

Charakterisierung und Anwendung von Antikörpern mit Spezifität für Pro/Ala-reiche Sequenzen

Jonas Schilz

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Martin Klingenspor

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Arne Skerra
2. Prof. Dr. Michael Groll

Die Dissertation wurde am 03.06.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 24.11.2022 angenommen.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Arne Skerra für die spannende Themenstellung sowie die Möglichkeit bedanken, am Lehrstuhl für Biologische Chemie meine Doktorarbeit anfertigen zu können. Die professionelle Unterstützung, exzellente Betreuung sowie die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen und hervorragenden Ideen haben maßgeblich zum erfolgreichen Verlauf meiner Doktorarbeit beigetragen.

Ein weiterer Dank gilt allen Kolleginnen und Kollegen vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München für den guten kollegialen Zusammenhalt, die unterhaltsamen Diskussionen wissenschaftlichen wie auch nichtwissenschaftlichen Charakters, sowie die stete Hilfe und produktive Zusammenarbeit im Laboralltag. Vor allem bei meinen langjährigen Kollegen Benjamin Escher, Carina Sommer, Christian Deuschle, Jan Scherthner, Fabian Rodewald, Elena Ilyukhina, Emanuel Peplau, Julia Martin, Laura Job, Corinna Brandt, Lea Nästle, Peter Mayrhofer und Carmen Longo möchte ich mich für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Lehrstuhls bedanken. Resi und Martina danke ich für die zuverlässige Bereitstellung von Kulturmedien und Pufferlösungen, Ina Theobald für ihre hilfreichen Tipps und Tricks bei der Laborarbeit.

Dem gesamten Team von XL-protein GmbH möchte ich für die exzellente Zusammenarbeit bei dieser Doktorarbeit danken, insbesondere ist hier die tatkräftige Unterstützung durch Uli Binder und sein stetes Interesse am Fortschritt des Projekts zu nennen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. habil André Schiefner, der mich bei kristallographischen Fragestellungen und der Proteinstrukturlösung tatkräftig unterstützt hat. Dr. Martin Schlapschy gilt großer Dank für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die Unterstützung bei Fragen aller Art. Herrn Klaus Wachinger danke ich herzlich für die Mithilfe bei zahlreichen Fermentationen, Herrn Dr. Markus Anneser für die Synthese diverser Derivate des L-Prolinamids sowie Herrn Stefan Achatz für die Unterstützung im Bereich der Massenspektrometrie und IT, insbesondere mit *ANTICALIGN*.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem Christina Lutz, Charlotte Clement und Franziska Greiner, die im Rahmen ihrer Forschungspraktika einen produktiven Beitrag zum Fortschritt meiner Projekte geleistet und für Abwechslung im Laboralltag gesorgt haben.

Professor Dr. Michael Groll und Dr. Eva Maria Huber vom Lehrstuhl für Biochemie der TU München danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Sammlung von Beugungsdaten.

Der allergrößte Dank gilt meiner Familie und meiner Lebensgefährtin Nicole, die mich in allen Phasen der Doktorarbeit stets tatkräftig und liebevoll unterstützt haben. Ohne Eure Unterstützung und Euer Verständnis auch in schwierigen Zeiten wäre all dies nicht möglich gewesen.

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

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

1) Schilz, J., Binder, U., Friedrich L., Gebauer, M., Lutz, C., Schlapschy, M., Schiefner, A. & Skerra, A. (2021) Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope. *J Mol Biol* **433**, 167113.

2) Schilz, J., Clement, C., Greiner, F. & Skerra, A. (2022) Direct affinity purification of long-acting PASylated proteins with therapeutic potential using L-prolinamide for mild elution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, e202200079.

Patentanmeldung:

Schilz, J., Binder, U., Friedrich, L., Gebauer, M., Schlapschy, M. and Skerra, A.
Antibodies specific for structurally disordered sequences.
Anmeldenummer: EP20216744

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	PASylation® Technologie zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Therapeutika	1
1.2	Antikörper und Mechanismen der molekularen Erkennung von Antigenen	5
1.3	Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie	9
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Bakterienstämme und Vektoren	13
2.2	Oligodesoxynukleotide	13
2.3	Charakterisierung von Antikörpern aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen	15
2.4	Charakterisierung von in <i>E. coli</i> produzierten Antikörperfragmenten	18
2.5	Epitop-Kartierung mit dem SPOT-Verfahren	19
2.6	Amplifizierung und Sequenzierung variabler Immunglobulin-Regionen der Maus	20
2.7	Gentechnische Herstellung und chromatographische Reinigung von Proteinen	21
2.7.1	Produktion von rekombinanten Fab-Fragmenten in <i>E. coli</i> im Schüttelkolben	22
2.7.2	Produktion von rekombinanten Fab-Fragmenten in <i>E. coli</i> im Laborfermenter	22
2.7.3	Gentechnische Herstellung PASylierter Proteine	24
2.7.4	Chromatographische Reinigung von Antikörperfragmenten und PASylierten Proteinen	24
2.8	Reinigung PASylierter Proteine mittels anti-PAS Affinitätschromatographie	27
2.9	Biophysikalische Methoden	28
2.9.1	ESI-Massenspektrometrie	28
2.9.2	Fluoreszenztitration	28
2.10	Proteinkristallisation	29
2.11	Computerprogramme und Datenbanken	31
3	Veröffentlichungen	33

3.1	Veröffentlichung in Journal of Molecular Biology, Juni 2021 – Überblick und eigener Beitrag.....	33
3.2	Veröffentlichung in Angewandte Chemie International Edition, März 2022 – Überblick und eigener Beitrag	35
4	Diskussion.....	37
4.1	Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen strukturell ungeordnete Pro/Ala-reiche Sequenzen	37
4.2	Strukturelle Untersuchung von Komplexen aus Antikörperfragmenten und Pro/Ala-reichen Epitoppeptiden.....	42
4.3	Entwicklung einer Strategie zur Affinitätsreinigung PASylierter Proteine auf Basis der charakterisierten Antikörperfragmente.....	48
5	Zusammenfassung	53
6	Abkürzungen	55
7	Literaturverzeichnis	57
8	Anhang	65
8.1	Anhang I: Nachdruck der eingebundenen Veröffentlichungen.....	65
8.2	Anhang II: Ergänzende Ergebnisse.....	120
8.3	Anhang III: Liste aller klonierten Antikörpersequenzen.....	122

1 Einleitung

1.1 PASylation® Technologie zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Therapeutika

Lange Zeit haben niedermolekulare Wirkstoffe den Arzneimittelmarkt dominiert, doch in den letzten beiden Jahrzehnten hat der Anteil an komplexen Makromolekülen biologischen Ursprungs, sogenannten Biologika, stark zugenommen. Seit der Zulassung von gentechnisch hergestelltem Insulin im Jahr 1982 als erstes Biotherapeutikum hat sich diese Wirkstoffklasse rasant entwickelt und stellt im 21. Jahrhundert den am schnellsten wachsenden Sektor der Pharmaindustrie dar (Otto *et al.*, 2014; Walsh, 2018). Dank der gewaltigen Fortschritte in der Biotechnologie steht mittlerweile eine Vielzahl an Biotherapeutika für die Therapie von Krankheiten in diversen Indikationsgebieten zur Verfügung, und unzählige weitere Wirkstoffkandidaten befinden sich aktuell in der klinischen Entwicklung. Abgesehen von kompletten Antikörpern, welche aufgrund des endosomalen Recyclings mehrere Wochen im Blutkreislauf zirkulieren (Mankarious *et al.*, 1988; Raghavan *et al.*, 1993), ist die Wirksamkeit vieler Biologika durch deren teils sehr kurze Plasmahalbwertszeit stark limitiert.

Insbesondere Hormone, hämatopoetische Wachstumsfaktoren, Interferone oder viele Enzyme werden aufgrund der unterhalb des Schwellenwerts für die Nierenfiltration von ca. 70 kDa (Hamano *et al.*, 2002) liegenden Molekülgröße recht zügig durch glomeruläre Filtration aus dem Blut ausgeschieden. Die dadurch bedingte häufige intravenöse oder subkutane Verabreichung des Medikaments geht mit hohen Kosten sowie Unannehmlichkeiten für den Patienten einher. In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Verweildauer von Proteinen/Peptiden im Blutplasma zu erhöhen, beispielsweise durch Fusion mit humanem Serumalbumin, Transferrin oder dem Fc-Teil eines IgG₁ (Binder & Skerra, 2012; Strohl, 2015). Die Verlängerung der Halbwertszeit kleiner Moleküle kann generell durch die Vergrößerung des hydrodynamischen Radius erreicht werden. Gemäß diesem Prinzip ist die Konjugation des Wirkstoffes mit Polyethylenglycol (PEG) eine bereits vielfach eingesetzte Modifikation (Dozier & Distefano, 2015). Ursprünglich entwickelt, um die Immunogenität von intravenös applizierten nicht-humanen Proteintherapeutika zu verringern (Davis, 2002), hat die PEGylierung in der Vergangenheit bei zahlreichen Protein- oder Peptidwirkstoffen Anwendung gefunden, um deren Zirkulationsdauer im Blutplasma zu verlängern. Mehrere PEGylierte Wirkstoffe sind bereits zugelassen und werden in verschiedenen Indikationsgebieten wie Leukämie (Oncaspar; Heo *et al.*, 2019), chronischer Hepatitis C (Peginterferon alfa-2a; Heathcote *et al.*, 2000) oder in der Augenheilkunde (Pegaptanib; Ng *et al.*, 2006) als Therapeutika eingesetzt.

