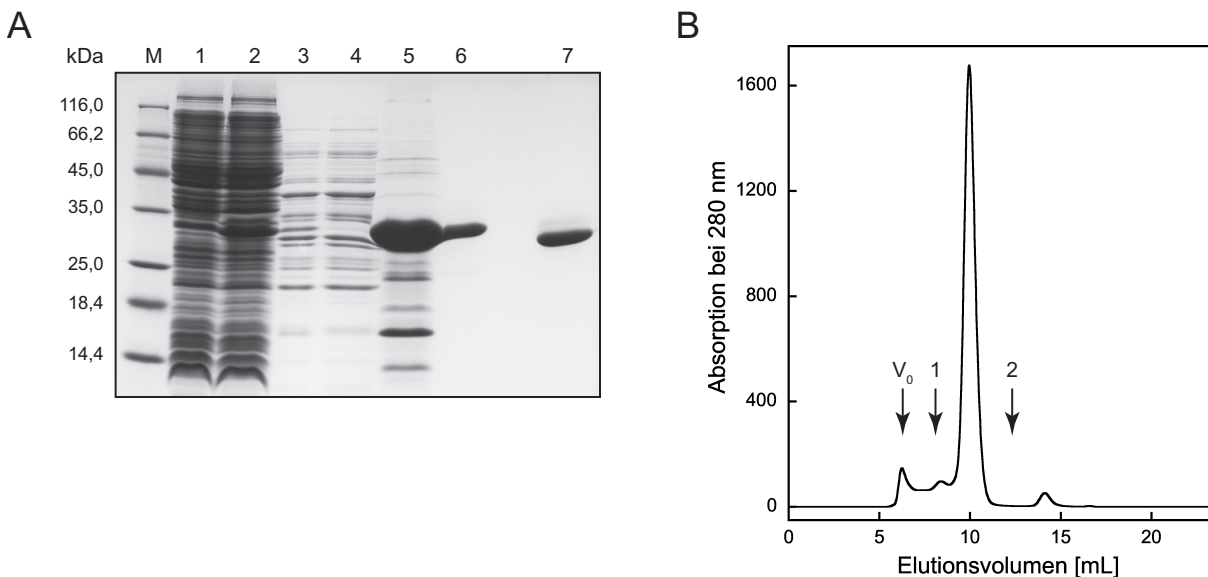
#### **3.3.1 Konstruktion eines bakteriellen Expressionsvektors für scFv T84.66**

Die genetische Information des murinen scFv T84.66 (Wu *et al.*, 1996) wurde zur funktionellen Produktion im Periplasma von *E. coli* zunächst auf einem geeigneten Expressionsvektor kloniert. Dazu wurde der periplasmatische Expressionsvektor pASK75-*Strep* II (Skerra, 1994) mit den Restriktionsendonukleasen *Stu*I am 5'-Ende und *Eco*47III am 3'-Ende geschnitten und zur Verhinderung einer Religierung mit SAP dephosphoryliert (siehe Abschnitt 2.2.5.1).



### 3.3.2 Periplasmatische Produktion und Reinigung des scFv T84.66

Chemisch kompetente *E. coli* JM83-Zellen wurden mit pASK75-scFvT84.66 transformiert und die Proteinproduktion im 2 L LB/Amp-Medium bei 22 °C durch Zugabe des Induktors aTc bei  $OD_{550} = 2,0$  für 3 h induziert. In der SDS-PAGE des Gesamtzellaufschlusses trat eine deutliche Produktbande bei ca. 30 kDa entsprechend der für scFv T84.66 kalkulierten Molekülmasse von 28,1 kDa auf (Abbildung 29A, Spur 2). Der Periplasma-Extrakt (Spur 3) wies erwartungsgemäß deutlich weniger Wirtszellproteine als der Gesamtzellextrakt auf. Das rekombinante scFv T84.66 wurde anhand des *Strep*-tag II mittels SA-Chromatographie isoliert und schließlich durch Gelfiltration von verbliebenen Verunreinigungen befreit (Abbildung 29A,B). Dabei eluierte das scFv T84.66 als monodisperse Proteinfraktion in einem symmetrischen Peak bei ca. 10 mL – entsprechend einer apparenten Molekülmasse von 30 kDa – und zeigte nur einen geringen Anteil an Aggregat oder oligomerer Proteinspezies.



**Abbildung 29. Periplasmatische Produktion und Reinigung des scFv T84.66.** (A) Gesamtzellaufschluss von JM83/pASK75-scFvT84.66 vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Induktion der Proteinproduktion bei  $OD_{550} = 2,0$ , Periplasmafraktion (Spur 3) sowie eine Probe des Durchlaufs (Spur 4) und des Eluats (Spur 5) der SA-Chromatographie wurden einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen unterzogen. Die beiden nachfolgenden Spuren zeigen scFv T84.66 nach der analytischen SEC unter reduzierenden (Spur 6) und nicht-reduzierenden (Spur 7) Bedingungen. (B) SEC von scFv T84.66 in 10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl an einer Superdex 75 HR 10/30 Säule. Standardproteine: 1 = BSA (66 kDa), 2 = Cytochrom C (12,4 kDa);  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule.

Die Bindungseigenschaften des so gereinigten scFv T84.66 für sein Antigen CEA wurden im Rahmen der späteren Charakterisierung des scFv/Anticalin-Fusionsproteins untersucht (siehe Abschnitt 3.3.4).

### 3.3.3 Klonierung und periplasmatische Synthese des Fusionsproteins T84.66-CL31

Zur Konstruktion des Fusionsproteins T84.66-CL31 wurde der Expressionsvektor pASK75-scFvT84.66 (siehe Abschnitt 3.3.1) zunächst mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *Eco47III* geschnitten (Abbildung 30). Das Fragment mit einer Größe von 3963 bp wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese isoliert und aus dem Gel gereinigt. Die einzufügende Gensequenz für CL31 wurde durch Doppelverdau mit *SalI* und *Eco47III* aus dem Duocalin-Vektor pNGAL134 präpariert und mit dem geschnittenen Vektorrückgrat von pASK75-scFvT84.66 ligiert. Die sich so ergebende C-terminale Fusion des Anticalins mit dem scFv-Fragment steht in Analogie zu der dort im ursprünglichen Antikörperformat lokalisierten konstanten Region. Der so generierte Expressionsvektor ermöglicht die periplasmatische Produktion von T84.66-CL31 mit einem kurzen Linker (GAVDANS) und dem C-terminalen *Strep*-tag II zur Isolierung des rekombinanten Proteins mittels SA-Chromatographie.

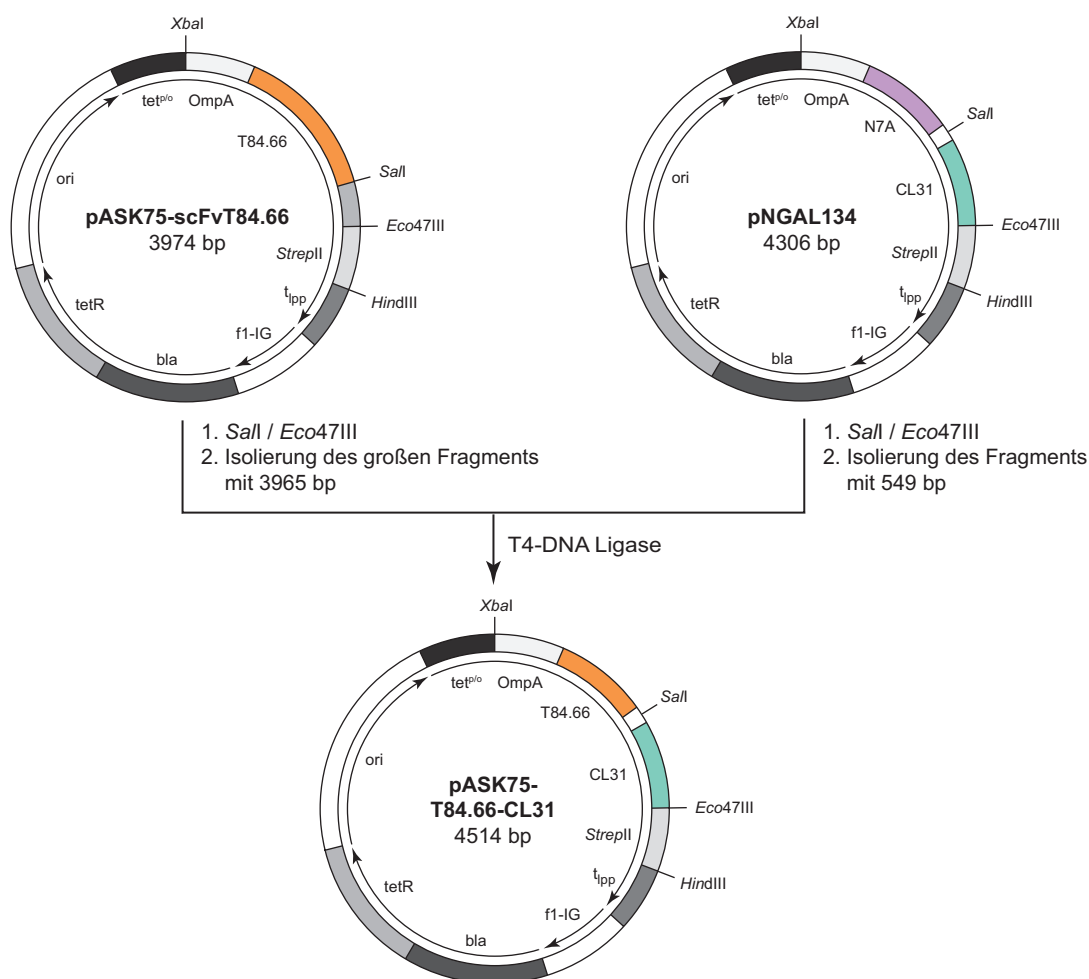
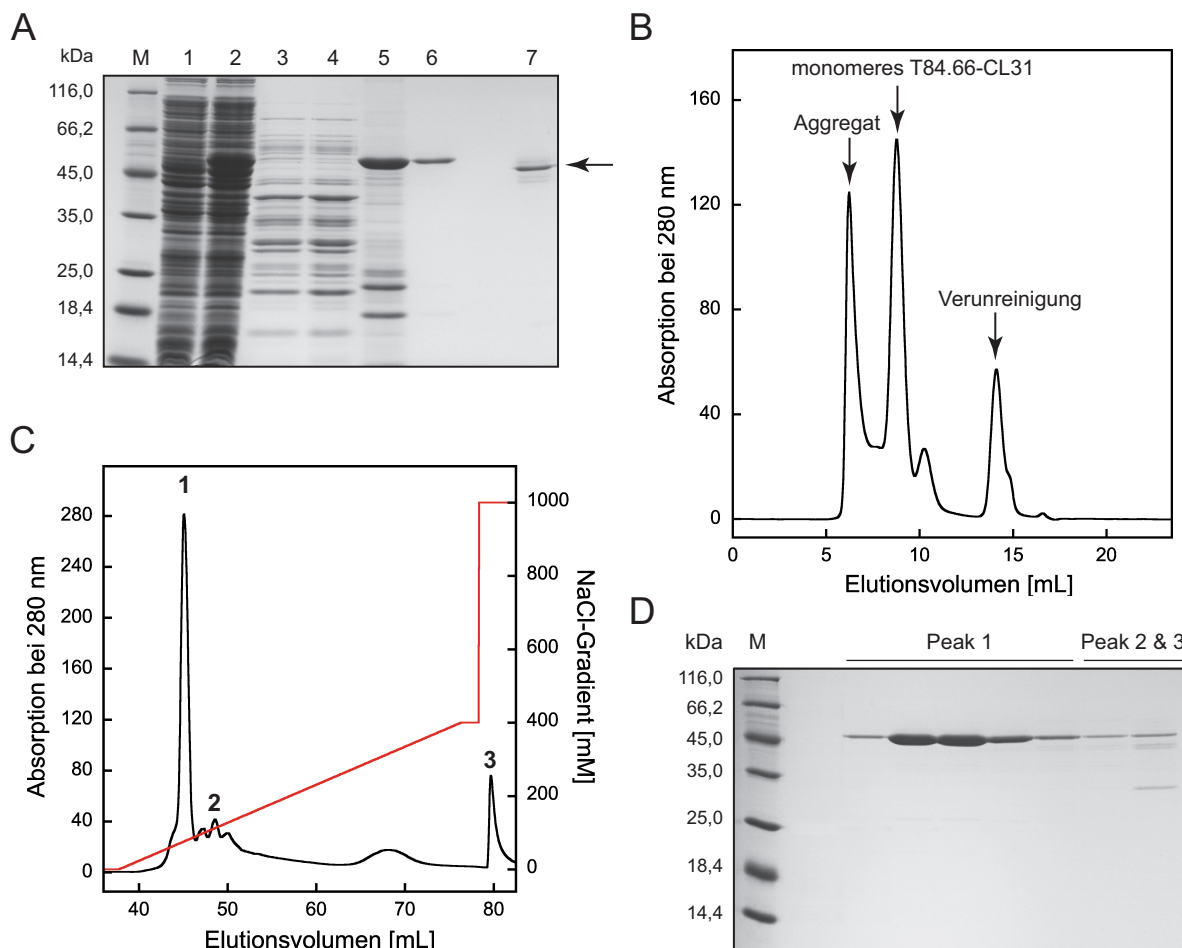


Abbildung 30. Konstruktion des periplasmatischen Expressionsvektors für das Fusionsprotein T84.66-CL31.

Die Produktion von T84.66-CL31 erfolgte analog zum scFv-Fragment im Periplasma von JM83 in 2 L LB/Amp-Medium bei Erreichen einer Zelldichte von  $OD_{550} = 2,0$ . Auch hier war nach der Induktion in der SDS-PAGE des Gesamtzellextrakts eine deutliche Produktbande erkennbar, dessen Migrationsver-

halten dem der kalkulierten Molekülmasse von 48,7 kDa entsprach (Abbildung 31A). Nach Präparation des periplasmatischen Extrakts wurde das rekombinante Protein durch SA-Chromatographie isoliert und einer SEC unterzogen (Abbildung 31B). Das im Vergleich zum scFv T84.66 niedrigere Elutionsvolumen von 8,8 mL spiegelte die höhere Molekülmasse des Fusionsproteins wider. Der Anteil an aggregiertem Protein (Elutionsvolumen: 6,5 mL) lag hier allerdings mit ca. 40 % deutlich höher.



**Abbildung 31. Periplasmatische Sekretion und Reinigung von T84.66-CL31.** (A) SDS-PAGE des Gesamtzellauflschlusses von JM83/pASK75-T84.66-CL31 vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Induktion der Proteinproduktion bei  $OD_{550} = 2,0$ , der Periplasmafraktion (Spur 3) sowie Proben des Durchlaufs (Spur 4) und des Eluats (Spur 5) der SA-Chromatographie sowie der SEC unter reduzierenden (Spur 6) und nicht-reduzierenden (Spur 7) Bedingungen. (B) Analytische SEC des konzentrierten SA-Eluats an einer Superdex 75 HR 10/30 Säule (Ausschlussvolumen: 6,5 mL) in 10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl. (C) Abtrennung der Faltungsisomere von T84.66-CL31 durch AEX an einer mit 20 mM Tris/HCl pH 8 äquilibrierten Resource Q Säule durch lineare Erhöhung der Salzkonzentration. (D) SDS-PAGE der AEX-Elutionsfraktionen unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

Wie die SDS-PAGE belegte (Abbildung 31A, Spur 6), konnte durch die SEC der geringe Anteil an proteinogenen sowie niedermolekularen Verunreinigungen, welche bei 10,3 mL bzw. 14,1 mL eluierten, abgetrennt werden. Allerdings wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen neben der Haupt-

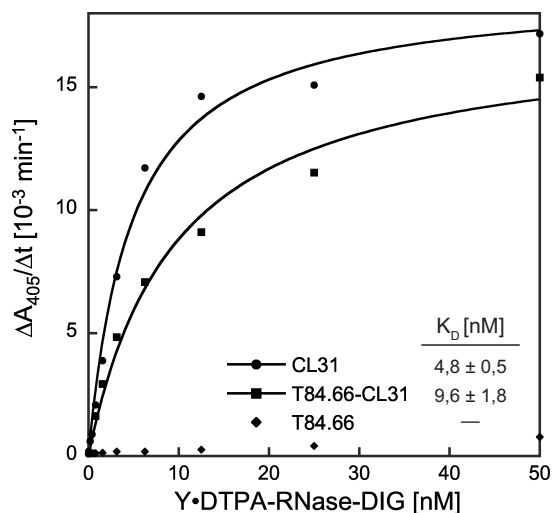


proteinbande schwache Banden mit veränderter Mobilität sichtbar, die auf Disulfidisomere von T84.66-CL31 hindeuteten. Der Versuch durch Ko-Überexpression der periplasmatischen Faltungshelferproteine/*Chaperone* DsbA, DsbC, FkpA und SurA mit dem Helferplasmid pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) den Anteil an Disulfidisomeren bzw. Aggregat zu reduzieren, war allerdings nicht erfolgreich.

Zur Abtrennung der Faltungsisomere wurden die SEC-Fractionen von T84.66-CL31 einer AEX bei pH 8 unterzogen. Bei diesem pH-Wert trägt das Protein mit einem kalkulierten pI = 5,6 eine negative Nettoladung und interagiert daher mit den quartären Ammoniumgruppen der Säulenmatrix (Abbildung 31C). Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte in einem linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 400 mM NaCl über 35 SV. Dabei wurde in Peak 1 bei ca. 100 mM NaCl ausschließlich homogenes und monomeres T84.66-CL31 erhalten, wie durch SDS-PAGE bestätigt wurde (Abbildung 31D). Die Disulfidisomere sowie kleine Verunreinigungen wurden erst bei höheren Salzkonzentrationen von der Säulenmatrix eluiert (Peak 2 & 3). Die Fractionen des Peaks 1 wurden vereinigt, konzentriert und für die Bestimmung der Ligandenbindungsaktivität durch Gelfiltration an einer Superdex Säule in PBS überführt.

#### **3.3.4 Bestimmung der Bindungsaffinität des Fusionsproteins T84.66-CL31 für Y-DTPA und CEA *in vitro***

Der Einfluss der Fusion von CL31 mit dem scFv T84.66 auf die Me-DTPA-Bindungsfähigkeit des Anticalins wurde zunächst durch einen indirekten ELISA quantifiziert (Abbildung 32). Der dabei als Doppelkonjugat eingesetzte Metallchelate-Komplex Me-DTPA-RNase-DIG wurde sowohl von dem Anticalin CL31 als auch dem Fusionsprotein T84.66-CL31 in einer typischen Sättigungskurve mit einer Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich komplexiert (halb-maximale Sättigungskonzentration für T84.66-CL31: 9,6 nM). Das Fusionsprotein besitzt damit einen 2-fach höheren  $K_D$ -Wert als das isolierte Anticalin. Für das als Kontrolle eingesetzte scFv T84.66 war erwartungsgemäß keine Signalentwicklung zu beobachten.



**Abbildung 32. Bestimmung der Bindungsaktivität von T84.66-CL31 für Y·DTPA-RNase-DIG im indirekten ELISA.** Die zu analysierenden rekombinanten Proteine wurden mittels des für das *Strep*-tag II spezifischen Antikörpers *Strep*MAB-Immo auf der Mikrotiterplatte adsorbiert, und anschließend wurde eine Konzentrationsreihe von Y·DTPA-RNase-DIG appliziert. Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wurde anhand der von einem anti-DIG-Fab-AP-Konjugat katalysierten chromogenen Reaktion gemäß Abschnitt 2.3.9 bestimmt.

Eine geringe Beeinflussung der Bindungsaktivität für Y·DTPA-RNase in Folge der Fusion zeigte sich ebenso bei der Untersuchung der Bindungskonstanten mittels SPR-Spektroskopie (Tabelle 12). Dazu wurde eine Konzentrationsreihe der gereinigten rekombinanten Proteine über einen mit ca. 300 RU Y/Lu·DTPA-RNase beladenen CM5 Sensorchip geleitet und nach Kurvenanpassung gemäß der 1:1 Langmuir-Komplexbildung die Assoziations- und Dissoziationsrate bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.1). Der bezüglich Y·DTPA-RNase ermittelte  $K_D$ -Wert für T84.66-CL31 war im Vergleich zu CL31 um den Faktor 3 auf 1 nM erhöht. Die maßgebliche Ursache dafür lag in der langsameren Assoziationsrate  $k_{on}$ .

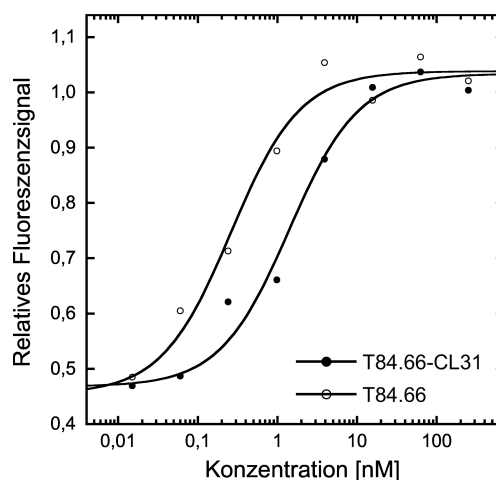
Zudem wurde die Bindungsaktivität für das mit Lutetium komplexierte DTPA-RNase-Konjugat im Hinblick auf *in vivo* Experimente zur Evaluierung des *Pretargeting*-Konzepts (siehe Abschnitte 3.3.8 und 3.3.9) untersucht. Die Affinität des Fusionsproteins blieb interessanterweise vom Austausch des Metallions beinahe unbeeinflusst ( $K_D = 2,86$  nM). Die 10-fach niedrigere Affinität des Anticalins CL31 für Lu·DTPA-RNase resultiert aus einem im Vergleich zu Yttrium geringeren Ionenradius von Lutetium (Corneillie *et al.*, 2003). Dieser hat direkten Einfluss auf die Konformation der für die Komplexierung verantwortlichen Carboxylgruppen im DTPA-Molekül, wodurch der Chelat-Ligand weniger stabil in die Ligandenbindungstasche des Anticalins aufgenommen wird (Kim *et al.*, 2009).

**Tabelle 12. Bindungskonstanten von T84.66-CL31 für Y/Lu-DTPA-RNase ermittelt durch SPR-Spektroskopie.**

	Y-DTPA-RNase			Lu-DTPA-RNase		
	$k_{\text{on}}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}^{\infty}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D^{\infty}$ [nM] <sup>a</sup>	$k_{\text{on}}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}^{\infty}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D^{\infty}$ [nM] <sup>a</sup>
<b>CL31</b>	0,308 ± 0,001	84 ± 0,2	0,273 ± 0,001	0,268 ± 0,001	627 ± 1,89	2,34 ± 0,01
<b>T84.66-CL31</b>	0,109 ± 0,001	116 ± 0,4	1,06 ± 0,01	0,094 ± 0,001	270 ± 0,001	2,86 ± 0,01

<sup>a</sup>  $K_D^{\infty}$  berechnet aus  $k_{\text{off}}^{\infty}/k_{\text{on}}$ .

Die Bindungsaktivität des scFv T84.66 sowie von T84.66-CL31 gegenüber CEA wurde auf CEA-exprimierenden HT-29 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 33). Die Auftragung des erhaltenen gemittelten Fluoreszenzsignals (*Mean Fluorescence Intensity*; MFI) des mit AlexaFluor488 konjugierten Sekundärantikörpers – als Maß für die Bindung von T84.66 – gegen die eingesetzte Proteinkonzentration in halb-logarithmischer Skalierung ergab einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Durch Kurvenanpassung anhand des Massenwirkungsgesetzes (siehe Abschnitt 2.6.4) wurde der  $K_D$ -Wert bei halb-maximaler Signalintensität für das scFv T84.66 zu  $261 \pm 68 \text{ pM}$  bestimmt. Demgegenüber zeigte das Fusionsprotein zwar eine 5-fach verminderte Bindungsaktivität ( $K_D = 1402 \pm 381 \text{ pM}$ ), was aber dennoch eine stabile Antigenbindung im niedrigen nanomolaren Bereich gewährleistet.

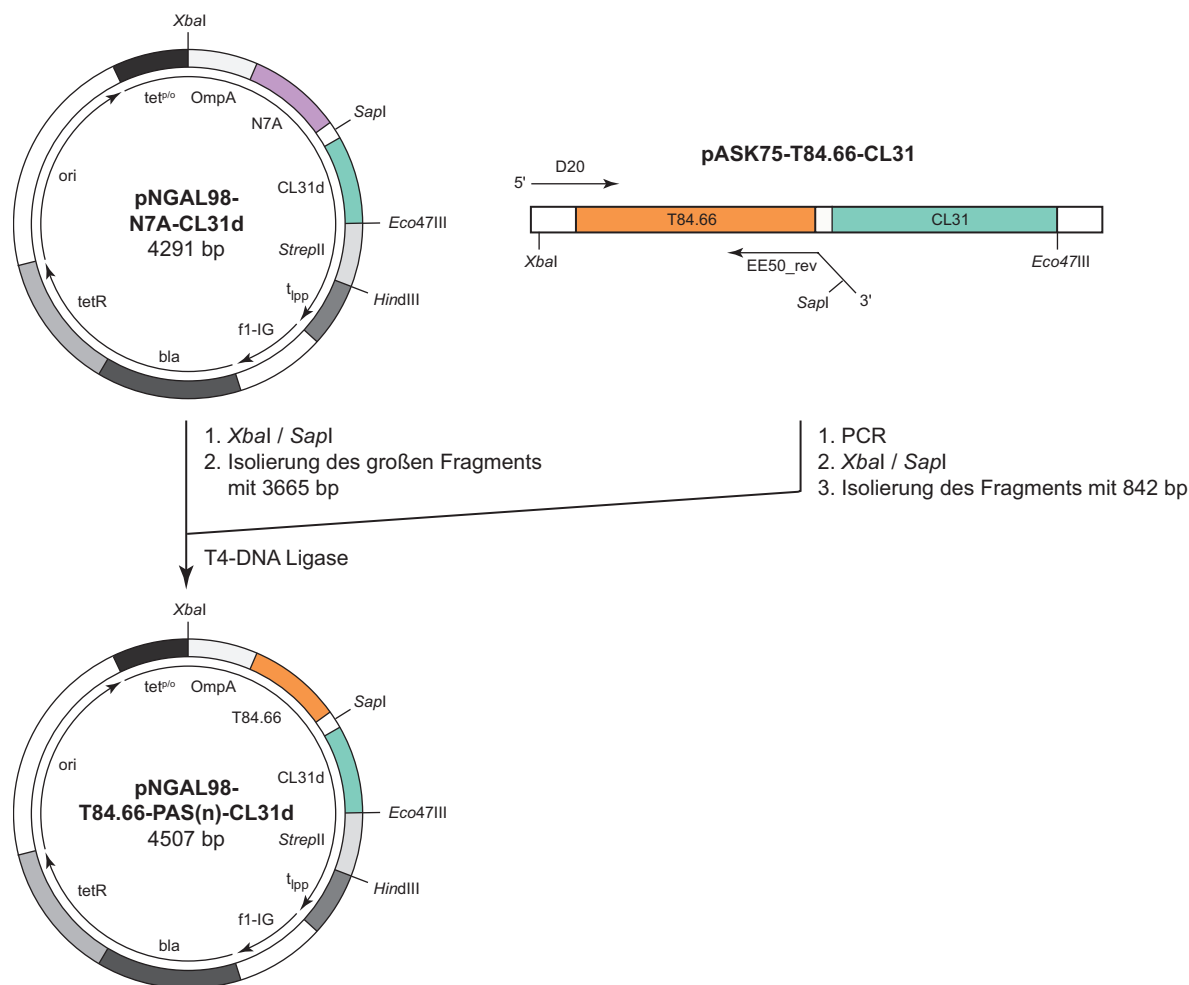


**Abbildung 33. Untersuchung der Ligandenbindungseigenschaften des scFv T84.66 sowie von T84.66-CL31 auf CEA-exprimierenden HT-29 Zellen mittels Durchflusszytometrie.** HT-29 Zellen wurden mit einer Konzentrationsreihe des jeweiligen rekombinanten Proteins inkubiert. Dessen Bindung an CEA wurde anschließend durch den für das *Strep*-tag II spezifischen murinen Antikörper *Strep*MAB-Immo sowie einen anti-Maus (Fab)<sub>2</sub>-AlexaFluor488 Sekundärantikörper quantifiziert (siehe Abschnitt 2.6.4).

### 3.3.5 Produktion und funktionelle Charakterisierung von scFv/Anticalin-Fusionsproteinen mit PAS-Linkern unterschiedlicher Länge

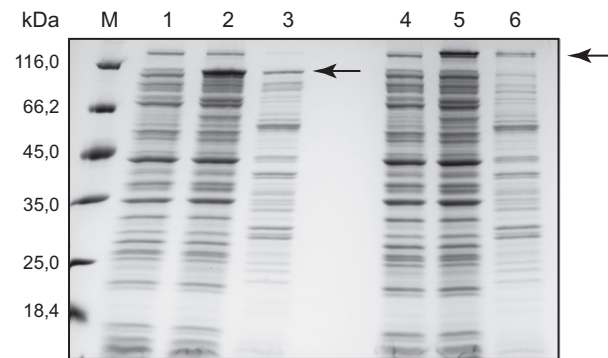
Im Hinblick auf die Anwendung des scFv/Anticalin-Fusionsproteins in der Radiagnostik/-therapie CEA-positiver Tumore sollten mit Hilfe der PASylation-Technologie – wie schon für die bispezifi-

schen Duocaline (siehe Abschnitt 3.2) – Varianten mit unterschiedlicher Molekülgröße und Plasma-Halbwertszeit generiert werden. Auf diese Weise kann die Akkumulation des Proteins im Tumor optimiert werden (Mendler *et al.*, 2015). Zu diesem Zweck wurden PAS-Polypeptide verschiedener Länge (200 und 400 AS) zwischen den beiden Bindeproteinen als Linker eingefügt. Aus dem Vektor pNGAL98-N7A-CL31d zur periplasmatischen Produktion eines Duocalins (siehe Abschnitt 3.2.1) wurde zunächst der Genabschnitt für das Anticalin N7A durch die Restriktionsenzyme *XbaI* und *SapI* entfernt und dafür das ebenfalls mit *XbaI* und *SapI* geschnittene DNA-Fragment für das scFv T84.66 inseriert (Abbildung 34). Dieser Genabschnitt war dazu mittels PCR unter Verwendung der Oligodesoxynukleotide D20 und EE50\_rev sowie der *Taq* DNA-Polymerase aus dem Expressionsvektor pASK75-T84.66-CL31 (siehe Abschnitt 3.3.3) amplifiziert worden. Dabei wurde am 3'-Ende des scFv T84.66 die kurze Nukleotidsequenz 3'-TCG AGA AGT CGG-5' angefügt, welche eine *SapI*-Schnittstelle beinhaltet. Diese *SapI*-Schnittstelle diente nachfolgend zur Insertion von PAS-Genkassetten für 200 bzw. 400 Aminosäuren. Die Sequenzen der konstruierten Vektoren wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft (siehe Abschnitt 2.2.5.7).



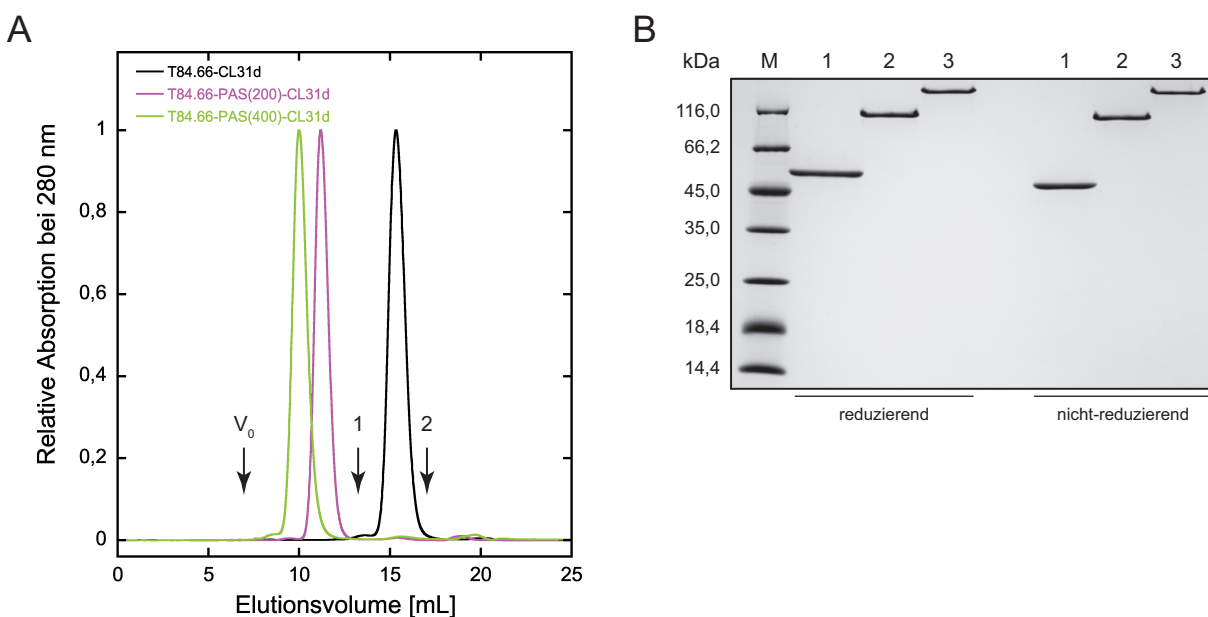
**Abbildung 34. Konstruktion von periplasmatischen Expressionsvektoren für T84.66-PAS(n)-CL31d.** Die zwischen den Genabschnitten von scFv T84.66 und CL31d gelegene *SapI*-Restriktionsschnittstelle diente zur anschließenden Insertion von PAS-Polypeptiden mit  $n = 200$  bzw.  $400$  Aminosäuren.

Die periplasmatische Sekretion der Fusionsproteine erfolgte entweder in mit dem jeweiligen Vektor transformierten TG1-F<sup>-</sup>-Zellen bei  $OD_{550} = 2,0$  im 2 L-Maßstab oder in *E. coli* W3310 im 8 L-Laborfermenter (siehe Abschnitt 2.3.1.2). Dabei konnte in der SDS-PAGE der Gesamtzellextrakte von Proben vor und nach Induktion der Proteinproduktion mit aTc jeweils die Bildung einer Produktbande beobachtet werden (Abbildung 35). Wie für PASylierte Proteine charakteristisch, zeigte sich auch hier eine erheblich verminderte elektrophoretische Mobilität der Proteine im Vergleich zu ihrer kalkulierten Molekülmasse (Tabelle 14), was auf eine verminderte Bindung von SDS als Triebkraft der elektrophoretischen Trennung zurückzuführen ist (Schlapschy *et al.*, 2013).



**Abbildung 35. SDS-PAGE der bakteriellen Produktion von T84.66-CL31d mit verschiedenen PAS-Linkern.** Untersucht wurde der Gesamtzellextrakt der mit dem entsprechenden Plasmid transformierten TG1-F Zellen vor (Spur 1) sowie nach (Spur 2) Induktion der Proteinproduktion bei  $OD_{550} = 2,0$  und eine Probe des Periplasma-Extrakts (Spur 3) von T84.66-PAS(200)-CL31d sowie von T84.66-PAS(400)-CL31d (entsprechend für Spuren 4-6). Die Pfeile markieren die jeweils relevante Proteinbande.

Nach Präparation des periplasmatischen Extrakts (Abbildung 35, Spur 3 bzw. 6) wurden die PASylierten scFv/Anticalin-Fusionsproteine in Analogie zu T84.66-CL31 ohne PAS-Linker zunächst durch *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert und anschließend durch AEX gereinigt (nicht gezeigt). Mit dem letzten Schritt wurde gleichzeitig das bakterielle Endotoxin aus den Proteinproben abgereichert, welches als pyrogener Bestandteil der äußeren Bakterienmembran bei *in vivo* Experimenten unerwünscht ist (Lee *et al.*, 2002). Zur biochemischen Charakterisierung wurden die gereinigten Fusionsproteine abschließend einer analytischen SEC sowie einer SDS-PAGE unterzogen (Abbildung 36).