In wässriger Lösung nimmt das hydrophile PEG eine ungeordnete Struktur ein und führt zu einem vergrößerten hydrodynamischen Volumen des Wirkstoffes (Gokarn *et al.*, 2012). Bei ausreichender Länge der verwendeten PEG-Polymere kann hierdurch ein hydrodynamischer Radius erreicht werden, der oberhalb der Porengröße der Nierenglomeruli liegt und aufgrund der verzögerten renalen Ausscheidung zu einer längeren Verweildauer im Blutplasma führt. Allerdings bringt die PEGylierung einige Nachteile mit sich: Notwendigkeit der chemischen Kopplung mit dem Therapeutikum *in vitro*, fehlende Einheitlichkeit der resultierenden Konjugate aufgrund der Polydispersität kommerziell erhältlicher PEG Derivate, häufiger Aktivitätsverlust des Moleküls durch Blockierung der Rezeptorbindestelle oder des aktiven Zentrums, sowie die durch fehlende biologische Abbaubarkeit bedingte Akkumulation in Geweben bzw. Vakuolisierung von Zellen (Bendele *et al.*, 1998). Besonders in letzter Zeit ist ein weiterer Nachteil der PEGylierung in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt, nämlich dessen anfangs unterschätzte Immunogenität insbesondere bei wiederholter Applikation und eine damit einhergehende Immunantwort in Form von anti-PEG Antikörpern. So wurde bei 41 % der mit PEGylierter Uricase behandelten Patienten ein hoher Titer an anti-*Drug* Antikörpern (ADA) festgestellt, die größtenteils gegen den PEG-Teil des Wirkstoffes gerichtet waren (Lipsky *et al.*, 2014). Diese ADA führen zu einer beschleunigten Ausscheidung des Wirkstoffes, was die für viele Patienten letzte Therapiemöglichkeit nutzlos macht. Ähnliche Beobachtungen von durch anti-PEG Antikörpern verursachtem Verlust der Therapiewirksamkeit wurden bei Patienten gemacht, die mit PEG-Asparaginase behandelt wurden (Armstrong *et al.*, 2007). In Anbetracht der Tatsache, dass eine vor einigen Jahren durchgeführte Studie in 72 % aller Blutproben aus der Bevölkerung anti-PEG Antikörper nachweisen konnte, wenn auch meist nur mit niedrigen Titern (Yang *et al.*, 2016), stellt sich die Frage, inwiefern sich deren Prävalenz infolge der aktuell breit verabreichten COVID-19 mRNA Vakzine von BioNTech/Pfizer und Moderna, die PEG-Derivate beinhalten, weiter entwickeln wird. Bereits jetzt wird ein Zusammenhang zwischen vereinzelt beobachteten anaphylaktischen Schocks bei Geimpften und den in beiden Impfstoffen enthaltenen PEG-Lipiden vermutet (Garvey & Nasser, 2021).

Mit der PASylation® Technologie wurde eine innovative biologische Alternative zur PEGylierung entwickelt (Schlapschy *et al.*, 2013). Die PASylierung basiert auf einer hydrophilen, aus den L-Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin aufgebauten Polypeptidkette. Während jede dieser drei Aminosäuren für sich als Homopolymer charakteristische Sekundärstrukturen annimmt, konnte durch gezielte Abwechslung der drei Aminosäurereste eine in Lösung strukturell ungeordnete und stark hydrophile Polypeptidkette mit *Random-Coil*-Struktur erzeugt werden (Schlapschy *et al.*, 2013).

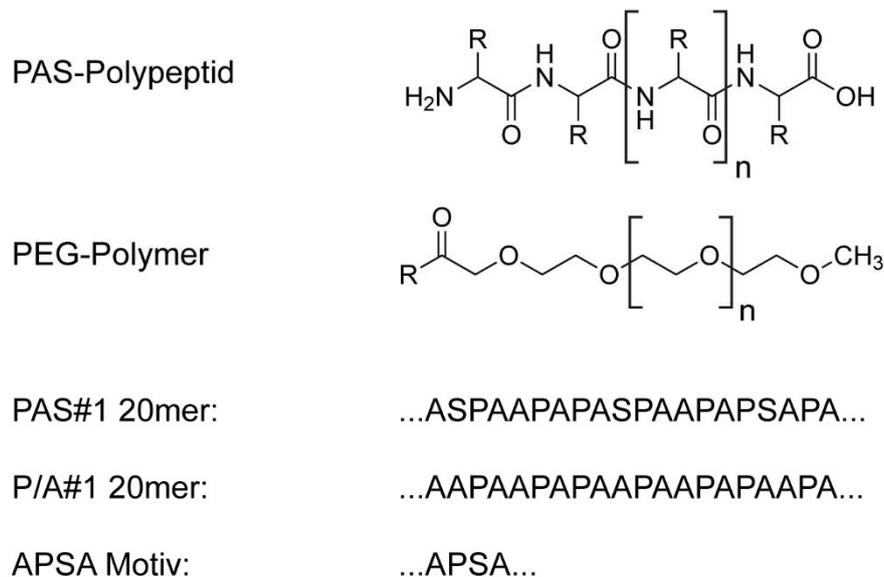


Abbildung 1: Chemischer Aufbau der PAS-Polypeptidkette im Vergleich zum PEG-Polymer. Im PAS-Polypeptid steht der Rest R für die Seitenketten der Aminosäuren Alanin, Prolin oder Serin. Für die PAS-Polypeptide PAS#1, P/A#1 und APSA ist die Aminosäuresequenz der kleinsten repetitiven Einheit angegeben.

Untersuchungen der Pro/Ala-reichen Sequenzen (PAS) mit biophysikalischen Methoden haben gezeigt, dass in wässriger Lösung keinerlei Sekundärstruktur zu beobachten ist und das PAS-Polypeptid damit eine ähnlich ungeordnete Raumstruktur wie PEG aufweist (Breibeck & Skerra, 2018). Außerdem bringt die Zusammensetzung aus ungeladenen Aminosäuren Vorteile mit sich, da es zu keiner Beeinflussung der Gewebeverteilung oder Zelloberflächenrezeptoraffinität kommt.

Durch genetische Fusion der für die PAS-Polypeptidkette kodierenden Nukleinsäuresequenz mit dem Gen für den biopharmazeutischen Wirkstoff kann das daraus resultierende Fusionsprotein in einem gewöhnlichen Expressionssystem rekombinant hergestellt werden. Verlustreiche chemische Kopplungsschritte mit sich daran anschließendem teuren Prozessen zur Isolierung des finalen Produkts werden somit umgangen. Sowohl die PAS#1-Sequenz als auch die nur aus den Aminosäuren Prolin und Alanin bestehende P/A#1-Sequenz ist aus repetitiven Bausteinen mit zwanzig Aminosäuren aufgebaut (Abbildung 1). Die weniger komplexe APSA-Polypeptidsequenz hingegen besteht aus dem sich wiederholenden Motiv der Vier-Aminosäure-Sequenz APSA.

Durch Anpassung der Länge des PAS-Polypeptids kann ein Biotherapeutikum mit maßgeschneidertem hydrodynamischen Volumen und entsprechender Plasmahalbwertszeit entworfen werden (Abbildung 2). Um eine möglichst lange Verweildauer im Blutplasma zu erzielen, bewegt sich die Länge der PAS-Polypeptide bei Biotherapeutika meist in einem

Bereich von mehreren hundert Aminosäuren. So konnten beispielsweise die Plasmahalbwertszeiten des Peptids Thymosin α 1 (Binder & Skerra, 2020) oder des IL-1 Rezeptorantagonisten Anakinra (Powers *et al.*, 2020) durch Fusion mit einem PAS-Polypeptid aus 600 Aminosäureresten bis um achtfache verlängert und dadurch das therapeutische Fenster vergrößert und die Notwendigkeit zur häufigen intravenösen Verabreichung verringert werden. Auf der anderen Seite ist beispielsweise im Bereich der Tumor-Radioimmundiagnostik die Möglichkeit einer präzisen Feinabstimmung der Plasmahalbwertszeit mit kürzeren PAS-Sequenzen vorteilhaft, um einen optimalen Kontrast für das *in vivo*-Imaging zu erreichen (Mendler *et al.*, 2015).

Die Zusammensetzung aus natürlichen L-Aminosäuren ermöglicht eine biologische Verstoffwechslung der PASylierten Moleküle und verhindert damit eine Akkumulation in Geweben. Des Weiteren wurde die intravenöse oder subkutane Gabe PASylierter Wirkstoffe in zahlreichen Tierstudien gut toleriert (Brandl *et al.*, 2020) und bislang keinerlei PAS-spezifische Immunantwort festgestellt.

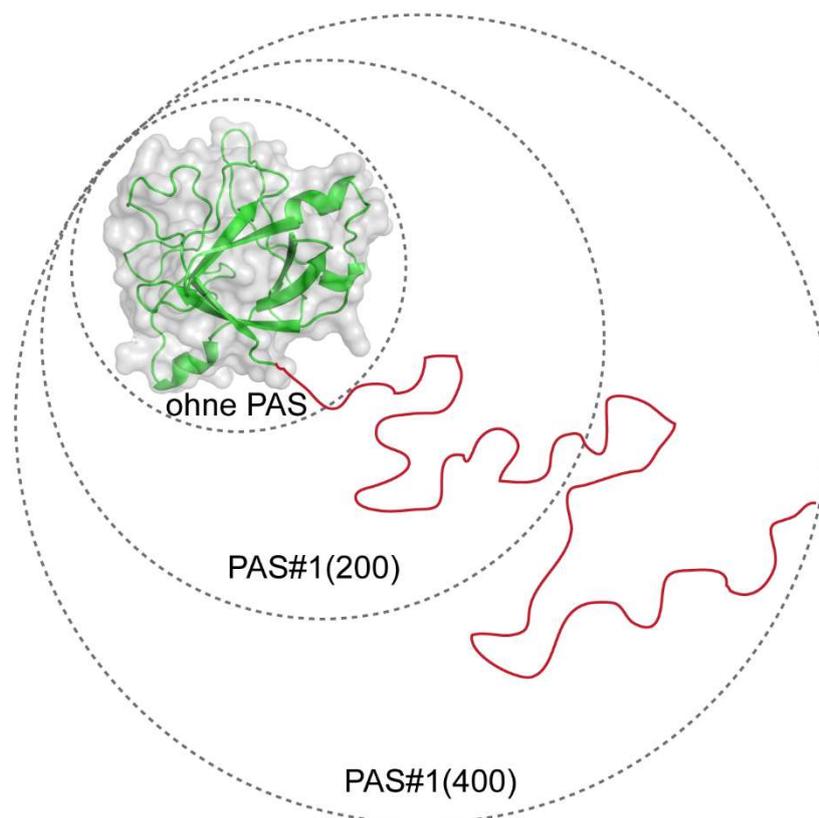


Abbildung 2: Veranschaulichung des Funktionsprinzips der PASylierungs-Technologie anhand des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1Ra; PDB-Code: 1ILR). Mit zunehmender Länge der mit dem IL-1Ra fusionierten PAS#1-Polypeptidkette (rot) kommt es zu einer Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens.

Nichtsdestotrotz wäre es insbesondere im Hinblick auf die klinische Entwicklung PASylierter Therapeutika wie auch für die experimentelle Forschung mit PASylierten Proteinen vorteilhaft, wenn Bindemoleküle wie beispielsweise Antikörper verfügbar wären, die den spezifischen Nachweis dieser Wirkstoffe erlauben. Da eine solche Wechselwirkung spezifisch für die PAS-Polypeptidsequenz wäre, könnten solche Antikörper ein universelles Werkzeug zur Detektion PASylierter Moleküle darbieten.

1.2 Antikörper und Mechanismen der molekularen Erkennung von Antigenen

Im Jahr 1890 wurde von Emil von Behring und Shibasaburō Kitasato zum ersten Mal gezeigt, dass eine Substanz im Blut vorliegt, welche Toxine neutralisieren kann. Damals noch als „Antitoxin“ bezeichnet, schützen uns Antikörper als Teil der adaptiven Immunantwort nicht nur erfolgreich vor Krankheitserregern, sondern sie haben in den letzten beiden Jahrzehnten auch ihren Siegeszug in der Anwendung als Biotherapeutika angetreten. Heutzutage sind Antikörper eine der wichtigsten Klassen von therapeutischen Wirkstoffen, die in der Therapie von Krebs und Autoimmunkrankheiten breite Anwendung finden (Leavy, 2010; Lu *et al.*, 2020; Strohl, 2015). Der Umstand, dass in 2019 weltweit sechs der zehn umsatzstärksten Medikamente Antikörper waren, unterstreicht deren Bedeutung für die medizinische Therapie sowie das große Interesse der pharmazeutischen Industrie an diesen Molekülen (Blankenship, 2020). Eine Besonderheit der Antikörper ist, dass sie neben der spezifischen Erkennung ihres Antigens durch die variablen Regionen zusätzlich durch ihren konstanten Fc Teil Effektorfunktionen vermitteln. So können Antikörper der im menschlichen Blut am häufigsten vorkommenden Immunglobulinklasse G1 (IgG₁) Natürliche Killerzellen, Makrophagen wie auch das Komplementsystem aktivieren und damit die Lyse von krankhaften oder infizierten Zellen bewirken. Gerade dieses Zusammenspiel von hochspezifischer Erkennung körperfremder Antigene und der Wechselwirkung vor allem mit dem zellulären Immunsystem machen Antikörper zu wertvollen Waffen, nicht nur im körpereigenen Kampf gegen Krankheiten sondern auch als zielgerichtete Therapeutika. Durch gentechnisches Engineering konnten die Eigenschaften natürlicher Antikörper erweitert und neuartige Formate mit maßgeschneiderter Affinität, Valenz, Geometrie und Spezifität geschaffen werden (Brinkmann & Kontermann, 2021; Dübel *et al.*, 2019).

Die hohe Spezifität und hochaffine Wechselwirkung mit Ihrem jeweiligen Antigen, die durch den Aviditätseffekt im Fall von oligomeren Antigenstrukturen nochmals verstärkt wird, machen Antikörper auch zu hervorragenden Werkzeugen für diagnostische Zwecke oder als Forschungsreagenzien. So finden sie breite Anwendung in der Bildgebung *in vivo* oder in diversen Immunassays wie Western Blotting, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA),

Immunpräzipitation, Immunhistochemie oder der Durchflusszytometrie, um nur einige zu nennen (Rüker & Wozniak-Knopp, 2021).

Einen besonders starken Schub bekam die Antikörperforschung mit der von César Milstein und Georges Köhler 1975 veröffentlichten Methode zur Erzeugung von Hybridomzellen (Köhler & Milstein, 1975). Hybridomzellen können durch Fusion einer Antikörperproduzierenden B-Zelle mit einer unsterblichen Myelom-Zelllinie und anschließender Selektion in einem geeigneten Medium erzeugt werden. Hierdurch war es erstmals möglich, kontinuierliche hybride Zelllinien zu erzeugen, die unbegrenzt einen gewünschten monoklonalen Antikörper produzieren. Damit war eine wichtige Grundlage für die sich fortan rasant entwickelnde Antikörperforschung gelegt, die schon 1986 in der ersten Zulassung eines monoklonalen Antikörpers, Muromonab-CD3, zu therapeutischen Zwecken durch die amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) resultierte, gefolgt von etlichen weiteren Zulassungen in den darauffolgenden Jahrzehnten (Lu *et al.*, 2020).

Die große molekulare Masse von 150 kDa eines intakten IgG₁-Antikörpers sorgt zusammen mit dem zellulären Prozess des endosomalen Recyclings für eine verhältnismäßig lange Zirkulationsdauer im Blut (Mankarious *et al.*, 1988; Raghavan *et al.*, 1993). Allerdings kann die Größe eines solchen Antikörpers auch von Nachteil sein, insbesondere was Anwendungen anbelangt die gute Gewebepenetration erfordern. Ein entscheidender Grundstein für die moderne Antikörpertechnologie war die Entwicklung von Methoden zur gentechnischen Produktion von Antikörpern und insbesondere deren Fragmenten in *E. coli* (Skerra & Plückthun, 1988). Erst hierdurch wurde ermöglicht, kleinere Fragmente von Antikörpern gentechnisch herzustellen, die bei deutlich geringerer Molekülgröße die gleiche Antigen-spezifität aufweisen.

IgG-Antikörper sind aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten aufgebaut: Zwei Kopien einer schweren Kette, welche durch interchenare Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden sind, sowie zwei leichte Ketten, von denen jede mittels einer interchenaren Disulfidbrücke mit je einer schweren Kette verknüpft ist (Abbildung 3).

Während die leichte Kette aus zwei Immunglobulindomänen aufgebaut ist, weist jede schwere Kette vier dieser Domänen auf (Padlan, 1994). Eine Immunglobulindomäne ist durch eine sandwichartige Struktur charakterisiert, die durch antiparallele β -Faltblätter gebildet und jeweils mittels einer intramolekularen Disulfidbrücke stabilisiert wird (Chothia *et al.*, 1985). Der Aufbau aus diesen β -Faltblättern bildet ein stabiles Proteingerüst, das eine Exposition der die β -Faltblätter verbindenden Peptidschleifen ermöglicht, welche in den variablen Domänen die Kontaktfläche mit dem Antigen bilden und damit für dessen spezifische Erkennung verantwortlich sind.