**Abbildung 36. Untersuchung von T84.66-CL31d sowie seiner zwei PASylierten Varianten mit analytischer SEC und SDS-PAGE.** (A) Nach Isolierung der scFv/Anticalin-Fusionsproteine mit Hilfe des *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels wurde das jeweilige SA-Eluat einer AEX unterzogen und anschließend durch SEC mit einer in PBS äquilibrierten

Superdex 200 10/300 GL Säule (Bettvolumen: 24 mL) untersucht. Standardproteine: 1 = BSA (66 kDa), 2 = Carboanhydrase (29 kDa);  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (B) SDS-PAGE von T84.66-CL31d (Spur 1), T84.66-PAS(200)-CL31d (Spur 2) und T84.66-PAS(400)-CL31d (Spur 3) nach der SEC.

Alle drei Proteine zeigten in der Gelfiltration ein homogen monodisperses Verhalten (Abbildung 36A). Das Elutionsvolumen von T84.66-PAS(200)-CL31d betrug 11,6 mL entsprechend einer apparenten Molekülmasse von 213 kDa (Tabelle 14). Damit wurde das hydrodynamische Volumen durch den PAS(200)-Linker um den Faktor 3,3 im Vergleich zur kalkulierten Masse von 65 kDa vergrößert. Für T84.66-PAS(400)-CL31d mit einer berechneten Masse von 81,5 kDa wurde ein Elutionsvolumen von 10 mL (= 437 kDa) und damit ein Vergrößerungsfaktor von 5,4 beobachtet. Das Fusionsprotein T84.66-CL31d ohne PAS-Linker eluierte dagegen bei einem der berechneten Masse entsprechendem Volumen von 15,0 mL (= 46 kDa). Die SDS-PAGE der drei Fusionsproteine unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen bestätigte die Homogenität der Präparationen (Abbildung 36B).

Des Weiteren wurde die Affinität der drei scFv/Anticalin-Fusionsproteine für ihre beiden Liganden und dabei der Einfluss des PAS-Polypeptids bestimmt (Tabelle 13). Die durch das Anticalin CL31d vermittelte Bindung an den für die späteren *in vivo* Versuche relevanten Lu·Chelat-Komplex wurde auf einem mit ca. 240 RU Lu·DTPA-RNase derivatisierten Sensorchip mittels SPR-Spektroskopie quantifiziert. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe des jeweiligen Fusionsproteins in PBS/0,05T über den Sensorchip geleitet, und die kinetischen Parameter wurden durch Kurvenanpassung an das 1:1 Langmuir-Komplexbildungsmodell bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.1). Die so ermittelte Assoziationskonstante  $k_{on}$  blieb für das Fusionsprotein mit PAS(200)-Linker im Vergleich zu T84.66-CL31d praktisch erhalten und war für T84.66-PAS(400)-CL31d nur wenig erniedrigt (Tabelle 13). Ursache hierfür ist vermutlich die verlangsamte Diffusion des Proteins in die Dextran-Matrix des Sensorchips als Folge des vergrößerten hydrodynamischen Volumens. Zudem hatte der PAS-Linker überraschenderweise einen verlangsamenden Effekt auf die Dissoziationskinetik. Mit zunehmender PAS-Länge wurde eine Erniedrigung von  $k_{off}$  registriert (2-fach für T84.66-PAS(200)-CL31d bzw. 5-fach für T84.66-PAS(400)-CL31d). Als mögliche Erklärung kommt ein negativer Einfluss des scFv T84.66 auf die Dissoziation der Fusionsproteine von Lu·DTPA-RNase in Frage, dessen Effekt durch Vergrößerung des Molekülabstands zum Anticalin abgeschwächt wird. In Folge dessen wurde der  $K_D$ -Wert von  $4,9 \pm 0,1$  nM für das unmodifizierte Fusionsprotein auf  $1,23 \pm 0,02$  nM für das Fusionsprotein mit dem PAS(400)-Linker erniedrigt.

**Tabelle 13. Bindungseigenschaften von T84.66-CL31d sowie seiner PASylierten Versionen für Lu-DTPA-RNase sowie CEA ermittelt durch SPR-Spektroskopie bzw. Durchflusszytometrie.**

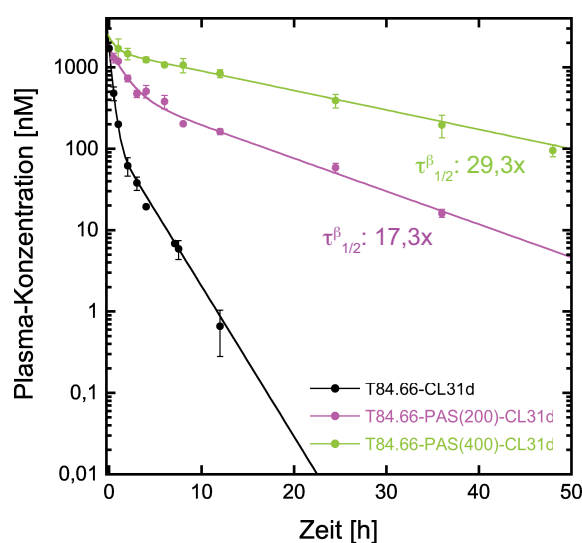
	Lu-DTPA-RNase			CEA
	$k_{on}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	$K_D$ [nM] <sup>b</sup>	$K_D$ [nM]
<b>T84.66-CL31d</b>	0,105 ± 0,001	517 ± 1,39	4,9 ± 0,1	1,40 ± 0,38
<b>T84.66-PAS(200)-CL31d</b>	0,106 ± 0,001	246 ± 1,34	2,31 ± 0,03	13 ± 1
<b>T84.66-PAS(400)-CL31d</b>	0,089 ± 0,001	110 ± 1,01	1,23 ± 0,02	22 ± 2

<sup>a</sup> Ermittelt aus einer Dissoziationszeit von 1500 s. <sup>b</sup>  $K_D$  berechnet aus  $k_{off}/k_{on}$ .

Die Affinität der scFv/Anticalin-Fusionsproteine zum CEA wurde, wie schon in Abschnitt 3.3.4 erläutert, auf HT-29 Karzinomzellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Tabelle 13). Die PASylierten Proteinvarianten zeigten ein von der Proteinkonzentration abhängiges sigmoidales Verhalten in der experimentell bestimmten Fluoreszenzintensität, wie es auch schon für T84.66-CL31 beobachtet wurde (vgl. Abbildung 33). Mit zunehmender PAS-Länge wurde eine Verringerung der Affinität für CEA beobachtet (T84.66-PAS(200)-CL31d um den Faktor 9,5 auf  $13 \pm 1 \text{ nM}$ ; T84.66-PAS(400)-CL31d um den Faktor 15,8 auf  $22 \pm 2 \text{ nM}$ ). Trotz der abgeschwächter Komplexbildung der PASylierten Fusionsproteine mit CEA auf den HT-29 Zellen liegt die Affinität nach wie vor im unteren nanomolaren Bereich und ist damit für eine *in vivo* Anwendung ausreichend.

### 3.3.6 Bestimmung der Plasma-Halbwertszeit von scFv/Anticalin-Fusionsproteinen in der Maus

Das scFv/Anticalin-Fusionsprotein sowie dessen PASylierte Versionen wurden hinsichtlich ihrer pharmakokinetischen Parameter charakterisiert (Abbildung 37, Tabelle 14). Hierfür wurden weibliche BALB/c Mäuse verwendet, welchen das jeweilige gereinigte Protein intravenös injiziert wurde.



**Abbildung 37. Pharmakokinetik von T84.66-CL31d sowie den beiden PASylierten Versionen in der Maus.** Weiblichen BALB/c Mäusen wurde intravenös T84.66-CL31d (Dosis: 5 mg/kg Körpergewicht) sowie die PASylierten



Versionen (äquimolare Dosis) injiziert (siehe Abschnitt 2.7.1). Die in einem *Sandwich*-ELISA quantifizierte Plasma-Konzentration (siehe Abschnitt 2.3.9) wurde gegen den Probenahmezeitpunkt aufgetragen und die Daten mit Hilfe der Software *WinNonlin* v6.1 angepasst. Die ermittelten Parameter sind in **Tabelle 14** zusammengefasst. Angegeben ist auch der jeweilige Faktor der Plasma-Halbwertszeit-Verlängerung im Verhältnis zum Fusionsprotein T84.66-CL31d.

Die mit Hilfe des quantitativen *Sandwich*-ELISA ermittelten Plasma-Konzentrationen der drei rekombinanten scFv/Anticalin-Fusionsproteine zeigten im zeitabhängigen Verlauf einen zweiphasigen Konzentrationsabfall (Abbildung 37). Dabei wurde das unmodifizierte T84.66-CL31d erwartungsgemäß am schnellsten eliminiert. Durch die PASylierung gelang es, die Plasma-Halbwertszeit von 26 min auf 7,4 h für T84.66-PAS(200)-CL31d bzw. auf 12,6 h für T84.66-PAS(400)-CL31d zu verlängern (Tabelle 14). Die Bioverfügbarkeit der Proteine – ausgedrückt in dem Flächenintegral unter der Kurve (AUC) – stieg in Abhängigkeit von der PAS-Länge um den Faktor 8 für das PAS(200)- bzw. Faktor 33 für das PAS(400)-Fusionsprotein. Gleichzeitig nahm die als Maß für die Ausscheidungsgeschwindigkeit geltende *Clearance* CL deutlich von 116 mL h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> (T84.66-CL31d) auf 3,6 mL h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> (T84.66-PAS(400)-CL31d) ab.

**Tabelle 14. Biochemische und pharmakokinetische Charakteristika von scFv/Anticalin-Fusionsproteinen.**

	MM [kDa] <sup>a</sup>	MM SEC [kDa] <sup>b</sup>	$\tau_{1/2}^{\beta}$ [h] <sup>c</sup>	AUC [h nM] <sup>d</sup>	CL [mL h <sup>-1</sup> kg <sup>-1</sup> ] <sup>e</sup>
<b>T84.66-CL31d</b>	48,7	46	0,43	885	116
<b>T84.66-PAS(200)-CL31d</b>	65,0	213	7,4	7154	14,4
<b>T84.66-PAS(400)-CL31d</b>	81,5	437	12,6	29003	3,6

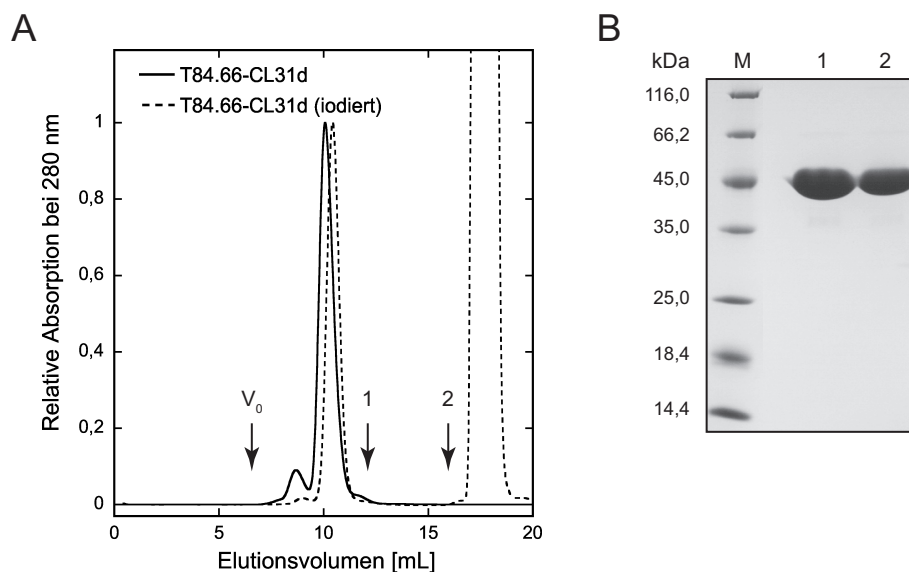
<sup>a</sup> Ermittelt aus der Primärsequenz des Proteins (ProtParam; www.expasy.org). <sup>b</sup> Anhand des Elutionsvolumens in der SEC kalkulierte apparente MM. <sup>c</sup> Plasma-Halbwertszeit in der Eliminierungsphase. <sup>d</sup> Flächenintegral unter der Kurve (*Area Under the Curve*). <sup>e</sup> Zeitabhängige Eliminierung des Proteins je Körpergewicht (*Clearance*). <sup>c,d,e</sup> Ermittelt aus der bi-exponentiellen Kurvenanpassung mit Hilfe des Programms *WinNonlin* v6.1.

### 3.3.7 *In vivo* Diagnostik von CEA-positiven Tumoren in der Maus durch Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Biodistributionsanalyse

Im Hinblick auf den Einsatz der scFv/Anticalin-Fusionsproteine für die *in vivo* Radiodiagnostik nach dem *Pretargeting*-Verfahren wurden die Proteine zunächst direkt mit radioaktivem <sup>124</sup>I markiert, um (i) ihre Fähigkeit zur spezifischen Anreicherung in dem CEA-positiven Tumormodell, (ii) ihre Verteilung in den gesunden Organen sowie (iii) ihre pharmakokinetischen Eigenschaften im Mausmodell zu evaluieren. Insbesondere der letzte Parameter liefert wichtige Informationen für das *Pretargeting*-Verfahren, da er Aufschluss über eine geeignete Zeitspanne zwischen der Injektion des tumorbindenden Proteins und der späteren Verabreichung des radioaktiven <sup>177</sup>Lu-DTPA-NH<sub>2</sub> gibt.

Die direkte Markierung von Proteinen mit Iod erfolgt ungerichtet in einer elektrophilen Substitutionsreaktion vornehmlich an Tyr-Seitenketten. Sind diese Seitenketten allerdings an der Ligandenbindung beteiligt, besteht das Risiko einer Beeinträchtigung der Bindungsaktivität. Um den Grad des Affinitätsverlusts im Fall des scFv/Anticalin-Fusionsproteins zu ermitteln, wurde zunächst T84.66-CL31d

kalt (nicht radioaktiv) iodiert, anschließend biochemisch charakterisiert (Abbildung 38) und die verbleibende Ligandenbindungsfähigkeit *in vitro* analysiert. Die Analyse der intermolekularen Kontakte zwischen CL31 und Y-DTPA anhand von Kristallstrukturinformationen hatte ergeben, dass die Interaktion unter anderem durch drei Tyr-Reste vermittelt wird (Eggenstein *et al.*, 2014), was infolge der Iodierung zu einer Reduktion der Affinität führen könnte. Zwar sind die molekularen Wechselwirkungen zwischen CEA und dem scFv T84.66 nicht bekannt, jedoch befinden sich auch hier mehrere Tyr-Seitenketten in den für die Antigenerkennung verantwortlichen CDRs (insbesondere CDR-H3; vgl. Abbildung 28).



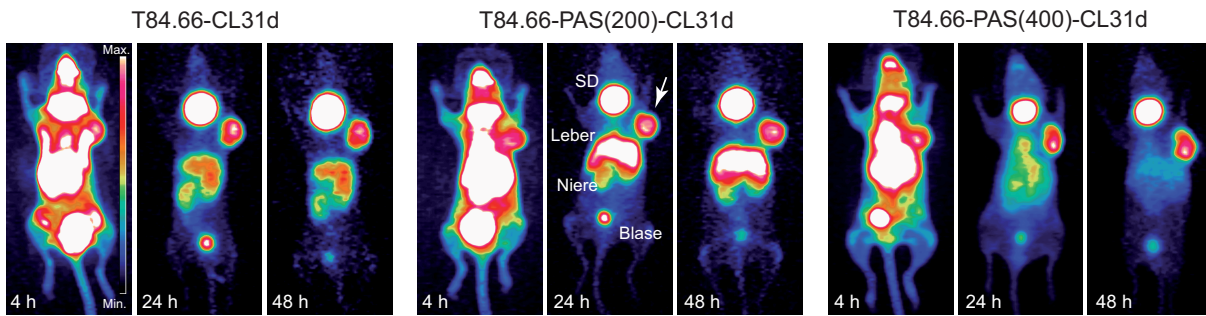
**Abbildung 38. Biochemische Analyse von kalt iodiertem T84.66-CL31d.** (A) Der Markierungsansatz wurde direkt im Anschluss an die Kopplungsreaktion auf eine mit PBS äquilibrierte analytische Superdex 75 10/300 GL Säule geladen und anschließend die Absorption des Fusionsproteins bei 280 nm auf den Wert 1 (ohne Berücksichtigung des Absorptionsbeitrages von Iod-Tyrosin) normalisiert. Das extrem intensive Signal bei ca. 18 mL resultiert aus der im Markierungsansatz enthaltenen Ascorbinsäure. Standardproteine: 1 = Carboanhydrase (29 kDa), 2 = Aprotinin (6,5 kDa);  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (B) SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von T84.66-CL31d vor (Spur 1) und nach (Spur 2) kalter Iodierung.

Das kalt iodierte T84.66-CL31d zeigte in der SEC keine Hinweise auf Proteinaggregation oder verändertes Oligomerisierungsverhalten (Abbildung 38A). Das Elutionsvolumen des symmetrischen Peaks war im Vergleich zum nicht iodierten T84.66-CL31d geringfügig in Richtung einer kleineren apparenten Molekülmasse verschoben. Dies deutete auf eine minimale unspezifische Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial. Die dem Reaktionsansatz zum Abstoppen der Iodierung zugesetzte Ascorbinsäure absorbiert stark bei 280 nm und eluiert bei ca. 18 mL. Die Analyse des Iodierungsansatzes von T84.66-CL31d mittels SDS-PAGE ergab keine sichtbaren Veränderungen des Laufverhaltens und ließ auf eine homogene Proteinpräparation schließen (Abbildung 38B).

Die Untersuchung der Ligandenbindungseigenschaften des kalt iodierten T84.66-CL31d für Lu-DTPA-RNase bzw. CEA ergab, dass die Affinität für beide Liganden durch die Iodierung fast unbeeinflusst blieb. In der SPR-Spektroskopie wurde für die Erkennung von Lu-DTPA-RNase ein  $K_D$ -Wert von  $8,99 \pm 0,08$  nM ermittelt, was einer Verdoppelung im Vergleich zum nicht-iodierten Protein entspricht. Hauptursache war hierfür die Verdoppelung der Dissoziationskonstante  $k_{off}$  auf  $1090 \pm 2,75 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ , während die Assoziationskonstante  $k_{on}$  nahezu unbeeinflusst blieb ( $k_{on} = 0,121 \pm 0,001 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Die mittels Durchflusszytofluorimetrie analysierte Erkennung von CEA auf HT-29 Zellen war durch die Iodierung ebenfalls nur geringfügig beeinträchtigt. Hier wurde ein  $K_D$ -Wert von  $3,30 \pm 0,73$  nM entsprechend einer um den Faktor 2,4 reduzierten Affinität bestimmt.

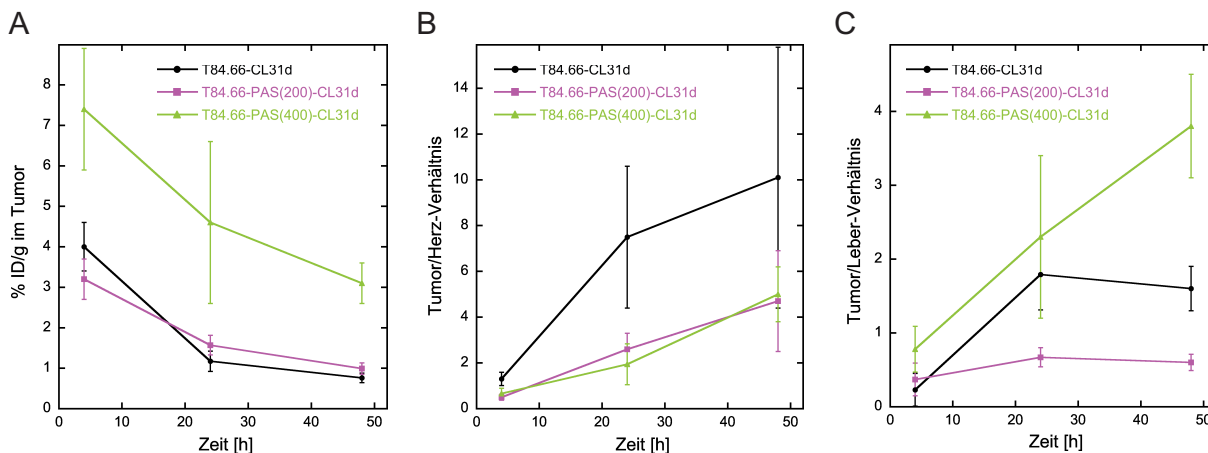
Die Markierung der drei scFv/Anticalin-Fusionsproteine mit radioaktivem  $^{124}\text{I}$  erfolgte gemäß der Vorschrift in Abschnitt 2.5.2. Die radiochemische Reinheit des Markierungsprodukts (Def.: Für ein bestimmtes Radionuklid das in Prozent ausgedrückte Verhältnis zwischen der Radioaktivität des Radionuklids in der angegebenen chemischen Form und der Gesamtradioaktivität des Radionuklids im radioaktiven Arzneimittel; *Ph. Eur.* 8. Ausgabe, 8. Nachtrag), also hier der prozentuale Anteil des mit  $^{124}\text{I}$  markierten Proteins an der Gesamtradioaktivität, wurde im Anschluss an die zur Abtrennung von überschüssigen Kopplungsreagenzien durchgeführte Gelfiltration dünnschichtchromatographisch ermittelt. Bei allen drei Fusionsproteinen lag diese über 96 %. Jede Gruppe (N = 3) der CEA-Xenograft Mäuse erhielt intravenös über die Schwanzvene ca. 0,05 nmol des jeweiligen  $^{124}\text{I}$ -Fusionsproteins (Spezifische Aktivität:  $\sim 1.1 \text{ MBq/pmol}$ ) injiziert und wurde 4 h, 24 h und 48 h danach unter Narkose einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit Computer Tomographie (CT) unterzogen (siehe Abschnitt 2.7.2). Mit Hilfe der nicht-invasiven PET-Bildgebung wird die räumliche Verteilung positronenemittierender Radionuklide – hier gekoppelt an ein Protein – sichtbar gemacht. Das CT-Bild ermöglicht gleichzeitig die anatomische Zuordnung der detektierten Radioaktivität (nicht gezeigt).

Alle drei Fusionsproteine wurden spezifisch in die CEA-positiven Tumore aufgenommen (Abbildung 39). Während 4 h nach der Injektion noch ein Großteil der Radioaktivität in der Vaskulatur zirkulierte, zeigte sich bereits nach 24 h eine deutliche Eliminierung aller drei Proteine aus dem Blutkreislauf, so dass das Tumorsignal hervortrat. In Folge dessen wurde das Hintergrundsignal deutlich reduziert, was zu einem höheren Bildkontrast führte. Dieser Trend setzte sich bis zum letzten Diagnosezeitpunkt bei 48 h fort. Da radioaktives  $^{124}\text{I}$  wie das nicht radioaktive Element verstoffwechselt wird, trat aufgrund von Protein-Deiodierungsreaktionen bei der Aufnahme zur Hormonproduktion eine hohe lokale Aktivität in der Schilddrüse (SD) auf. Überschüssiges Iod wird schnell zudem über den Urin ausgeschieden und war daher auch in der Harnblase zu finden. Überraschenderweise zeigten die mit  $^{124}\text{I}$ -T84.66-PAS(200)-CL31d injizierten Mäuse nach 24 h ein höheres Radioaktivitätssignal in der Leber als die übrigen Versuchsgruppen, welches dort über weitere 24 h zurückgehalten wurde. Im Gegensatz dazu blieb die Anreicherung des Fusionsproteins mit dem PAS(400)-Linker in gesundem Gewebe fast gänzlich aus. T84.66-CL31d wurde im Vergleich dazu bloß moderat im Lebergewebe angereichert.



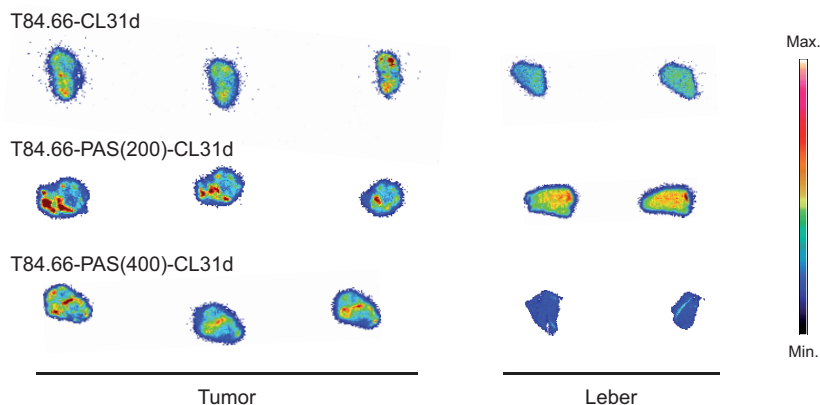
**Abbildung 39. PET-Untersuchung von CEA-Xenograft Mäusen nach Injektion  $^{124}\text{I}$  markierter scFv/Anticalin-Fusionsproteine.** Zur Ausbildung eines CEA-positiven Tumors wurden immundefizienten CD1 Mäusen 5 Mio. LS-174T Karzinomzellen in die rechte Schulter (Pfeil) injiziert. Nach 10 Tagen wurden 5,6 bis 7,1 MBq des jeweiligen  $^{124}\text{I}$ -Fusionsproteins (Spezifische Aktivität:  $\sim 1.1$  MBq/pmol) intravenös appliziert und dessen Verteilung nach 4 h, 24 h und 48 h in einem Kleintier-PET/CT verfolgt. Die PET-Bilder wurden iterativ mit Hilfe des Algorithmus 3D-OSEM rekonstruiert. Dargestellt ist jeweils das repräsentative MIP (*Maximum Imaging Projection*) PET-Bild einer Mausgruppe (N = 3) zum angegebenen Zeitpunkt, wobei jedes Bild für optimalen Bildkontrast (Tumor/Hintergrund-Verhältnis) skaliert wurde.

Die Quantifizierung der  $^{124}\text{I}$ -Radioaktivität anhand der PET-Bilder, ausgedrückt als prozentualer Anteil der injizierten Dosis pro Gewebemasse (% ID/g), ermöglichte eine Bewertung der pharmakokinetischen Eigenschaften der drei scFv/Anticalin-Fusionsproteine (Abbildung 40 und Tabelle A1). Die vergleichsweise höchste Tumorrakkumulation zeigte T84.66-PAS(400)-CL31d 4 h nach der Injektion mit  $7,4 \pm 1,5$  % ID/g (Abbildung 40A). Dieser Wert halbierte sich beinahe im Verlauf der weiteren 44 h auf  $3,1 \pm 0,5$  % ID/g. Die Aufnahme der beiden anderen Fusionsproteine in das Tumorgewebe lag demgegenüber deutlich niedriger. So betrug 4 h nach der Proteininjektion die Radioaktivität im Tumor  $4,0 \pm 0,6$  % ID/g für T84.66-CL31d bzw.  $3,2 \pm 0,5$  % ID/g für T84.66-PAS(200)-CL31d. Nach 48 h war die Aktivität im Tumor in diesen Fällen um ungefähr 1/4 (T84.66-CL31d) bzw. 1/3 (T84.66-PAS(200)-CL31d) reduziert.



**Abbildung 40. Tumoranreicherung der  $^{124}\text{I}$  markierten scFv/Anticalin-Fusionsproteine in CEA-Xenograft Mäusen.** (A) Anhand der nach 4 h, 24 h und 48 h aufgenommenen PET-Bilder jeder Maus wurde die im Tumor lokalisierte  $^{124}\text{I}$ -Radioaktivität, ausgedrückt als prozentualer Anteil der injizierten Dosis pro Organmasse (% ID/g), mit dem Programm *Inveon Research* quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus  $N = 3$ . Die spezifische Tumoranreicherung der scFv/Anticalin-Fusionsproteine wurde zudem in das Verhältnis zur ermittelten % ID/g im Herzen – entsprechend der im Blut zirkulierenden Radioaktivität – (B) sowie in der Leber (C) gesetzt.

Die Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit durch die PASylierung ging im Versuchsverlauf mit einer Verschlechterung des Tumor/Herz-Verhältnisses einher (Abbildung 40B). Das zunächst nach 4 h für alle drei Fusionsproteine nahezu identische niedrige Tumor/Herz-Verhältnis, erhöhte sich für T84.66-CL31d nach 48 h auf fast das 10-fache des Ausgangswertes. Die Tumor/Herz-Verhältnisse der beiden PASylierten Varianten stiegen im zeitlichen Verlauf des Versuchs ebenfalls an, erreichten jedoch nur ca. 30 % (nach 24 h) bzw. 50 % (nach 48 h) dieses Wertes. T84.66-PAS(200)-CL31d und T84.66-PAS(400)-CL31d wiesen dabei sehr ähnliche Tumor/Herz-Verhältnisse auf, wobei der PAS(200)-Linker zwar zu einer schnelleren Eliminierung als der PAS(400)-Linker führte, aber T84.66-PAS(200)-CL31d deutlich weniger im Tumorgewebe akkumulierte. Die geringe unspezifische Aufnahme von T84.66-PAS(400)-CL31d in die Leber spiegelte sich in einem vergleichsweise hohen Tumor/Leber-Verhältnis von  $3,8 \pm 0,7$  nach 48 h wider (Abbildung 40C). Im Gegensatz dazu erzielte das Fusionsprotein mit dem PAS(200)-Linker dabei mit  $0,60 \pm 0,11$  den mit Abstand schlechtesten Wert.



**Abbildung 41. Autoradiographische Analyse von Tumor- und Leberschnitten 48 h nach Injektion der  $^{124}\text{I}$  markierten scFv/Anticalin-Fusionsproteine.** Ein Teil des für die Biodistribution entnommenen Organs wurde in *Tissue-Tek* Einbettmedium konserviert, und mit Hilfe eines Kryo-Mikrotoms wurden aus verschiedenen Regionen des Gewebes 10  $\mu\text{m}$  dünne Schnitte abgetragen. Diese wurden auf einem Objektträger fixiert und mit einem lichtempfindlichen Fotofilm in Kontakt gebracht. Anschließend wurde die durch den  $^{124}\text{I}$ -Zerfall freiwerdende Strahlung quantifiziert.

Die Verteilung der  $^{124}\text{I}$ -Fusionsproteine innerhalb des Tumors bzw. der Leber wurde im Anschluss an die weiter unten beschriebene Biodistributionsanalyse durch autoradiographische Analyse von Gewebeschnitten untersucht (Abbildung 41). Alle drei Proteine zeigten stark heterogene Verteilung der Aktivität mit lokalen Maxima im Tumorrinneren. Die Heterogenität des Radioaktivitätssignals ist vermutlich auf die histologische Morphologie des mit Hilfe der LS-174T Zellen generierten Xenograft-Tumors zurückzuführen. So sind ein moderater bis geringer Differenzierungsgrad, eine heterogene und unsystematische Gefäßstruktur sowie heterogene CEA-Expression für dieses Xenograft-Modell charakteristisch (El Emir *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu dem anti-CEA Antikörper A5B7 (El Emir *et al.*, 2007), der ebenfalls die hier beobachtete extrem heterogene und ungleichmäßige Verteilung im Tumor – allerdings mehr in dessen Peripherie – gezeigt hatte, wiesen alle scFv/Anticalin-Fusionsproteine zudem gute Gewebepenetration auf, so dass sich in den Randbereichen der Tumore die niedrigste Signalintensität zeigte. Die autoradiographische Analyse der Leberschnitte ergab eine hohe aber vergleichsweise homogene Akkumulation von  $^{124}\text{I}$ -T84.66-PAS(200)-CL31d. Die scFv/Anticalin-Fusionsproteine mit PAS(400)- bzw. ohne PAS-Linker zeigten dagegen erwartungsgemäß nur minimale  $^{124}\text{I}$ -Intensität.

Nach der letzten PET-Untersuchung 48 h nach Proteininjektion wurde mit den Gewebeproben eine Biodistributionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden alle Organe aus den Mäusen präpariert, gewogen und die Gesamtradioaktivität im  $\gamma$ -Zähler quantifiziert. Nach Korrektur der  $^{124}\text{I}$ -Aktivität unter Berücksichtigung des radioaktiven Isotopenzerfalls sowie der bei der Proteininjektion in der Schwanzvene verbliebenen Aktivität wurde die organspezifische Verteilung der Proteine als % ID/g ermittelt (Tabelle 15).

**Tabelle 15. Biodistribution von  $^{124}\text{I}$  markierten scFv/Anticalin-Fusionsproteinen in CEA-Xenograft Mäusen 48 h nach intravenöser Proteininjektion.**

	<b>T84.66-CL31d</b>	<b>T84.66-PAS(200)-CL31d</b>	<b>T84.66-PAS(400)-CL31d</b>
<i>% ID/g</i>			
<b>Blut</b>	0,076 ± 0,020	0,21 ± 0,03	1,13 ± 0,14
<b>Herz</b>	0,050 ± 0,007	0,13 ± 0,01	0,27 ± 0,02
<b>Lunge</b>	0,072 ± 0,014	0,27 ± 0,08	0,62 ± 0,14
<b>Leber</b>	0,68 ± 0,08	2,3 ± 0,1	0,95 ± 0,08
<b>Milz</b>	0,48 ± 0,06	1,83 ± 0,18	0,87 ± 0,04
<b>Niere</b>	1,05 ± 0,13	1,77 ± 0,15	0,85 ± 0,09
<b>Nebenniere</b>	0,23 ± 0,04	0,50 ± 0,13	0,57 ± 0,08
<b>Pankreas</b>	0,039 ± 0,003	0,10 ± 0,02	0,17 ± 0,04
<b>Magen</b>	0,077 ± 0,009	0,15 ± 0,04	0,32 ± 0,02
<b>Dünndarm</b>	0,042 ± 0,003	0,094 ± 0,014	0,15 ± 0,02
<b>Dickdarm</b>	0,081 ± 0,031	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,02
<b>Muskel</b>	0,021 ± 0,001	0,033 ± 0,009	0,071 ± 0,002
<b>Knochen</b>	0,16 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,253 ± 0,004
<b>Haut</b>	0,087 ± 0,003	0,17 ± 0,02	0,32 ± 0,01
<b>Gehirn</b>	0,007 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,032 ± 0,003
<b>Tumor</b>	1,06 ± 0,25	1,43 ± 0,25	3,7 ± 1,0
<i>Tumor/Organ-Verhältnis</i>			
<b>T/Blut</b>	14 ± 5	6,9 ± 1,5	3,3 ± 1,0
<b>T/Herz</b>	21 ± 6	10,8 ± 2,1	14 ± 4
<b>T/Lunge</b>	15 ± 5	5,3 ± 1,7	6,0 ± 2,1
<b>T/Leber</b>	1,55 ± 0,41	0,64 ± 0,11	3,9 ± 1,1
<b>T/Milz</b>	2,0 ± 0,6	0,78 ± 0,16	4,3 ± 1,2
<b>T/Niere</b>	1,00 ± 0,27	0,81 ± 0,16	4,3 ± 1,3
<b>T/Nebenniere</b>	4,6 ± 1,3	2,9 ± 0,9	6,4 ± 2,0
<b>T/Pankreas</b>	27 ± 7	14 ± 4	22 ± 8
<b>T/Magen</b>	14 ± 4	9,5 ± 3,2	12 ± 3
<b>T/Dünndarm</b>	25 ± 6	15 ± 3	25 ± 8
<b>T/Dickdarm</b>	13 ± 6	13 ± 4	23 ± 7
<b>T/Muskel</b>	50 ± 12	43 ± 13	52 ± 14
<b>T/Knochen</b>	6,8 ± 1,9	3,8 ± 0,8	15 ± 4
<b>T/Haut</b>	12 ± 3	8,4 ± 1,7	11 ± 3
<b>T/Gehirn</b>	153 ± 48	98 ± 22	117 ± 34

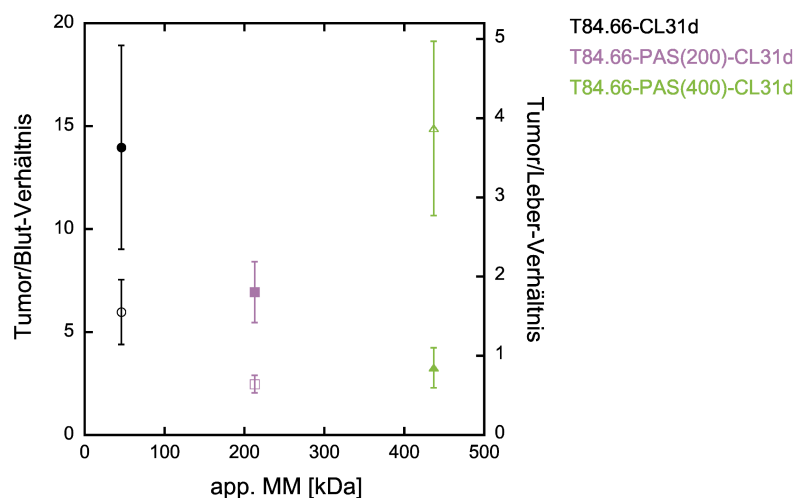
Angegeben ist der % ID/g bzw. der Quotient aus den % ID/g zweier Organe als Mittelwert aus N = 3.