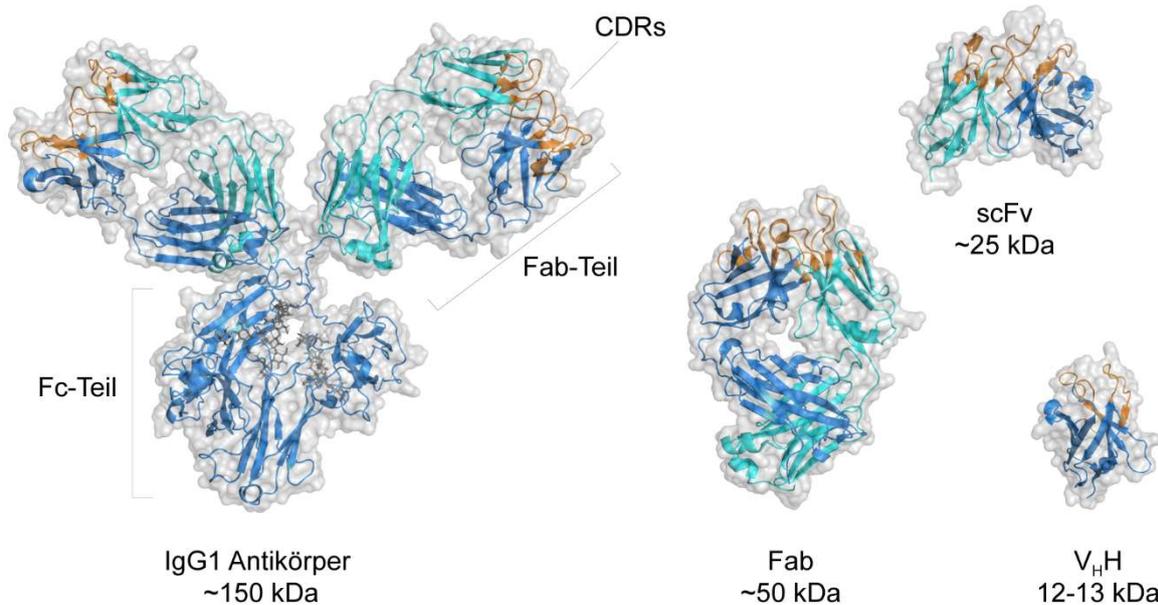


Abbildung 3: Aufbau und Struktur eines typischen IgG₁ Antikörpers (PDB-Code: 1IGY) sowie ausgewählter Antikörperformate. Der IgG₁-Antikörper zeigt den Aufbau aus zwei schweren Ketten (dunkelblau) und zwei leichten Ketten (cyan). Die ersten beiden Immunglobulindomänen der schweren und leichten Ketten bilden zusammen das Fab-Fragment (*Fragment Antigen Binding*, PDB-Code: 7O33), während die beiden letzten Immunglobulindomänen der schweren Kette den Fc-Teil (*Fragment Crystallizable*) darstellen, welcher glycosyliert ist. Nochmals kleiner als das Fab-Fragment ist ein scFv-Fragment (*single chain variable Fragment*, PDB-Code: 6J9O), das nur aus der jeweils ersten variablen Immunglobulindomäne der schweren und der leichten Kette besteht. Die minimalistische V_HH-Domäne (*Variable heavy chain Homodomain*, PDB-Code: 7O31) stammt aus Antikörpern von Kameliden, in welchen die leichte Kette nicht vorhanden ist. Die exponierten hypervariablen Peptidschleifen (CDRs, *Complementarity Determining Regions*) sind für die Wechselwirkungen mit dem jeweils erkannten Antigen zuständig (in allen vier Proteinstrukturen in orange hervorgehoben).

Die Gesamtstruktur des IgG kann in zwei Fragmente aufgeteilt werden. Die zwei C-terminalen Domänen der schweren Kette bilden das sogenannte *Fragment crystallizable* (Fc), welches hauptsächlich für die Vermittlung der Effektorfunktionen des zellulären Immunsystems verantwortlich ist. Jeweils eine leichte Kette bildet zusammen mit den zwei N-terminalen Domänen einer schweren Kette das *Fragment antigen-binding* (Fab). Dessen jeweils N-terminal gelegenen Immunglobulindomänen, V_H im Fall der schweren und V_L im Fall der leichten Kette, weisen je drei hypervariablen, exponierte Peptidschleifen auf. Somit ergeben sich sechs Peptidschleifen, auch *Complementarity Determining Region* (CDR) genannt, die zusammen das Paratop bilden und die spezifische und hochaffine Erkennung des Epitops im Antigen ermöglichen. Es hat sich gezeigt, dass alleine der Fab-Teil und, noch minimalistischer, ein rekombinantes Fusionsprotein aus V_H- und V_L- Domäne (scFv, *single chain variable Fragment*), für die Bindung des Epitops ausreichend ist. Eine erwähnenswerte Besonderheit

unter den in Wirbeltieren vorkommenden Immunglobulinen weisen jene der Kameliden auf, da sie neben den konventionellen IgG₁-Antikörpern auch Immunglobuline produzieren, welche lediglich aus zwei miteinander verbundenen schweren Ketten aufgebaut sind. In diesem besonderen Fall reicht die einzelne, nur 12-13 kDa große N-terminale Immunglobulindomäne aus, um das Antigen zu binden (Muyldermans, 2013). Diese sogenannten V_H-Einzeldomänen-Antikörper (V_HH) finden zum Beispiel als biochemische Reagenzien, als Affinitätsliganden oder als Kristallisationspartner Anwendung (Brilhante-da-Silva *et al.*, 2021; Ereño-Orbea *et al.*, 2018).

Die spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Paratop eines Antikörpers und dem Epitop des Antigens sind nicht-kovalenter Natur und basieren auf intermolekularen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen, Van-der-Waals Kontakten sowie hydrophoben Interaktionen. Insbesondere die strukturell hypervariablen Peptidschleifen der sechs CDRs bilden eine zusammenhängende Oberfläche aus, die komplementär zur Oberfläche des Antigens ist. Hierdurch wird eine große Menge an nicht-kovalenten Bindungen zwischen Paratop und Epitop ermöglicht. Gerade diese Vielzahl trägt zur energetischen Stabilisierung des Komplexes bei und bestimmt die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen.

Epitope lassen sich grundsätzlich in zwei Klassen einteilen: Kontinuierliche Epitope sind allein durch die Primärstruktur der zusammenhängenden Aminosäuresequenz definiert, während sich die diskontinuierlichen oder konformationellen Epitope aus Resten zusammensetzen, die voneinander in der Aminosäuresequenz getrennt sind und erst durch die Faltung des Proteins zur nativen Struktur zusammengebracht werden (Barlow *et al.*, 1986). Es hat sich nicht nur gezeigt, dass die überwiegende Mehrheit der B-Zell Epitope auf nativen Proteinen konformationeller Art sind (Huang & Honda, 2006) sondern auch, dass diese Art von Epitop immunologische Vorteile gegenüber kontinuierlichen Epitopen mit sich bringen kann, was beispielsweise die breitere Neutralisierung von Virusisolaten betrifft (Steimer *et al.*, 1991).

Strukturell ungeordnete kontinuierliche Epitope stellen eine besondere Herausforderung für die spezifische Erkennung durch Antikörper dar und werden von einigen humanpathogenen Krankheitserregern geradezu als Strategie zur Vermeidung einer potenten Immunantwort genutzt (Goh *et al.*, 2016; Guy *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2014). Die Flexibilität in wässriger Lösung und die fehlende Ausbildung von Sekundär- oder Tertiärstrukturen erschweren eine hochaffine und spezifische Erkennung solcher Peptidepitope durch Antikörper. Die hohen entropischen Kosten aufgrund des mit der Bindung einhergehenden Übergangs zu geordneter Struktur spielen hierbei eine wesentliche Rolle (Kwong *et al.*, 2002).

Nichtsdestotrotz finden strukturell wenig definierte Epitope in der Entwicklung von Peptidvakzinen Anwendung, spielen bei der Antikörperantwort auf Malariaimpfstoffe eine

wichtige Rolle und sind potentielle Bindestellen für therapeutische Antikörper (Foquet *et al.*, 2014; MacRaild *et al.*, 2018; Vazquez-Martinez *et al.*, 2020). Ein besseres strukturelles Verständnis der molekularen Mechanismen zur Erkennung ungeordneter Epitope wäre von großer Hilfe, um Licht auf das Zusammenspiel zwischen konformationeller Unordnung und Spezifität der molekularen Erkennung zu werfen. Dies wäre eine Unterstützung für das gezielte Design von Antikörper-Bibliotheken, oder könnte dabei helfen, die bioinformatische Simulation von Interaktionen mit intrinsisch ungeordneten Epitopeptiden zu verbessern (Mandaci *et al.*, 2020).

1.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Gentechnisch hergestellte Proteine finden breiten Einsatz in industriellen Anwendungen, der pharmazeutischen Wirkstoffentwicklung und der biochemischen Forschung. Um das produzierte Protein in möglichst reiner Form zu erhalten, bedarf es Methoden, um das rekombinante Protein von allen anderen Proteinen des Expressionsorganismus abzutrennen. Eine Möglichkeit zur selektiven Isolierung des gewünschten Proteins bietet die Affinitätschromatographie, welche sich die molekulare Erkennung von Biomolekülen zunutze macht und bereits seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzt wird (Rodriguez *et al.*, 2020). Diese Methodik ist eine Form der Flüssigchromatographie, in der ein immobilisierter Affinitätsligand als stationäre Phase dient. Dessen selektive Affinität zu einer Zielsubstanz macht man sich zunutze, um letztere aus einem komplexen Probengemisch zu isolieren. Grundvoraussetzung hierfür ist allerdings ein geeignetes biochemisches Affinitätspar, bei dem unter definierten Bedingungen eine Bindung des Zielmoleküls stattfindet. Durch gezielte Veränderung dieser chemischen Bedingungen wird andererseits aber auch dessen Elution von der Chromatographiematrix ermöglicht.

Während die ersten Affinitätspaare noch auf monospezifischen Liganden wie Analoga von Enzyminhibitoren basierten (Cuatrecasas *et al.*, 1968), wurden in den darauffolgenden Jahrzehnten sogenannte Affinitätsanhängsel entwickelt, die gruppenspezifisch sind und ein breites Anwendungsspektrum bieten. Solche peptidischen Affinitätsanhängsel können durch Genfusion, indem das zu produzierende Protein und das Affinitätsanhängsel in einem gemeinsamen Leseraster kodiert werden, einfach an ein rekombinantes Protein angefügt werden. Breite Anwendung findet beispielsweise das Oligohistidin-Affinitätsanhängsel, oftmals als His-tag bezeichnet, welches gewöhnlich aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten aufgebaut ist (Kimple *et al.*, 2013; Skerra *et al.*, 1991). Histidin ist als weiche Lewis-Base ein guter Ligand für Übergangsmetallionen wie Ni^{2+} , Co^{2+} oder Zn^{2+} , was zum Zweck der Affinitätschromatographie genutzt werden kann, indem ebendiese Metallionen mithilfe eines an die stationäre Phase gekoppelten Chelators immobilisiert werden.

Das mit dem Oligohistidin-Affinitätsanhängsel ausgestattete Zielprotein bindet an die immobilisierten Metallionen, während die restlichen im Probengemisch enthaltenen Proteine sich durch die Chromatographiesäule hindurchbewegen. Die Elution kann durch Anlegen eines Konzentrationsgradienten mit Imidazol, das mit Histidin um die Koordinierung der Metallionen kompetiert, erreicht werden.

Ebenfalls weit verbreitet sind auf dem Biotin-Bindeprotein Streptavidin und Biotin basierende Affinitätsanhängsel wie das *Strep*-tag (Schmidt & Skerra, 2007; Skerra & Schmidt, 2000). Die Affinität zwischen Streptavidin und Biotin ist mit einer Dissoziationskonstante im femtomolaren Bereich eine der stärksten bekannten biologischen Wechselwirkungen und aufgrund dessen für eine in der Affinitätschromatographie nötige reversible Bindung nicht direkt geeignet. Aus diesem Grund wurden Peptide aus acht bzw. neun Aminosäureresten mit Affinität zu Streptavidin entwickelt und haben sich – vor allem nach der Entwicklung einer optimierten Streptavidinmutante – als Affinitätsanhängsel für die Einschnitt-Reinigung rekombinant produzierter Proteine bewiesen (Schmidt & Skerra, 2007; Skerra & Schmidt, 2000). Des Weiteren sind als Affinitätsanhängsel genutzte große Fusionsproteine wie Glutathion S-Transferase (Smith & Johnson, 1988), das Calmodulin-Bindeprotein (Klein, 2003) oder das Maltose-Bindeprotein (Maina *et al.*, 1988) ebenfalls gut etabliert.

Bei all den Vorteilen, die Affinitätsanhängsel für die Reinigung rekombinanter Proteine mit sich bringen, kann deren Vorhandensein in einigen Fällen unerwünscht sein oder einen Nachteil für die geplante Anwendung darstellen. So kann die Fusion mit einem Affinitätsanhängsel negative Auswirkungen auf die biologische Aktivität und Struktur seines Fusionspartners oder die Immunogenität des Fusionsproteins haben (Fonda *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2000; Khan *et al.*, 2012). Für therapeutische Anwendungen muss das Affinitätsanhängsel in der Regel entfernt werden, was mit einer Kostensteigerung durch den Einsatz hierfür erforderlicher Proteasen und zusätzlichen Prozessschritten in der Weiterverarbeitung sowie Qualitätskontrolle einhergeht (Arnau *et al.*, 2006). Derzeit gibt es keine generisch anwendbare, kostengünstige Methode zur affinitätschromatographischen Reinigung von Proteinen ohne Affinitätsanhängsel.

Um trotzdem ein Produkt zu erhalten, das vollkommen frei von Affinitätsanhängseln ist, bietet sich eine andere Möglichkeit an: Das affinitätsbasierte Abfangen des Zielproteins unter Verwendung eines Affinitätsliganden, der spezifisch für dieses Protein oder diese Proteinklasse ist (Guan & Chen, 2014). Ein geeigneter Träger kann mit einem solchen Affinitätsliganden funktionalisiert werden, um dadurch eine maßgeschneiderte Affinitätsmatrix für das Zielprotein zu erhalten. Das beste Beispiel für eine solche Strategie ist die Nutzung des bakteriellen Antikörper-Bindeproteins Protein A zur Reinigung von Antikörpern (Ey *et al.*, 1978; Hober *et al.*, 2007). Protein A ist ein aus fünf homologen Domänen aufgebautes Zellwandprotein des pathogenen Bakteriums *Staphylococcus aureus* mit einer starken Affinität

zum Fc Teil von Antikörpern der humanen Immunglobulinklassen IgG₁, IgG₂ und IgG₄. Gerade aufgrund dieser von den variablen Regionen des Antikörpers unabhängigen Wechselwirkung eignet sich die Protein A Chromatographie als generischer Reinigungsprozess und hat sich als Industriestandard für die affinitätschromatographische Reinigung von Antikörpern etabliert (Gagnon, 2012).

Die Immunaффinitätschromatographie hingegen nutzt die sehr spezifische Affinität eines Antikörpers oder Antikörperfragments zu seinem Antigen, um letzteres anzureichern und von anderen Bestandteilen des Probengemisches abzutrennen (Moser & Hage, 2010). Ein großer Nachteil sind allerdings die oftmals notwendigen harschen Elutionsbedingungen bei beiden Verfahren, beispielsweise pH-Werte im Bereich von unter 3, chaotrope Reagenzien oder Denaturierungsmittel, um die starke Wechselwirkung zwischen Antikörper und zu reinigendem Zielprotein oder Protein A aufzubrechen (Hillman *et al.*, 2001). Möchte man auf solch schädigende Elutionsbedingungen verzichten, kommen im Fall der Immunaффinitätschromatographie kompetitiv bindende Substanzen als mögliche Elutionsreagenzien in Frage, die allerdings für jedes Paar aus Antikörper und Zielprotein/Antigen neu bestimmt und nur in Einzelfällen verfügbar sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit der Affinitätschromatographie eine robuste Technologie zur Reinigung von Proteinen zur Verfügung steht. Allerdings bringt diese in einigen Bereichen Limitationen mit sich und ist nicht allgemein einsetzbar. Die Entwicklung neuer, universell für eine ganze Proteinklasse einsetzbarer Affinitätschromatographietechniken, ohne Verwendung eines Affinitätsanhängsels, würde die Reinigung pharmazeutisch genutzter Proteine erleichtern und zu deren schnellen Entwicklung beitragen.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die PASylierung hat sich als vielversprechende biologische Alternative zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Biopharmazeutika gegenüber Polyethylenglycol (PEG) erwiesen. Um die präklinische und klinische Entwicklung PASylierter Biologika voranzutreiben, wäre es hilfreich, über spezifische Antikörper zu verfügen die den empfindlichen Nachweis PASylierter Wirkstoffe erlauben. In dieser Arbeit sollten monoklonale Antikörper gegen strukturell ungeordnete Pro/Ala-reiche Sequenzen (PAS) charakterisiert werden. Auf Basis einer durch den Kooperationspartner XL-protein GmbH in Auftrag gegebenen Immunisierung von Mäusen mit drei verschiedenen PAS-Polypeptiden sollten dabei gewonnene Hybridomzellen und die entsprechenden sekretierten Antikörper auf Bindungseigenschaften wie Affinität und Kreuzreaktivität untersucht werden.

Weiterhin galt es, für jede Art PAS-Polypeptid die vielversprechenden Antikörper auszuwählen und für diese die Nukleinsäuresequenz der variablen Regionen einerseits sowie die Aminosäuresequenz des Epitops andererseits zu bestimmen. Die daraufhin in *E. coli* produzierten Antikörperfragmente sollten zusammen mit ihrem jeweiligen Epitoppeptid kokristallisiert und die molekularen Mechanismen der Bindung mittels Röntgenkristallographie untersucht werden (Veröffentlichung 1).

Hinsichtlich einer weiteren praktischen Anwendung der identifizierten Antikörper war zudem geplant, eine auf deren spezifischen Wechselwirkungen mit PAS-Polypeptiden basierende generische Strategie zur affinitätsbasierten Reinigung PASylierter Proteine zu entwickeln (Veröffentlichung 2).

2 Material und Methoden

Diese publikationsbasierte Dissertation basiert auf zwei wissenschaftlichen Veröffentlichungen, in denen diverse molekularbiologische, proteinbiochemische, genetische und strukturelle Methoden angewendet wurden. Diese Methoden sind im Detail in den hier eingebundenen Veröffentlichungen sowie den dazugehörigen ergänzenden Informationen beschrieben. Aus diesem Grund werden in diesem Kapitel nur die wichtigsten aktuellen Methoden erläutert. Weitere Beschreibungen von molekularbiologischen, gentechnischen und proteinbiochemischen Standardmethoden können vorangegangenen Doktorarbeiten am Lehrstuhl für Biologische Chemie der Technischen Universität München entnommen werden, beispielsweise von Dr. M. Schlapschy, Dr. M. Gebauer, Dr. L. Friedrich und Dr. J. Breibeck.

2.1 Bakterienstämme und Vektoren

Escherichia coli B Stämme:

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

Escherichia coli K Stämme:

JM83 *ara*, Δ (*lac-proAB*), *rpsL* (= *strA*), $\Phi 80$, *lacZ* Δ M15
(Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

KS272 F^- , Δ *lacX74*, *galE*, *galK*, *thi*, *rpsL*(= *strA*), Δ *phoA*(*pvull*)
(Meerman & Georgiou, 1994)

Origami B F^- , *ompT*, *lon*, *hsdS_B*($r_B^- m_B^-$), *gal*, *dcm*, *lacY1*, *ahpC*,
gor522:Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R) (Bessette *et al.*, 1999)

XL1-Blue *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_K, m_K^+), *supE44*,
relA1, Δ (*lacZYA-argF*)U169 [F^- :*proAB*⁺, *lacI^q*, *lacZ* Δ M15,
Tn10 (tet^r)] (Bullock, 1987)

2.2 Oligodesoxynukleotide

Satz von Primern zur Amplifizierung von variablen Immunglobulinomänen der Maus (Chardès *et al.*, 1999):

Für degenerierte Nukleotide wurden folgende Abkürzungen verwendet: R = A/G; Y = T/C; K = T/G; W = A/T; M = C/A; S = C/G; V = A/C/G.