Die mit  $3,7 \pm 1,0$  % ID/g höchste Akkumulation im Tumorgewebe erzielte T84.66-PAS(400)-CL31d gefolgt von T84.66-PAS(200)-CL31d mit  $1,43 \pm 0,25$  % ID/g sowie T84.66-CL31d mit  $1,06 \pm 0,25$  % ID/g. Somit bewirkte der PAS(400)-Linker eine ca. 3,5-fache Steigerung des proteinvermittelten  $^{124}\text{I}$ -Radioaktivitätssignals am Tumor im Vergleich zum unmodifizierten Fusionsprotein. Die Version mit

dem PAS(200)-Linker wurde in vergleichsweise hoher Konzentration in gesunden Organen wie der Niere, der Milz und vor allem der Leber nachgewiesen, in der die Anreicherung bis zu  $2,3 \pm 0,1$  % ID/g und damit mehr als dem Dreifachen des unmodifizierten Fusionsproteins entsprach. In allen übrigen Organen – außer dem Blut – zeigten die Fusionsproteine unabhängig von der PASylierung keine ausgeprägte Tendenz zur Akkumulation ( $\% \text{ ID/g} < 0,6$ ).

Die Ergebnisse aus der Quantifizierung der PET-Bilder wurden damit vor allem hinsichtlich der Anreicherung im Tumor wie auch der Leber bestätigt. Generell wurde allerdings beobachtet, dass die aus der Biodistribution erhaltenen Werte für % ID/g etwa 30 % (T84.66-CL31d und T84.66-PAS(200)-CL31d) bzw. 17 % (T84.66-PAS(400)-CL31d) höher waren als die anhand der PET-Bilder ermittelten % ID/g Werte. Dies läßt sich vermutlich auf die Abschwächung der  $\gamma$ -Quanten des Radionuklids innerhalb eines Gewebes und andererseits auf die auf 1-2 mm limitierte Auflösung der PET-Bildgebung zurückführen, was beides zur Unterschätzung des Aktivitätssignals führt (Judenhofer *et al.*, 2011).

Der Anteil des im Blut zirkulierenden T84.66-PAS(400)-CL31d war mit  $1,13 \pm 0,14$  % ID/g aufgrund der verlangsamten renalen Eliminierung in Folge des vergrößerten hydrodynamischen Volumens gegenüber dem unmodifizierten Fusionsprotein ( $0,076 \pm 0,020$  % ID/g) nach 48 h deutlich erhöht. Infolgedessen erzielte T84.66-PAS(400)-CL31d trotz einer vergleichsweise hohen lokalen Konzentration am Tumor mit  $3,3 \pm 1,0$  das niedrigste Tumor/Blut-Verhältnis im Vergleich zu den beiden anderen Fusionsproteinen (Abbildung 42). Das unmodifizierte Fusionsprotein erreichte mit einem Wert von  $14 \pm 5$  dagegen das beste Tumor/Blut-Verhältnis. Das Tumor/Leber-Verhältnis korrelierte überraschenderweise auf nicht-lineare Art mit dem hydrodynamischen Volumen (Abbildung 42). Hier spiegelte sich die hohe Leberakkumulation von T84.66-PAS(200)-CL31d in einem niedrigen Tumor/Leber-Verhältnis wider ( $< 1$ ), welches durch den längeren PAS(400)-Linker um den Faktor 6 bzw. bei Fehlen des PAS-Linkers um den Faktor 2,4 erhöht war.



**Abbildung 42.** Abhängigkeit der Tumor/Gewebe-Verhältnisse ermittelt durch Biodistributionsanalyse (48 h p.i.) von der apparenten Molekülmasse der  $^{124}\text{I}$  markierten Fusionsproteine. Die gefüllten Symbole repräsentieren die Tumor/Blut-Verhältnisse, wohingegen die leeren Symbole die Tumor/Leber-Verhältnisse abbilden. Die Werte



wurden aus den Quotienten der % ID/g des jeweiligen Organs aus  $N = 3$  Mäusen berechnet. Die jeweilige apparente Molmasse wurde aus dem Elutionsvolumen in der analytischen SEC ermittelt (**Tabelle 14**).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde das Fusionsprotein T84.66-PAS(400)-CL31d als besonders vielversprechend für die *in vivo Pretargeting*-Studie ausgewählt (siehe Abschnitt 3.3.9). Entscheidend dabei waren die hohe Tumorakkumulation sowie das gute Tumor/Gewebe-Verhältnis bei einem moderaten Tumor/Blut-Verhältnis. Der Zeitpunkt der Biodistributionsmessung wurde im folgenden als Injektionszeitpunkt für  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA-NH}_2$  festgelegt, da sowohl die Quantifizierung der PET-Bilder nach 48 h – im Vergleich zu 4 h bzw. 24 h – als auch die Biodistribution das höchste Tumor/Blut-Verhältnis für T84.66-PAS(400)-CL31d ergeben hatten. Für eine konventionelle nuklearmedizinische Diagnostik, bei der das antigenbindende Protein direkt mit dem Radionuklid markiert ist (z.B. mit einem Iodisotop), wäre dagegen das unmodifizierte T84.66-CL31d vorzuziehen, da dessen besseres Tumor/Blut-Verhältnis zu einem stärkeren Kontrast der PET-Aufnahme zu einem früheren Zeitpunkt sowie zu einer niedrigen radioaktiven Gesamtbelastung des Patienten führt.

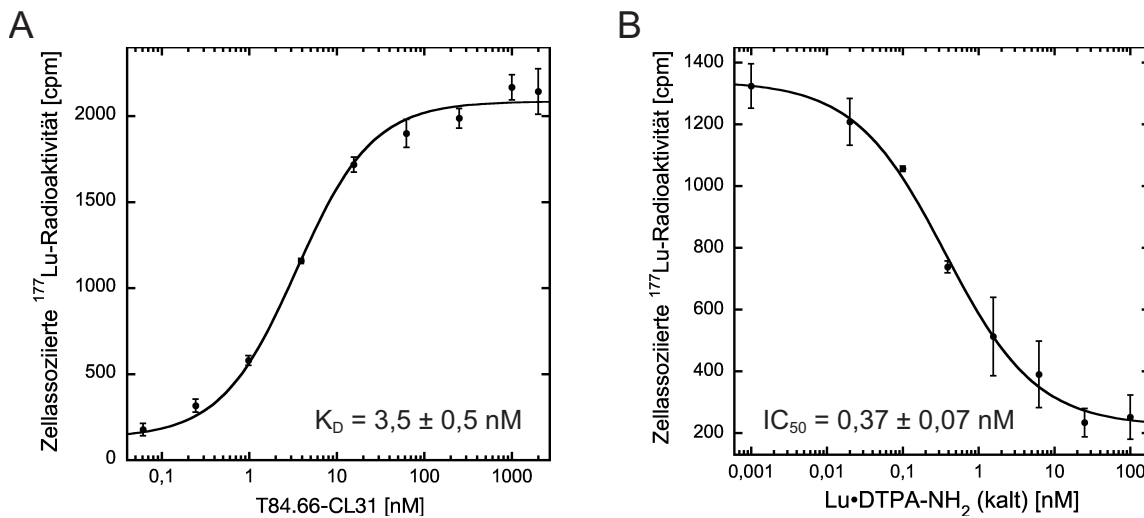
### 3.3.8 *In vitro Pretargeting* auf CEA-positiven HT-29 Zellen mit mono- und divalentem $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}$

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Untersuchung der scFv/Anticalin-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Ligandenbindungsfähigkeit für den Me-DTPA-Komplex (indirekter ELISA, SPR-Spektroskopie) und zellassoziertes CEA (Durchflusszytofluorimetrie) beschrieben. Der Nachweis einer simultanen Bindung beider Liganden, wie es für eine Anwendung im Sinne des *Pretargeting*-Verfahrens notwendig ist, erfolgte bislang ausschließlich im quantitativen *Sandwich*-ELISA zur Auswertung der pK-Studie in der Maus (siehe Abschnitt 3.3.6). Anhand von Bindungsexperimenten auf CEA-exprimierenden HT-29 Zellen unter Verwendung von radioaktivem  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}$  sollte nun im Hinblick auf das *Pretargeting in vivo* die effektive Bindung beider Liganden auf den Zellen simuliert werden. Zugleich sollten divalente DTPA-Konjugate evaluiert werden, um von einem ggf. auftretenden Aviditätseffekt für das Anticalin CL31d profitieren zu können.

#### 3.3.8.1 Verwendung des monovalenten Radiometallchelators $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA-NH}_2$

Zunächst wurde die Affinität des unmodifizierten Fusionsproteins T84.66-CL31 für zellassoziertes CEA bestimmt, indem nach Inkubation der HT-29 Zellen mit einer Konzentrationsreihe des Proteins und anschließender Zugabe von  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA-NH}_2$  im Überschuß die zellgebundene  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität quantifiziert wurde (Abbildung 43A). Für diese, als indirektes Maß der Proteinbindung geltende  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität ergab sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration in halb-logarithmischer Darstellung erwartungsgemäß eine sigmoidale Signalzunahme, was auf ein Sättigungsverhalten hindeutete. Nach Kurvenanpassung entsprechend dem Massenwirkungsgesetz wurde die Proteinkonzentration bei halb-maximaler  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität zu  $3,5 \pm 0,5$  nM bestimmt und entsprach damit nahezu dem mittels Durchflusszytofluorimetrie bestimmten  $K_D$ -Wert von 1,4 nM für die Kom-

plexbildung zwischen dem scFv T84.66 im Fusionsprotein und dem membranständigen Rezeptor (siehe Abschnitt 3.3.5).



**Abbildung 43. In vitro Pretargeting auf CEA-exprimierenden HT-29 Karzinomzellen.** (A) Die adhären wachsenden Zellen wurden zunächst mit einer Konzentrationsreihe von T84.66-CL31 und nach Waschen mit PBS mit 100.000 cpm  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> (Spezifische Aktivität: 131 MBq/nmol) je Vertiefung inkubiert. Die gewaschenen Zellen wurden anschließend lysiert und deren  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität im  $\gamma$ -Zähler quantifiziert. (B) Adhären HT-29 Zellen wurden zunächst mit einer 50 nM T84.66-CL31d-Lösung und dann mit einer Konzentrationsreihe von Lu-DTPA-NH<sub>2</sub> in Gegenwart einer konstanten Konzentration von 1 nM radioaktivem  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> inkubiert (ohne Berücksichtigung, dass der Chelator vermutlich nur partiell durch das Radiometall  $^{177}\text{Lu}$  komplexiert vorlag). Anschließend wurde der zellgebundene Anteil an  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität wie bei (A) quantifiziert. Die Kurvenanpassung erfolgte entsprechend der Formel in Abschnitt 2.6.4. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung.

Die Bindungsaktivität von T84.66-CL31d für  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> konnte nicht durch direkte Titration bestimmt werden, da die zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes notwendige Radioligandenkonzentration zu einem hohen unspezifischen Hintergrundsignal auf den Zellen führt. Stattdessen wurde eine kompetitive Verdrängung des radioaktiven Liganden an dem zellgebundenen Fusionsprotein durch nicht-radioaktives Lu-DTPA-NH<sub>2</sub> durchgeführt (Abbildung 43B). Dazu wurde eine konstante Konzentration von 50 nM T84.66-CL31d eingesetzt, bei der die CEA-Bindungsstellen auf den Zellen weitgehend gesättigt sind. Die ebenfalls konstante Konzentration von radioaktivem  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> orientierte sich dagegen an dem aus der Fluoreszenztitration ermittelten  $K_D$ -Wert und betrug 1 nM (siehe Abschnitt 3.1.4). Zur Konkurrenz wurde eine Konzentrationsreihe von 400 nM bis 0,0015 nM nicht-radioaktivem Lu-DTPA-NH<sub>2</sub> zugesetzt. Die  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität der lysierten Zellen wurde anschließend gegen die eingesetzte Konzentration des nicht-radioaktiven Metallchelats in halb-logarithmischer Skalierung aufgetragen. Im Gegensatz zu einem nicht-kompetitiven ELISA nimmt hier die Signalstärke mit zunehmender Ligandenkonzentration ab, wobei das Radioaktivitätssignal von ca.

200 cpm bei hoher Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> Konzentration (> 100 nM) die unspezifische Bindung von radioaktivem <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> an die Zellen widerspiegelt. Die Konzentration von kaltem Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> bei halb-maximaler <sup>177</sup>Lu-Radioaktivität wird als IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration 50 %*) bezeichnet und entspricht der Konzentration, die notwendig ist, um die spezifische Bindung von <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> um 50 % zu reduzieren. Durch nicht-lineare Kurvenanpassung nach der Formel in Abschnitt 2.6.4 wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0,37 ± 0,07 nM bestimmt.

Zur Ermittlung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K<sub>D</sub> von T84.66-CL31d für den Komplex mit kaltem Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> in Abwesenheit des Indikators <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> wurde die Cheng-Prusoff Gleichung nach Abschnitt 2.6.4 verwendet. Im Gegensatz zum IC<sub>50</sub>-Wert ist K<sub>D</sub> unabhängig von der eingesetzten Radioliganden-Konzentration. Je größer die eingesetzte <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> Konzentration ist, desto höhere Konzentrationen an kaltem Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> sind für eine Verdrängung des Radioliganden erforderlich, wodurch der IC<sub>50</sub>-Wert ebenfalls zunimmt. Unter der Annahme, dass <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> und nicht-radioaktives Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> identische Affinität zu CL31d aufweisen, wurde der K<sub>D</sub>-Wert ermittelt, indem der für die Bindung von Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> in einer Fluoreszenztitration zuvor bestimmte EC<sub>50</sub>-Wert von 0,8 nM (vgl. Abschnitt 3.1.3), die eingesetzte Konzentration von <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> (1 nM) und der experimentell ermittelte IC<sub>50</sub>-Wert in die Cheng-Prusoff Gleichung eingesetzt wurden. Der dabei ermittelte K<sub>D</sub>-Wert von 0,16 nM bestätigte die extrem gute Bindungsaffinität des Anticalins CL31d für den Metallchelator-Komplex, welche selbst bei Fusion mit einem anderen Bindeprotein (hier das scFv) erhalten bleibt.

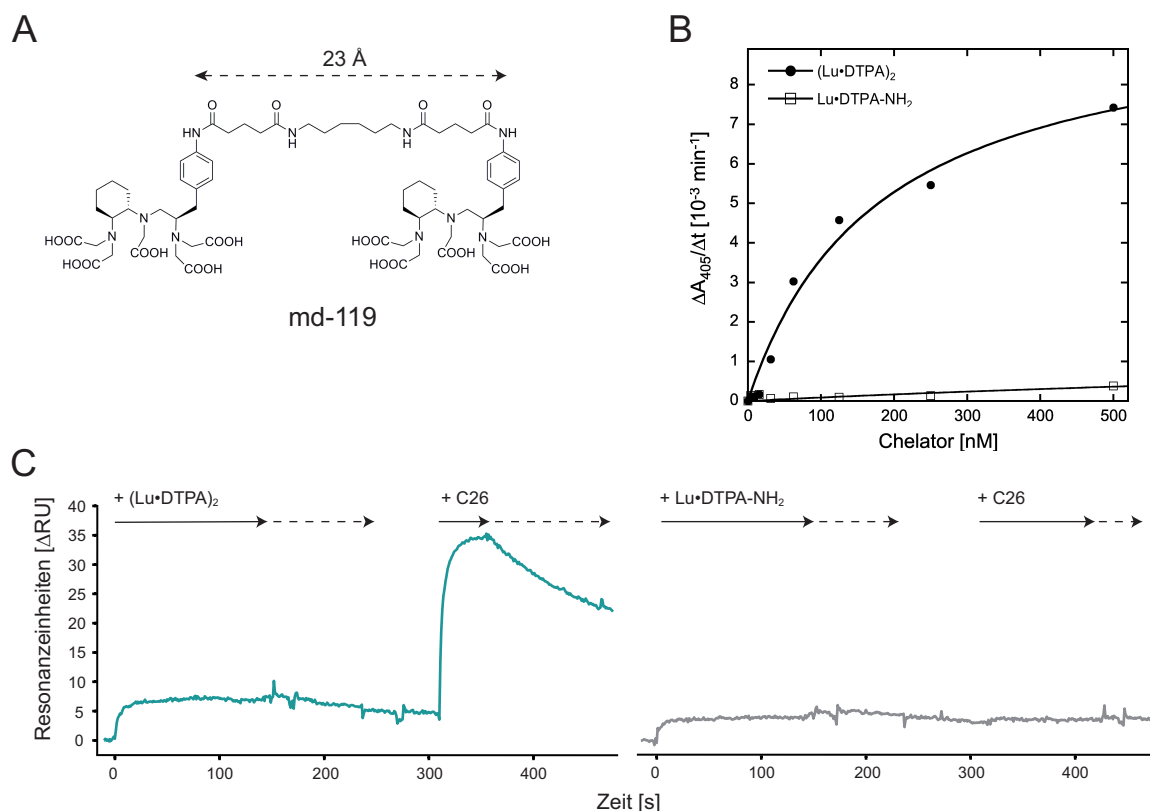
### 3.3.8.2 Verwendung eines divalenten Radiometallchelators (<sup>177</sup>Lu·DTPA)<sub>2</sub>

Neben dem monovalenten <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> sollte ebenso eine divalente Version des DTPA-Chelators eingesetzt werden. Der durch die gleichzeitige Bindung beider Lu·DTPA-Gruppen entstehende Aviditätseffekt hemmt aufgrund eines intrinsischen Effekts die Wiederfreisetzung des Metallchelator-Komplexes. In der Literatur ist bisher nur ein einziges divalentes DTPA-Konstrukt beschrieben, wobei die Chelator-Einheiten durch einen Tyrosyl-Lysin Peptid-Linker verknüpft wurden (Le Doussal *et al.*, 1990). Sowohl *in vitro* als auch in Mausexperimenten konnte damit im Vergleich zum monovalenten DTPA eine effizientere Tumoranreicherung gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden inerte chemische Linker zur Kopplung der beiden identischen DTPA-Einheiten verwendet. Von Dr. M. Dauner (Labor Prof. Skerra) wurden insgesamt fünf divalente DTPA-Derivate (siehe Abbildung A1) mit Linkern unterschiedlicher Länge (16-40 Å) und verschiedenen Löslichkeitseigenschaften synthetisiert. Die Mindestlänge eines Linkers, der die gleichzeitige Bindung zweier Anticaline ermöglichen soll, wird durch die Eindringtiefe der Me·DTPA-Gruppen in deren Bindungstaschen bestimmt und wurde anhand der bekannten Kristallstruktur von CL31 (Eggenstein *et al.*, 2014) auf 16 Å abgeschätzt.

Der qualitative Funktionsnachweis der fünf divalenten DTPA-Derivate erfolgte zunächst *in vitro* mit Hilfe eines Sandwich-ELISA sowie durch SPR-Spektroskopie und ist hier beispielhaft für die Substanz md-119 dargestellt (Abbildung 44), welche später auch im *Pretargeting*-Experiment *in vivo* zum

Einsatz kam. Im Vergleich zu dem hydrophoben Kohlenwasserstoff-Linker von md-060, dessen Funktionalität bereits von Dr. H.-J. Kim (Labor von Prof. Skerra) in früheren Versuchen untersucht worden war, wurde in md-119 durch Einfügen zweier polarer Amidgruppen die Löslichkeit in wässriger Lösung verbessert und gleichzeitig das Risiko für unspezifische Wechselwirkungen gesenkt (Abbildung 44A). Die damit einhergehende Distanzzunahme zwischen den DTPA-Einheiten von 16 auf 23 Å schien die gleichzeitige Bindung zweier Anticaline ohne sterisch ungünstige Interaktionen zudem zu begünstigen.

Im *Sandwich*-ELISA führte die Verwendung von  $(\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  bei steigender Konzentration zu einer hyperbolischen Sättigungskurve (Abbildung 44B). Wurde dagegen das monovalente  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  eingesetzt, blieb eine Farbreaktion aus, da die Bindung des eingesetzten Duocalins N7A.19-CL31d (siehe Abschnitt 3.2.7) nicht erfolgen konnte. Des Weiteren wurde das bispezifische Bindungsverhalten von md-119 mit Hilfe von SPR-Spektroskopie auf einer mit dem Anticalin C26 (300 RU) derivatisierten Sensorchip-Oberfläche untersucht (Abbildung 44C). Die Bindung von  $(\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  an das immobilisierte C26 erfolgte in einer schnellen Assoziation, wobei nach ca. 5 s bereits das maximale Resonanzsignal mit  $\Delta R_{\text{max}} = 7$  erreicht war. Im Anschluss an die Injektion fiel das Signal entsprechend einer langsamen Dissoziationskinetik mit geringer Steigung ab. Die darauffolgende Injektion von C26 führte zu einer schnellen Signaländerung mit  $\Delta R_{\text{max}} = 30$ , die durch die Bindung des Anticalins an die noch freie zweite  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}$ -Einheit auf der Sensorchip-Oberfläche bedingt ist. Keine Änderung des Resonanzsignals erfolgte dagegen bei Injektion von wtLcn2 (nicht gezeigt). Ebenso wurde bei Verwendung des monovalenten  $\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  anstelle von md-119 kein Bindungsereignis nach der Injektion von C26 beobachtet (Abbildung 44C). Damit konnte gezeigt werden, dass beide DTPA-Einheiten von md-119 zur Erkennung durch  $\text{Me}\cdot\text{DTPA}$ -spezifische Anticaline geeignet sind.



**Abbildung 44. Qualitativer Nachweis der Funktionalität des divalenten (Lu·DTPA)<sub>2</sub> mittels Sandwich-ELISA und SPR-Spektroskopie.** (A) Konstitutionsformel des divalenten DTPA (md-119). md-119 wurde von Dr. M. Dauner (Labor Prof. Skerra) in mehreren Stufen ausgehend von DTPA-CHX-A''-NH<sub>2</sub> und 5,5'-[(1,6-Dioxo-1,6-hexandiyl)diimino]-bis-pentansäure synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Angegeben ist die Ausdehnung des Linkers in gestreckter Konformation zwischen den Stickstoff-Atomen der Amidbindungen. (B) Die Vertiefungen einer MaxiSorp-Platte wurden mit 50  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CL31d in 100 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA beladen, und nach Waschen wurde anschließend eine Konzentrationsreihe von (Lu·DTPA)<sub>2</sub> oder Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> appliziert. Daraufhin wurde mit 100 nM eines Duocalins (N7A.19-CL31d) inkubiert, dessen Bindung schließlich durch Inkubation mit 100 nM Fn7B8-His<sub>6</sub>, einem anti-His<sub>6</sub> IgG Antikörper sowie anti-Maus IgG/AP-Konjugat detektiert wurde. Die AP-katalysierte Farbreaktion wurde bei 405 nm für 15 min verfolgt. (C) Ein CM5 Sensorchip wurde mit 300 RU C26 in 10 mM Natriumacetat pH 5 durch Amin-Kopplung beladen und anschließend mit einer 1  $\mu\text{M}$  Lösung von (Lu·DTPA)<sub>2</sub> oder Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> überspült. Direkt im Anschluss folgte die Injektion von 1  $\mu\text{M}$  C26, dessen Dissoziation über 100 s verfolgt wurde. Die Pfeile markieren die Assoziations- (—) bzw. Dissoziationsphase (- - -).

Die Funktionalität der weiteren vier divalenten DTPA-Derivate (Abbildung A1) konnte ebenfalls mittels Sandwich-ELISA und SPR-Spektroskopie gezeigt werden. Die kompetitiven Verdrängungsexperimente auf den HT-29 Zellen ergaben dabei allerdings vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte wie für das monovalente <sup>177</sup>Lu·DTPA-NH<sub>2</sub> (siehe Abschnitt 3.3.8.1). Demnach trat bei diesen divalenten Haptenen auf HT-29 Zellen kein nachweisbarer Aviditätseffekt auf. Weitere Argumente für die Verwendung der Substanz md-119 für erste *Pretargeting*-Experimente *in vivo* waren neben dessen hydrophilen Charak-

ter die im Vergleich zu md146 und md-152 einfache Synthese mit akzeptabler Ausbeute (14 %; Dauer M., unveröffentlicht).

### 3.3.9 Evaluierung des *Pretargeting*-Verfahrens für die Diagnostik CEA-positiver Tumore durch Biodistributionsanalyse

Beim in Abschnitt 3.3.7 beschriebenen Tierversuch zur Diagnostik CEA-positiver Tumore *in vivo*, in dem Versionen des Proteins T84.66-CL31d iodiert und deren Verteilung mittels PET und Biodistributionsanalyse untersucht wurde, wurde T84.66-PAS(400)-CL31d als dasjenige Fusionsprotein identifiziert, welches im Vergleich zu den anderen scFv/Anticalin-Fusionsproteinen 48 h nach der Injektion die stärkste Tumorakkumulation und zugleich niedrigste unspezifische Organanreicherung aufwies. Nun sollte überprüft werden, ob sich dieses bispezifische scFv/Anticalin-Fusionsprotein zur Adressierung von CEA-Xenograft Tumoren nach dem *Pretargeting*-Verfahren eignet. In diesem Zuge wurde neben dem monovalenten  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  ebenfalls das divalente  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  md-119 untersucht.

Zu diesem Zweck wurde den CEA-Xenograft Mäusen zweier Gruppen (N = 3) intravenös  $^{125}\text{I}$ -T84.66-PAS(400)-CL31d injiziert, wohingegen zwei weitere Mausgruppen zur Überprüfung der unspezifischen Gewebeanreicherung der Metallchelate-Komplexe als Kontrollversuch nur PBS erhielten. Nach 46 h wurde den Mäusen je einer der beiden Gruppen  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  bzw.  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  injiziert. Nach weiteren 2 h wurden die Mäuse einer Biodistributionsanalyse unterzogen, wobei die  $^{125}\text{I}$ - und die  $^{177}\text{Lu}$ -Aktivität in den entnommenen Organen mit Hilfe eines  $\gamma$ -Zählers separat bestimmt wurde (Tabelle 16 und Tabelle A2, Abbildung 45).

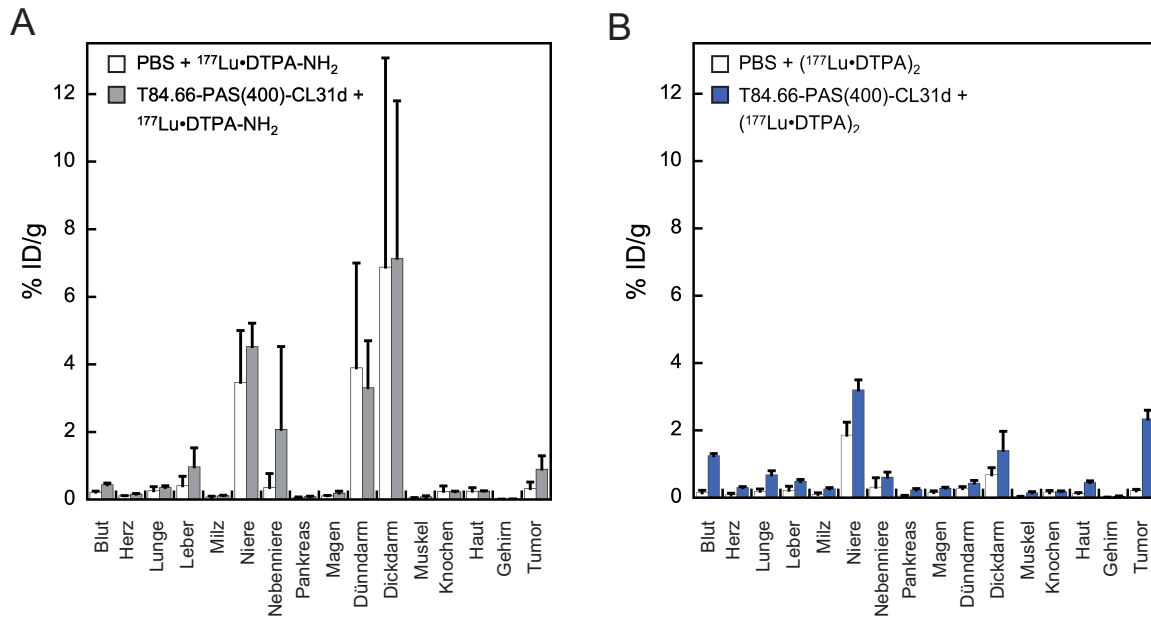
Die Markierung von T84.66-PAS(400)-CL31d mit dem selektiv detektierbaren  $^{125}\text{I}$  (Spezifische Aktivität: 74 MBq/nmol) ermöglichte die nochmalige Überprüfung der Biodistribution des scFv/Anticalin-Fusionsproteins (vgl. Abschnitt 3.3.7). Die radiochemische Reinheit des Iodierungsansatzes nach der Gelfiltration wurde mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt und betrug >99 %. Jeder Maus einer Versuchsgruppe wurde – entsprechend der im PET-Versuch eingesetzten Stoffmenge – 0,05 nmol Protein injiziert. Die Biodistributionsanalyse nach 48 h ergab für beide Versuchsgruppen eine vergleichbare Akkumulation des Fusionsproteins im Tumor und in den gesunden Organen (Tabelle 16), wie zuvor mit  $^{124}\text{I}$  beobachtet worden war. Allein der Proteinanteil im Blut lag mit  $2,3 \pm 0,4$  % ID/g bzw.  $2,0 \pm 0,3$  % ID/g etwa doppelt so hoch als beim ersten Tierexperiment, was zu einem leicht verschlechterten Tumor/Blut-Verhältnis von  $2,5 \pm 1,2$  für die mit  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  behandelte Mausgruppe bzw.  $1,9 \pm 0,39$  für  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  führte.

Tabelle 16. Biodistribution von  $^{125}\text{I}$ -T84.66-PAS(400)-CL31d 48 h nach intravenöser Injektion.

<i>% ID/g</i>	mit $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH <sub>2</sub> behandelte Mausgruppe	mit ( $^{177}\text{Lu}$ -DTPA) <sub>2</sub> behandelte Mausgruppe
<b>Blut</b>	2,3 ± 0,4	2,0 ± 0,3
<b>Herz</b>	0,55 ± 0,07	0,48 ± 0,08
<b>Lunge</b>	1,02 ± 0,05	0,97 ± 0,16
<b>Leber</b>	0,69 ± 0,07	0,72 ± 0,14
<b>Milz</b>	0,56 ± 0,09	0,50 ± 0,14
<b>Niere</b>	1,19 ± 0,15	1,09 ± 0,18
<b>Nebenniere</b>	1,40 ± 0,17	0,92 ± 0,19
<b>Pankreas</b>	0,44 ± 0,07	0,40 ± 0,05
<b>Magen</b>	1,09 ± 0,41	0,84 ± 0,10
<b>Dünndarm</b>	0,43 ± 0,05	0,36 ± 0,08
<b>Dickdarm</b>	0,47 ± 0,04	0,33 ± 0,06
<b>Muskel</b>	0,28 ± 0,16	0,21 ± 0,05
<b>Knochen</b>	0,23 ± 0,04	0,16 ± 0,03
<b>Haut</b>	0,69 ± 0,14	0,59 ± 0,03
<b>Gehirn</b>	0,087 ± 0,021	0,085 ± 0,017
<b>Tumor</b>	5,6 ± 2,5	3,8 ± 0,6

*% ID/g* pro Organ wurde aus N = 3 berechnet. Zum Zeitpunkt t = 0 wurden 1,0-1,3 MBq  $^{125}\text{I}$  markiertes T84.66-PAS(400)-CL31d injiziert.

Um die spezifische Tumoranreicherung von  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> bzw. ( $^{177}\text{Lu}$ -DTPA)<sub>2</sub> im Xenograft-Tiermodell und damit das erfolgreiche *Pretargeting* zu überprüfen, wurde die  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität in den entnommenen Organen quantifiziert (Abbildung 45, Tabelle A2). Im Fall von  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> wurde eine Aktivität von 0,90 ± 0,04 % ID/g im Tumor nachgewiesen, während in der Kontrollgruppe die Radioaktivität im Tumor mit 0,32 ± 0,20 % ID/g deutlich niedriger war (Abbildung 45A). Die primären Ausscheidungsorgane – Nieren, Dünndarm und Dickdarm – wiesen sowohl in der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe die im Vergleich zu den übrigen Organen höchste  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität auf. Die schnelle Eliminierung des kleinen Metallchelate-Moleküls führte bereits 2 h nach der Injektion zu einer sehr niedrigen Konzentration im Blut (0,22 % ID/g). Weiterhin kam es in der Versuchsgruppe zu einer leicht erhöhten Aufnahme von  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-NH<sub>2</sub> in die Leber (0,97 ± 0,56 % ID/g; Kontrollgruppe: 0,41 ± 0,28 % ID/g) sowie die Nebenniere (2,1 ± 2,5 % ID/g; Kontrollgruppe: 0,36 ± 0,41 % ID/g).



**Abbildung 45. Biodistributionsanalyse von mono- und divalentem  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}$  nach Tumor-*Pretargeting*.** CEA-Xenograft Mäusen wurde 46 h nach Injektion von T84.66-PAS(400)-CL31d oder PBS 0,025 nmol  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\text{-NH}_2$  (A) bzw. 0,0125 nmol  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  (B) intravenös verabreicht, und die Verteilung der  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität wurde nach weiteren 2 h untersucht. Angegeben ist % ID/g  $\pm$  Standardabweichung als Mittelwert aus N = 3.

In der Versuchsgruppe, die das divalente  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  erhalten hatte, wurde mit  $2,3 \pm 0,32$  % ID/g (PBS-Kontrollgruppe:  $0,20 \pm 0,05$  % ID/g) ebenfalls eine spezifische Aufnahme von  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität in das Tumorgewebe beobachtet (Abbildung 45B). Der Einsatz von  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  statt des monovalenten  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\text{-NH}_2$  bewirkte eine um den Faktor 2,6 erhöhte  $^{177}\text{Lu}$ -Konzentration am Tumor. Darüberhinaus ergab die Biodistributionsanalyse der PBS-Kontrollgruppe, dass das  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  – im Gegensatz zum monovalenten Chelator-Komplex – kaum unspezifisch in Organe aufgenommen wurde. Die höchste Aktivität ( $1,86 \pm 0,38$  % ID/g) wurde in der Niere als primäres Ausscheidungsorgan für niedermolekulare Substanzen verzeichnet. Durch das *Pretargeting* mit T84.66-PAS(400)-CL31d stieg die Konzentration von  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität im Blut von  $0,14 \pm 0,08$  % ID/g (PBS-Kontrollgruppe) auf  $1,25 \pm 0,06$  % ID/g. Das führte schließlich zu sehr ähnlichen Tumor/Blut-Verhältnissen der beiden DTPA-Derivate von  $2,07 \pm 0,94$  für  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\text{-NH}_2$  und  $1,88 \pm 0,23$  für  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$ .

Zusammenfassend konnte damit demonstriert werden, dass sich die Tumorakkumulation der bispezifischen anti-CEA x anti-DTPA scFv/Anticalin-Fusionsproteine durch PASylierung optimieren lässt und mit solchen bispezifischen Protein-*Tracern* eine Tumoradressierung nach dem *Pretargeting*-Konzept möglich ist. Weiterhin steht mit dem divalenten DTPA-Derivat md-119 ein potenter Radioligand zur Verfügung, der hinsichtlich Avidität und Biodistribution dem monovalenten CHX-A"-DTPA überlegen ist.

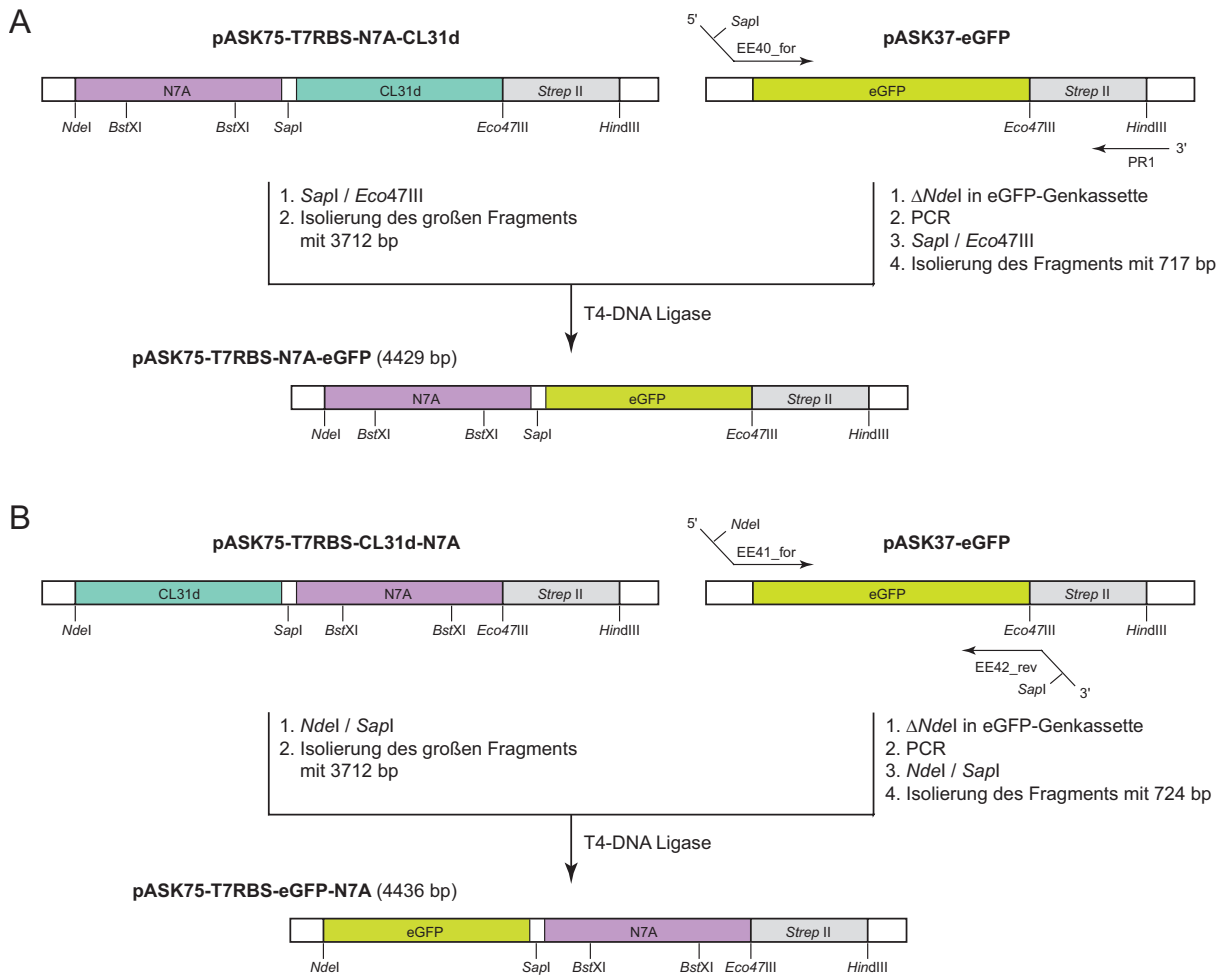


### 3.4 ChromoCaline: Anticaline fusioniert mit einem Fluorophorprotein

Eine Alternative zur nuklearmedizinischen Diagnostik bei Tumorerkrankungen oder im Versuchstier bietet die optische Bildgebung. Bei diesem nicht- oder minimal-invasiven Verfahren entfällt die für den Patienten potentiell cytotoxische radioaktive Strahlung und wird beispielsweise stattdessen durch ungefährliche Fluoreszenzstrahlung ersetzt. Durch die Wahl einer geeigneten Fluorophor-Detektor-Kombination kann eine gute Signalauflösung und Sensitivität erreicht werden (Kaur *et al.*, 2012). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die vergleichsweise geringe Gewebepenetration, wodurch es vorzugsweise nur für Oberflächentumore (Xenografts), exponierte Organe oder für die intraoperative Bildgebung verwendet wird (Condeelis & Weissleder, 2010). Als Fluorophore können einerseits fluoreszierende Farbstoffe, die durch chemische Kopplung mit einem antigenspezifischen Bindeprotein konjugiert werden, und andererseits fluoreszierende Proteine verwendet werden. Letztere werden in der Regel bereits auf genetischer Ebene mit dem Bindeprotein fusioniert. In der vorliegenden Arbeit wurde das ED-B-bindende Anticalin N7A als Fusion mit dem grün-fluoreszierenden Protein eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) – einer maturierten Version des ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierten GFP (Zhang *et al.*, 1996) – zur Generierung eines photoaktiven Reagens verwendet.

#### 3.4.1 Konstruktion von Vektoren zur genetischen Fusion des EB-D-bindenden Anticalins N7A mit dem *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP)

Für die Konstruktion der ChromoCaline in zwei verschiedenen Anordnungen, N7A-eGFP und eGFP-N7A, wurden die cytoplasmatischen Expressionsvektoren für die in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Duocaline mit dem C-terminalen *Strep*-tag II verwendet (Abbildung 46). Die Expressionskassette für N7A-eGFP wurde generiert, in dem das Gensegment für CL31d durch Restriktionsverdau mit *SapI* und *Eco47III* aus dem pASK75-T7RBS-Duocalin Vektor entfernt und das lineare Vektorrückgrat mit der kodierenden Region für das Anticalin N7A isoliert wurde (Abbildung 46A). Das Strukturgen für eGFP wurde mit Hilfe der Oligodesoxynukleotide EE40\_for und PR1 von dem Plasmid pASK37-eGFP (Kuhn *et al.*, 2010) durch PCR amplifiziert, wobei am 5'-Ende eine *SapI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde. Zuvor war die eGFP-interne *NdeI*-Restriktionsschnittstelle durch QuikChange-Mutagenese mit den Oligodesoxynukleotiden EE43\_for/rev entfernt worden. Das durch den anschließenden *SapI/Eco47III*-Restriktionsverdau erhaltene 717 bp lange Fragment wurde mit dem obigen Vektorrückgrat ligiert, wodurch zudem ein kurzer Peptidlinker (Ser<sub>3</sub>Ala) generiert wurde.



**Abbildung 46. Konstruktion der Vektoren zur cytoplasmatischen Produktion der ChromoCaline N7A-eGFP (A) und eGFP-N7A (B).** Die cytoplasmatischen Expressionsvektoren für die Duocaline N7A-CL31d bzw. CL31d-N7A dienen für die beiden ChromoCalin-Varianten jeweils als Vektorrückgrat, wobei pASK75-T7RBS-CL31d-N7A unter Verwendung von pNGAL15-CL31d-PAS(n)-N7A als Matrize für die PCR-Amplifizierung hergestellt wurde (vgl. **Abbildung 21**). Die unidirektional klonierbare *BstXI*-Kassette ermöglicht es, das zentrale Anticalin-Gensegment (hier N7A) gegen solche für Anticaline mit anderer Antigenespezifität auszutauschen. Die interne *SapI*-Restriktionsschnittstelle in dem ChromoCalin-Fusionsgen diente später zum Einfügen einer Genkassette für ein PAS-Polypeptid (siehe Abschnitt 3.4.3).

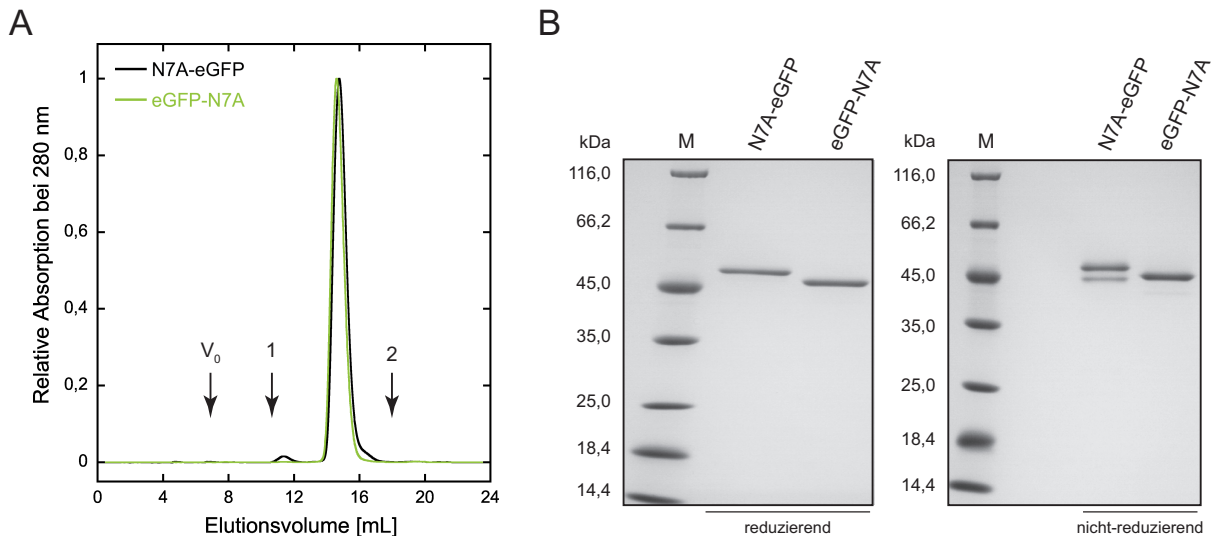
Zur Klonierung von eGFP-N7A wurde durch PCR mit den Oligodesoxynukleotiden EE41\_for und EE42\_rev sowohl eine *NdeI*- am 5'-Ende als auch eine *SapI*-Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende an das eGFP-Gen angehängt (**Abbildung 46B**). Nach Restriktionsverdau des 741 bp langen PCR-Produkts wie auch des Vektors pASK75-T7RBS-CL31d-N7A mit den entsprechenden Endonukleasen wurden die erhaltenen DNA-Fragmente ligiert, wodurch zudem ein kurzer Ser<sub>3</sub>Ala-Peptidlinker zwischen den Gensegmenten für eGFP und N7A generiert wurde. Die korrekte Basenabfolge in den beiden ChromoCalin-Vektoren wurde abschließend durch Sequenzierung verifiziert (siehe Abschnitt

2.2.5.7). Der Vektor für ein Kontrollprotein, eGFP fusioniert mit Lcn2, wurde durch einfache Subklonierung der *Bst*XI-Kassette aus pNGAL98-Lcn2 erhalten.

### 3.4.2 Charakterisierung von ChromoCalinen mit N- oder C-terminalem eGFP

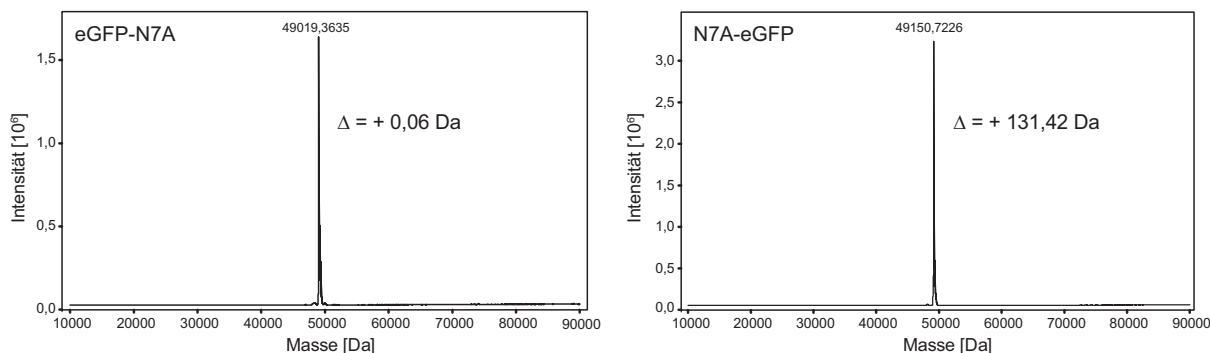
Die cytoplasmatischen Expressionsvektoren pASK75-T7RBS-N7A-eGFP und pASK75-T7RBS-eGFP-N7A wurden zur Transformation chemisch kompetenter Origami B-Zellen eingesetzt. In diesem *E. coli*-Stamm sind die Gene für die Thioredoxin-Reduktase (*trx*B) und die Glutathion-Reduktase (*gor*) mutiert (Prinz *et al.*, 1997), wodurch die Bildung von Disulfidbrücken – die zur korrekten Faltung von Anticalinen notwendig sind – ermöglicht wird. Gleichzeitig wird so der bevorzugt im Cytoplasma stattfindende Prozesse der Faltung von eGFP einschließlich Reifung seines intrinsischen Chromophors gewährleistet (Dammeyer & Tinnefeld, 2012). Die Proteinproduktion erfolgte im 2 L-Maßstab bei 30 °C nach Induktion bei  $OD_{550} = 0,5$  mit aTc für 5 h (siehe Abschnitt 2.3.1.1). Nach mechanischem Zellaufschluss wurden die Proteine aus der löslichen Proteinfraction durch SA-Chromatographie und AEX gereinigt. Durch einen linearen NaCl-Gradienten in 20 mM Tris/HCl pH 8 Puffer konnten Wirtszellproteine, Proteinaggregate und Faltungsisomere der ChromoCaline abgetrennt werden.

In der abschließenden analytischen SEC wiesen beide ChromoCaline ein monomeres sowie monodisperses Verhalten und gleichzeitig keine nachweisbaren Verunreinigungen auf (Abbildung 47A). Die hohe Reinheit wurde durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen bestätigt (Abbildung 47B, links). Ohne Zugabe des Reduktionsmittels  $\beta$ -Mercaptoethanol zum Probenpuffer zeigte sich bei N7A-eGFP eine zusätzliche Proteinspezies unterhalb der Hauptbande, was auf das Vorhandensein von Faltungsisomeren hindeutet (Abbildung 47B, rechts). Anhand der Bandenintensität wurde deren Anteil am Gesamtprotein auf ca. 30 % geschätzt. Bei eGFP-N7A wurden dagegen keine Faltungsisomere beobachtet. Die Proteinausbeute wurde nach der analytischen SEC anhand des charakteristischen Absorptionsmaximums von eGFP bei 488 nm bestimmt, wobei ein molarer Extinktionskoeffizient von  $55.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Heim *et al.*, 1995) verwendet wurde: 0,6 mg für N7A-eGFP und 2,0 mg für eGFP-N7A aus je 2 L Kulturvolumen.



**Abbildung 47. Proteinbiochemische Analyse der beiden ChromoCaline N7A-eGFP und eGFP-N7A nach präparativer SA-Chromatographie und AEX.** (A) Die anschließende analytische SEC erfolgte mit einer in PBS äquilierten Superdex 200 HR 10/30 Säule (Bettvolumen: 24 mL). Beide ChromoCaline eluierten in einem einzelnen symmetrischen Peak mit einer apparenten Molekülmasse von ca. 50 kDa (Tabelle 17). Standardproteine: 1 = ADH (150 kDa), 2 = Cytochrom C (12,6 kDa).  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (B) SDS-PAGE von N7A-eGFP und eGFP-N7A nach der analytischen SEC (M = Größenstandard). Nur das ChromoCalin mit C-terminalem eGFP zeigt unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein heterogenes Migrationsverhalten.

Bei der massenspektrometrischen Analyse des gereinigten eGFP-N7A wurde im Bereich zwischen 10 und 90 kDa nur eine einzige Proteinspezies nachgewiesen (Abbildung 48, links), dessen Masse sehr gut mit der kalkulierten Molekülmasse ( $M_{\text{calc}}$ ) von 49019,3 Da übereinstimmte. Bei der Berechnung wurde berücksichtigt, dass die aus der Primärsequenz resultierende Proteinmasse (Gasteiger *et al.*, 2005) von 49041,3 Da (ohne den N-terminalen Met-Rest) um 20 Da in Folge der Chromophorreifung im eGFP (18 Da für den Verlust eines Wassermoleküls durch die Zyklisierung/Kondensationsreaktion und 2 Da für den Verlust von  $H_2$  durch die darauffolgende Oxidation) sowie um 2 Da durch die oxidative Ausbildung der Disulfidbrücke im Anticalin reduziert wird (Tabelle 17). Überraschenderweise zeigte das Massenspektrum von N7A-eGFP – trotz der zwei Proteinbanden unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE (Abbildung 47B) – nach der Dekonvolution des Rohspektrums ebenso nur einen singulären Peak (Abbildung 48, rechts). Die dazugehörige Masse war im Vergleich zu  $M_{\text{calc}}$  allerdings um 131,4 Da erhöht, was der Masse einer Met-Seitenkette (131,2 Da) entspricht. Diese Massendifferenz deutete darauf hin, dass während der Proteinprozessierung in *E. coli* das Start-Methionin nicht durch die Methionin-Aminopeptidase abgespalten worden war. Dennoch schien N7A-eGFP anhand dieser Masse überwiegend sowohl ein funktionales eGFP-Chromophor als auch die Disulfidbrücke im Anticalin aufzuweisen.



**Abbildung 48. Massenspektrometrische Analyse der gereinigten ChromoCaline.** Die Proteine wurden gegen 10 mM Ammoniumacetat pH 6,7 dialysiert und nach Zugabe von Ameisensäure im Positiv-Modus mit einem ESI-Q-TOF-MS (Bruker maXis) analysiert. Die Proteinmassen wurden durch Dekonvolution der Rohspektren mit Hilfe des geräteeigenen Programms *Compass Data Analysis* v4.0 erhalten. Angegeben ist jeweils die Differenz ( $\Delta$ ) zwischen der experimentell ermittelten Masse und  $M_{\text{calc}}$ .

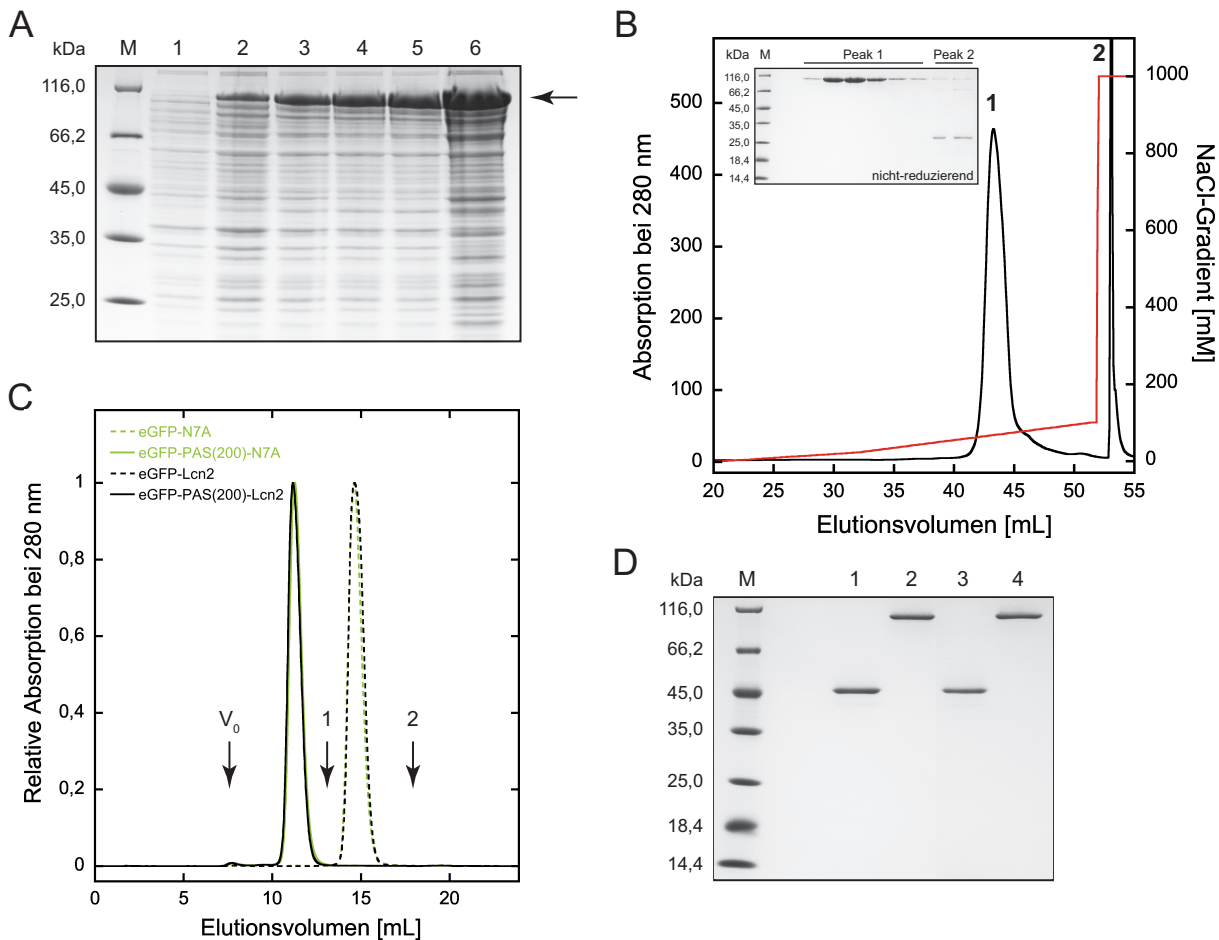
Aufgrund dieser Analysen wurden die weiterführenden Studien nur mit dem ChromoCalin eGFP-N7A durchgeführt.

### 3.4.3 Konstruktion von eGFP/Anticalin-Fusionsproteinen mit PAS-Linker

Im folgenden wurde das ChromoCalin eGFP-N7A anstelle des Peptids Ser<sub>3</sub>Ala mit einem PAS-Polypeptid als Linker zwischen eGFP und dem Anticalin ausgestattet. Dies sollte die konformationelle Flexibilität zwischen den beiden Proteinuntereinheiten erhöhen, was die Funktionalität des ChromoCalins positiv beeinflussen könnte. Die zwischen den eGFP- und Anticalin-Genabschnitten gelegene *SapI*-Restriktionsschnittstelle diente hierbei zur Insertion einer PAS(200)-Genkassette (Abbildung 46). Außerdem wurde durch Subklonierung der *BstXI*-Genkassette für Lcn2 eine PASylierte Negativkontrolle für nachfolgende Antigenbindungsexperimente generiert.

Bei der SDS-PAGE der Origami B Gesamtzellextrakte im Verlauf der Induktion der Proteinbiosynthese von eGFP-PAS(200)-N7A trat eine Proteinbande bei ca. 100 kDa auf (Abbildung 49A). Damit zeigte eGFP-PAS(200)-N7A – wie für PASylierte Proteine charakteristisch (Schlapschy *et al.*, 2013) – eine im Vergleich zu  $M_{\text{calc}}$  von ca. 65,5 kDa (siehe Tabelle 17) verminderte elektrophoretische Mobilität. Das zunächst durch SA-Chromatographie isolierte ChromoCalin wurde wiederum mittels AEX an einer Resource Q Säule bei pH 8 gereinigt (Abbildung 49B). Dabei schien vor allem eGFP mit einem pI von 5,75 die Wechselwirkung zu den quartären Ammoniumgruppen zu bestimmen, während N7A (pI = 9,01) bei pH 8 eine positive Netto-Oberflächenladung trägt. Wie die SDS-PAGE relevanter AEX-Fractionen zeigte, wurden dabei die ionischen Wechselwirkungen zur Säulenmatrix bereits bei niedriger Salzkonzentration (Peak 1, ca. 80 mM NaCl) neutralisiert, wobei das Protein in hoher Homogenität eluierte. Der am Ende des linearen NaCl-Konzentrationsgradienten auftretende Peak 2 enthielt dagegen sowohl Wirtszellproteine als auch Faltungsisomere des ChromoCalins, die unter nicht-reduzierenden Bedingungen als schwache Banden ober- und unterhalb der Hauptproteinbande in der SDS-

PAGE sichtbar waren. Auf analoge Weise wurden eGFP-Lcn2 und eGFP-PAS(200)-Lcn2 zur Homogenität gereinigt.



**Abbildung 49. Cytoplasmatische Produktion und Reinigung von ChromoCalinen mit PAS-Linker.** (A) SDS-PAGE von Origami B Gesamtzellextrakten vor (Spur 1), sowie 1 h (Spur 2), 2 h (Spur 3), 3 h (Spur 4), 4 h (Spur 5) und 5 h (Spur 6) nach Induktion der Biosynthese von eGFP-PAS(200)-N7A. (B) Exemplarische Reinigung des zuvor durch SA-Chromatographie isolierten eGFP-PAS(200)-N7A mittels AEX. (C) Untersuchung der gereinigten ChromoCaline mit/ohne PAS-Linker durch analytische SEC in PBS (Superdex 200 10/300 GL Säule; Bettvolumen: 24 mL). Standardproteine: 1 = BSA (66 kDa), 2 = Carboanhydrase (29 kDa).  $V_0$  = Ausschlussvolumen der Säule. (D) SDS-PAGE der ChromoCaline eGFP-N7A (Spur 1), eGFP-PAS(200)-N7A (Spur 2), eGFP-Lcn2 (Spur 3) und eGFP-PAS(200)-Lcn2 (Spur 4) nach der analytischen SEC unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

Nach der AEX wurde das Volumen der unmodifizierten und PASylierten ChromoCaline durch Zentrifugation in einem Konzentrator eingengt und einer analytischen SEC in PBS unterzogen (Abbildung 49C). Dabei wiesen die Chromatogramme aller vier ChromoCaline jeweils nur einen symmetrischen Peak auf, wobei die beiden unmodifizierten wie auch die PASylierten ChromoCaline jeweils – mit N7A oder Lcn2 – bei identischen Volumina eluierten. Die aus dem Elutionsvolumen ermittelte Molekülmasse der beiden unmodifizierten ChromoCaline spiegelte das  $M_{\text{calc}}$  des monomeren Proteins von

ca. 49 kDa wider (siehe Tabelle 17). Dagegen zeigten die PASylierten ChromoCaline im Vergleich zu  $M_{\text{calc}}$  von ca. 65,5 kDa ein um den Faktor 4 vergrößertes hydrodynamisches Volumen. Dieser Vergrößerungseffekt ist charakteristisch für die PAS-Technologie und resultiert aus der Abwesenheit von Sekundärstrukturelementen (*Random Coil*) im PAS-Polypeptid (Schlupschy *et al.*, 2013). Die ESI-MS-Untersuchung von eGFP-PAS(200)-N7A wie auch von eGFP-Lcn2 bzw. eGFP-PAS(200)-Lcn2 bestätigten die berechnete Masse dieser ChromoCaline (siehe Tabelle 17) sowie ihre hohe Reinheit.

**Tabelle 17. Kalkulierte und durch ESI-MS-Analyse ermittelte Molekülmassen der ChromoCaline.**

	M [Da] <sup>a</sup>	$M_{\text{calc}}$ [Da] <sup>b</sup>	ESI-MS [Da] <sup>c</sup>	$\Delta(\text{ESI-MS} - M_{\text{calc}})$ [Da]	$M_{\text{SEC}}$ [kDa] <sup>d</sup>
<b>N7A-eGFP</b>	49041,3	49019,3	49150,72	+ 131,4	50,9
<b>eGFP-N7A</b>	49041,3	49019,3	49019,36	+ 0,06	54,7
<b>eGFP-PAS(200)-N7A</b>	65559,7	65537,7	65538,49	+ 0,79	247,2
<b>eGFP-Lcn2</b>	48816,2	48794,2	48792,90	- 1,30	54,0
<b>eGFP-PAS(200)-Lcn2</b>	65334,6	65312,6	65313,74	+ 1,14	257,5

<sup>a</sup> Molekülmasse (M) ermittelt aus der Primärsequenz des Proteins ohne das Start-Met (ProtParam; [www.expasy.org](http://www.expasy.org)). <sup>b</sup> M unter Berücksichtigung der Ausbildung des eGFP-Chromophors (-20 Da) sowie der Disulfidbrücke im Lipocalin/Anticalin (-2 Da). <sup>c</sup> Durch Massenspektrometrie ermittelte M. <sup>d</sup> Anhand des SEC-Elutionsvolumens kalkulierte apparente M. <sup>e</sup> Die Massendifferenz entspricht einem Met-Rest (131,2 Da).

Der PAS-Linker wirkte sich im Fall des ED-B-bindenden ChromoCalins positiv auf die Proteinausbeute aus. Sie betrug für eGFP-PAS(200)-N7A nach der analytischen SEC 114 nmol (7,5 mg) aus 2 L Kulturvolumen und war damit im Vergleich zu eGFP-N7A (41 nmol; 2,0 mg) um etwa das Dreifache erhöht. Bei eGFP-Lcn2 lag die Ausbeute vergleichsweise um den Faktor 10 höher (434 nmol), was durch Insertion des PAS-Linkers nicht weiter gesteigert wurde. Die abschließende SDS-PAGE aller gereinigten ChromoCaline unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigte jeweils nur eine Proteinbande und keine Anzeichen für Verunreinigungen oder Faltungsisomere (Abbildung 49D).

### 3.4.4 Biophysikalische Charakterisierung der ED-B-bindenden ChromoCaline

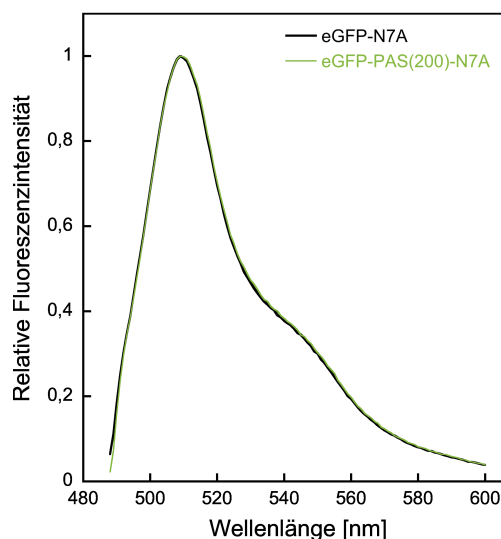
Die Bindungsaktivität der ChromoCaline für ED-B wurde durch SPR-Spektroskopie ermittelt. Dazu wurde über die mit Fn7B8 ( $\Delta\text{RU} = 300$ ) derivatisierte CMD200L Sensorchip-Oberfläche eine Konzentrationsreihe des jeweiligen ChromoCalins geleitet und dessen Bindung detektiert. Dabei wies eGFP-N7A einen im Vergleich zum unfusionierten Anticalin N7A ca. 10-fach höheren  $K_D$ -Wert auf, was hauptsächlich durch die 10-fach langsamere Assoziationskinetik bedingt war (siehe Tabelle 18). Interessanterweise führte die Insertion des PAS(200)-Linkers wieder zu einer deutlich schnelleren Assoziation mit Fn7B8, so dass sich die Affinität im Vergleich zum unfusionierten N7A in diesem Fall nur um den Faktor 4 verminderte. Die Dissoziationsraten ( $k_{\text{off}}$ ) beider ChromoCaline waren dagegen beinahe identisch zum Wert von N7A.

**Tabelle 18. Bindungskinetiken der ChromoCaline für Fn7B8 ermittelt durch SPR-Spektroskopie.**

	$k_{\text{on}}$ [ $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}$ [ $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM] <sup>a</sup>
N7A <sup>b</sup>	4,54 ± 0,03	26,2 ± 0,02	5,8 ± 0,04
eGFP-N7A	0,44 ± 0,01	22,3 ± 0,3	51 ± 1
eGFP-PAS(200)-N7A	1,16 ± 0,01	24,4 ± 0,1	21 ± 0,2

<sup>a</sup> Kalkuliert aus dem Quotienten  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ . <sup>b</sup> Daten aus Gebauer *et al.*, 2013.

Des Weiteren wurden die Fluoreszenzeigenschaften der gereinigten ChromoCaline durch Aufnahme von Emissionsspektren nach Anregung des eGFP bei 488 nm untersucht (Abbildung 50). Beide ED-B-bindenden ChromoCaline, eGFP-N7A und eGFP-PAS(200)-N7A, zeigten sowohl ein Emissionsmaximum bei 509 nm als auch ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 545 nm. Sie weisen damit die typischen spektralen Eigenschaften des unfusionierten eGFP auf (Kremers *et al.*, 2011), unbeeinflusst von der Länge des Linkers.



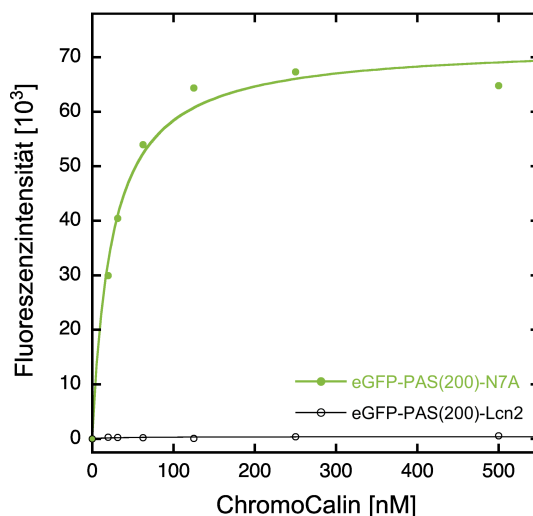
**Abbildung 50. Fluoreszenzemissionsspektrum von ED-B-bindenden ChromoCalinen.** Die Fluoreszenz der gereinigten ChromoCaline (10 nM) in PBS wurde nach Anregung bei 488 nm über einen Wellenlängenbereich von 490-600 nm bei 25 °C aufgezeichnet. Die jeweils über fünf Zyklen gemittelten Emissionsspektren wurden zum besseren Vergleich auf den maximalen Wert 1 skaliert.

### 3.4.5 Anwendungsbeispiele für ChromoCaline

Zum Nachweis von Antigenen ist in der biowissenschaftlichen Grundlagenforschung wie auch der medizinischen Diagnostik die ELISA-Methode gebräuchlich. Hierbei wird im einfachsten Fall das an eine Plastikoberfläche adsorbierte Antigen durch einen antigenspezifischen Antikörper detektiert, der idealerweise direkt mit einem Enzym konjugiert ist, welches eine chromogene Reaktion katalysiert. ChromoCaline können als Alternative dazu eingesetzt werden, da sie sowohl die Spezifität gegenüber einem Antigen als auch ein detektierbares Fluoreszenzsignal in sich vereinen, entsprechend dem *Fluo-*



*rescent-linked Immunosorbant Assay (FLISA)*. Die Fluoreszenz ist im Vergleich zu Absorptions- oder Lumineszenzsignalen allgemein deutlich sensitiver.

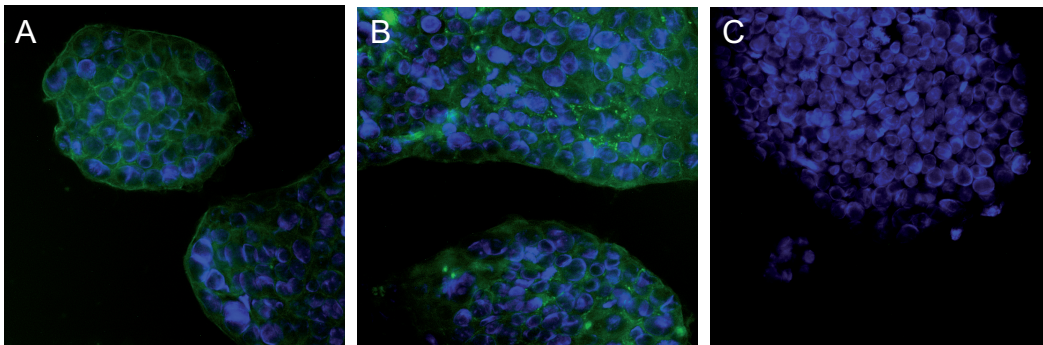


**Abbildung 51. Nachweis eines rekombinanten Antigens im FLISA.** Die Vertiefungen einer schwarzen MaxiSorp-Platte wurden mit 50  $\mu\text{L}$  einer 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fn7B8-Lösung in TBS befüllt, freie Bindungsstellen auf der Platte anschließend mit BSA blockiert, und daraufhin wurde mit einer Konzentrationsreihe von eGFP-PAS(200)-N7A – bzw. der Negativkontrolle eGFP-PAS(200)-Lcn2 – inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Menge an gebundenem ChromoCalin je Vertiefung durch Messung des Fluoreszenzsignals in einem Synergy 2 Multi-Detektionsspektrometer unter Verwendung von Filtern für Anregung (485/20) sowie Emission (528/20) bestimmt und gegen die eingesetzte ChromoCalin-Konzentration aufgetragen.