VH1.1 5'-ACT GCA GGT RTC CAC TCC-3'

VH1.2 5'-ATA GCA GGT GTC CAC TCC-3'

VH1.3 5'-RCT ACA GGT GTC CAC TCC-3'

VH1.4 5'-GCY ACA GMT GTC CAC TCC-3'

VH1.5	5'-ACT GCA GGT GTC CWM TCC-3'
VH1.6	5'-RCT RCA GGT GTK CAC TCC-3'
VH1.7	5'-GCT AWM GGT GTC CAC TCC-3'
VH1.8	5'-CC TCA GGT GTC CAC TCC-3'
VH1.9	5'-GCT ACA GGT GCT CAC TCC-3'
VH1.10	5'-ACT GCA GGT GTC CTC TCT-3'
VH1.11	5'-AYT GCA GGT GTC CAY TGC-3'
VH1.12	5'-GCT AMM GGT GTC CAC TTC-3'
VH1.13	5'-CTC CTG TCA KTA ACT KCA GGT-3'
VH1.15	5'-AAC TGC AGG TGT CTC TCT-3'
VH1.16	5'-RCT RCA GGY GTC CAC TCT-3'
VH2.1	5'-CCA AGC TGT ATC CTT TCC-3'
VH2.2	5'-CCA AGC TGT GTC CTR TCC-3'
VH3.1	5'-TGT TGA CAG YCV TTC CKG GT-3'
VH3.2	5'-TGT TCA CAG CCT TTC CTG GT-3'
VH4	5'-TTT AAA AGG GGT CCA GTG T-3'
VH5.1	5'-TAY TTT AAA ARG TGT CMA GTG T-3'
VH5.2	5'-GTT TTA AAA GGT GTC CTG TG-3'
VH6	5'-CTY TTA AAA GGK GTC CAG WG-3'
VH7.1	5'-CYT TTA MAT GGT ATC CAG TGT-3'
VH7.2	5'-CTT TTA CAT GGT TTC AAG TGT-3'
VH8	5'-YTG TCC CTG CAT ATG TCY T-3'
VH9	5'-ATG GCA GCW GCY CAA AG-3'
VH10	5'-TTT ATC AAG GTG TGC ATT GT-3'
VH11	5'-CTT TTA AAA GWT GTC CAG KGT-3'
VH12	5'-GTG ACA GTC CTT CCT GGT AG-3'
VH14	5'-CTT CCT GAT GGC AGT GGT T-3'
VH15	5'-AGC TAC AGG TAT CCA ATC C-3'
Vk1.1	5'-CTG WTG TTC TGG ATT CCT G-3'
Vk1.2	5'-GGT CAG ACA GTC AGC AGT-3'
Vk2	5'-GTG CTC TGG ATT CGG GAA-3'
Vk4/5	5'-TCA GCT TCY TGC TAA TCA GTG-3'
Vk4/5	5'-CTA ATC AGT GCT TCA GGA-3'
Vk8.1	5'-TGG GTA TCT GGT RCS TGT G-3'
Vk8.2	5'-AAA TTT AAA AGT ACC TGT GGG-3'
Vk9A/9b.1	5'-GTT TCM AGG TRC CAG ATG T-3'
Vk9A/9b.2	5'-GCT CTG GTT YCC AGG TAT C-3'

Vk10	5'-TGT TTT CAA GGT RCC AGA TGT-3'
Vk11	5'-GTT GTA ATG TCC AGA GGA-3'
Vk12/13.1	5'-GCT TAC AGG TGC CAG ATG T-3'
Vk12/13.2	5'-TCA ATT GTA GRT GCC AGA TGT-3'
Vk12/13.3	5'-TTA CAG TAG GTG TCA GAT GT-3'
Vk12/13.4	5'-CAG TCG TAG TTG TCA GAT GT-3'
Vk12/13.5	5'-CCT CCT TCT TGG CCA AGA-3'
Vk19/28.1	5'-TTA TAT GGA GCT GAT GGG-3'
Vk19/28.2	5'-GTG TCT GGT GCT CAT GGG-3'
Vk19/28.3	5'-CTS TGG TTG TCT GGT GTT GA-3'
Vk20	5'-GTC TCT GAT TCT AGG GCA-3'
Vk21.1	5'-TGC TKC KCT GGG TTC CAG-3'
Vk21.2	5'-TTG CAG GTG TTG ACG GA-3'
Vk22.1	5'-GTA GGT GCC TCG TGC AC-3'
Vk22.2	5'-TGT CTG GTG CCT GTG CA-3'
Vk23	5'-TGG AYT YCA GCC TCC AGA-3'
Vk24/25.1	5'-WTC TCT RGA GTC AGT GGG-3'
Vk24/25.2	5'-CTG GAT CCC TGG AKC YAC T-3'
Vk32	5'-TGT TCT GCT TTT TAG GTG TG-3'
Vk33/34	5'-GAA TCC CAG GCA TGA TAT GT-3'
Vk31/38C	5'-GCT TCA TGG TGC TCA GTG T-3'
VkRF	5'-GAT ATC AGG TGC CCA GTG T-3'

Außerdem wurden folgende Primer aus dem Bestand des Lehrstuhls verwendet (Loers *et al.*, 2014):

RMG	5'-AGG TCG CCA CAC GTG TGG-3'
RMK	5'-GAC CTC CAC GGA GTC AGC-3'

2.3 Charakterisierung von Antikörpern aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen

Anti-PAS Antikörper aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen wurden zwecks Bestimmung der Affinität und Kreuzreaktivität gegenüber PAS-Polypeptidsequenzen mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR) und *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) charakterisiert. Da es sich bei einem Kulturüberstand um ein komplexes Probengemisch handelt, in dem neben den zu untersuchenden Antikörpern zahlreiche weitere Proteine und makromolekulare Bestandteile enthalten sind, mussten geeignete Methoden gefunden werden, um die Antikörper im Assay selektiv aus dem Probengemisch zu

immobilisieren. Hierbei wurden sowohl in der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie als auch im ELISA anti-Maus IgG spezifische Fangantikörper eingesetzt. Auf diese Weise konnte im Fall des ELISA zudem sichergestellt werden, dass eine definierte Maximalmenge Antikörper aus dem Überstand auf der Mikrotiterplatte adsorbiert wurde. Dies erlaubte eine Charakterisierung der Bindungsaktivität unabhängig von der Konzentration des Antikörpers im Überstand.

Charakterisierung von Antikörpern aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (SPR)

Alle Messungen wurden bei 25 °C an einem Biacore X100 Instrument (GE Healthcare, München) durchgeführt und die Ergebnisse mittels der Biacore X100 Evaluation Software (Version 2.0.1) ausgewertet. Als Laufpuffer und zur Verdünnung der Proben diente HBSET-Puffer (0.01 M HEPES/NaOH pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005 % v/v Tween-20). Über die Carboxylgruppen der Carboxydextran-Matrix eines CM3 Sensorchips (GE Healthcare) wurde der anti-Maus IgG-Fangantikörper gemäß Herstellerprotokoll (Maus Antibody Capture Kit, GE Healthcare) durch Aminkopplung mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) kovalent immobilisiert. Verbliebene NHS-Estergruppen wurden durch Injektion von 1 M Ethanolamin abgesättigt. Dies erlaubte das reversible Einfangen von Antikörpern aus dem Kulturüberstand von Maus-Hybridomzellen an der Chip-Oberfläche und eine Echtzeitanalyse seiner Bindungswechselwirkung mit den jeweiligen Antigenen in unterschiedlichen Konzentration. Hierzu wurde der Fangantikörper in beiden Kanälen der Flusszelle des Sensorchips immobilisiert und anschließend nur in einem Kanal Antikörper aus dem Zellkulturüberstand adsorbiert, um den zweiten Kanal später als Referenz nutzen zu können. Eine Zugabe von Antigenen in unterschiedlichen Konzentrationen erfolgte bei der anschließenden Messung in beiden Kanälen. Hybridom-Kulturüberstände wurden im Verhältnis 1:5 in HBSET-Puffer verdünnt und 30 µl dieser Lösung bei einer Flussrate von 10 µl/min injiziert, um darin enthaltene anti-PAS Antikörper zu adsorbieren. Anschließend wurden abhängig von dem zu untersuchenden Antikörper mittels Einzelzyklus-Kinetik (Karlsson *et al.*, 2006) 45 µl eines der folgenden PAS-Fusionsproteine bei einer Flussrate von 30 µl/min und in Konzentrationen von 100 nM, 20 nM, 4 nM, 800 pM und 125 pM injiziert: PAS#1(200)-IL1Ra, P/A#1(200)-IL1Ra, P/A#1(600)-GMCSF, APSA(200)-IL1Ra und hu4D5-P/A#1(200) (Breibeck & Skerra, 2018; Schlapschy *et al.*, 2013). Um den adsorbierten Antikörper nach der Messung abzulösen und damit die Oberfläche des Sensorchips für eine nächste Analyse zu regenerieren, wurde 50 µl 10 mM Glycin/HCl pH 1,7 mit einer Flussrate von 30 µl/min injiziert. Die Messsignale wurden nach Subtraktion des Referenzwerts aus Kanal 2 und eines mit HBSET bestimmten Leerwertes der Kurvenanpassung nach einem Bindungsmodell mit bivalenten Analyten zur Bestimmung der

Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) unterzogen. Die Dissoziationskonstante K_D ergab sich anschließend aus dem Quotienten k_{off}/k_{on} .

Bestimmung der Bindungsaktivität von Antikörpern aus Hybridom-Überständen durch Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Vertiefung einer NUNC Maxisorp F 96-Well Mikrotiterplatte wurde über Nacht mit 50 μ l einer in PBS auf 5 μ g/ml verdünnten Lösung eines Fc-spezifischen anti-Maus IgG Fangantikörpers (polyklonal, aus Ziege) beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden nach zwei Waschschrritten mit PBS (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl) durch Inkubation mit 200 μ l 3 % w/v BSA in PBS/T (PBS mit 0,1 % v/v Tween-20) für 1 h blockiert, gefolgt von fünf Waschschrritten mit PBS/T. Der den anti-PAS Antikörper enthaltende Hybridom-Überstand wurde 1:100 in PBS/T verdünnt und je 50 μ l dieser Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 h und fünfmaligem Waschen mit PBS/T wurde jede Reihe der Platte für 1 h mit einer 1:2 Verdünnungsreihe (beginnend bei 8 nM) und, je nach Bedarf, mit einem der folgenden Antigene in PBS/T inkubiert: digoxigeniertes APSA(200)-II1Ra, hu4D5-PAS#1(200), hu4D5-P/A#1(200) (Breibeck & Skerra, 2018; Schlapschy *et al.*, 2013). Nach fünf Waschschrritten mit PBS/T erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-human kappa leichte Kette Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma-Aldrich, Darmstadt), 1:1000 in PBS/T, oder anti-Digoxigenin Fab Fragment Alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim), 1:500 in PBS/T). Die Nachweisreaktion wurde nach 5 Waschschrritten mit PBS durch Zugabe von 0,5 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) gestartet, und die Absorption bei 405 nm wurde für eine Dauer von 15 min in Intervallen von 1 min mit einem Synergy 2 Mikroplatten-Lesegerät (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) aufgezeichnet.

Die Änderung der Absorption mit der Zeit ($\Delta A_{405}/\Delta t$) wurde gegen die Konzentration des in der Verdünnungsreihe eingesetzten PASylierten Proteins aufgetragen. Für die Bildung des Komplexes (P·L) zwischen Bindeprotein (P) und immobilisiertem Ligand (L) wurde ein einfaches Gleichgewicht angenommen. Die Dissoziationskonstante wurde gemäß der Gleichung

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

durch nichtlineare Regression bestimmt (Voss & Skerra, 1997), wobei $[P]_t$ und $[L]_t$ die Gesamtkonzentrationen an Bindeprotein (Antikörper) bzw. Ligand (Antigen) sind. Der K_D -Wert ergibt sich hierbei aus der in der Verdünnungsreihe eingesetzten und bekannten Konzentration anhand des jeweiligen Absorptionwertes, der zur Konzentration des Komplexes $[P \cdot L]$

proportional ist. Für die iterative Kurvenanpassung wurden die Softwarepakete OriginPro2020 und KaleidaGraph verwendet.

2.4 Charakterisierung von in *E. coli* produzierten Antikörperfragmenten

Im Gegensatz zu den Antikörpern aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen (siehe Abschnitt 2.3) lagen die entsprechenden in *E. coli* rekombinant produzierten Antikörperfragmente in mittels Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie gereinigter Form vor. Dies erlaubte eine vereinfachte Charakterisierung der Bindungseigenschaften, da beispielsweise auf einen Fangantikörper verzichtet werden konnte. So wurde ein direkter ELISA angewendet, bei dem das Antigen direkt an der Platte immobilisiert wird. Im Fall der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie wurden die PASylierten Proteine als Liganden ebenfalls direkt auf einem Chip immobilisiert, um durch anschließende Zugabe des Antikörperfragments als Analyt dessen monovalente Affinitätskonstante bestimmen zu können.

Charakterisierung von in *E. coli* hergestellten Antikörperfragmenten mittels SPR

Um die Bindungseigenschaften der Antikörperfragmente zu untersuchen, wurden die PASylierten Proteine PAS#1(200)-IL1Ra, P/A#1(200)-IL1Ra und Thioredoxin A (TrxA)-APSA(200) (Breibeck & Skerra, 2018) mit der 20fachen molaren Menge Succinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate biotinyliert und jeweils einzeln als Ligand in einem Kanal eines Biotin CAPture Chip immobilisiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Antikörperfragments mittels Einzelzyklus-Kinetik (Karlsson *et al.*, 2006) bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ in den Chip injiziert. Zur Vorbereitung für die Immobilisierung eines neuen biotinylierten Liganden erfolgte die Regenerierung des Chips durch zwei aufeinanderfolgende Injektionen von 30 % v/v Acetonitril, 0,25 M NaOH und 6 M Guanidin-HCl. Eine Auswertung der Daten erfolgte nach Subtraktion des Referenzkanals sowie eines mit HBSET aufgenommenen Leerwertes durch Anpassung der Kurven nach einem 1:1 Bindungsmodell in der Software Biacore X100 Evaluation.

Bestimmung der Bindungsaktivität von Fab Fragmenten im direkten ELISA

Die Vertiefungen einer NUNC Maxisorp F 96-Well Mikrotiterplatte wurden mit je 50 μl einer auf 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS verdünnten Antigenlösung von P/A#1(600), PAS#1(600)-Leptin oder APSA(200)-IL1Ra (Breibeck & Skerra, 2018; Morath *et al.*, 2015) entweder über Nacht bei 4 $^{\circ}\text{C}$ oder für 2 h bei Raumtemperatur beschichtet. Auf einen Waschschrift mit PBS/T folgte eine Inkubation mit 200 μl 3 % w/v BSA in PBS/T für 1 h, um freie Bindungsstellen auf der Platte zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/T wurde jede Reihe der Mikrotiterplatte für 1 h mit 50 μl einer fortlaufenden 1:2 Verdünnungsreihe (beginnend mit einer geeigneten

Konzentration, typischerweise 100 nM) des zu untersuchenden Fab Fragments in PBS/T inkubiert. Ungebundene Antikörperfragmente wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS/T entfernt und die Platte für 1 h mit je 50 µl einer 1:1000 Verdünnung eines anti-human kappa leichte Kette Alkalische Phosphatase Konjugats (Sigma-Aldrich) in PBS/T inkubiert. Auf je zwei Waschschriffe mit PBS/T und PBS wurde die Nachweisreaktion durch Zugabe von *p*-Nitrophenylphosphat (0,5 mg/ml in AP-Puffer) gestartet. Die Absorption bei 405 nm wurde über eine Dauer von 15 min in Intervallen von 1 min mit einem Synergy 2 Mikroplatten-Lesegerät aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte analog zur Kurvenanpassung des ELISA mit den Antikörpern aus dem Kulturüberstand (siehe Abschnitt 2.3).

2.5 Epitop-Kartierung mit dem SPOT-Verfahren

Um die Aminosäuresequenz des von den anti-PAS Antikörpern gebundenen Peptidepitops zu bestimmen, wurde eine Epitop-Kartierung mit dem SPOT-Verfahren durchgeführt (Frank, 2002). Arrays aus 12mer Peptiden, welche den kompletten Bereich der repetitiven 20 Aminosäuren der PAS#1 und P/A#1 Sequenz abdeckten (Schlapschy *et al.*, 2013), wurden als um jeweils eine Aminosäure versetzte Peptide in räumlich separierten Spots auf einer hydrophilen Zellulosemembran synthetisiert. Im Fall der APSA-Sequenz wurde aufgrund des einfacheren hochrepetitiven Aufbaus der Aminosäuresequenz dagegen eine Substitutionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurde ein an den Positionen 3-8 durch alle 20 proteinogenen Aminosäuren substituiertes Peptid mit der Sequenz AAPSAAPSAA synthetisiert. In allen drei Synthesen wurden Aminosäurederivate verwendet, deren terminale Aminogruppe durch eine Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Schutzgruppe blockiert war. Im Fall von Aminosäuren mit reaktiven Seitenketten wurden weitere Schutzgruppen verwendet die während der gesamten Synthesephase stabil waren. Eine Aktivierung der freien terminalen Carboxylgruppe der zu koppelnden Aminosäure erfolgte durch Veresterung des in *N*-Methyl-2-Pyrrolidon (NMP) gelösten Derivats mit Hydroxybenzotriazol (HOBt) in Anwesenheit von *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) als Aktivator. Die Ausbildung der neuen Peptidbindung geschah durch Reaktion des so erhaltenen Aktivesters mit den Aminogruppen der derivatisierten Zellulosemembran bzw. der freien N-terminalen Aminogruppe des wachsenden Peptids, welches vorher mit 20 % v/v Piperidin in Dimethylformamid (DMF) von der Fmoc-Gruppe entschützt wurde. Nach jedem Kopplungsschritt erfolgte eine Acetylierung verbliebener freier Aminogruppen durch Zugabe von 5 % v/v Essigsäureanhydrid in DMF. Um eine im natürlichen Polypeptid nicht vorkommende Ladung der synthetisierten Peptide am N-Terminus zu vermeiden, wurde diese Acetylierung quantitativ nach dem letzten Kopplungsschritt durchgeführt. Die gesamte Synthese wurde automatisiert mit dem MultiPep RS Peptidsyntheseroboter (Intavis, Köln) durchgeführt, wobei die Planung, Berechnung der benötigten Reagenzien und die Programmierung der Syntheseschritte anhand der Peptidsequenzen mit Hilfe der MultiPep-Software erfolgten.