In einem FLISA-Experiment wurde für eGFP-PAS(200)-N7A eine konzentrationsabhängige Zunahme des Fluoreszenzsignals durch Bindung an das auf einer MaxiSorp-Platte immobilisierte Fn7B8 beobachtet (Abbildung 51). Die Kurvenanpassung ergab eine Dissoziationskonstante von  $24,0 \pm 3,5$  nM, welche nahezu dem mittels SPR-Spektroskopie ermittelten Wert entsprach ( $K_D = 21$  nM; siehe Tabelle 18). Dagegen blieb eine unspezifische Signalentwicklung für die Negativkontrolle eGFP-PAS(200)-Lcn2 auch bei hohen Proteinkonzentrationen aus.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von ChromoCalinen ist die antigenspezifische Fluoreszenzfärbung von Tumorzellen (Abbildung 52). Hierzu wurden adhärent wachsende Caco-2 Zellen, welche die onkofetale, ED-B-positive Fn-Isoform als Bestandteil ihrer ECM exprimieren, in einer ChromoCalin-Lösung inkubiert und nach Anregung der Fluoreszenz unter einem Inversmikroskop betrachtet (siehe Abschnitt 2.6.3). Zellen, die mit den ED-B-spezifischen ChromoCalinen eGFP-N7A und eGFP-PAS(200)-N7A in Kontakt gebracht worden waren, zeigten sowohl in den Zellzwischenräumen als auch auf der Zelloberfläche eine intensive Grünfärbung (Abbildung 52A,B). Dabei führte die PASylierte ChromoCalin-Variante im Vergleich zu eGFP-N7A zu einer leicht erhöhten Signalintensität. Generell wiesen diese Fluoreszenzfärbungen ein äußerst gutes Signal/Rausch-Verhältnis auf. Zellen,

die mit eGFP-PAS(200)-Lcn2 inkubiert worden waren, zeigten dagegen keinerlei grüne Fluoreszenz (Abbildung 52C).



**Abbildung 52. Fluoreszenzfärbung von ED-B-positiven Caco-2 Zellen mit eGFP-N7A (A), eGFP-PAS(200)-N7A (B) und eGFP-PAS(200)-Lcn2 (C).** Die adhärent wachsenden Zellen wurden nach einem Fixierungsschritt in einer 5  $\mu$ M ChromoCalin-Lösung (grün) inkubiert, welche zur Färbung der Zellkerne zudem mit einer 5  $\mu$ g/mL DAPI-Lösung (blau) versetzt wurde. Repräsentative Ausschnitte der gefärbten Zellen wurden nach 20-facher Vergrößerung in einem Zeiss Axiovert 40 CFL Mikroskop mit einer Xenonlampe und einer AxioCam MRm mit passenden Bandpass-Filtern dokumentiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt, dass ED-B-spezifische ChromoCaline aufgrund ihrer hohen Affinität zum Antigen sowie ihres günstigen biochemischen Verhaltens in Kombination mit dem photostabilen Fluorophor eGFP geeignete Reagenzien für die sensitive Anfärbung des Tumorantigens ED-B *in vitro* darstellen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Optimierung von Anticalinen mit Bindungsspezifität für Me-DTPA

Eine Strategie des *Pretargeting*-Verfahrens in der nuklearmedizinischen Therapie und Diagnostik von Tumorerkrankungen ist die Erkennung eines radioaktiven Metallchelate-Komplexes durch ein bispezifisches Bindeprotein. Die Grundvoraussetzung, um auf diese Weise eine optimale Tumoranreicherung bzw. einen guten Bildkontrast zu erzielen, ist eine hohe Affinität ( $K_D = 10^{-8}$ - $10^{-10}$  M) und insbesondere eine möglichst lange Halbwertszeit der Dissoziation zwischen dem Bindeprotein und dem Radiometallchelate-Komplex (Schmidt & Wittrup, 2009). Unter diesen Gesichtspunkten wurden in der vorliegenden Arbeit die Bindungseigenschaft der Anticaline C26, L1 und CL31 gegenüber Y-DTPA-CHX-A" evaluiert und anhand von Kristallstrukturinformationen optimiert.

Die Anticaline C26, L1 und CL31, welche von Dr. H.-J. Kim in dieser Reihenfolge mit zunehmender Affinität aus einer Lcn2-Zufallsbibliothek selektiert worden waren, sind in der Lage, das DTPA-Derivat in Komplex mit verschiedenen Metallen der Lanthanidreihe zu binden (Kim *et al.*, 2009; Eggenstein *et al.*, 2014). Sie unterscheiden sich dabei maßgeblich in der Dissoziationskinetik, wobei CL31 mit 138 min im Vergleich zu C26 (37 min) und L1 (78 min) die deutlich längste Komplex-Halbwertszeit aufweist. In dem Anticalin CL31 wurden ausgehend von C26 im Verlauf des Maturierungsprozesses insgesamt elf Aminosäuresubstitutionen vorgenommen, von denen sechs auf den Loop #1 entfielen, während die fünf übrigen Mutationen über die *BstXI*-Genkassette verstreut auftraten. Die vergleichende Kristallstrukturanalyse verdeutlichte die mit der Sequenzänderung im Loop #1 einhergehenden Konformationsänderungen des Proteinrückgrats in der Art eines die Bindungstasche verschließenden Deckels. Somit wurde der Loop #1 als Hauptstrukturelement für die erhöhte Stabilität des Anticalin-Ligand-Komplexes identifiziert.

Zudem wurde durch „Vorwärts-Mutagenese“ ausgehend von dem Anticalin L1 gezeigt, dass von den fünf in der *BstXI*-Kassette verstreut liegenden Mutationen in CL31 bloß die Aminosäuren Asp65, Asn99 und Phe107 – und zwar auf additive Weise – für die Affinitätsverbesserung von CL31 ( $K_D^\infty = 0,273$  nM, im Vergleich zu L1 mit  $K_D^\infty = 1,19$  nM) verantwortlich sind. Dieser positive Effekt auf die Ligandenbindung erscheint insofern überraschend, als diese im unteren Bereich des  $\beta$ -Barrels gelegenen Seitenketten laut der PISA-Interaktionsanalyse keine direkten Wechselwirkungen zum Me-DTPA-Komplex ausbilden (Eggenstein *et al.*, 2014). Ihre unmittelbare räumliche Nähe zu Aminosäurepositionen, die – wie beispielsweise Val66, Ala68 und Tyr106 – über Wasserstoffbrücken oder van der Waals Kontakte mit dem Liganden interagieren, bewirkt offenbar geringfügige strukturelle Anpassungen, wodurch der Ligand-Protein-Komplex stabilisiert wird. Eine ähnliche Beobachtung wurde kürzlich für die Affinitätsmaturierung eines scFv-Fragments für die Bindung von Y-DOTA-Bn beschrieben (Orcutt *et al.*, 2011b). Dabei befanden sich die zur 1000-fachen Erhöhung der Ligandenaffinität führenden Aminosäuresubstitutionen fast alle mehr als 5 Å vom Metallchelate-Liganden entfernt.

Weitere Mutationsstudien zur Bestimmung der thermodynamischen Faltungsstabilität der Anticalin-Varianten ergaben, dass die übrigen zwei (Ser86/Pro87) der zuvor erwähnten fünf Mutationen zu einer erheblichen Destabilisierung von CL31 im Vergleich zu wtLcn2 führten. Durch das Einbringen der wtLcn2-Aminosäuren Gly86/Ser87 wurde die Schmelztemperatur deutlich von  $T_m = 59,1\text{ °C}$  auf  $65,4\text{ °C}$  erhöht. Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 detailliert erläutert, sind intramolekulare Wechselwirkungen in der kurzen Loop-Region um die Positionen Gly86/Ser87 maßgeblich für diese Stabilisierung verantwortlich.

Um das Risiko einer Immunreaktion im Menschen mit Hilfe einer Minimierung der Abweichungen zur natürlichen wtLcn2-Sequenz zu senken, wurden neben Gly86/Ser87 mit Glu44 und Thr145 zwei weitere Aminosäuren des wtLcn2 wieder in die Variante CL31d eingebracht. Diese Änderungen führten interessanterweise zu einer weiteren Erhöhung der Proteinstabilität auf  $T_m = 67,3\text{ °C}$  für CL31d. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke von Thr145 nahe der C-terminalen  $\alpha$ -Helix von CL31 (siehe Abschnitt 3.1.2) bewirkte zudem eine erhebliche Steigerung der Proteinausbeute. Die Affinität von CL31d zum Y-DTPA-RNase-Konjugat wurde durch diese Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zu CL31 dagegen kaum beeinflusst ( $K_D^\infty = 0,543\text{ nM}$ ). Eine weitere Steigerung der Proteinstabilität wurde durch die Generierung der CL31d-Varianten CL31x (= CL31d(K74S/M75Q)) und CL31x(D45E) mit einer Erhöhung der Schmelztemperatur auf  $71,4\text{ °C}$  bzw.  $69,6\text{ °C}$  erreicht, jedoch zeigte die SPR-Analyse dabei eine Verminderung der Dissoziations-Halbwertszeit für Y-DTPA-RNase von 109 min (CL31d) auf ca. 60 min.

Basierend auf der Kristallstruktur von CL31 wurden die sechs Aminosäurepositionen Arg36, Ala40, Arg70, Leu79, Phe123 und Ser134 in der Ligandenbindungstasche ausgewählt, um durch die Substitutionen Arg36Lys/Gln, Ala40Gln/Lys/Arg, Arg70Leu, Leu79Arg, Phe123Tyr bzw. Ser134Lys eine Verbesserung der Bindungseigenschaften in CL31x zu erreichen. Dabei ist es im Fall der Mutanten CL31x(A40Q) und CL31x(L79R) gelungen, die Ausbeute bei der bakteriellen Proteinproduktion um den Faktor 3 bis 4 auf ca. 20 mg/L Kulturvolumen zu steigern. Eine Verbesserung der bereits mit 0,848 nM (CL31x) sehr niedrigen Dissoziationskonstante gegenüber Y-DTPA-RNase wurde allerdings durch keine der oben genannten Substitutionen erzielt. Die beiden Arg-Seitenketten an den Positionen 36 sowie 70 spielten für die hohe Stabilität des Protein·Ligand-Komplexes offenbar eine wichtige Rolle, da ihr Austausch eine extreme Erhöhung der Dissoziationsrate um auf das 137-fache (CL31x(R36Q)) zur Folge hat. Demnach scheint das Anticalin CL31 bereits über eine optimale Aminosäurezusammensetzung in der Bindungstasche zu verfügen und praktisch perfekte Bindungseigenschaften für die Komplexbildung zu besitzen. Interessanterweise zeigte die mathematische Simulation einer *Pretargeting*-Radioimmuntherapie, dass eine optimale Retention des Haptens im Tumor bereits mit einer Affinität von ca. 100 pM für den Metallchelate-Komplex gegeben ist (Orcutt *et al.*, 2011b). Dieser Wert deckt sich sehr gut mit dem  $K_D^\infty$ -Wert von CL31 (0,273 nM) bzw. CL31d (0,543 nM) gegenüber Y-DTPA und zeigt, dass kein weiterer Bedarf für eine Affinitätsmaturierung der Me·DTPA-spezifischen Anticaline besteht.

Seit der Entwicklung des *Pretargeting*-Konzepts (Reardan *et al.*, 1985) hat es insgesamt nur wenige Ansätze zur Entwicklung von Bindeproteinen gegen Metallchelate-Komplexe gegeben. Der murine monoklonale Antikörper CHA255 zur Bindung eines  $^{111}\text{In}$ -markierten EDTA-Derivats ( $K_D = 4 \text{ nM}$ ) wurde als erstes beschrieben (Reardan *et al.*, 1985). Dieser konnte allerdings nur sehr eingeschränkt eingesetzt werden, da die Verwendung anderer radioaktiver Metallionen, wie z.B. Scandium oder Gallium, welche als  $\beta^+$ -Emitter statt für SPECT ( $^{111}\text{In}$ ) für die PET-Bildgebung eingesetzt werden können, zu einer bis zum Faktor  $10^4$  verminderten Bindungsaffinität führte. Zudem verfügt EDTA nur über sechs Koordinationsstellen und komplexiert damit die in der Nuklearmedizin häufig eingesetzten Lanthanide nur mit unzureichender Stabilität (siehe Abschnitt 1.1.1).

Etwa zeitgleich wurde durch die Immunisierung von Mäusen mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-BSA der Antikörperklon m734 gewonnen (Le Doussal *et al.*, 1990). Auch hier bewirkte der Wechsel des Metallions verglichen mit m734 ( $K_D = 43 \text{ nM}$ ) eine deutliche Verminderung der Affinität gegenüber dem Me-DTPA-Komplex. Trotz der äußerst kurzen Halbwertszeit des Antikörper-Ligand-Komplexes von 35 s wurde das Fab'-Fragment von m734 in Kombination mit einem bivalentem  $^{111}\text{In}$ -DTPA bereits erfolgreich für die *Pretargeting*-Therapie von Patienten mit metastasierendem medullärem (MTC) bzw. nicht-medullärem (non-MTC) Schilddrüsenkarzinom eingesetzt (Barbet *et al.*, 1998; Kraeber-Bodère *et al.*, 2006; Chatal *et al.*, 2006) (siehe Abschnitt 4.3). Dabei konnte der Krankheitsverlauf im Vergleich zu unbehandelten Patienten langfristig (mind. 2 Jahre) stabilisiert und die Überlebensrate signifikant erhöht werden.

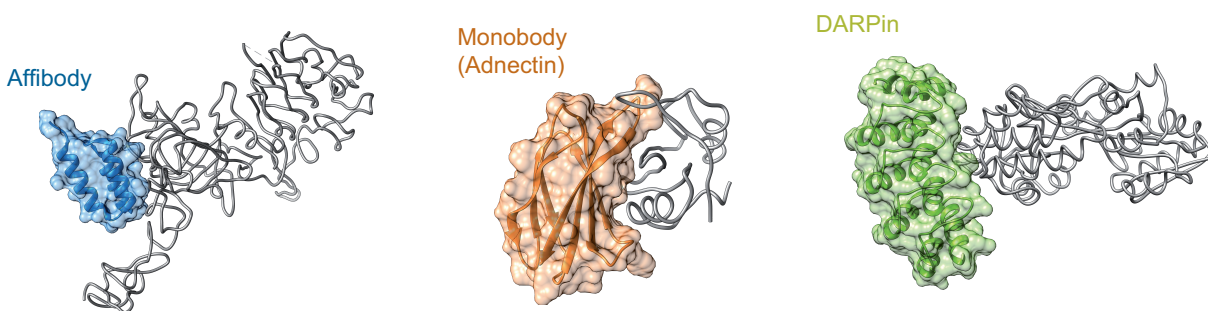
Ein aus einer *Phage Display* Bibliothek ebenfalls zur Bindung von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-BSA selektiertes scFv-Fragment wies mit 0,8 nM (ELISA) eine ähnliche Dissoziationskonstante wie die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Anticaline auf (Vaughan *et al.*, 1996). Es sind jedoch keine *in vivo* Anwendungen für dieses scFv in der Literatur beschrieben. Allerdings neigen scFv-Antikörperfragmente generell zur Instabilität in Form von Dimerisierung bzw. Aggregatbildung (Worn & Plückthun, 2001).

Der bislang vielversprechendste Ansatz gelang durch die Generierung des  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Bn-spezifischen Antikörpers 2D12.5 mit Hilfe der Hybridom-Technologie (Goodwin *et al.*, 1994). Dieser besitzt – neben einer hohen Affinität von 10 nM für den  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Bn-Komplex – eine breit gefächerte Spezifität für andere Metalle aus der Lanthanidreihe (Corneillie *et al.*, 2003). Kürzlich wurde durch zufallsbasierte Mutagenese des 2D12.5 scFv und *Yeast Surface Display* die stabilitätsmurierte Variante scFv C8.2.5 mit picomolarer Affinität ( $K_D = 15 \text{ pM}$ ) für  $^{90}\text{Y}$ -DOTA-Bn selektiert (Orcutt *et al.*, 2011b). In einem anschließenden *Pretargeting*-Experiment konnte eine signifikant höhere Tumoranreicherung als mit dem ursprünglichen 2D12.5 scFv beobachtet werden. Im direkten Vergleich zum stabilitätsmurierten Anticalin CL31d ( $\tau_{1/2}^\infty = 109 \text{ min}$ ) verfügt scFv C8.2.5 allerdings mit 53 min über eine deutlich kürzere Dissoziations-Halbwertszeit. Das lässt hoffen, dass CL31d in *Pretargeting*-Experimenten wenigstens vergleichbare Ergebnisse erzielen kann.

Zusammenfassend betrachtet stehen somit auf dem *Pretargeting*-Gebiet für die zukünftige Evaluierung des *Pretargeting*-Konzepts im Menschen fast ausschließlich Antikörper murinen Ursprungs zur

Verfügung. Murine Antikörper bergen jedoch die Gefahr, vom humanen Immunsystem als fremd erkannt zu werden und folglich eine Immunreaktion auszulösen (*Human Anti-Mouse Antibodies*; HAMA bzw. *Anti-Drug Antibodies*; ADA). Dadurch kann die Wirksamkeit der Behandlung behindert bzw. im schlimmsten Fall eine wiederholte Behandlung unmöglich werden (Klee, 2000).

Die Erkennung von Metallchelate-Komplexen durch andere etablierte Protein-*Scaffolds*, wie Affibodies, Monobodies und DARPin, ist dagegen bislang nicht beschrieben. Als Grund hierfür ist anzunehmen, dass die Bindung der Zielmoleküle dabei, im Gegensatz zu Anticalinen, fast ausschließlich über eine planare Interaktionsfläche vermittelt wird (Abbildung 53). Dabei formen Sekundärstrukturelemente wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter ein rigides Grundgerüst, welches sich vor allem gut zur Wechselwirkung mit ausgedehnten Proteinliganden eignet. Dagegen erfüllen Anticaline mit ihrer ausgeprägten Bindungstasche über die optimalen strukturellen Voraussetzungen, um kleine haptentartige Substanzen wie Me-DTPA mit hoher Affinität stabil zu binden.



**Abbildung 53. Prinzip der molekularen Erkennung von biomedizinisch relevanten Zielmolekülen (grau) durch Protein-*Scaffolds*.** Affibody (abgeleitet vom 3-Helix-Bündel der Z-Domäne aus Protein A von *S. aureus*; blau) im Komplex mit der HER2 Domäne III (PDB: 3MZW), Monobody (abgeleitet von der zehnten extrazellulären Domäne vom Typ III des humanen Fn; orange) im Komplex mit einer SH2 Domäne (PDB: 4JE4) sowie DARPin (abgeleitet von Konsensussequenzen der Ankyrin-Proteine; grün) im Komplex mit dem Maltose-Bindungsprotein (PDB: 1SVX).

Das *Pretargeting*-Konzept ist in den letzten Jahren weiter in den Fokus der Nuklearmedizin gerückt und konnte bereits in mehreren Studien Wirksamkeit *in vivo* zeigen (Goldenberg *et al.*, 2012; Sharkey *et al.*, 2012; Frampas *et al.*, 2013). Daher besteht für das maturierte Anticalin CL31d mit seiner picomolaren Affinität für den Metallchelator ( $K_D = 543$  pM), langen Komplex-Halbwertszeit ( $\tau_{1/2}^\infty = 109$  min) und sehr guten Proteinstabilität ( $T_m = 67,3$  °C) diesbezüglich ein enormes Anwendungspotential. Wie in den Abschnitten 3.2, 3.4 sowie 3.3 erläutert, eignen sich Anticaline zudem aufgrund ihrer Robustheit und einfachen Handhabung hervorragend zur Konstruktion von bifunktionellen Proteinen, wie sie unter anderem für das *Pretargeting* benötigt werden.

## 4.2 Entwicklung eines Duocalins mit einstellbarer Plasma-Halbwertszeit für die Radiodiagnostik und -therapie von ED-B-exprimierenden Tumoren

Aktuell stehen für die *Pretargeting*-Radiodiagnostik/-therapie ausschließlich bispezifische Antikörper zur Verfügung. Ungeachtet ihres Erfolges in präklinischen Studien birgt jedoch deren biopharmazeutische Produktion gewisse Herausforderungen. So werden Fab'-Fragmente unterschiedlicher Spezifität (d.h. für das Tumorantigen und für ein Metallchelate) häufig durch chemische Kopplung über eine freie Sulfhydryl-Gruppe konjugiert, wobei eine Thioether-Bindung entsteht (Goldenberg *et al.*, 2007). Der Herstellungsprozess ist allerdings aufwendig, da die oxidationsanfälligen Sulfhydryl-Gruppen vor der Kopplungsreaktion reduziert werden müssen, wobei intramolekulare Disulfidbindungen beeinträchtigt werden können. Zudem ist das Reaktionsprodukt oftmals heterogen. Bei der klassischen Quadrom-Technologie (Milstein & Cuello, 1983) werden die bispezifischen Antikörper durch Fusion zweier Antikörper-produzierender Hybridom-Zelllinien generiert. Neben den hohen Kosten für eukaryotische Expressionssysteme gilt bei dieser Methode die entstehende Mischung einschließlich Fehlpaarung der Antikörperketten als problematisch (Milstein, 2000).

Duocaline – Fusionsproteine aus zwei Anticalinen – bieten demgegenüber entscheidende Vorteile. So bestehen Duocaline aus einer einzigen Polypeptidkette, da die beiden Anticaline bereits auf genetischer Ebene miteinander fusioniert werden. Mit Hilfe unaufwendiger DNA-Klonierungstechniken lassen sich Anticaline mit gleichen oder unterschiedlichen Bindungsspezifitäten beliebig kombinieren. In diesem Zusammenhang ist der gut zugängliche und fernab der Ligandenbindungstasche lokalisierte N- bzw. C-Terminus im Gegensatz zu scFv-Fragmenten, bei denen der N-Terminus häufig Teil des Paratops ist, von Vorteil. Die unkomplizierte Biosynthese von Duocalinen wurde bereits – wie für die isolierten Anticaline – im Periplasma von *E. coli* demonstriert (Schlehuber & Skerra, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Ansatz von Dr. M. Gebauer zur Entwicklung eines Duocalins mit Bindungsspezifität für Fibronectindomäne ED-B und Me-DTPA (Gebauer, 2013) zur Adressierung der Tumervaskulatur aufgegriffen. In Pilotexperimenten konnte Dr. M. Gebauer für die im Periplasma von *E. coli* produzierten Duocalin-Varianten, N7A-CL31 und CL31-N7A, mittels *Sandwich*-ELISA bispezifische Bindungsaktivität nachweisen. Beide Proteine besaßen im Vergleich zu den isolierten Anticalinen jedoch ungünstige proteinbiochemische Eigenschaften, vor allem eine äußerst geringe Ausbeute in *E. coli* (ca. 100 g/L Kultur) sowie die Tendenz zur Ausbildung von Disulfidisomeren.

Die Zusammensetzung des Linkers zwischen den Fusionspartnern hat einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion, Faltung und biologische Aktivität von bifunktionellen Proteinen, wobei sich hohe Flexibilität und Hydrophilie positiv auswirken (Zhang *et al.*, 2009). Aufgrund dessen wurde in einem initialen Experiment der von Dr. M. Gebauer verwendete kurze Peptidlinker („GAVDANS“) in den Duocalin-Varianten N7A-CL31d und CL31d-N7A gegen ein strukturell ungeordnetes PAS-Polypeptid (Schlupschy *et al.*, 2013) bestehend aus 60 bzw. 100 Aminosäuren ausgetauscht. Als Vergleich dienten entsprechende Duocalin-Varianten ausgestattet mit einem kurzen Ser<sub>3</sub>Ala-Linker (PAS(0)-Linker), der sich aus der zur Insertion der PAS-Genkassette eingefügten *SapI*-Schnittstelle ergab. Von den

sechs im Periplasma von *E. coli* produzierten Duocalinen zeigten die vier PASylierten Proteine nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie im Vergleich zu den unmodifizierten Varianten eine ca. 2,5-fache (PAS(60)) bzw. 1,5-fache (PAS(100)) Steigerung der Ausbeute.

Die durch den PAS-Linker erzeugte größere räumliche Distanz der beiden Anticaline fördert offenbar eine effizientere Proteinfaltung, bei der es zu weniger Aggregatbildung kommt. Die proteinbiochemische Analyse der sechs Duocaline mittels SEC und SDS-PAGE ergab, dass der überwiegende Anteil (90-95 %) der Proteinpräparationen als Monomer vorlag, wobei – im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dr. M. Gebauer sowie mit anderen Duocalinen (Schlehuber & Skerra, 2001) – kaum Anzeichen von Disulfidisomeren vorhanden waren. Letzteres kann wiederum auf die erhöhte Distanz der Anticaline während der Faltung der PASylierten Duocaline zurückgeführt werden, wodurch Fehlpaarungen der Cys-Seitenketten vermieden werden.

Für diese sechs Duocaline wurde mittels *Sandwich*-ELISA jeweils bispezifische Bindungsaktivität nachgewiesen. Dabei ermöglichte der PAS-Linker offenbar eine sterisch ungehinderte Bindung an das Zielmolekül Fn7B8, da mit zunehmender PAS-Länge eine größere Signalamplitude beobachtet wurde. Zudem wurde mit der PASylierung die verringerte Affinität der unmodifizierten Duocaline für Fn7B8 (N7A-CL31d: 11,3 nM; CL31d-N7A: 29,7 nM) im Vergleich zum isolierten Anticalin N7A ( $K_D = 1,76$  nM) weitgehend rückgängig gemacht. Die Varianten mit N-terminalem N7A zeigten sich dabei denen mit N-terminalem CL31d überlegen (N7A-PAS(100)-CL31d: 4,75 nM; CL31d-PAS(100)-N7A: 12,4 nM). Die Bestimmung der Affinität für Fn7B8 mittels SPR-Spektroskopie (Abschnitt 3.2.6) bestätigte, dass N7A-PAS(0)-CL31d bzw. N7A-PAS(100)-CL31d mit 10 nM einen zum isolierten Anticalin N7A (5,8 nM) vergleichbaren  $K_D$ -Wert besitzen. Für die Erkennung von Y-DTPA-RNase durch diese Duocaline wurde ebenfalls nur eine geringfügige Verminderung der Affinität beobachtet.

Die Anreicherung eines therapeutischen Proteins im Tumor als Grundvoraussetzung für die zielgerichtete Radiotherapie bzw. -diagnostik hängt neben der Affinität für das tumorassoziierte Antigen in großem Maße sowohl von der Plasma-Halbwertszeit als auch von der Tumorpenetration des Proteinwirkstoffs ab, die beide durch dessen Molekülmasse definiert werden (Wittrup *et al.*, 2012). So erreichen Antikörper, vor allem bedingt durch ihre lange Blut-Zirkulationszeit, im Vergleich zu den kleineren Antikörperfragmenten wie Fab und scFv oder anderen Protein-*Scaffolds* die höchste Tumorrakkumulation. Die Vorteile dieser kleineren Bindeproteine gegenüber Antikörpern liegen dagegen in ihrer deutlich besseren Tumorpenetration, einer rascheren Aufnahme in den Tumor sowie einer schnelleren systemischen Eliminierung. Letzteres führt zu einem besseren Bildkontrast und reduziert die Strahlenbelastung für den Patienten. Wie am Beispiel zweier humanisierter Fab-Fragmente (mit Spezifität für HER2 bzw. CD20) demonstriert, kann durch Vergrößerung des hydrodynamischen Molekülvolumens die Tumorrakkumulation und der Bildkontrast eines kleinen Proteins signifikant optimiert werden (Mendler *et al.*, 2015).



Durch Einführung längerer Linkersequenzen, PAS(200), PAS(400) und PAS(600), in das Duocalin N7A.19-CL31d wurde eine Palette von bispezifischen Bindeproteinen mit zunehmender Plasma-Halbwertszeit generiert. Ihre gentechnische Produktion erfolgte – im Gegensatz zu den Duocalin-Varianten mit kürzeren PAS-Linkern – im Cytoplasma von *E. coli* Origami B (Prinz *et al.*, 1997). In einem Pilotexperiment mit N7A-CL31d und N7A-PAS(100)-CL31d konnte gezeigt werden, dass sich unter Umgehung der Translokation der Polypeptidkette in das bakterielle Periplasma die Ausbeute etwa um das 100-fache steigern lässt. Die Ausbildung der strukturell konservierten Disulfidbrücke im Anticalin wurde dabei durch das leicht oxidierende Milieu des Cytoplasmas von Origami B sichergestellt.

Die SEC-Analyse dieser gereinigten Duocaline (siehe Abschnitt 3.2.7) ergab erwartungsgemäß eine deutliche Vergrößerung ihres hydrodynamischen Volumens in Folge der PASylierung. So konnte die kalkulierte Molekülmasse um das 3,5-fache für N7A.19-PAS(200)-CL31d, den Faktor 5,6 für N7A.19-PAS(400)-CL31d bzw. den Faktor 6,6 für N7A.19-PAS(600)-CL31d erhöht werden. Interessanterweise sind diese Werte nahezu identisch zu den Vergrößerungsfaktoren, die bei der endständigen Fusion entsprechender PAS-Polypeptide mit einem Fab-Fragment erzielt worden waren (Schlapschy *et al.*, 2013). Wie bereits für andere PASylierte Proteine beobachtet (Schlapschy *et al.*, 2013), ist die mit steigender PAS-Länge einhergehende Verringerung der Antigenaffinität im SPR-Experiment – hier gegenüber Fn7B8 und Y-DTPA-RNase (siehe Abschnitt 3.2.7) – vor allem durch eine langsamere Assoziationskinetik bedingt. Diese resultiert aus einer erschwerten Diffusion der PASylierten Proteine durch die Dextran-Oberflächenmatrix des SPR-Sensorchips zum immobilisierten Zielmolekül.

Die pharmakokinetische (PK) Studie in Mäusen bestätigte, dass das vergrößerte hydrodynamische Volumen mit einer langsameren renalen Eliminierung der Duocaline assoziiert ist. Die dadurch erheblich verlängerte Plasma-Halbwertszeit (N7A.19-CL31d: 24 min; N7A.19-PAS(600)-CL31d: 6 h) erhöht die Bioverfügbarkeit des Proteinwirkstoffes. Wie schon bei den Vergrößerungsfaktoren der Molekülmasse beobachtet, standen auch hier die PK-Faktoren im Einklang mit den Werten, die bei der terminalen PASylierung von Fab-Fragmenten erhalten worden waren (Schlapschy *et al.*, 2013). Wie exemplarisch durch *Western Blot*-Analyse von Plasmaproben mit N7A.19-PAS(600)-CL31d gezeigt wurde, trat im zeitlichen Verlauf der PK-Studie trotz der ungeordneten dreidimensionalen Struktur des langen PAS-Polypeptids keine proteolytische Spaltung auf. Das ist im Hinblick auf *Pretargeting*-Experimente von größter Bedeutung, da erfahrungsgemäß die Injektion des radioaktiven Haptens 24–48 h nach der Proteininjektion erfolgt. Anders als beim Einsatz von chemischen Polymeren zur Verlängerung der Halbwertszeit, wie beispielsweise PEG, unterliegen PAS-Polypeptide dennoch grundsätzlich dem natürlichen Proteinmetabolismus durch lysosomalen Abbau und werden folglich nicht in Zellen akkumuliert (Binder & Skerra, 2012).

Die spezifische Erkennung von ED-B-positivem Fn durch N7A im Kontext der ECM auf Tumorzellen wurde bereits durch fluoreszenzbasierte Zellfärbung demonstriert (Gebauer *et al.*, 2013). Die Bindungsanalyse auf den ED-B-exprimierenden Caco-2 Zellen mit Hilfe von radioaktivem  $^{177}\text{Lu}$ -DTPA-

NH<sub>2</sub> (siehe Abschnitt 3.2.9) ergab jedoch im Vergleich zum durch SPR-Spektroskopie ermittelten K<sub>D</sub>-Wert (41 pM) eine um den Faktor 1000 reduzierte Affinität von N7A.19-CL31d. Es scheint denkbar, dass benachbarte Fn-Domänen bzw. Interaktion von Fn mit anderen ECM-Komponenten die Protein-Ligand-Wechselwirkung behindern. Es bleibt im Hinblick auf das Tumor-Xenograft-Modell zu klären, ob eventuell andere etablierte ED-B-exprimierende Tumorzellen, wie z.B. die murine Teratokarzinom-Zelllinie F9 (ATCC CRL-1720) oder die humane Glioblastom-Zelllinie U-251 MG, eine bessere Bindung der ED-B zulassen (Moosmayer *et al.*, 2006). Auch die Erkennung von murinem ED-B durch ED-B-spezifische Anticaline ist aufgrund der 100 %-igen Übereinstimmung zur humanen Aminosäuresequenz möglich (Neri & Bicknell, 2005). Der Einfluss der PASylierung auf die Bindungsaktivität des Duocalins spielte hingegen nur eine untergeordnete Rolle. Für die in dem oben erwähnten Zellexperiment 5-fache Verminderung der Affinität von N7A.19-PAS(400)-CL31d (im Vergleich zu N7A.19-CL31d) wird ein aufgrund des vergrößerten hydrodynamischen Volumens gebremstes Eindringen des Proteins in die ECM angenommen.

Der Vorteil einer gegen ED-B-positives Fn gerichteten *Pretargeting*-Radiotherapie gegenüber dem konventionellen Ansatz mit direkt markierten Bindeproteinen konnte bereits anhand einer Biodistributionsstudie unter Verwendung eines bispezifischen Antikörpers bestehend aus dem scFv AP39 (entwickelt aus scFv L19) und dem anti-HSG (*Histamine-Succinyl-Glycine*) Fab'-Fragment m679 demonstriert werden, welches zur Bindung von <sup>111</sup>In markiertem HSG-DOTA eingesetzt wurde (Moosmayer *et al.*, 2006). Dabei wurde eine mehr als dreifach höhere therapeutische Wirksamkeit erreicht. Die in dieser Arbeit entwickelten Duocaline sind diesem bispezifischen Antikörperformat allerdings in den nachfolgenden Gesichtspunkten überlegen. So ist, wie bereits zuvor diskutiert, die Herstellung des bispezifischen Antikörpers durch chemische Kopplung aufwendig und ineffizient. Ferner besteht die Gefahr, dass das Kopplungsprodukt heterogen ist, da AP39 bekanntermaßen zur Ausbildung nicht-kovalenter Dimere neigt. Des Weiteren ist auch die durch SPR-Spektroskopie ermittelte Affinität für ED-B von 2,4 nM für das unfusionierte dimere scFv AP39 im Vergleich zu N7A.19-CL31d sowie dessen PASylierten Varianten deutlich schlechter.

Mit N7A.19-CL31d und seinen drei PASylierten Varianten stehen damit vielversprechende Proteinreagenzien für die *Pretargeting*-Radiotherapie und/oder -diagnostik zur Verfügung. Ihre Fähigkeit, sich in einem Tumor-Xenograft Modell in Mäusen in hoher Konzentration am Tumor anzureichern, muss zukünftig *in vivo* zunächst durch direkte Isotopen-Markierung der Proteine mit beispielsweise <sup>124</sup>I (vgl. Abschnitt 3.3.7) evaluiert werden. Wie bereits zuvor diskutiert, wird dabei ihre Plasma-Halbwertszeit eine entscheidende Rolle spielen. In Abhängigkeit vom Verwendungszweck kann damit das Duocalin mit derjenigen PAS-Länge ausgewählt werden, welches maximale Tumoranreicherung (Therapie) bzw. einen möglichst guten Bildkontrast (Diagnostik) erzielt.

### 4.3 Potential eines scFv/Anticalin-Fusionsproteins für die Radiodiagnostik und -therapie solider Tumore nach dem *Pretargeting*-Verfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Fusionsprotein aus dem murinen anti-CEA scFv-Fragment T84.66 und dem anti-Me-DTPA Anticalin CL31 ein weiteres bispezifisches Bindeprotein für die *Pretargeting*-Diagnostik und/oder Therapie entwickelt, welches sich von konventionellen Antikörperformaten unterscheidet. Wie bereits in Abschnitt 4.2 diskutiert, verfügen solche relativ kleinen Proteine (ca. 50 kDa) über eine gute Penetration des Tumors, jedoch eine im Vergleich zum Antikörper (150 kDa) schlechtere Tumorretention. Durch Veränderung des hydrodynamischen Volumens kann jedoch die Tumorakkumulation des Proteins gegenüber der schnellen Ausscheidung über die Nieren signifikant beeinflusst werden (Mendler *et al.*, 2015). Analog zu dem in Abschnitt 3.2 beschriebenen Duocalin wurde dabei ein PAS-Peptidlinker verwendet, mittels dessen die Plasma-Halbwertszeit des scFv/Anticalin-Fusionsproteins auf einfache Weise variiert werden kann.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich das scFv/Anticalin-Fusionsprotein im Periplasma von *E. coli* produzieren lässt und dabei die Ligandenbindungsfähigkeiten beider Bindeproteine nur marginal (max. Faktor 5) beeinflusst wird (siehe Abschnitte 3.3.3 und 3.3.4). Zu diesem Zweck wurde das scFv T84.66 über einen kurzen Peptidlinker („GAVDANS“) mit dem Anticalin CL31 fusioniert. Die Proteinpräparation enthielt nach der Streptavidin-Affinitätschromatographie einen erheblichen Anteil an Disulfidisomeren. Diese sind auf Fehlpaarungen der insgesamt drei intramolekularen Disulfidbrücken (2x scFv, 1x Anticalin) zurückzuführen, deren Auftreten auch durch die Koexpression von periplasmatischen Chaperonen (Schlupschy *et al.*, 2006) nicht verhindert werden konnte. Die Disulfidisomere von T84.66-CL31 wiesen aber gegenüber dem korrekt gefalteten Fusionsprotein geringe Nettoladungsunterschiede auf, die für die vollständige Abtrennung mittels AEX genutzt werden konnten.

Das so zur Homogenität gereinigte T84.66-CL31 zeigte für beide Liganden jeweils eine Bindungsaktivität im einstelligen nanomolaren Bereich (Y-DTPA-RNase: 1 nM; Lu-DTPA-RNase: 2,9 nM; CEA: 1,4 nM). Darüber hinaus konnte die simultane Bindung beider Liganden im Rahmen eines *in vitro Pretargeting*-Experiments auf CEA-exprimierenden HT-29 Karzinomzellen demonstriert werden (siehe Abschnitt 3.3.8.1). Die hohe Affinität des scFv/Anticalin-Fusionsproteins für CEA ( $K_D = 3,5$  nM) wurde dabei bestätigt. Erfreulicherweise besitzt T84.66-CL31d zudem eine höhere Bindungsaktivität für Lu-DTPA-NH<sub>2</sub> in Lösung ( $K_D = 160$  pM) als aufgrund der Ergebnisse der SPR-Spektroskopie erwartet worden war ( $K_D = 4,9$  nM). Demnach spielen hier etwaige stabilisierende, durch das Trägerprotein RNase vermittelte Wechselwirkungen für die biomolekulare Komplexbildung keine verstärkende Rolle.

Die beiden PASylierten scFv/Anticalin-Fusionsproteine, T84.66-PAS(200)-CL31d und T84.66-PAS(400)-CL31d, konnten nach Sekretion ins bakterielle Periplasma analog zum unmodifizierten Protein zur Homogenität gereinigt werden (siehe Abschnitt 3.3.5). Die kinetische Stabilität zwischen dem Fusionsprotein und dem Me-DTPA-Komplex wurde durch die Flexibilität des PAS-Linkers positiv beeinflusst, so dass T84.66-PAS(200)-CL31d ( $K_D = 2,3$  nM) bzw. T84.66-PAS(400)-CL31d

( $K_D = 1 \text{ nM}$ ) eine leicht höhere Bindungsaktivität für Lu-DTPA-RNase aufwiesen als das unmodifizierte Fusionsprotein ( $K_D = 4,9 \text{ nM}$ ). Die Bindung des Tumorantigens CEA auf HT-29 Zellen wurde mit Zunahme der Länge des PAS-Linkers hingegen leicht verschlechtert (T84.66-CL31d:  $1,4 \text{ nM}$ ; T84.66-PAS(200)-CL31d:  $13 \text{ nM}$ ; T84.66-PAS(400)-CL31d:  $22 \text{ nM}$ ). Vermutlich beruht dies wiederum auf einer Verlangsamung der Assoziationskinetik in Folge des vergrößerten hydrodynamischen Volumens. Eine spezifische Tumoranreicherung sollte mit diesen Parametern aber dennoch gewährleistet sein (Schmidt & Wittrup, 2009).

Die PET bzw. Biodistributionsanalyse der drei  $^{124}\text{I}$  markierten scFv/Anticalin-Fusionsproteine wurde durchgeführt, um (i) ihre Fähigkeit zur spezifischen Anreicherung im CEA-positiven LS-174T Tumor-Xenograft, (ii) ihre pharmakokinetischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der PASylierung und (iii) ihre Biodistribution im gesunden Gewebe sowie im Hinblick auf die *Pretargeting*-Radiodiagnostik/-therapie zu evaluieren. Für alle drei scFv/Anticalin-Fusionsproteine wurde eine spezifische Tumoranreicherung beobachtet. Die höchste Aktivität wurde dabei jeweils 4 h nach der Proteininjektion erreicht (siehe Abschnitt 3.3.7). Das scFv/Anticalin-Fusionsprotein T84.66-PAS(400)-CL31d wies mit  $\tau_{1/2}^{\beta} = 12,6 \text{ h}$  die längste Plasma-Halbwertszeit von den drei untersuchten Proteinen auf (T84.66-CL31d: 26 min; T84.66-PAS(200)-CL31d: 7,4 h). Im Vergleich zum unmodifizierten T84.66-CL31d (4,0 % ID/g) zeigte T84.66-PAS(400)-CL31d (7,4 % ID/g) eine höhere maximale Signalintensität im Tumor (4 h p.i.). T84.66-PAS(200)-CL31d führte dagegen 4 h nach der Injektion zu einer niedrigeren Tumoranreicherung (3,2 % ID/g). Diese Korrelation zwischen der apparenten Molekülmasse bzw. der Zirkulationsdauer eines Proteins und seiner Tumoraufnahme war bereits in einer Studie an systematisch PASylierten Proteinen gezeigt worden (Mendler *et al.*, 2015). Darüber hinaus deckt sich diese Beobachtung gut mit den Ergebnissen von Studien zur Erhöhung der Tumoranreicherung des  $^{125}\text{I}$ -scFv T84.66 durch Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit mit anderen Methoden (Kenanova *et al.*, 2007; Yazaki *et al.*, 2008). Ein negativer Einfluss auf die Adressierung des CEA-positiven Tumors infolge der durch PASylierung oder Iodierung leicht verminderten Affinität der scFv/Anticalin-Fusionsproteine für CEA wurde nicht beobachtet. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass eine erhöhte Tumoranreicherung großer Moleküle zum Teil auch durch passive unspezifische Anreicherung verursacht werden kann. Dieses als *Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect* bekannte Phänomen (Matsumura & Maeda, 1986) resultiert hauptsächlich aus der im Vergleich zum gesunden Gewebe veränderten Gefäßarchitektur solider Tumore – ausgelöst durch Hypervaskularisierung, Fenestrierung und damit erhöhter Durchlässigkeit der Gefäße sowie Defizite im lymphatischen System – wodurch einerseits die Diffusion von Molekülen in den Tumor erleichtert und andererseits der Abtransport insbesondere von Makromoleküle erschwert wird (Fang *et al.*, 2011). Dem gegenüber steht die in einer kürzlich veröffentlichten Xenograft-Studie mit CD20 bindenden Fab-Fragmenten diskutierte Tumorperfusion (Mendler *et al.*, 2016), welche einen genau gegenläufigen Effekt, nämlich einen verlangsamten Transport von Makromolekülen in den Tumor, zur Folge hat und zudem zu einer extrem heterogenen tumoralen Verteilung der Proteinwirkstoffe führen kann. Insgesamt ist damit der Schluß zulässig, dass die Einflussfaktoren der intratumoralen Verteilung von makromolekularen Wirkstoffen

bisher nur unzureichend verstanden sind und damit in weiteren systematische Studien definierte Modelle entwickelt werden müssen.

Auffälligerweise zeigte T84.66-PAS(200)-CL31d erst 24 h nach der Proteininjektion eine höhere spezifische Akkumulation als das unmodifizierte Fusionsprotein. Die erreichten % ID/g-Werte (siehe oben) lagen dabei deutlich hinter den Erwartungen zurück. Zudem wurde für T84.66-PAS(200)-CL31d eine im Verhältnis zum Tumor erhöhte Retention in der Leber beobachtet, was insbesondere im zeitlichen Verlauf des Versuchs zu einem schlechten Tumor/Leber-Verhältnis (24 h p.i.: 0,7 bzw. 48 h p.i.: 0,6) führte. Die autoradiographische Analyse einzelner Gewebeschnitte (siehe Abschnitt 3.3.7) bestätigte eine erhöhte  $^{124}\text{I}$ -Radioaktivität in der Leber 48 h nach der Proteininjektion. T84.66-PAS(400)-CL31d zeigte dagegen im Versuchsverlauf das beste Tumor/Leber-Verhältnis mit einem Maximum bei 3,8 (48 h p.i.) gefolgt von T84.66-CL31d (48 h p.i.: 1,6).

Die nachfolgend aufgeführten Faktoren tragen vermutlich zu diesem unvorteilhaften Tumor/Leber-Verhältnis im Fall von T84.66-PAS(200)-CL31d bei. Die unter anderem von der Molekülmasse abhängigen Prozesse der Proteineliminierung spielen dabei wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Während kleine Proteine wie T84.66-CL31d (app. MM: 46 kDa) hauptsächlich durch renale Filtration aus dem Blutkreislauf eliminiert werden, erfolgt die Eliminierung größerer Proteine, also auch von T84.66-PAS(200)-CL31d (app. MM: 213 kDa) und T84.66-PAS(400)-CL31d (app. MM: 437 kDa) aufgrund der überschrittenen renalen Ausschlussgrenze ( $> 70$  kDa) unter anderem vermehrt durch spezifische und/oder unspezifische Aufnahme in die Leber (Solá & Griebenow, 2010). So ist zu erklären, dass bei beiden PASylierten scFv/Anticalin-Fusionsproteinen 24 h p.i. und 48 h p.i. eine im Vergleich zu T84.66-CL31d höhere  $^{124}\text{I}$ -Radioaktivität in der Leber beobachtet wurde. Warum allerdings die  $^{124}\text{I}$ -Radioaktivität in der Leber bei T84.66-PAS(400)-CL31d nach 24 h p.i. und besonders 48 h p.i. deutlich geringer war als bei T84.66-PAS(200)-CL31d, konnte nicht abschließend geklärt werden und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Neben der Molekülgröße wird die hepatische (wie auch renale) Eliminierung durch die Nettoladung des Proteins beeinflusst (Fang *et al.*, 2011). Das PAS-Polypeptid ist allerdings – im Gegensatz zu den meisten anderen zum Zweck der Halbwertszeit-Verlängerung eingesetzten Biopolymere (Binder & Skerra, 2012) – ungeladen und verändert daher die Nettoladung des Wirkstoffs nicht.

Eine durch das Antigen induzierte verstärkte Metabolisierung der scFv/Anticalin-Fusionsproteine erscheint ebenso unwahrscheinlich. Zwar wird CEA durch Phospholipasen von der Oberfläche der hier verwendeten LS-174T Zellen freigesetzt (Akamatsu *et al.*, 1998) und aufgrund seiner starken Glykosylierung überwiegend in der Leber verstoffwechselt, jedoch ist die dabei erreichte Plasma-Konzentration von löslichem CEA äußerst gering (2 ng/mL  $\approx$  0,01 nM; Urva *et al.*, 2010). Bei *in vivo* Bildgebungsstudien in LS-174T Tumorxenograft-Mäusen mit  $^{111}\text{In}$  markierten T84.66 Antikörpern/-fragmenten (cT84.66, scFv-Fc, Minibody und Diabody) wurde ebenfalls eine hohes Aktivitätssignal in der Leber beobachtet, was allerdings nachweislich nicht durch zirkulierendes CEA hervorgerufen wurde, da eine hohe hepatische Akkumulation auch in Mäusen ohne Tumorxenograft auftrat (Kenanova *et al.*,

2007). Eine Ursache für die erhöhte Leberaktivität für die  $^{111}\text{In}$ -mAbT84.66-Derivate konnte bisher nicht identifiziert werden. *In vivo* Studien mit Iod markierten T84.66-basierten Antikörperformaten hatten im Vergleich zu den Radiometallen dagegen ein deutlich geringeres bis gar keine Radioaktivitätssignal in der Leber zur Folge (Yazaki *et al.*, 2001; Sundaresan *et al.*, 2003; Kenanova *et al.*, 2007; Yazaki *et al.*, 2013). Das kann allerdings eine Folge von Dehalogenierungs-/Metabolisierungsprozessen der markierten Proteine sein, wodurch Radionuklide wie Iodid und andere Halogenide in der Lage sind, die Phospholipidmembranen zu überwinden und selektiv in der Schilddrüse angereichert oder über den Urin ausgeschieden werden, und damit der Proteinwirkstoff nicht mehr detektiert werden kann.

Im Hinblick auf einen in der Radiodiagnostik angestrebten möglichst hohen Bildkontrast muss allerdings festgehalten werden, dass durch die PASylierung von T84.66-CL31d – trotz der erhöhten Tumorakkumulation – kein besseres Tumor/Blut-Verhältnis erreicht wurde. Da aber T84.66-PAS(400)-CL31d 48 h nach der Proteininjektion (i) die höchste Tumorakkumulation und das (ii) beste Tumor/Leber-Verhältnis bei einem moderaten Tumor/Blut-Verhältnis zeigte, wurde dieses PASylierte scFv/Anticalin-Fusionsprotein für das *in vivo* *Pretargeting*-Experiment ausgewählt.

Ein generelles Problem des *Pretargetings* mit einem bispezifischen Bindeprotein und einem Hapten ist, dass – trotz der fortwährenden Bestrebungen, die kinetische Stabilität dieses bimolekularen Komplexes durch *Protein Engineering* zu optimieren (siehe Abschnitt 4.1) – die dabei erzielten Dissoziations-Halbwertszeiten (z.B. anti-Me·DTPA CL31d: 109 min; anti-Me·DOTA scFv C8.2.5: 53 min) mehr als eine Zehnerpotenz kürzer sind als die Halbwertszeit des radioaktiven Zerfalls medizinisch relevanter Isotope (siehe Tabelle 1). Damit geht der überwiegende Anteil der eingesetzten Strahlungsenergie für den anti-tumoralen Effekt durch Dissoziation verloren. Der wohl effektivste Ansatz, diesem Verlust entgegenzuwirken, ist es, diese reversible Protein·Ligand-Interaktion in eine kovalente Wechselwirkung umzuwandeln (Corneillie *et al.*, 2006). Zu diesem Zweck werden im Kontext eines spezifischen Bindeproteins Chelat-Moleküle beispielsweise mit einer elektrophilen Gruppe (z.B. Acrylamid) ausgestattet, die dann in einer Michael-Addition mit der nukleophilen Thiolgruppe einer durch ortsgerichtete Mutagenese inserierten Cys-Seitenkette in der Nähe der Bindetasche reagiert. Zwar wurde für solche Chelator-Derivate nur eine geringere Kreuzreaktivität gegenüber biologisch relevanten Nukleophilen (z.B. Albumin, Glutathion) gezeigt, jedoch gilt die gentechnische Herstellung von Proteinen mit einer ungepaarten Cys-Seitenkette generell als problematisch (Corneillie *et al.*, 2006).

Daneben bietet der Einsatz eines divalenten Haptens eine alternative Möglichkeit, die Protein·Ligand-Interaktion zu stabilisieren. Wie mehrfach gezeigt werden konnte, resultiert die Erhöhung der Affinität zwischen dem Protein und dem DTPA-Molekül als Folge von zwei Bindungsereignissen in enger räumlicher Nähe durch den Aviditätseffekt in einer gesteigerten Aufnahme und Retention im Tumor und damit zu einem besseren Tumor/Blut-Verhältnis (Le Doussal *et al.*, 1990; Goodwin *et al.*, 1994; Boerman *et al.*, 1999). Um dabei unspezifische Wechselwirkungen (siehe Abschnitt zuvor) zu verhin-

dern sowie schnelle Eliminierung des Metallchelats selbst durch glomeruläre Filtration sicherzustellen, sollte der bivalente Komplex, und darin insbesondere der Linker, hydrophilen Charakter aufweisen. Mit steigender Lipophilie des Haptens wird u.a. eine vermehrte Ausscheidung über das Leber/Galle-System beobachtet, was zum unerwünschten Auftreten von Radioaktivität im Darmtrakt führt (Goodwin *et al.*, 1994). Im einzigen in der Literatur beschriebenen divalenten DTPA-Molekül wurden die Chelat-Einheiten über zwei Aminosäuren, Tyrosin und Lysin, miteinander verknüpft (di-Me-DTPA-TL) (Le Doussal *et al.*, 1990). Dieses Dipeptid bietet den Vorteil, dass das Hapten – neben dem Radiometall – über die Tyr-Seitenkette ebenso mit Iod-Isotopen (siehe Abschnitt 1.1.1) markiert werden kann. Durch die Verwendung von chemisch inerten Linkern – wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden – wird demgegenüber jedoch die Gefahr einer enzymatischen Spaltung durch Plasma-Proteasen umgangen.

Von den insgesamt fünf im Rahmen dieser Arbeit evaluierten divalenten DTPA-Derivaten (siehe Abschnitt 3.3.8.2) wurde schließlich mit md-119 ein 23 Å langer Kohlenwasserstofflinker mit zwei Amidbindungen für die *in vivo Pretargeting*-Experimente ausgewählt. Zwar konnte für alle fünf Konstrukte mittels *Sandwich*-ELISA und SPR-Spektroskopie gezeigt werden, dass beide DTPA-Einheiten gleichzeitig durch das Me-DTPA-spezifische Anticalin erkannt werden können, jedoch ließen die kompetitiven Verdrängungsexperimente auf CEA-exprimierenden Zellen nur im Fall von md-119 auf einen ausgeprägten Aviditätseffekt schließen. Aufgrund der langen Kohlenwasserstoffkette und des damit verbundenen hydrophoben Charakters erscheint md-60 für eine *in vivo* Anwendung ohnehin den übrigen divalenten Konstrukten unterlegen. Darüber hinaus konnte md-119 im Vergleich zu den beiden ähnlich aufgebauten, aber längeren Linkern in md-147 und md-152 leichter und mit höherer Ausbeute (14 %) synthetisiert werden.

Die Eignung der scFv/Anticalin-Fusionsproteine für die Adressierung CEA-exprimierender Xenograft-Tumore nach dem *Pretargeting*-Konzept wurde schließlich anhand der Biodistribution von  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  bzw.  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  nach Injektion von T84.66-PAS(400)-CL31d demonstriert (siehe Abschnitt 3.3.9). Der divalente Metallchelate-Komplex zeigte sich dabei dem monovalenten  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  hinsichtlich der spezifischen Tumoranreicherung ( $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$ : 2,3 % ID/g;  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$ : 0,9 % ID/g; jeweils 2 h p.i.) klar überlegen. Der mit der Bindung von  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  an das scFv/Anticalin-Fusionsprotein einhergehende Aviditätseffekt führte offenbar zu einer besseren Retention der  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität am Tumor. Des Weiteren beschränkte sich die unspezifische Aufnahme von  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  – im Gegensatz zu  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  – sowohl in der Kontrollgruppe (1. Injektion: PBS, 2. Injektion: Hapten) als auch in der Versuchsgruppe (1. Injektion: T84.66-PAS(400)-CL31d, 2. Injektion: Hapten) auf die Nieren, die als primäres Ausscheidungsorgan fungieren. Die Retention von  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  in den gesunden Organen (2-7 % ID/g) unterschritt aber deutlich den für viele andere radioaktive Haptene (kleine Peptide und Metallchelatoren) typischen Wertebereich von 10-30 % ID/g (Orcutt *et al.*, 2011a).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse besteht im Hinblick auf eine künftige klinische Anwendung dieses *Pretargeting*-Ansatzes, beispielweise zur Diagnostik und Therapie von Kolonkarzinomen, noch Optimierungsbedarf. So konnte – entgegen den Erwartungen – das für einen guten Bildkontrast entscheidende Tumor/Blut-Verhältnis durch den Einsatz von  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  nicht erhöht werden, da zum Zeitpunkt der Biodistribution (2 h p.i. der Tracerinjektion) eine im Vergleich zu  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$  2,8-fach höhere  $^{177}\text{Lu}$ -Radioaktivität im Blut vorlag (siehe Abschnitt 3.3.9). Vermutlich kommt es in Folge des dann noch recht hohen Anteils an T84.66-PAS(400)-CL31d im Blut (2,0 % ID/g) zur Ausbildung von Protein-Ligand-Komplexen zwischen dem scFv/Anticalin-Fusionsprotein und dem  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$ -Chelatkomplex. Die Plasma-Halbwertszeit dieser makromolekularen Komplexe ist aufgrund des großen hydrodynamischen Molekülvolumens von mindestens 880 kDa (für zwei verbrückte T84.66-PAS(400)-CL31d) deutlich höher als für den Komplex aus T84.66-PAS(400)-CL31d und  $^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA}\cdot\text{NH}_2$ , was zur Retention im Plasma führt.

Die einfachste Strategie, eine solche nicht-kovalente Quervernetzung zu verhindern und damit das Tumor/Blut-Verhältnis zu verbessern, wäre zum Zeitpunkt der Injektion des Metallchelate-Komplexes eine geringere Proteinkonzentration ( $< 1$  % ID/g) im Blut sicherzustellen (Cardillo *et al.*, 2004). Das kann zum einen durch einen größeren zeitlichen Abstand zwischen der ersten (Protein) und zweiten (Metallchelate-Komplex) Injektion erreicht werden. Zum anderen könnte der Einsatz eines *Clearing Agents*, das vor dem radioaktiven Hapten injiziert wird – beispielsweise ein hochmolekulares nicht-radioaktives Me·DTPA-Dextran-Konjugat – eine rasche Eliminierung des zirkulierenden T84.66-PAS(400)-CL31d über die Leber bzw. das mononukleäre Phagozytensystem (MPS) bewirken (Yoo *et al.*, 2013). Manche Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass durch den Einsatz eines *Clearing Agents* die absolute Aufnahme des Radioliganden ebenfalls reduziert wird. Zudem nimmt damit die Komplexität des ohnehin bereits multifaktoriellen *Pretargetings* weiter zu, was die experimentelle Feinabstimmung wie auch pharmazeutische Zulassung noch aufwendiger und damit kostenintensiver macht.

Bei der Optimierung des *Pretargeting*-Verfahrens hinsichtlich maximaler Tumoranreicherung und niedrigem Hintergrundsignal muss neben der Kinetik des bispezifischen Proteins und des Haptens die molare Dosis insgesamt sowie das molare Verhältnis beider Agenzien berücksichtigt werden. Bei vergleichbaren anti-CEA *Pretargeting*-Studien mit bispezifischen Antikörpern wurde durch Feinabstimmung dieser Parameter eine maximale Anreicherung im LS-174T Xenograft-Tumor von 10 % ID/g (24 p.i.; di- $^{111}\text{In}$ ·DTPA-TL-Derivat; (van Schaijk *et al.*, 2005), 6 % ID/g (24 p.i.;  $^{177}\text{Lu}$ ·DOTA; (Yazaki *et al.*, 2013) bzw. 4 % ID/g (24 p.i.;  $^{177}\text{Lu}$ ·DOTA-HSG-Derivat; (Frampas *et al.*, 2011) erreicht. Der Umstand, dass dabei eine bis zu 10-fach höhere Proteinkonzentration sowie ein deutlich höheres Protein/Hapten-Verhältnis von 10:1-20:1 – statt des hier verwendeten 2:1-Verhältnisses – eingesetzt wurde, lässt darauf schließen, dass sich die hier beobachtete Tumoranreicherung des  $(^{177}\text{Lu}\cdot\text{DTPA})_2$  von 2,3 % ID/g weiter steigern lassen sollte. Insbesondere im Hinblick auf eine *Pretargeting* anti-CEA Therapie müsste eine Tumor-Inhibitionsstudie zeigen, ob die auf diese Weise im Tu-



mor akkumulierte Aktivität ausreicht, um das Tumorwachstum zu stoppen oder rückgängig zu machen.

#### 4.4 ChromoCaline zur Detektion von Zelloberflächen-Antigenen *in vitro*

Die Grundlage einer erfolgreichen antigenspezifischen Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen ist die quantitative wie auch qualitative Evaluierung relevanter Tumormarker *in vitro*. In der vorliegenden Arbeit wurden ChromoCaline, d.h. chimäre fluoreszierende Antigenbindepoteine bestehend aus dem ED-B-spezifischen Anticalin N7A (Gebauer *et al.*, 2013) und dem Fluoreszenzprotein eGFP (Zhang *et al.*, 1996) konstruiert, und deren Funktionalität anhand verschiedener analytischer Methoden demonstriert.

Beim Vergleich verschiedener Pilotkonstrukte wurde gezeigt, dass bei der rekombinanten Produktion in *E. coli* und Reinigung das Format eGFP-N7A dem Format N7A-eGFP deutlich überlegen ist (Abschnitt 3.4.2). Neben einer 3-fach geringeren Ausbeute wies N7A-eGFP einen erheblichen Anteil (ca. 30 %) an Disulfidisomeren auf. Die Ursache dafür liegt sehr wahrscheinlich in der räumlichen Nähe der C-terminalen Disulfidbindung von N7A (Cys76-Cys175) zum ungepaarten Cys70 des eGFP. Die Fusion beider Proteine mittels eines kurzen Ser<sub>3</sub>Ala-Linkers begünstigte offenbar die Ausbildung falsch verbrückter Cystine. Der Befund der besseren bakteriellen Produktion des ChromoCalins mit dem eGFP an N-terminaler Position steht im Einklang mit der Studie von Casey *et al.* (2000), in der die periplasmatische Produktion von eGFP-scFv in *E. coli* ebenfalls zu einer deutlich höheren Ausbeute als gegenüber scFv-eGFP führte.

Die Produktion der ChromoCaline erfolgte im leicht oxidierenden Milieu des Cytoplasma von *E. coli* Origami B (Prinz *et al.*, 1997). Somit wurde die Ausbildung der strukturellen Disulfidbrücke im Anticalin N7A gewährleistet. Eine periplasmatische Expression der ChromoCaline war aufgrund der in der Literatur beschriebenen Inaktivität von eGFP nach der Translokation über den post-translationalen Sec-Transportweg nicht möglich (Feilmeier *et al.*, 2000). Die massenspektrometrische Analyse der gereinigten ChromoCaline eGFP-N7A und N7A-eGFP bestätigte die erfolgreiche Reifung des intrinsischen Fluorophors durch Zyklisierung und Oxidation des Tripeptids Thr65-Tyr66-Gly67 (Heim *et al.*, 1995) wie auch die Faltung des Anticalins mit seiner Disulfidbrücke.

Im Fall von N7A-eGFP erfolgte während der kotranslationalen Proteinprozessierung nicht wie üblich die Abspaltung des Start-Methionins. Ein Grund dafür ist die enge Substratspezifität der *E. coli*-eigenen Methionin-Aminopeptidase MetAP1, welche kleine Aminosäuren, wie Gly, Ala, Ser, Thr, Cys oder Val, an der P1'-Position nach dem Start-Methionin bevorzugt. Dagegen erfolgt die Met-Abspaltung deutlich ineffizienter oder gar nicht, wenn an P1' größere und/oder geladene Aminosäuren, wie beispielsweise Asp, Glu, Phe, Lys oder Gln lokalisiert sind (Xiao *et al.*, 2010). Im ChromoCalin N7A-eGFP befindet sich an dieser Position ein Gln, im Gegensatz zu einem Ser bei eGFP-N7A. Tatsächlich wurde beim letztgenannten Protein eine effiziente Prozessierung gefunden.

In der Literatur sind bereits verschiedene, ebenfalls in *E. coli* produzierte, antigenspezifische eGFP-Chimäre beschrieben worden, darunter Fusionen mit scFv-Fragmenten (Casey *et al.*, 2000; Hink *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2008; Markiv *et al.*, 2011), mit Affibodies (Affiprobos) (Lyakhov *et al.*, 2010) und mit DARPin (Zahnd *et al.*, 2010). Affibodies und DARPins, die wie Anticaline alternative *Scaffolds* repräsentieren, besitzen keine Disulfidbrücken, so dass die cytoplasmatische Produktion der eGFP-Fusionsproteine unproblematisch ist. Für Fusionsproteine aus scFv und eGFP wurden sowohl periplasmatische als auch cytoplasmatische Produktionsstrategien verfolgt, wobei jedoch meist heterogene Produkte mit unbefriedigendem Reinheitsgrad (90 %), Dimerisierungstendenz und unklarem Isomerenstatus resultierten. Die Produktion von scFv-eGFP Chimären erfolgte ebenso in Säugetier-, Insekten- und Hefezellen, wobei die offenbar vor allem durch das scFv-bedingte inhärente Instabilität besser beherrscht wurde und höhere Ausbeuten erzielt werden konnten (Markiv *et al.*, 2011). Diese Expressionssysteme sind allerdings im Vergleich zur bakteriellen Produktion deutlich zeit- und kostenintensiver.

Die genetische Fusion zweier biologisch aktiver Proteine wie eGFP und N7A erfordert den Einsatz eines *Spacers*, der durch eine möglichst flexible Konformation einen ausreichenden Abstand zwischen den Proteinen sicherstellt (Cao *et al.*, 2008). Dadurch kann eine gegenseitige strukturelle wie auch funktionelle Beeinträchtigung der Proteine, welche im ungünstigsten Fall zur Proteinaggregation und zum Funktionsverlust führt, vermieden werden. Hink *et al.* (2000) zeigten an einem funktionalen scFv-eGFP Fusionsprotein mit Hilfe von zeitaufgelöster Fluoreszenzanisotropie, dass bereits ein Hexapeptid ausreicht, um den beiden Domänen unabhängige Rotationsfreiheitsgrade zu verleihen. Dieser Ansatz wurde bereits in den oben erwähnten Pilotversuchen mit eGFP-N7A und N7A-eGFP durch Verwendung eines Ser<sub>3</sub>Ala-Linkers aufgegriffen.

Basierend auf diesen ersten Vorversuchen wurde das ChromoCalin eGFP-N7A statt des Peptids Ser<sub>3</sub>Ala mit einem PAS(200)-Polymer als langen Linker-Polypeptid (Schlupschy *et al.*, 2013) zwischen eGFP und dem Anticalin ausgestattet. Der Einsatz dieses deutlich längeren strukturell ungeordneten *Spacers* erwies sich als sehr vorteilhaft. Neben einer Steigerung der Ausbeute um den Faktor 3 war die in SPR-Analysen ermittelte Dissoziationskonstante von eGFP-PAS(200)-N7A für das rekombinante Fn7B8 im Vergleich zu eGFP-N7A 2,5-fach niedriger. Die schnelle Assoziation von N7A an Fn7B8 wird hauptsächlich durch elektrostatische Wechselwirkungen bedingt, was auf der gegensätzlichen Netto-Oberflächenladung ( $pI^{N7A} = 9,01$ ;  $pI^{Fn7B8} = 4,4$ ) ihrer Kontaktflächen beruht (Gebauer *et al.*, 2013). eGFP ( $pI = 5,75$ ) weist ein ähnlich negatives Potential wie Fn7B8 auf. Es ist somit möglich, dass eGFP in enger räumlicher Nähe die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen N7A und Fn7B8 beeinträchtigt. In der Tat ist die Assoziationsrate von eGFP-N7A im Vergleich zum unfusionierten Anticalin N7A um den Faktor 10 verlangsamt, wohingegen die Dissoziationsrate unbeeinflusst ist. Der konformationell ungeordnete PAS(200)-Linker erhöht dagegen die räumliche Distanz zwischen eGFP und N7A, was sich positiv auf die Assoziationskinetik zwischen Fn7B8 und eGFP-PAS(200)-N7A auswirkt, welche im Vergleich zum unfusionierten N7A nur um den Faktor 4 reduziert ist.

Das Anwendungspotential von antigenspezifischen eGFP-Chimären ist groß. eGFP gilt als sensitives spektroskopisches Reporterprotein unter anderem zur Visualisierung von zellulären Strukturen und Prozessen in lebenden Geweben und Organismen in Echtzeit, für die Untersuchung von Genexpression und Protein-Protein-Interaktion sowie zur Quantifizierung von physiologischen Prozessen (Chudakov *et al.*, 2010). Die eGFP-Fluoreszenz ist dabei relativ unabhängig von externen Faktoren. Tatsächlich zeigten sich die Fluoreszenzeigenschaften des eGFP (Kremers *et al.*, 2011) in den ChromoCalinen eGFP-N7A und eGFP-PAS(200)-N7A unbeeinflusst vom Fusionspartner bzw. Peptidlinker. Die im Vergleich zu Fluoreszenzfarbstoffen wie Fluorescein hohe Photostabilität verdankt eGFP seiner  $\beta$ -Barrel Gerüststruktur, in der das Chromophor eingebettet liegt und somit vor Umgebungseinflüssen geschützt ist (Chudakov *et al.*, 2010).

Die beiden ChromoCaline eGFP-N7A und eGFP-PAS(200)-N7A wurden zur Detektion und Visualisierung von ED-B-positivem Fn *in vitro* eingesetzt. Neben der antigenspezifischen Bindung von rekombinantem Fn7B8 im FLISA wurde die Färbung der ED-positiven Fn-Spleissvariante in der ECM von adhärent wachsenden Tumorzellen demonstriert. Dabei zeigten ED-B-exprimierende Caco-2 Zellen eine sehr ähnliche Fluoreszenzfärbung wie zuvor mit Hilfe des Anticalins N7A und einem konventionellen Primär-/Sekundär-Antikörperpaar beobachtet worden war (Gebauer *et al.*, 2013). Mit PASyliertem ChromoCalin inkubierte Zellen erschienen im Vergleich zu eGFP-N7A optisch intensiver gefärbt. Das könnte einerseits auf die höhere Bindungsaktivität von eGFP-PAS(200)-N7A für das ED-B-Antigen zurückgeführt werden; andererseits erleichtert der flexible PAS(200)-Linker möglicherweise ein tieferes Eindringen des ChromoCalins in die ECM.

Ein entscheidender Anwendungsvorteil von ChromoCalinen ist die Möglichkeit der schnellen Änderung der Antigenpezifität aufgrund der unidirektionalen *Bst*XI-Schnittstellen im Expressionskonstrukt (Gebauer & Skerra, 2012). So wurde bereits ein ChromoCalin mit Spezifität für den *Vascular Epithelial Growth Factor Receptor-3* (VEGFR-3) – ein weiterer diagnostischer Marker der Tumorvaskularisierung – produziert und erfolgreich zum Antigennachweis mittels Durchflusszytofluorimetrie auf lebenden Zellen verwendet (Eggenstein, Richter und Skerra, unveröffentlicht). In diesem Zusammenhang ist auch denkbar ChromoCaline zur *in vitro* Selektion antigenexprimierender Zellpopulationen (*Fluorescence-activated Cell Sorting*; FACS) einzusetzen.

Potentielle Anwendungen *in vivo* ergeben sich für diesen neuartigen Typ von Anticalin-Fusionsproteinen durch Einsatz eines im Infrarotbereich fluoreszierenden GFP-Homologon nicht nur bei präklinischen Studien in Kleintiermodellen, sondern auch bei der intraoperativen Bildgebung.



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von vier Anwendungen untersucht, inwieweit sich Anticaline zur Konstruktion von bifunktionellen Fusionsproteinen für die Diagnostik von Tumoren eignen.

In der ersten Anwendung wurden Anticaline zur Erkennung des Metallchelate-Komplexes Me-DTPA-CHX-A" untersucht und optimiert, welche bereits früher in diesem Labor aus einer Lcn2-Bibliothek selektiert und affinitätsmaturiert worden waren: C26 sowie L1 und CL31, die aus dessen Affinitätsmaturierung durch kombinatorisches *Protein Engineering* hervorgegangen waren. Zwar zeigten die Anticaline L1 und CL31 in der SPR-Analyse keine Verbesserung der Bindungsaktivität zum Konjugat Y-DTPA-RNase, jedoch resultierte aus der Affinitätsmaturierung eine zweifache bzw. vierfache Verlangsamung der Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes von  $\tau_{1/2}^{\infty} = 37$  min (C26) auf  $\tau_{1/2}^{\infty} = 78$  min (L1) bzw.  $\tau_{1/2}^{\infty} = 138$  min (CL31). Die für die Erhöhung der kinetischen Komplexstabilität relevanten Aminosäurepositionen wurden im Zuge einer Kristallstrukturanalyse von C26 und CL31 (Pos. im Loop #1: 43, 44, 46, 47, 50, und 51) wie auch durch eine Mutagenesestudie an L1 mit anschließender SPR-Analyse eingegrenzt (Pos. 65, 99 und 107). Darüber hinaus wurde mittels strukturbasierter Mutagenese die im Vergleich zu C26 ( $T_m = 69,9$  °C) und L1 ( $T_m = 67,7$  °C) deutlich niedrigere Schmelztemperatur von CL31 ( $T_m = 59,1$  °C) durch die neu eingeführten Substitutionen S86G/P87S auf 65,4 °C erhöht. Durch die weiter eingeführten Mutationen M44E und A145T – woraus die Anticalin-Variante CL31d resultierte – gelang eine zusätzliche Stabilisierung des Proteins. Bestrebungen, durch systematische Mutationsanalyse die Affinität einer CL31d-Variante zu erhöhen, blieben ohne Erfolg, lieferten aber wertvolle Informationen über die Rolle einzelner Aminosäuren bei der Ligandenbindung und zeigten die Bedeutung des Loops #1 als eine die Bindungstasche verschließendes Strukturelement.

In der zweiten Anwendung wurde ein sog. Duocalin konstruiert, eine genetische Fusion aus dem Anticalin CL31 und dem ED-B-bindenden Anticalin N7A. Die als Linker eingesetzten PAS-Polypeptide (PAS60, PAS100) führten zu einer bis zu 2,5-fach höheren Ausbeute des im Periplasma von *E. coli* produzierten Proteins und verminderten deutlich die Bildung von Disulfidisomeren. Mittels *Sandwich-ELISA* wurde nachgewiesen, dass die generierten Duocaline beide Liganden gleichzeitig komplexieren können. Dabei erwies sich die PASylierung insbesondere für die Bindung von Fn7B8 als vorteilhaft, was sich in einem bis zu zweifach niedrigeren  $K_D$ -Wert widerspiegelte. Da die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Bindeproteins seine Fähigkeit zur Tumoranreicherung beeinflussen, wurden zudem Duocaline mit längeren PAS-Linkern (200-, 400-, 600-Reste) hergestellt. Diese wurden im Cytoplasma von *E. coli* Origami B ( $\Delta trxB/\Delta gor$ ) mit nochmals verbesserter Ausbeute produziert. Mit zunehmender Länge des PAS-Linkers wurde aufgrund des vergrößerten hydrodynamischen Volumens die Plasma-Halbwertszeit in der Maus von 24 min (N7A.19-CL31d) auf 6 h (N7A.19-PAS(600)-CL31d) verlängert. Mit Hilfe des Duocalins N7A.19-CL31d gelang es, eine Dissoziationskonstante für die Erkennung von ED-B-positivem Fibronectin auf Zellen für das Anticalin N7A zu bestimmen ( $K_D$

= 70 nM). Aufgrund ihres bispezifischen Bindungsverhaltens und der durch PASylierung justierbaren Pharmakokinetik zeigen diese Duocaline gute Voraussetzungen für die Radiodiagnostik/-therapie *in vivo*.

Eine weitere Anwendung bot die Fusion des CEA-bindenden scFv T84.66 mit dem Anticalin CL31. Für das im Periplasma von *E. coli* produzierte, gereinigte Fusionsprotein wurde der Erhalt der Bindungsaktivität für seine Liganden (CEA, Me-DTPA-RNase) mittels Durchflusszytometrie und SPR-Analyse demonstriert. Zudem lieferte ein *in vitro* *Pretargeting*-Experiment auf CEA-positiven Zellen den Nachweis, dass eine simultane Erkennung der Liganden möglich ist. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von T84.66-CL31d ( $t_{1/2}^{\beta} = 0,43$  h;  $CL = 116$  mL h<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>) konnten durch Insertion eines 200 bzw. 400 Aminosäure umfassenden PAS-Linkers moduliert werden. So nahm die Plasma-Halbwertszeit um das 17-fache (T84.66-PAS(200)-CL31d) bzw. 29-fache (T84.66-PAS(400)-CL31d) zu. Aus der kombinierten PET- und Biodistributionsstudie ging T84.66-PAS(400)-CL31d als vielversprechendster Kandidat für *in vivo* *Pretargeting*-Experimente hervor, da es nach 48 h die höchste Tumorakkumulation (3,7 % ID/g) und das beste Tumor/Organ-Verhältnis bei moderatem Tumor/Blut-Verhältnis aufwies. Schließlich wurde sowohl mit <sup>177</sup>Lu-DTPA-NH<sub>2</sub> als auch mit dessen divalentem Derivat (<sup>177</sup>Lu-DTPA)<sub>2</sub> demonstriert, dass das *Pretargeting* von CEA-Xenograft-Tumoren in Mäusen mit diesem scFv/Anticalin-Fusionsprotein möglich ist.

Schließlich wurde das Anticalin N7A zusammen mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) zur Konstruktion sog. ChromoCaline als neuartiger Reagenzientyp für die fluoreszenzbasierte Zelldiagnostik eingesetzt. Durch deren gentechnische Herstellung im Cytoplasma von *E. coli* Origami B wurde sowohl die Ausbildung der Disulfidbrücke im Anticalin als auch die oxidative Zyklisierung des Fluorophors in eGFP gewährleistet. Weiterhin erwiesen sich die ChromoCaline mit N-terminalem eGFP denen mit C-terminalem eGFP hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften (keine Faltungsisomere, höhere Ausbeute, Abspaltung des Start-Met während der Proteinprozessierung) überlegen. Ein PAS(200)-Linker zwischen eGFP und N7A führte im Vergleich zum kurzen Ser<sub>3</sub>Ala-Linker zu einer dreifach gesteigerten Ausbeute (7,5 mg pro 2 L Kulturvolumen) und einer 2,5-fach besseren Ligandenaffinität. Der für eGFP-PAS(200)-N7A mittels SPR-Analyse bestimmte K<sub>D</sub>-Wert für das Zielmolekül Fn7B8 betrug 21 nM und war damit wenig schlechter als die des unfusionierten Anticalins N7A (K<sub>D</sub> = 5,8 nM). Darüber hinaus wurde die Eignung dieses ED-B-spezifischen ChromoCalins sowohl für fluoreszenzbasierten ELISA (FLISA) als auch für die Detektion von ED-B-positivem Fibronectin auf Tumorzellen durch Immunfluoreszenzmikroskopie demonstriert.

Insgesamt wurde gezeigt, dass Anticalin-Fusionsproteine aufgrund ihrer einfachen Produzierbarkeit sowie Robustheit und Funktionalität eine hervorragende Alternative zu antikörperbasierten Bindeproteinen für die gerichtete Tumordiagnostik bieten. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind nicht nur im Zusammenhang mit der Entwicklung potenter Proteinreagenzien für das *Pretargeting*-Konzept in der Nuklearmedizin bedeutend, sondern sie leisten zudem einen wichtigen Beitrag zur Evaluierung der Anticalin-Technologie in Tiermodellen hinsichtlich klinischer Anwendbarkeit.

**6 Abkürzungen und Symbole**

$A_x$	Absorption bei x nm
aTc	Anhydrotetracyclin
<i>bla</i>	Gen für die $\beta$ -Lactamase
bp	<i>Base Pair</i>
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
CD	Circulardichroismus
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
$E_x$	Extinktion bei x nm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FLISA	<i>Fluorescence-linked Immunosorbent Assay</i>
$\epsilon_x$	Extinktionskoeffizient bei x nm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
$K_D$	Komplexdissoziationskonstante
Lcn2	Lipocalin 2
OD <sub>550</sub>	Optische Dichte bei 550 nm
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
p.i.	<i>Post Injection</i>
$\Theta$	Elliptizität
RNase	Ribonuklease A
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
RT	Raumtemperatur
SA-Chromatographie	Streptavidinaffinitäts-Chromatographie

scFv	Verknüpfte variablen Domänen der leichten und schweren Kette eines Ig
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	<i>Volume per Volume</i>
w/v	<i>Weight per Volume</i>



## 7 Literatur

- Akamatsu, Y., Murphy, J.C., Nolan, K.F., Thomas, P., Kreitman, R.J., Leung, S.O. & Junghans, R.P. (1998) A single-chain immunotoxin against carcinoembryonic antigen that suppresses growth of colorectal carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 4, 2825-2832.
- Åkerström, B., N. Borregaard, N., Flower, D.A. & Salier, J.-S. (2006) *Lipocalins*, Landes Bioscience, Georgetown, Texas.
- 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.
- Alford, R., Ogawa, M., Choyke, P.L. & Kobayashi, H. (2009) Molecular probes for the *in vivo* imaging of cancer. *Mol Biosyst* 5, 1279-1291.
- Amartey, J.K., Esguerra, C., Al-Otaibi, B., Al-Jammaz, I., Al-Qahtani, M. & Parhar, R.S. (2005) Prosthetic radioiodination of interleukin-8 ( $[(^{123}/^{131})\text{I}]\text{-IL-8}$ ): biological behavior in a mouse infection model. *Appl Radiat Isot* 62, 39-47.
- Arndt, K.M., Müller, K.M. & Plückthun, A. (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry* 37, 12918-12926.
- Astrof, S. & Hynes, R.O. (2009) Fibronectins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12, 165-175.
- Bachmann, B.J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol Rev* 54, 130-197.
- Banerjee, S.R. & Pomper, M.G. (2013) Clinical applications of Gallium-68. *Appl Radiat Isot* 76, 2-13.
- Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, J.P., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P., Leccia, F., Corcuff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P. & Chatal, J.F. (1998) Radioimmunodetection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J Nucl Med* 39, 1172-1178.
- Baslé, E., Joubert, N. & Pucheault, M. (2010) Protein chemical modification on endogenous amino acids. *Chem Biol* 17, 213-227.
- Beauchemin, N., Benchimol, S., Cournoyer, D., Fuks, A. & Stanners, C.P. (1987) Isolation and characterization of full-length functional cDNA clones for human carcinoembryonic antigen. *Mol Cell Biol* 7, 3221-3230.
- Beauchemin, N., Draber, P., Dveksler, G., Gold, P., Gray-Owen, S., Grunert, F., Hammarstrom, S., Holmes, K.V., Karlsson, A., Kuroki, M., Lin, S.H., Lucka, L., Najjar, S.M., Neumaier, M., Obrink, B., Shively, J.E., Skubitz, K.M., Stanners, C.P., Thomas, P., Thompson, J.A., Virji, M., von Kleist, S., Wagener, C., Watt, S. & Zimmermann, W. (1999) Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp Cell Res* 252, 243-249.

- Belhocine, T., Spaepen, K., Dusart, M., Castaigne, C., Muylle, K., Bourgeois, P., Bourgeois, D., Dierickx, L. & Flamen, P. (2006)  $^{18}\text{F}$ FDG PET in oncology: the best and the worst. *Int J Oncol* **28**, 1249-1261.
- Bergers, G. & Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401-410.
- 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. (2012) Half-life extension of therapeutic proteins via genetic fusion to recombinant PEG mimetics. *Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate their Plasma Half-lives*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Binder, U. & Skerra, A. (2015) Current Strategies for Pharmacokinetic Optimization. *Biobetters: Protein Engineering to Approach the Curative*. Springer-Verlag, New York.
- Birchler, M., Viti, F., Zardi, L., Spiess, B. & Neri, D. (1999) Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment. *Nat Biotechnol* **17**, 984-988.
- Birchler, M.T., Milisavljevic, D., Pfaltz, M., Neri, D., Odermatt, B., Schmid, S. & Stoeckli, S.J. (2003) Expression of the extra domain B of fibronectin, a marker of angiogenesis, in head and neck tumors. *Laryngoscope* **113**, 1231-1237.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* **136**, 175-179.
- Boehm, M.K., Mayans, M.O., Thornton, J.D., Begent, R.H., Keep, P.A. & Perkins, S.J. (1996) Extended glycoprotein structure of the seven domains in human carcinoembryonic antigen by X-ray and neutron solution scattering and an automated curve fitting procedure: implications for cellular adhesion. *J Mol Biol* **259**, 718-736.
- Boehm, M.K. & Perkins, S.J. (2000) Structural models for carcinoembryonic antigen and its complex with the single-chain Fv antibody molecule MFE23. *FEBS Lett* **475**, 11-16.
- Boerman, O.C., Kranenborg, M.H., Oosterwijk, E., Griffiths, G.L., McBride, W.J., Oyen, W.J., de Weijert, M., Oosterwijk-Wakka, J., Hansen, H.J. & Corstens, F.H. (1999) Pretargeting of renal cell carcinoma: improved tumor targeting with a bivalent chelate. *Cancer Res* **59**, 4400-4405.

- Bolze, F., Morath, V., Bast, A., Rink, N., Schlapschy, M., Mocek, S., Skerra, A. & Klingenspor, M. (2016) Long-acting PASylated leptin ameliorates obesity by promoting satiety and preventing hypometabolism in leptin-deficient Lep(ob/ob) mice. *Endocrinology* 157, 233-244.
- Bornscheuer, U. & Kazlauskas, R.J. (2011) Survey of protein engineering strategies. *Curr Protoc Protein Sci* 66, 1-14.
- Borregaard, N. & Cowland, J.B. (2006) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. *Biometals* 19, 211-215.
- Brechbiel, M.W. (2008) Bifunctional chelates for metal nuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 52, 166-173.
- Breustedt, D.A., Schönfeld, D.L. & Skerra, A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim Biophys Acta* 1764, 161-173.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transformation recA *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *BioTechniques* 5, 376-378.
- Buss, N.A., Henderson, S.J., McFarlane, M., Shenton, J.M. & de Haan, L. (2012) Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol* 12, 615-622.
- Cai, W., Olafsen, T., Zhang, X., Cao, Q., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Wu, A.M. & Chen, X. (2007) PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an  $^{18}\text{F}$ -labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *J Nucl Med* 48, 304-310.
- Camacho-Leal, P., Zhai, A.B. & Stanners, C.P. (2007) A co-clustering model involving  $\alpha 5 \beta 1$  integrin for the biological effects of GPI-anchored human carcinoembryonic antigen (CEA). *J Cell Physiol* 211, 791-802.
- Cao, M., Cao, P., Yan, H., Ren, F., Lu, W., Hu, Y. & Zhang, S. (2008) Construction and characterization of an enhanced GFP-tagged anti-BAFF scFv antibody. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 423-431.
- Cardillo, T.M., Karacay, H., Goldenberg, D.M., Yeldell, D., Chang, C.H., Modrak, D.E., Sharkey, R.M. & Gold, D.V. (2004) Improved targeting of pancreatic cancer: experimental studies of a new bispecific antibody, pretargeting enhancement system for immunoscintigraphy. *Clin Cancer Res* 10, 3552-3561.
- Carter, P.J. (2011) Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Exp Cell Res* 317, 1261-1269.
- Casey, J.L., Coley, A.M., Tilley, L.M. & Foley, M. (2000) Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools. *Protein Eng* 13, 445-452.

- Castellani, P., Borsi, L., Carnemolla, B., Biro, A., Dorcaratto, A., Viale, G.L., Neri, D. & Zardi, L. (2002) Differentiation between high- and low-grade astrocytoma using a human recombinant antibody to the extra domain-B of fibronectin. *Am J Pathol* 161, 1695-1700.
- 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.
- Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S. & Batra, S.K. (2012) The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826, 129-169.
- Chatal, J.F., Campion, L., Kraeber-Bodère, F., Bardet, S., Vuillez, J.P., Charbonnel, B., Rohmer, V., Chang, C.H., Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M. & Barbet, J. (2006) Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: a collaborative study with the french endocrine tumor group. *J Clin Oncol* 24, 1705-1711.
- Cheng, Y. & Prusoff, W.H. (1973) Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22, 3099-3108.
- Chu, S.T., Lin, H.J., Huang, H.L. & Chen, Y.H. (1998) The hydrophobic pocket of 24p3 protein from mouse uterine luminal fluid: fatty acid and retinol binding activity and predicted structural similarity to lipocalins. *J Pept Res* 52, 390-397.
- Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K.A. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 90, 1103-1163.
- Coles, M., Diercks, T., Muehlenweg, B., Bartsch, S., Zolzer, V., Tschesche, H. & Kessler, H. (1999) The solution structure and dynamics of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Mol Biol* 289, 139-157.
- Condeelis, J. & Weissleder, R. (2010) *In vivo* imaging in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003848.
- Corneillie, T.M., Whetstone, P.A., Fisher, A.J. & Mearns, C.F. (2003) A rare earth-DOTA-binding antibody: probe properties and binding affinity across the lanthanide series. *J Am Chem Soc* 125, 3436-3437.
- Corneillie, T.M., Whetstone, P.A. & Mearns, C.F. (2006) Irreversibly binding anti-metal chelate antibodies: artificial receptors for pretargeting. *J Inorg Biochem* 100, 882-890.
- Cowland, J.B. & Borregaard, N. (1997) Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 45, 17-23.

- Dammeyer, T. & Tinnefeld, P. (2012) Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. *Comput Struct Biotechnol J* 3, e201210013.
- Deri, M.A., Zeglis, B.M., Francesconi, L.C. & Lewis, J.S. (2013) PET imaging with  $^{89}\text{Zr}$ : from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol* 40, 3-14.
- Devireddy, L.R., Teodoro, J.G., Richard, F.A. & Green, M.R. (2001) Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* 293, 829-834.
- DiPiro, J.T. (2010) *Concepts in clinical pharmacokinetics*, American Society of Health-System Pharmacists, Bethesda.
- Dougherty, D.A. (1996) Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 271, 163-168.
- Eades-Perner, A.M., van der Putten, H., Hirth, A., Thompson, J., Neumaier, M., von Kleist, S. & Zimmermann, W. (1994) Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. *Cancer Res* 54, 4169-4176.
- Eary, J.F. & Brenner, W. (2007) *Nuclear medicine therapy*, Informa Healthcare, New York.
- 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.
- Eidelman, F.J., Fuks, A., DeMarte, L., Taheri, M. & Stanners, C.P. (1993) Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. *J Cell Biol* 123, 467-475.
- El Emir, E., Qureshi, U., Dearling, J.L., Boxer, G.M., Clatworthy, I., Folarin, A.A., Robson, M.P., Nagl, S., Konerding, M.A. & Pedley, R.B. (2007) Predicting response to radioimmunotherapy from the tumor microenvironment of colorectal carcinomas. *Cancer Res* 67, 11896-11905.
- Elvin, J.G., Couston, R.G. & van der Walle, C.F. (2013) Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int J Pharm* 440, 83-98.
- Engering, A., Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demarex, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C.G., Piguët, V. & van Kooyk, Y. (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168, 2118-2126.
- Erba, P.A., Sollini, M., Orciuolo, E., Traino, C., Petrini, M., Paganelli, G., Bombardieri, E., Grana, C., Giovannoni, L., Neri, D., Menssen, H.D. & Mariani, G. (2012) Radioimmunotherapy with radretumab in patients with relapsed hematologic malignancies. *J Nucl Med* 53, 922-927.
- Erickson, H.P. (2002) Stretching fibronectin. *J Muscle Res Cell Motil* 23, 575-580.
- Ersahin, D., Doddamane, I. & Cheng, D. (2011) Targeted radionuclide therapy. *Cancers* 3, 3838-3855.

- Eyer, F. & Hruska, K. (2012) Single-domain antibody fragments derived from heavy-chain antibodies: a review. *J Vet Med* 57, 439-513.
- Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. (2011) The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 136-151.
- Fattorusso, R., Pellecchia, M., Viti, F., Neri, P., Neri, D. & Wuthrich, K. (1999) NMR structure of the human oncofoetal fibronectin ED-B domain, a specific marker for angiogenesis. *Structure* 7, 381-390.
- Feilmeier, B.J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H. & Phillips, G.J. (2000) Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182, 4068-4076.
- Ffrench-Constant, C. (1995) Alternative splicing of fibronectin – many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res* 221, 261-271.
- Fichna, J. & Janecka, A. (2003) Synthesis of target-specific radiolabeled peptides for diagnostic imaging. *Bioconjug Chem* 14, 3-17.
- 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. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318 (Pt 1), 1-14.
- Fogh, J., Fogh, J.M. & Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.
- Forster, G.J., Santos, E.B., Smith-Jones, P.M., Zanzonico, P. & Larson, S.M. (2006) Pretargeted radioimmunotherapy with a single-chain antibody/streptavidin construct and radiolabeled DOTA-biotin: strategies for reduction of the renal dose. *J Nucl Med* 47, 140-149.
- Fraker, P.J. & Speck, J.C., Jr. (1978) Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3  $\alpha$ , 6  $\alpha$ -diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80, 849-857.
- Frapas, E., Maurel, C., Remaud-Le Saëc, P., Mauxion, T., Faivre-Chauvet, A., Davodeau, F., Goldenberg, D.M., Bardiès, M. & Barbet, J. (2011) Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38, 2153-2164.
- Frapas, E., Rousseau, C., Bodet-Milin, C., Barbet, J., Chatal, J.F. & Kraeber-Bodère, F. (2013) Improvement of radioimmunotherapy using pretargeting. *Front Oncol* 3, 1-8.
- 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, T., Yoshida, N., Kataoka, Y., Manabe, R., Mizuno-Horikawa, Y., Sato, M., Kuriyama, K., Yasui, N. & Sekiguchi, K. (2002) Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly *in vitro*. *Cancer Res* 62, 5603-5610.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784-3788.
- 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*, The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press.
- Gautherot, E., Bouhou, J., Le Doussal, J.M., Manetti, C., Martin, M., Rouvier, E. & Barbet, J. (1997) Therapy for colon carcinoma xenografts with bispecific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten. *Cancer* 80, 2618-2623.
- Gebauer, M. (2013) Kombinatorisches Design und funktionelle Charakterisierung von Anticalinen gegen die Extra-Domäne B in onkofetalem Fibronectin. Dissertation. Technische Universität München.
- 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. (2009) Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13, 245-255.
- Gebauer, M. & Skerra, A. (2012) Anticalins: small engineered binding proteins based on the lipocalin scaffold. *Methods Enzymol* 503, 157-188.
- Gerber, H.P., Senter, P.D. & Grewal, I.S. (2009) Antibody drug-conjugates targeting the tumor vasculature: current and future developments. *MAbs* 1, 247-253.
- Gestin, J.F., Loussouarn, A., Bardiès, M., Gautherot, E., Gruaz-Guyon, A., Saï-Maurel, C., Barbet, J., Curtet, C., Chatal, J.F. & Faivre-Chauvet, A. (2001) Two-step targeting of xenografted colon carcinoma using a bispecific antibody and <sup>188</sup>Re-labeled bivalent hapten: biodistribution and dosimetry studies. *J Nucl Med* 42, 146-153.
- Geyer, C.R., McCafferty, J., Dubel, S., Bradbury, A.R. & Sidhu, S.S. (2012) Recombinant antibodies and *in vitro* selection technologies. *Methods Mol Biol* 901, 11-32.
- Gibson, T.J. (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. PhD thesis. University of Cambridge, UK.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319-326.

- 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.
- Goetz, D.H., Willie, S.T., Armen, R.S., Bratt, T., Borregaard, N. & Strong, R.K. (2000) Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry* 39, 1935-1941.
- Gold, P. & Freedman, S.O. (1965a) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 121, 439-462.
- Gold, P. & Freedman, S.O. (1965b) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122, 467-481.
- Goldenberg, D.M., Chang, C.H., Rossi, E.A., McBride, W.J. & Sharkey, R.M. (2012) Pretargeted molecular imaging and radioimmunotherapy. *Theranostics* 2, 523-540.
- Goldenberg, D.M., Chang, C.H., Sharkey, R.M., Rossi, E.A., Karacay, H., McBride, W., Hansen, H.J., Chatal, J.F. & Barbet, J. (2003) Radioimmunotherapy: is avidin-biotin pretargeting the preferred choice among pretargeting methods? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30, 777-780.
- Goldenberg, D.M., Chatal, J.F., Barbet, J., Boerman, O. & Sharkey, R.M. (2007) Cancer imaging and therapy with bispecific antibody pretargeting. *Update Cancer Ther* 2, 19-31.
- Goldenberg, D.M., DeLand, F., Kim, E., Bennett, S., Primus, F.J., van Nagell, J.R., Jr., Estes, N., DeSimone, P. & Rayburn, P. (1978) Use of radiolabeled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning. *N Engl J Med* 298, 1384-1396.
- Goldenberg, D.M., Sharkey, R.M., Paganelli, G., Barbet, J. & Chatal, J.F. (2006) Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy. *J Clin Oncol* 24, 823-834.
- Goodwin, D.A., Meares, C.F., Watanabe, N., McTigue, M., Chaovapong, W., Ransone, C.M., Renn, O., Greiner, D.P., Kukis, D.L. & Kronenberger, S.I. (1994) Pharmacokinetics of pretargeted monoclonal antibody 2D12.5 and <sup>88</sup>Y-Janus-2-(p-nitrobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecanetetraacetic acid (DOTA) in BALB/c mice with KHJJ mouse adenocarcinoma: a model for <sup>90</sup>Y radioimmunotherapy. *Cancer Res* 54, 5937-5946.
- Goswami, S., Wang, W., Arakawa, T. & Ohtake, S. (2013) Developments and challenges for mAb-based therapeutics. *Antibodies* 2, 452-500.
- Hammarström, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol* 9, 67-81.



- Hanahan, D. & Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Harari, D., Kuhn, N., Abramovich, R., Sasson, K., Zozulya, A.L., Smith, P., Schlapschy, M., Aharoni, R., Köster, M., Eilam, R., Skerra, A. & Schreiber, G. (2014) Enhanced *in vivo* efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis. *J Biol Chem* 289, 29014-29029.
- He, X.M. & Carter, D.C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 358, 209-215.
- Hefta, L.J., Neumaier, M. & Shively, J.E. (1998) Kinetic and affinity constants of epitope specific anti-carcinoembryonic antigen (CEA) monoclonal antibodies for CEA and engineered CEA domain constructs. *Immunotechnology* 4, 49-57.
- Hefta, S.A., Hefta, L.J., Lee, T.D., Paxton, R.J. & Shively, J.E. (1988) Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4648-4652.
- Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664.
- Hermanson, G.T. (2008) *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, UK.
- Heumann, D. & Roger, T. (2002) Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 323, 59-72.
- Hink, M.A., Griep, R.A., Borst, J.W., van Hoek, A., Eppink, M.H., Schots, A. & Visser, A.J. (2000) Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *J Biol Chem* 275, 17556-17560.
- Hnatowich, D.J. (1994) The *in vivo* uses of streptavidin and biotin: a short progress report. *Nucl Med Commun* 15, 575-577.
- Hnatowich, D.J., Virzi, F. & Rusckowski, M. (1987) Investigations of avidin and biotin for imaging applications. *J Nucl Med* 28, 1294-1302.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T. & De Bruijn, E.A. (2004) Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56, 549-580.
- Hohenester, E. & Engel, J. (2002) Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 21, 115-128.
- Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6444-6448.
- Hong, H., Sun, J. & Cai, W. (2008) Radionuclide-based cancer imaging targeting the carcinoembryonic antigen. *Biomark Insights* 3, 435-451.

- Hricak, H. (2007) *Advancing Nuclear Medicine through Innovation*, The National Academies Press, Washington, D.C.
- Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L.E., Wong, J.Y., Shively, J.E. & Wu, A.M. (1996) Minibody: a novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-C<sub>H</sub>3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res* **56**, 3055-3061.
- Huang, C., Zhan, T., Liu, Y., Li, Q., Wu, H., Ji, D. & Li, Y. (2015) Glycomic profiling of carcinoembryonic antigen isolated from human tumor tissue. *Clin Proteomics* **12**, 1-17.
- Huang, M., Shen, A., Ding, J. & Geng, M. (2014) Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. *Trends Pharmacol Sci* **35**, 41-50.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M. & Ullrich, A. (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* **9**, 1165-1172.
- Hvidberg, V., Jacobsen, C., Strong, R.K., Cowland, J.B., Moestrup, S.K. & Borregaard, N. (2005) The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett* **579**, 773-777.
- Hynes, R.O. (1990) *Fibronectins*, Springer-Verlag, New York.
- Ilanzis, C., DeMarte, L., Sreaton, R.A. & Stanners, C.P. (2002) Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia* **4**, 151-163.
- Jacobson, O., Kiesewetter, D.O. & Chen, X. (2015) Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem* **26**, 1-18.
- Jamous, M., Haberkorn, U. & Mier, W. (2013) Synthesis of peptide radiopharmaceuticals for the therapy and diagnosis of tumor diseases. *Molecules* **18**, 3379-3409.
- Jarasch, A., Kopp, M., Eggenstein, E., Richter, A., Gebauer, M. & Skerra, A. (2016) ANTICALIgN: visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering. *Protein Eng Des Sel* **29**, 263-270.
- Järveläinen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N. & Penttinen, R. (2009) Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* **61**, 198-223.
- Jean, F., Malapert, P., Rougon, G. & Barbet, J. (1988) Cell membrane, but not circulating, carcinoembryonic antigen is linked to a phosphatidylinositol-containing hydrophobic domain. *Biochem Biophys Res Commun* **155**, 794-800.

- Jia, F., Shelton, T.D. & Lewis, M.R. (2007) Preparation, characterization, and biological evaluation of a streptavidin-chimeric T84.66 conjugate for antibody pretargeting. *Cancer Biother Radiopharm* **22**, 654-664.
- Jitrapakdee, S. & Wallace, J.C. (2003) The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Pept Sci* **4**, 217-229.
- 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.
- Jothy, S., Yuan, S.Y. & Shirota, K. (1993) Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. *In situ* hybridization study and implication for a new *in vivo* functional model. *Am J Pathol* **143**, 250-247.
- Judenhofer, M.S., Wiehr, S., Kukuk, D., Fischer, K. & Pichler, B. (2011) Guidelines for nuclear image analysis. *Small Animal Imaging*. Springer-Verlag Berlin.
- Kaczmarek, J., Castellani, P., Nicolo, G., Spina, B., Allemanni, G. & Zardi, L. (1994) Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* **59**, 11-16.
- Karlsson, R., Michaelsson, A. & Mattsson, L. (1991) Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* **145**, 229-240.
- Kaspar, M., Zardi, L. & Neri, D. (2006) Fibronectin as target for tumor therapy. *Int J Cancer* **118**, 1331-1339.
- Katsamba, P.S., Navratilova, I., Calderon-Cacia, M., Fan, L., Thornton, K., Zhu, M., Bos, T.V., Forte, C., Friend, D., Laird-Offringa, I., Tavares, G., Whatley, J., Shi, E., Widom, A., Lindquist, K.C., Klakamp, S., Drake, A., Bohmann, D., Roell, M., Rose, L., Dorocke, J., Roth, B., Luginbühl, B. & Myszka, D.G. (2006) Kinetic analysis of a high-affinity antibody/antigen interaction performed by multiple Biacore users. *Anal Biochem* **352**, 208-221.
- Kaur, S., Venktaraman, G., Jain, M., Senapati, S., Garg, P.K. & Batra, S.K. (2012) Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Lett* **315**, 97-111.
- Kenanova, V., Olafsen, T., Crow, D.M., Sundaresan, G., Subbarayan, M., Carter, N.H., Ikle, D.N., Yazaki, P.J., Chatziioannou, A.F., Gambhir, S.S., Williams, L.E., Shively, J.E., Colcher, D., Raubitschek, A.A. & Wu, A.M. (2005) Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res* **65**, 622-631.

- 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.
- Khan, Z.A., Caurtero, J., Barbin, Y.P., Chan, B.M., Uniyal, S. & Chakrabarti, S. (2005a) ED-B fibronectin in non-small cell lung carcinoma. *Exp Lung Res* 31, 701-711.
- Khan, Z.A., Chan, B.M., Uniyal, S., Barbin, Y.P., Farhangkhoe, H., Chen, S. & Chakrabarti, S. (2005b) EDB fibronectin and angiogenesis – a novel mechanistic pathway. *Angiogenesis* 8, 183-196.
- 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.
- Kjeldsen, L., Cowland, J.B. & Borregaard, N. (2000) Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 1482, 272-283.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A.H., Sengelov, H. & Borregaard, N. (1993) Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 268, 10425-10432.
- Klee, G.G. (2000) Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 124, 921-923.
- Kobayashi, H., Wu, C., Yoo, T.M., Sun, B.F., Drumm, D., Pastan, I., Paik, C.H., Gansow, O.A., Carrasquillo, J.A. & Brechbiel, M.W. (1998) Evaluation of the *in vivo* biodistribution of yttrium-labeled isomers of CHX-DTPA-conjugated monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 39, 829-836.
- Kodera, Y., Isobe, K., Yamauchi, M., Satta, T., Hasegawa, T., Oikawa, S., Kondoh, K., Akiyama, S., Itoh, K., Nakashima, I. & et al. (1993) Expression of carcinoembryonic antigen (CEA) and nonspecific crossreacting antigen (NCA) in gastrointestinal cancer; the correlation with degree of differentiation. *Br J Cancer* 68, 130-136.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kopp, P.A. (2008) Reduce, recycle, reuse - iodotyrosine deiodinase in thyroid iodide metabolism. *N Engl J Med* 358, 1856-1859.
- Korndörfer, I.P., Schlehuber, S. & Skerra, A. (2003) Structural mechanism of specific ligand recognition by a lipocalin tailored for the complexation of digoxigenin. *J Mol Biol* 330, 385-396.
- Kraeber-Bodère, F., Rousseau, C., Bodet-Milin, C., Ferrer, L., Faivre-Chauvet, A., Campion, L., Vuillez, J.P., Devillers, A., Chang, C.H., Goldenberg, D.M., Chatal, J.F. & Barbet, J. (2006) Targeting, toxicity, and efficacy of 2-step, pretargeted radioimmunotherapy using a chimeric bispecific antibody and <sup>131</sup>I-labeled bivalent hapten in a phase I optimization clinical trial. *J Nucl Med* 47, 247-255.

- Kremers, G.J., Gilbert, S.G., Cranfill, P.J., Davidson, M.W. & Piston, D.W. (2011) Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* 124, 157-160.
- Kuhn, S.M., Rubini, M., Fuhrmann, M., Theobald, I. & Skerra, A. (2010) Engineering of an orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase for efficient incorporation of the non-natural amino acid O-methyl-L-tyrosine using fluorescence-based bacterial cell sorting. *J Mol Biol* 404, 70-87.
- Kuijpers, W.H., Bos, E.S., Kaspersen, F.M., Veeneman, G.H. & van Boeckel, C.A. (1993) Specific recognition of antibody-oligonucleotide conjugates by radiolabeled antisense nucleotides: a novel approach for two-step radioimmunotherapy of cancer. *Bioconjug Chem* 4, 94-102.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Le Doussal, J.M., Chetanneau, A., Gruaz-Guyon, A., Martin, M., Gautherot, E., Lehur, P.A., Chatal, J.F., Delaage, M. & Barbet, J. (1993) Bispecific monoclonal antibody-mediated targeting of an indium-111-labeled DTPA dimer to primary colorectal tumors: pharmacokinetics, biodistribution, scintigraphy and immune response. *J Nucl Med* 34, 1662-1671.
- Le Doussal, J.M., Gruaz-Guyon, A., Martin, M., Gautherot, E., Delaage, M. & Barbet, J. (1990) Targeting of indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates: imaging of tumors hosted in nude mice. *Cancer Res* 50, 3445-3452.
- Lee, S.-H., Kim, J.-S. & Kim, C.-W. (2002) Optimization of buffer conditions for the removal of endotoxins using Q-sepharose. *Process Biochem* 38, 1091-1098.
- Li, L., Bading, J., Yazaki, P.J., Ahuja, A.H., Crow, D., Colcher, D., Williams, L.E., Wong, J.Y., Raubitschek, A. & Shively, J.E. (2008) A versatile bifunctional chelate for radiolabeling humanized anti-CEA antibody with In-111 and Cu-64 at either thiol or amino groups: PET imaging of CEA-positive tumors with whole antibodies. *Bioconjug Chem* 19, 89-96.
- Li, Y., Cao, H., Jiao, Z., Pakala, S.B., Sirigiri, D.N., Li, W., Kumar, R. & Mishra, L. (2010) Carcinoembryonic antigen interacts with TGF- $\beta$  receptor and inhibits TGF- $\beta$  signaling in colorectal cancers. *Cancer Res* 70, 8159-8168.
- Liedberg, B., Nylander, C. & Lundström, I. (1995) Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started. *Biosens Bioelectron* 10, i-ix.
- Liersch, T., Meller, J., Bittrich, M., Kulle, B., Becker, H. & Goldenberg, D.M. (2007) Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with <sup>131</sup>I-labetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. *Ann Surg Oncol* 14, 2577-2590.
- Liersch, T., Meller, J., Kulle, B., Behr, T.M., Markus, P., Langer, C., Ghadimi, B.M., Wegener, W.A., Kovacs, J., Horak, I.D., Becker, H. & Goldenberg, D.M. (2005) Phase II trial of carcinoembryonic

- antigen radioimmunotherapy with  $^{131}\text{I}$ -labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol* 23, 6763-6770.
- Liu, S. (2008) Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1347-1370.
- Liu, S. & Edwards, D.S. (2001) Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem* 12, 7-34.
- 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  $^{131}\text{I}$ -L19SIP in a prostate cancer patient. *J Cancer Res Clin Oncol* 140, 35-43.
- Löfblom, J., Frejd, F.Y. & Stahl, S. (2011) Non-immunoglobulin based protein scaffolds. *Curr Opin Biotechnol* 22, 843-848.
- Lonberg, N. (2008) Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol* 20, 450-459.
- Lu, P., Weaver, V.M. & Werb, Z. (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 196, 395-406.
- Lumry, R. & Biltonen, R. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.
- 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.
- Lyakhov, I., Zielinski, R., Kuban, M., Kramer-Marek, G., Fisher, R., Chertov, O., Bindu, L. & Capala, J. (2010) HER2- and EGFR-specific affiprobe – novel recombinant optical probes for cell imaging. *Chembiochem* 11, 345-350.
- Mach, J.P., Carrel, S., Merenda, C., Sordat, B. & Cerottini, J.C. (1974) *In vivo* localisation of radiolabelled antibodies to carcinoembryonic antigen in human colon carcinoma grafted into nude mice. *Nature* 248, 704-696.
- Malmqvist, M. (1999) BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem Soc Trans* 27, 335-340.
- Mao, Y. & Schwarzbauer, J.E. (2005) Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* 24, 389-399.
- Mariani, G., Lasku, A., Balza, E., Gaggero, B., Motta, C., Di Luca, L., Dorcaratto, A., Viale, G.A., Neri, D. & Zardi, L. (1997) Tumor targeting potential of the monoclonal antibody BC-1 against oncofetal fibronectin in nude mice bearing human tumor implants. *Cancer* 80, 2378-2384.

- Markiv, A., Beatson, R., Burchell, J., Durvasula, R.V. & Kang, A.S. (2011) Expression of recombinant multi-coloured fluorescent antibodies in *gor/trxB<sup>-</sup>* *E. coli* cytoplasm. *BMC Biotechnol* 11, 117.
- Matsumura, Y. & Maeda, H. (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46, 6387-6392.
- McBride, W.J., Zanzonico, P., Sharkey, R.M., Noren, C., Karacay, H., Rossi, E.A., Losman, M.J., Brard, P.Y., Chang, C.H., Larson, S.M. & Goldenberg, D.M. (2006) Bispecific antibody pretargeting PET (immunopET) with an <sup>124</sup>I-labeled hapten-peptide. *J Nucl Med* 47, 1678-1688.
- McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. & Chiswell, D.J. (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348, 552-554.
- Mendler, C.T., Feuchtinger, A., Heid, I., Aichler, M., D'Alessandria, C., Pirsig, S., Blechert, B., Wester, H.J., Braren, R., Walch, A., Skerra, A. & Schwaiger, M. (2016) Tumor uptake of anti-CD20 Fabs depends on tumor perfusion. *J Nucl Med* 57, 1971-1977.
- Mendler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J. & Skerra, A. (2015) High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MAbs* 7, 96-109.
- Menrad, A. & Messen, H.D. (2005) ED-B fibronectin as a target for antibody-based cancer treatments. *Expert Opin Ther Targets* 9, 491-500.
- Mercader, J.V. & Skerra, A. (2002) Generation of anticalins with specificity for a nonsymmetric phthalic acid ester. *Anal Biochem* 308, 269-277.
- Milenic, D.E. & Brechbiel, M.W. (2004) Targeting of radio-isotopes for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 3, 361-370.
- Miller, J.H. (1992) *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Milstein, C. (2000) With the benefit of hindsight. *Immunol Today* 21, 359-364.
- Milstein, C. & Cuello, A.C. (1983) Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* 305, 537-540.
- Moosmayer, D., Berndorff, D., Chang, C.H., Sharkey, R.M., Rother, A., Borkowski, S., Rossi, E.A., McBride, W.J., Cardillo, T.M., Goldenberg, D.M. & Dinkelborg, L.M. (2006) Bispecific antibody pretargeting of tumor neovasculature for improved systemic radiotherapy of solid tumors. *Clin Cancer Res* 12, 5587-5595.

- Morath, V., Bolze, F., Schlapschy, M., Schneider, S., Sedlmayer, F., Seyfarth, K., Klingenspor, M. & Skerra, A. (2015) PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced *in vivo* efficacy. *Mol Pharm* 12, 1431-1442.
- Müller, C. & Schibli, R. (2013) Single photon emission computed tomography tracer. *Molecular Imaging in Oncology*. Springer Verlag, Berlin.
- Myszka, D.G. (1999) Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* 12, 279-284.
- Nap, M., Mollgard, K., Burtin, P. & Fleuren, G.J. (1988) Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumour Biol* 9, 145-153.
- Neri, D. & Bicknell, R. (2005) Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 5, 436-446.
- Neumaier, M., Fenger, U. & Wagener, C. (1985) Monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen (CEA) as a model system: identification of two novel CEA-related antigens in meconium and colorectal carcinoma tissue by Western blots and differential immunoaffinity chromatography. *J Immunol* 135, 3604-3609.
- Neumaier, M., Shively, L., Chen, F.S., Gaida, F.J., Ilgen, C., Paxton, R.J., Shively, J.E. & Riggs, A.D. (1990) Cloning of the genes for T84.66, an antibody that has a high specificity and affinity for carcinoembryonic antigen, and expression of chimeric human/mouse T84.66 genes in myeloma and Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 50, 2128-2134.
- Nygren, P.A. & Skerra, A. (2004) Binding proteins from alternative scaffolds. *J Immunol Methods* 290, 3-28.
- Obrink, B. (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr Opin Cell Biol* 9, 616-626.
- Oikawa, S., Nakazato, H. & Kosaki, G. (1987) Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 142, 511-508.
- Olafsen, T., Cheung, C.W., Yazaki, P.J., Li, L., Sundaresan, G., Gambhir, S.S., Sherman, M.A., Williams, L.E., Shively, J.E., Raubitschek, A.A. & Wu, A.M. (2004) Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng Des Sel* 17, 21-27.
- Olins, P.O., Devine, C.S., Rangwala, S.H. & Kavka, K.S. (1988) The T7 phage gene 10 leader RNA, a ribosome-binding site that dramatically enhances the expression of foreign genes in *Escherichia coli*. *Gene* 73, 227-235.
- Orcutt, K.D., Nasr, K.A., Whitehead, D.G., Frangioni, J.V. & Wittrup, K.D. (2011a) Biodistribution and clearance of small molecule hapten chelates for pretargeted radioimmunotherapy. *Mol Imaging Biol* 13, 215-221.



- Orcutt, K.D., Slusarczyk, A.L., Cieslewicz, M., Ruiz-Yi, B., Bhushan, K.R., Frangioni, J.V. & Wittrup, K.D. (2011b) Engineering an antibody with picomolar affinity to DOTA chelates of multiple radionuclides for pretargeted radioimmunotherapy and imaging. *Nucl Med Biol* 38, 223-233.
- Ordenez, C., Screaton, R.A., Ilantzis, C. & Stanners, C.P. (2000) Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 60, 3419-3424.
- Otto, F. (1990) DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods Cell Biol* 33, 105-110.
- Padlan, E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31, 169-217.
- Pan, H., Chen, K., Chu, L., Kinderman, F., Apostol, I. & Huang, G. (2009) Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn. *Protein Sci* 18, 424-433.
- Pankov, R. & Yamada, K.M. (2002) Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 3861-3863.
- Papadia, F., Basso, V., Patuzzo, R., Maurichi, A., Di Florio, A., Zardi, L., Ventura, E., Gonzalez-Iglesias, R., Lovato, V., Giovannoni, L., Tasciotti, A., Neri, D., Santinami, M., Menssen, H.D. & De Cian, F. (2013) Isolated limb perfusion with the tumor-targeting human monoclonal antibody-cytokine fusion protein L19-TNF plus melphalan and mild hyperthermia in patients with locally advanced extremity melanoma. *J Surg Oncol* 107, 173-179.
- Papworth, C., Bauer, J.C., Braman, J. & Wright, D.A. (1996) QuikChange site-directed mutagenesis. *Strategies* 9, 3-4.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. & Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- 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.
- Pirotte, B., Goldman, S., Massager, N., David, P., Wikler, D., Vandesteene, A., Salmon, I., Brotchi, J. & Levivier, M. (2004) Comparison of <sup>18</sup>F-FDG and <sup>11</sup>C-methionine for PET-guided stereotactic brain biopsy of gliomas. *J Nucl Med* 45, 1293-1298.
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 178, 497-515.
- Prinz, W.A., Åslund, 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<sup>+</sup> and ED-B<sup>+</sup> isoforms by human and experimental colorectal cancer. Contribution of cancer cells and tumor-associated myofibroblasts. *Am J Pathol* 148, 579-592.
- Rauth, S., Hinz, D., Börger, M., Uhrig, M., Mayhaus, M., Riemenschneider, M. & Skerra, A. (2016) High-affinity Anticalins with aggregation-blocking activity directed against the Alzheimer  $\beta$ -amyloid peptide. *Biochem J* 473, 1563-1578.
- Raymond, K.N., Dertz, E.A. & Kim, S.S. (2003) Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3584-3588.
- Reardan, D.T., Meares, C.F., Goodwin, D.A., McTigue, M., David, G.S., Stone, M.R., Leung, J.P., Bartholomew, R.M. & Frincke, J.M. (1985) Antibodies against metal chelates. *Nature* 316, 265-268.
- Reichert, J.M. & Dhimolea, E. (2012) The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discov Today* 17, 954-963.
- 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.
- Richter, A. & Skerra, A. (2016) Anticalins directed against vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR-3) with picomolar affinities show potential for medical therapy and *in vivo* imaging. *Biol Chem*.
- Roopenian, D.C. & Akilesh, S. (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7, 715-725.
- Rosebrough, S.F. (1993) Plasma stability and pharmacokinetics of radiolabeled deferoxamine-biotin derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 408-415.
- Rosebrough, S.F. & Hartley, D.F. (1995) Quantification and lowering of serum biotin. *Lab Anim Sci* 45, 554-557.
- Rosenblum, B.B., Lee, L.G., Spurgeon, S.L., Khan, S.H., Menchen, S.M., Heiner, C.R. & Chen, S.M. (1997) New dye-labeled terminators for improved DNA sequencing patterns. *Nucleic Acids Res* 25, 4500-4504.
- Sack, T.L., Gum, J.R., Low, M.G. & Kim, Y.S. (1988) Release of carcinoembryonic antigen from human colon cancer cells by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Clin Invest* 82, 586-593.
- 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.
- Salaun, P.Y., Champion, L., Bournaud, C., Faivre-Chauvet, A., Vuillez, J.P., Taieb, D., Ansquer, C., Rousseau, C., Borson-Chazot, F., Bardet, S., Oudoux, A., Cariou, B., Mirallié, E., Chang, C.H.,

- Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M., Chatal, J.F., Barbet, J. & Kraeber-Bodéré, F. (2012) Phase II trial of anticarcinoembryonic antigen pretargeted radioimmunotherapy in progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: biomarker response and survival improvement. *J Nucl Med* **53**, 1185-1192.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- 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. & Messen, 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.
- 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., Grimm, S. & Skerra, A. (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng Des Sel* **19**, 385-390.
- 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. (2001) Duocalins: engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. *Biol Chem* **382**, 1335-1342.
- 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.

- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2005) Anticalins as an alternative to antibody technology. *Expert Opin Biol Ther* 5, 1453-1462.
- Schlom, J., Hand, P.H., Greiner, J.W., Colcher, D., Shrivastav, S., Carrasquillo, J.A., Reynolds, J.C., Larson, S.M. & Raubitschek, A. (1990) Innovations that influence the pharmacology of monoclonal antibody guided tumor targeting. *Cancer Res* 50, 820s-827s.
- 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.
- Schoffelen, R., Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M., Franssen, G., McBride, W.J., Rossi, E.A., Chang, C.H., Laverman, P., Disselhorst, J.A., Eek, A., van der Graaf, W.T., Oyen, W.J. & Boerman, O.C. (2010) Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a <sup>68</sup>Ga- and <sup>18</sup>F-labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 9, 1019-1027.
- Schoffelen, R., van der Graaf, W.T., Sharkey, R.M., Franssen, G.M., McBride, W.J., Chang, C.H., Bos, D.L., Goldenberg, D.M., Oyen, W.J. & Boerman, O.C. (2012) Quantitative immuno-SPECT monitoring of pretargeted radioimmunotherapy with a bispecific antibody in an intraperitoneal nude mouse model of human colon cancer. *J Nucl Med* 53, 1926-1932.
- 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.
- Schwarzbauer, J.E. & Sechler, J.L. (1999) Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr Opin Cell Biol* 11, 622-627.
- Shapovalov, M.V. & Dunbrack, R.L., Jr. (2011) A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure* 19, 844-858.
- Sharkey, R.M., Cardillo, T.M., Rossi, E.A., Chang, C.H., Karacay, H., McBride, W.J., Hansen, H.J., Horak, I.D. & Goldenberg, D.M. (2005a) Signal amplification in molecular imaging by pretargeting a multivalent, bispecific antibody. *Nat Med* 11, 1250-1255.
- Sharkey, R.M., Chang, C.H., Rossi, E.A., McBride, W.J. & Goldenberg, D.M. (2012) Pretargeting: taking an alternate route for localizing radionuclides. *Tumour Biol* 33, 591-600.
- Sharkey, R.M., Karacay, H., Cardillo, T.M., Chang, C.H., McBride, W.J., Rossi, E.A., Horak, I.D. & Goldenberg, D.M. (2005b) Improving the delivery of radionuclides for imaging and therapy of cancer using pretargeting methods. *Clin Cancer Res* 11, 7109s-7121s.

- Shields, A.F. (2006) Positron emission tomography measurement of tumor metabolism and growth: its expanding role in oncology. *Mol Imaging Biol* **8**, 141-150.
- Sia, A.K., Allred, B.E. & Raymond, K.N. (2013) Siderocalins: siderophore binding proteins evolved for primary pathogen host defense. *Curr Opin Chem Biol* **17**, 150-157.
- Skerra, A. (1989) Funktionelle Expression Antigen bindender Immunglobulinfragmente in *Escherichia coli*. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- 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) Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-135.
- Skerra, A. (2000a) Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *J Mol Recognit* **13**, 167-187.
- Skerra, A. (2000b) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 337-350.
- Skerra, A. (2008) Alternative binding proteins: anticalins – harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J* **275**, 2677-2683.
- 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, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.
- Solá, R.J. & Griebenow, K. (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs* **24**, 9-21.
- Speer, T.W. (2012) *Targeted Radionuclide Therapy*, Wolters Kluwer Health, Philadelphia, PA.
- Stern, N., Markel, G., Arnon, T.I., Gruda, R., Wong, H., Gray-Owen, S.D. & Mandelboim, O. (2005) Carcinoembryonic antigen (CEA) inhibits NK killing via interaction with CEA-related cell adhesion molecule 1. *J Immunol* **174**, 6692-6701.
- Stickney, D.R., Anderson, L.D., Slater, J.B., Ahlem, C.N., Kirk, G.A., Schweighardt, S.A. & Frincke, J.M. (1991) Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res* **51**, 6650-6655.
- 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.
- Sugiura, G., Kühn, H., Sauter, M., Haberkorn, U. & Mier, W. (2014) Radiolabeling strategies for tumor-targeting proteinaceous drugs. *Molecules* **19**, 2135-2165.

- Sundaresan, G., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Finn, R.D., Larson, S.M., Raubitschek, A.A., Williams, L.E., Chatziioannou, A.F., Gambhir, S.S. & Wu, A.M. (2003)  $^{124}\text{I}$ -labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med* 44, 1962-1969.
- Szabo, A., Stolz, L. & Granzow, R. (1995) Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr Opin Struct Biol* 5, 699-705.
- Tabor, S. & Richardson, C.C. (1995) A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6339-6343.
- Tarli, L., Balza, E., Viti, F., Borsi, L., Castellani, P., Berndorff, D., Dinkelborg, L., Neri, D. & Zardi, L. (1999) A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood* 94, 192-198.
- Ternant, D. & Paintaud, G. (2005) Pharmacokinetics and concentration-effect relationships of therapeutic monoclonal antibodies and fusion proteins. *Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, S37-S47.
- Thomas, P. (2009) Carcinoembryonic Antigen. *Encyclopedia of Cancer*. Springer Berlin.
- Thomas, P. & Zamcheck, N. (1983) Role of the liver in clearance and excretion of circulating carcinoembryonic antigen (CEA). *Dig Dis Sci* 28, 216-224.
- Thompson, J. & Zimmermann, W. (1988) The carcinoembryonic antigen gene family: structure, expression and evolution. *Tumour Biol* 9, 63-83.
- Thompson, J.A., Grunert, F. & Zimmermann, W. (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5, 344-366.
- Thompson, J.A., Pande, H., Paxton, R.J., Shively, L., Padma, A., Simmer, R.L., Todd, C.W., Riggs, A.D. & Shively, J.E. (1987) Molecular cloning of a gene belonging to the carcinoembryonic antigen gene family and discussion of a domain model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2965-2959.
- To, W.S. & Midwood, K.S. (2011) Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 1-17.
- Tolmachev, V. (2008) *Choice of Radionuclides and Radiolabelling Techniques*, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I. & Kahan, B.D. (1976) Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro* 12, 180-191.
- Toth, C.A., Thomas, P., Broitman, S.A. & Zamcheck, N. (1982) A new Kupffer cell receptor mediating plasma clearance of carcinoembryonic antigen by the rat. *Biochem J* 204, 377-381.
- Toth, C.A., Thomas, P., Broitman, S.A. & Zamcheck, N. (1985) Receptor-mediated endocytosis of carcinoembryonic antigen by rat liver Kupffer cells. *Cancer Res* 45, 392-387.

- Triebel, S., Bläser, J., Reinke, H. & Tschesche, H. (1992) A 25 kDa  $\alpha_2$ -microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett* 314, 386-388.
- Uemori, T., Asada, K., Kato, I. & Harasawa, R. (1992) Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 15, 181-186.
- Urva, S.R. & Balthasar, J.P. (2010) Target mediated disposition of T84.66, a monoclonal anti-CEA antibody: application in the detection of colorectal cancer xenografts. *MABs* 2, 67-72.
- Urva, S.R., Yang, V.C. & Balthasar, J.P. (2010) Physiologically based pharmacokinetic model for T84.66: a monoclonal anti-CEA antibody. *J Pharm Sci* 99, 1582-1600.
- van Gisbergen, K.P., Aarnoudse, C.A., Meijer, G.A., Geijtenbeek, T.B. & van Kooyk, Y. (2005) Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Res* 65, 5935-5944.
- van Schaijk, F.G., Oosterwijk, E., Soede, A.C., Broekema, M., Frielink, C., McBride, W.J., Goldenberg, D.M., Corstens, F.H. & Boerman, O.C. (2005) Pretargeting of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a biologically produced bispecific anticarcinoembryonic antigen x anti-indium-labeled diethylenetriaminepentaacetic acid antibody. *Clin Cancer Res* 11, 7130s-7136s.
- Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hodits, R.A., Wilton, J. & Johnson, K.S. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 14, 309-314.
- Viti, F., Tarli, L., Giovannoni, L., Zardi, L. & Neri, D. (1999) Increased binding affinity and valence of recombinant antibody fragments lead to improved targeting of tumoral angiogenesis. *Cancer Res* 59, 347-352.
- Voges, M., Bachmann, V., Naujoks, J., Kopp, K. & Hauck, C.R. (2012) Extracellular Ig<sub>C2</sub> constant domains of CEACAMs mediate PI3K sensitivity during uptake of pathogens. *PLoS One* 7, e39908.
- Volkert, W.A., Goeckeler, W.F., Ehrhardt, G.J. & Ketring, A.R. (1991) Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *J Nucl Med* 32, 174-185.
- 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.
- Wagener, C., Yang, Y.H., Crawford, F.G. & Shively, J.E. (1983) Monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen and related antigens as a model system: a systematic approach for the determination of epitope specificities of monoclonal antibodies. *J Immunol* 130, 2308-2315.


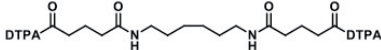
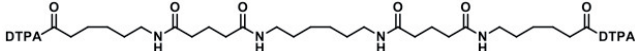
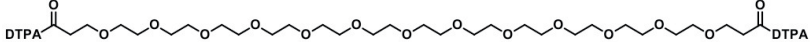
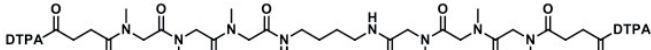
- Wagner, K., Schulz, P., Scholz, A., Wiedenmann, B. & Menrad, A. (2008) The targeted immunocytokine L19-IL2 efficiently inhibits the growth of orthotopic pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 14, 4951-4960.
- Westwood, J.H., Bessell, E.M., Bukhari, M.A., Thomas, P. & Walker, J.M. (1974) Studies on the structure of the carcinoembryonic antigen. Some deductions on the basis of chemical degradations. *Immunochemistry* 11, 811-808.
- 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.
- White, E.S. & Muro, A.F. (2011) Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *IUBMB Life* 63, 538-546.
- Wilbur, D.S. (1992) Radiohalogenation of proteins: an overview of radionuclides, labeling methods, and reagents for conjugate labeling. *Bioconjug Chem* 3, 433-470.
- 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.
- Wong, J.Y., Chu, D.Z., Williams, L.E., Liu, A., Zhan, J., Yamauchi, D.M., Wilczynski, S., Wu, A.M., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Leong, L. & Raubitschek, A.A. (2006) A phase I trial of <sup>90</sup>Y-DOTA-anti-CEA chimeric T84.66 (cT84.66) radioimmunotherapy in patients with metastatic CEA-producing malignancies. *Cancer Biother Radiopharm* 21, 88-100.
- Wong, J.Y., Chu, D.Z., Yamauchi, D., Odom-Maryon, T.L., Williams, L.E., Liu, A., Esteban, J.M., Wu, A.M., Primus, F.J., Beatty, J.D., Shively, J.E. & Raubitschek, A.A. (1998) Dose escalation trial of indium-111-labeled anti-carcinoembryonic antigen chimeric monoclonal antibody (chimeric T84.66) in presurgical colorectal cancer patients. *J Nucl Med* 39, 2097-2104.
- Wong, J.Y., Shibata, S., Williams, L.E., Kwok, C.S., Liu, A., Chu, D.Z., Yamauchi, D.M., Wilczynski, S., Ikle, D.N., Wu, A.M., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Doroshov, J.H. & Raubitschek, A.A. (2003) A Phase I trial of <sup>90</sup>Y-anti-carcinoembryonic antigen chimeric T84.66 radioimmunotherapy with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 9, 5842-5852.
- Wong, J.Y., Williams, L.E., Yamauchi, D.M., Odom-Maryon, T., Esteban, J.M., Neumaier, M., Wu, A.M., Johnson, D.K., Primus, F.J., Shively, J.E. & et al. (1995) Initial experience evaluating <sup>90</sup>yttrium-radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen chimeric T84.66 in a phase I radioimmunotherapy trial. *Cancer Res* 55, 5929s-5934s.
- Worn, A. & Plückthun, A. (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 305, 989-1010.



- Wu, A.M., Chen, W., Raubitschek, A., Williams, L.E., Neumaier, M., Fischer, R., Hu, S.Z., Odom-Maryon, T., Wong, J.Y. & Shively, J.E. (1996) Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. *Immunotechnology* 2, 21-36.
- Wu, A.M., Yazaki, P.J., Tsai, S., Nguyen, K., Anderson, A.L., McCarthy, D.W., Welch, M.J., Shively, J.E., Williams, L.E., Raubitschek, A.A., Wong, J.Y., Toyokuni, T., Phelps, M.E. & Gambhir, S.S. (2000) High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8495-8500.
- Wurch, T., Lowe, P., Caussanel, V., Bes, C., Beck, A. & Corvaia, N. (2008) Development of novel protein scaffolds as alternatives to whole antibodies for imaging and therapy: status on discovery research and clinical validation. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 502-509.
- Wurch, T., Pierre, A. & Depil, S. (2012) Novel protein scaffolds as emerging therapeutic proteins: from discovery to clinical proof-of-concept. *Trends Biotechnol* 30, 575-582.
- Xiao, Q., Zhang, F., Nacev, B.A., Liu, J.O. & Pei, D. (2010) Protein N-terminal processing: substrate specificity of *Escherichia coli* and human methionine aminopeptidases. *Biochemistry* 49, 5588-5599.
- Yaghoubi, S.S. & Gambhir, S.S. (2008) Imaging and Cancer. *The Molecular Basis of Cancer*. Elsevier, Philadelphia.
- Yamashita, K., Totani, K., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Ueda, I. & Kobata, A. (1987) Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res* 47, 3451-3449.
- 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.
- Yazaki, P.J., Kassa, T., Cheung, C.W., Crow, D.M., Sherman, M.A., Bading, J.R., Anderson, A.L., Colcher, D. & Raubitschek, A. (2008) Biodistribution and tumor imaging of an anti-CEA single-chain antibody-albumin fusion protein. *Nucl Med Biol* 35, 151-158.
- Yazaki, P.J., Lee, B., Channappa, D., Cheung, C.W., Crow, D., Chea, J., Poku, E., Li, L., Andersen, J.T., Sandlie, I., Orcutt, K.D., Wittrup, K.D., Shively, J.E., Raubitschek, A. & Colcher, D. (2013) A series of anti-CEA/anti-DOTA bispecific antibody formats evaluated for pre-targeting: comparison of tumor uptake and blood clearance. *Protein Eng Des Sel* 26, 187-193.
- Yazaki, P.J., Sherman, M.A., Shively, J.E., Ikle, D., Williams, L.E., Wong, J.Y., Colcher, D., Wu, A.M. & Raubitschek, A.A. (2004) Humanization of the anti-CEA T84.66 antibody based on crystal structure data. *Protein Eng Des Sel* 17, 481-489.
- Yazaki, P.J., Wu, A.M., Tsai, S.W., Williams, L.E., Iker, D.N., Wong, J.Y., Shively, J.E. & Raubitschek, A.A. (2001) Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and T84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug Chem* 12, 220-228.

- Yoo, B., Cheal, S.M., Torchon, G., Dilhas, A., Yang, G., Pu, J., Punzalan, B., Larson, S.M. & Ouerfelli, O. (2013) N-acetylgalactosamino dendrons as clearing agents to enhance liver targeting of model antibody-fusion protein. *Bioconjug Chem* 24, 2088-2103.
- 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.
- Zardi, L., Carnemolla, B., Siri, A., Petersen, T.E., Paoletta, G., Sebastio, G. & Baralle, F.E. (1987) Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 6, 2337-2342.
- Zhang, G., Gurtu, V. & Kain, S.R. (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 707-711.
- Zhang, J., Yun, J., Shang, Z., Zhang, X. & Pan, B. (2009) Design and optimization of a linker for fusion protein construction. *Prog Nat Sci* 19, 1197-1200.
- Zhou, H., Fuks, A., Alcaraz, G., Bolling, T.J. & Stanners, C.P. (1993) Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. *J Cell Biol* 122, 951-960.
- Zimmermann, W., Ortlieb, B., Friedrich, R. & von Kleist, S. (1987) Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 2960-2954.

## 8 Anhang

		Lineare Ausdehnung
md-060		16 Å
md-119		23 Å
md-146		41 Å
md-147		52 Å
md-152		32 Å

**Abbildung A1. Übersicht der von Dr. M. Dauner (Labor von Prof. Skerra) synthetisierten divalenten DTPA-Derivate.** Als Bezugspunkte der angegebenen linearen Ausdehnung gelten jeweils die Kohlenstoffatome der linkerendständigen Ketogruppe.

**Tabelle A1. Quantifizierung der Organanreicherung von  $^{124}\text{I}$  markierten scFv/Anticalin-Fusionsproteinen in CEA-Xenograft Mäusen anhand von PET-Bildern.**

	<b>4 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<i><math>^{124}\text{I}</math>-T84.66-CL31d</i>			
<b>Herz</b>	2,9 ± 0,4	0,16 ± 0,06	0,075 ± 0,041
<b>Leber</b>	17 ± 17	0,65 ± 0,10	0,48 ± 0,05
<b>Muskel</b>	0,42 ± 0,30	0,032 ± 0,027	0,011 ± 0,014
<b>Tumor</b>	4,0 ± 0,6	1,17 ± 0,25	0,76 ± 0,12
<b>T/Herz</b>	1,35 ± 0,29	7,5 ± 3,1	10,1 ± 5,7
<b>T/Leber</b>	0,23 ± 0,22	1,79 ± 0,48	1,60 ± 0,30
<b>T/Muskel</b>	9,4 ± 6,8	37 ± 32	68 ± 88
<i><math>^{124}\text{I}</math>-T84.66-PAS(200)-CL31d</i>			
<b>Herz</b>	6,3 ± 1,3	0,61 ± 0,13	0,21 ± 0,09
<b>Leber</b>	8,6 ± 5,0	2,3 ± 0,3	1,67 ± 0,20
<b>Muskel</b>	0,64 ± 0,36	0,085 ± 0,053	0,040 ± 0,039
<b>Tumor</b>	3,2 ± 0,5	1,57 ± 0,24	0,99 ± 0,14
<b>T/Herz</b>	0,50 ± 0,13	2,6 ± 0,7	4,7 ± 2,2
<b>T/Leber</b>	0,37 ± 0,22	0,67 ± 0,13	0,60 ± 0,11
<b>T/Muskel</b>	4,9 ± 2,9	18 ± 12	25 ± 25
<i><math>^{124}\text{I}</math>-T84.66-PAS(400)-CL31d</i>			
<b>Herz</b>	11,2 ± 3,1	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,12
<b>Leber</b>	9,6 ± 3,3	2,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,08
<b>Muskel</b>	0,83 ± 0,34	0,26 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,059 ± 0,043
<b>Tumor</b>	7,4 ± 1,5	4,6 ± 2,0 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,5
<b>T/Herz</b>	0,66 ± 0,23	1,94 ± 0,89 <sup>a</sup>	5,0 ± 1,2
<b>T/Leber</b>	0,78 ± 0,31	2,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,8 ± 0,7
<b>T/Muskel</b>	9,0 ± 4,2	17 ± 9 <sup>a</sup>	52 ± 39

Angegeben ist der prozentuale Anteil der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) bzw. der Quotient aus den % ID/g zweier Organe als Mittelwert (N = 3). <sup>a</sup>Mittelwerte aus N = 2.

**Tabelle A2. Biodistribution von  $^{177}\text{Lu-DTPA-NH}_2$  und  $(^{177}\text{Lu-DTPA})_2$  2 h nach der Injektion in CEA-Xenograft Mäuse. Den Tieren war 48 h zuvor entweder T84.66-PAS(400)-CL31d oder PBS verabreicht worden.**

	<b>mit <math>^{177}\text{Lu-DTPA-NH}_2</math> behandelte Mausgruppe:</b>		<b>mit <math>(^{177}\text{Lu-DTPA})_2</math> behandelte Mausgruppe:</b>	
	<b>PBS</b>	<b>T84.66-PAS(400)-CL31d</b>	<b>PBS</b>	<b>T84.66-PAS(400)-CL31d</b>
<i>% ID/g<sup>a</sup></i>				
<b>Blut</b>	0,22 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,14 ± 0,08	1,25 ± 0,06
<b>Herz</b>	0,111 ± 0,013	0,16 ± 0,02	0,087 ± 0,045	0,31 ± 0,03
<b>Lunge</b>	0,26 ± 0,12	0,36 ± 0,05	0,19 ± 0,07	0,68 ± 0,12
<b>Leber</b>	0,41 ± 0,28	0,97 ± 0,56	0,22 ± 0,12	0,48 ± 0,06
<b>Milz</b>	0,078 ± 0,016	0,12 ± 0,01	0,099 ± 0,035	0,26 ± 0,04
<b>Niere</b>	3,5 ± 1,5	4,5 ± 0,7	1,86 ± 0,38	3,2 ± 0,3
<b>Nebenniere</b>	0,36 ± 0,41	2,1 ± 2,5	0,31 ± 0,28	0,61 ± 0,15
<b>Pankreas</b>	0,059 ± 0,015	0,095 ± 0,011	0,048 ± 0,020	0,23 ± 0,04
<b>Magen</b>	0,113 ± 0,006	0,19 ± 0,06	0,15 ± 0,05	0,28 ± 0,03
<b>Dünndarm</b>	3,9 ± 3,1	3,3 ± 1,4	0,27 ± 0,06	0,44 ± 0,08
<b>Dickdarm</b>	6,9 ± 6,2	7,1 ± 4,7	0,68 ± 0,21	1,40 ± 0,57
<b>Muskel</b>	0,050 ± 0,014	0,085 ± 0,029	0,026 ± 0,008	0,14 ± 0,04
<b>Knochen</b>	0,24 ± 0,16	0,23 ± 0,02	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,02
<b>Haut</b>	0,25 ± 0,10	0,25 ± 0,01	0,12 ± 0,03	0,45 ± 0,05
<b>Gehirn</b>	0,015 ± 0,002	0,024 ± 0,001	0,013 ± 0,005	0,041 ± 0,006
<b>Tumor</b>	0,32 ± 0,20	0,90 ± 0,40	0,20 ± 0,05	2,3 ± 0,3
<i>Tumor/Organ-Verhältnis</i>				
<b>T/Blut</b>	1,46 ± 0,95	2,07 ± 0,94	1,41 ± 0,87	1,88 ± 0,23
<b>T/Herz</b>	2,8 ± 1,8	5,7 ± 2,6	2,3 ± 1,3	7,7 ± 1,1
<b>T/Lunge</b>	1,22 ± 0,98	2,5 ± 1,1	1,08 ± 0,51	3,4 ± 0,7
<b>T/Leber</b>	0,76 ± 0,71	0,93 ± 0,68	0,91 ± 0,54	4,9 ± 0,9
<b>T/Milz</b>	4,0 ± 2,7	7,4 ± 3,3	2,0 ± 0,9	8,9 ± 1,6
<b>T/Niere</b>	0,091 ± 0,070	0,20 ± 0,09	0,109 ± 0,035	0,73 ± 0,11
<b>T/Nebenniere</b>	0,88 ± 1,15	0,43 ± 0,55	0,65 ± 0,60	3,9 ± 1,0
<b>T/Pankreas</b>	5,3 ± 3,7	9,5 ± 4,3	4,2 ± 2,1	10,3 ± 2,2
<b>T/Magen</b>	2,8 ± 1,8	4,8 ± 2,6	1,36 ± 0,60	8,5 ± 1,3
<b>T/Dünndarm</b>	0,081 ± 0,082	0,27 ± 0,17	0,74 ± 0,25	5,4 ± 1,2
<b>T/Dickdarm</b>	0,046 ± 0,050	0,13 ± 0,10	0,30 ± 0,12	1,7 ± 0,7
<b>T/Muskel</b>	6,3 ± 4,4	10,7 ± 6,0	7,7 ± 3,0	16 ± 5
<b>T/Knochen</b>	1,34 ± 1,23	3,9 ± 1,7	1,48 ± 0,81	13 ± 2
<b>T/Haut</b>	1,24 ± 0,92	3,5 ± 1,6	1,73 ± 0,60	5,1 ± 0,8
<b>T/Gehirn</b>	21 ± 14	38 ± 17	16 ± 7	57 ± 11

<sup>a</sup> % ID/g pro Organ (N = 3).