Nach der automatisierten Synthese wurde die Membran in Ethanol (p.a.) gewaschen, getrocknet und jegliche verbliebenen Schutzgruppen mittels zweistündiger Inkubation mit einer Lösung aus 95 % v/v Trifluoressigsäure, 3 % v/v Triisopropylsilan und 2 % v/v H₂O in einer verschlossenen Polypropylen-Box (unter dem Abzug) abgespalten. Es folgten vier Waschschriffe mit je 20 ml Dichlormethan, gefolgt von 4 Waschschriffen mit DMF und zweimaligem Waschen mit Ethanol. Die Membran wurde anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet, gegebenenfalls zugeschnitten und entweder sofort verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Danach erfolgte die Inkubation mit den anti-PAS Antikörpern beziehungsweise Antikörperfragmenten. Hierzu wurde die Membran nach dreimaligem Waschen mit TBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0) bei 4 °C über Nacht in MBS (TBS mit 0.05 % v/v Tween-20, 1 % w/v Saccharose) mit 10 % v/v Western Blocking Reagenz (Roche, Penzberg) inkubiert. Nach Waschen mit MBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit einer 1:5000 Verdünnung des Antikörpers aus dem Hybridom-Überstand oder einer 1 µg/ml Lösung des rekombinanten Antikörperfragments in MBS. Auf dreimaliges Waschen mit MBS folgte die Inkubation mit einer 1:1000 Verdünnung eines geeigneten Sekundäntikörpers (anti-Maus IgG Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma-Aldrich) im Fall der Antikörper aus dem Hybridom-Überstand; anti-human kappa leichte Kette Alkalische Phosphatase Konjugat (Sigma-Aldrich) im Fall der rekombinanten Fabs) in MBS für 1 h. Die Membran wurde daraufhin mit TBS-T (TBS mit 0.05 % Tween-20) gewaschen und in AP-Puffer äquilibriert. Durch Zugabe von 10 µl Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, 75 mg/ml in 70 % (v/v) DMF) und des AP-Substrats 60 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP, 50 mg/ml in DMF) pro 20 ml AP-Puffer wurde die Färbereaktion gestartet, wobei diejenigen Peptid-Spots sichtbar gemacht wurden, an die ein anti-PAS Antikörper oder Antikörperfragment gebunden hatte.

2.6 Amplifizierung und Sequenzierung variabler Immunglobulin-Regionen der Maus

Um die Sequenz der variablen Regionen der von Hybridomzellen sekretierten Antikörper zu bestimmen, wurde die nach Isolierung der Gesamt-Zell-RNA erzeugte cDNA mit geeigneten Primern amplifiziert und anschließend sequenziert. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Hybridomzellen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Hierbei wurden die Hybridomzellen mit Hilfe einer Spritze mit stumpfer Kanüle (0,9 mm Durchmesser) nach Angaben des Herstellers homogenisiert. Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde mit dem NanoDrop 2000 Photometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt und diese anschließend sofort für die Synthese der cDNA weiterverwendet oder bei -20 °C eingefroren.

Mittels reverser Transkription wurde zur Gesamt-RNA komplementäre cDNA synthetisiert. Hierfür wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) unter Befolgung des Herstellerprotokolls verwendet. Für die Synthese der cDNA mithilfe der reversen Transkriptase aus dem *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) wurden 1-3 µg der isolierten Gesamt-RNA sowie ein (dT)₁₈-Oligodesoxynukleotid als Primer verwendet. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Ausgehend davon wurde mit einem Satz an 63 Vorwärts-Primern, die die Keimbahnsequenzen der leichten und schweren variablen Immunglobulinregionen der Maus weitgehend abdecken (siehe Abschnitt 2.2; Chardès *et al.*, 1999), zusammen mit den Rückwärts-Primern RMG und RMK, mittels PCR amplifiziert. Um hierbei zeit- und ressourcenschonend zu arbeiten, wurden die Vorwärts-Primer für die leichten und schweren variablen Regionen in jeweils drei Untergruppen mit 5-15 verschiedenen Oligodesoxynukleotiden zusammengefasst und gemischt. Diejenige Untergruppe, welche in einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese Banden mit der zu erwartenden Länge zeigte, wurde anschließend durch Verwendung der einzelnen Primer eingegrenzt, bis ein Paar aus Vorwärts- und Rückwärts-Primern identifiziert werden konnte, das zur spezifischen Amplifizierung der variablen Region führte. Das mit diesem Primer-Paar amplifizierte DNA-Fragment wurde anschließend mit dem Wizard SV Gel und PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) von Primern und Polymerase gereinigt und in Verbindung mit dem jeweiligen spezifischen Vorwärts- oder Rückwärts-Primer mittels Mix2Seq Kit (Eurofins Genomics, Ebersberg) von beiden Seiten sequenziert. Die PCR-Ansätze zur Amplifizierung der variablen Immunglobulinregionen wurden mit 100 ng cDNA, 0,5 µM der Primer-Mischung oder der spezifischen Primer und Q5 Polymerase mit einer finalen Konzentration von 0,02 U/µl in einem Reaktionsvolumen von 30 µl durchgeführt. Auf eine initiale Denaturierung für 30 s bei 98 °C folgten 30 Zyklen mit Denaturierung (98 °C, 10 s), Hybridisierung (60 °C, 30 s) und Elongation (72 °C, 30 s) sowie eine abschließende Vervollständigung der Syntheseprodukte bei 72 °C für 10 min. Um Kontaminationen der verwendeten Reagenzien ausschließen zu können, wurden jeweils parallel Reaktionsansätze ohne cDNA als Negativkontrolle angesetzt und ebenfalls durch analytische Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

2.7 Gentechnische Herstellung und chromatographische Reinigung von Proteinen

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden entweder cytoplasmatisch oder im periplasmatischen Raum von *E. coli* produziert. In letzterem Fall wurde eine Sekretion des Proteins durch Fusion des Strukturgens mit dem Genabschnitt der Signalsequenz des *Outer Membrane Protein A* (OmpA) oder der Alkalischen Phosphatase (PhoA) erreicht (Skerra, 1994). Durch selektive Permeabilisierung der äußeren Bakterienmembran kann anschließend ein Periplasmaextrakt präpariert werden, der die rekombinanten Proteine enthält. Um bei der

Produktion von Fab-Fragmenten die korrekte Ausbildung sowohl inter- als auch intrachenarer Disulfidbindungen zu begünstigen, war die Expression im oxidierenden Milieu des periplasmatischen Raums unabdingbar (Skerra, 1994). Die kodierenden Sequenzen der variablen leichten und schweren Immunglobulinregionen wurden zur Expression als chimäres Fab, d.h. mit den humanen C κ - und CH1 γ 1-Domänen, auf dem generischen Vektor pASK88 (Schiweck & Skerra, 1995) kloniert. Die Sequenzen der variablen Regionen der Hybridom-Klone 1.2, 2.1 und 3.1 waren bereits bekannt und wurden mit zur Subklonierung auf dem Vektor pASK88 geeigneten Restriktionsschnittstellen als synthetische Gene (Thermo Fisher Scientific) bestellt. An die kodierenden Sequenzen der Klone, deren Sequenz durch Amplifizierung der variablen Domänen ausgehend von der cDNA bestimmt worden war, wurden mittels geeigneter Primer Restriktionsschnittstellen angefügt. Diese Vorgehensweise ist in vorausgegangenen Arbeiten ausführlich beschrieben (Loers *et al.*, 2014; Peplau *et al.*, 2020). Alle klonierten Antikörpersequenzen sind mit Translation im Anhang angegeben.

2.7.1 Produktion von rekombinanten Fab-Fragmenten in *E. coli* im Schüttelkolben

Ausgehend von einer frisch transformierten Einzelkolonie des *E. coli* K12-Stamms JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) wurde 50 ml LB-Medium (Sambrook & Russell, 2001), supplementiert mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin), inokuliert und diese Vorkultur bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Nach Zusatz des entsprechenden Antibiotikums wurde 2 L TB-Medium mit 4 ml der Vorkultur inokuliert und diese Hauptkultur bei 22 °C und 180 rpm über Nacht kultiviert. Nach Erreichen eines OD₅₅₀-Werts von 1,5 - 2 wurde die rekombinante Genexpression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (Acros Organics, Geel, Belgien) mit einer Konzentration von 200 µg/l induziert. Nach 3 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm für 20 min sedimentiert und der Überstand vollständig entfernt. Das erhaltene Zellsediment wurde unter Kühlung auf Eis mit 25 ml eiskaltem Periplasma-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch zwei 15-minütige Zentrifugationsschritte bei 4 °C und 5000 bzw. 11000 rpm wurden die Spheroplasten vom Periplasmaextrakt abgetrennt und letzterer zur darauffolgenden Reinigung mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie gegen das 100-fache Volumen des entsprechenden Chromatographiepuffers dialysiert (siehe Abschnitt 2.7.4).

2.7.2 Produktion von rekombinanten Fab-Fragmenten in *E. coli* im Laborfermenter

Die Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli* im Laborfermenter wurde bis auf kleine Änderungen nach einem publizierten Protokoll durchgeführt (Schiweck & Skerra, 1995). Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Lösungen kann dieser Publikation entnommen werden. Fermentationen wurden mit dem *E. coli* Stamm KS272 (Meerman & Georgiou, 1994) in einem 10 l Fermenter in Mineralsalzlösung (31 mM Na₂HPO₄, 19 mM KH₂PO₄, 25 mM NH₄Cl, 5 mM Na₃-Citrat) durchgeführt, der Glucose und Ammoniak als Kohlenstoff- bzw.

Stickstoffquelle zugeführt wurden. Um während der gesamten Fermentation gleichbleibende Bedingungen zu gewährleisten, erfolgte eine Überwachung von Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck durch geeignete Regeleinheiten (Hamilton, Reno, NV). Hierbei wurde der pH-Wert durch Titration mit 12,5 % w/v Ammoniak bzw. 25 % w/v Orthophosphorsäure auf einen Wert von 7,0 eingestellt. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Begasung mit Druckluft bzw. reinem Sauerstoff sowie durch Anpassung der Rührgeschwindigkeit im Bereich von 400-800 rpm bei einem Wert von ≥ 30 % des sauerstoffgesättigten Partialdrucks in dem noch nicht angeimpften Kulturmedium gehalten.

Als Vorvorkultur wurden ausgehend von einer frisch transformierten Einzelkolonie des *E. coli* Stamms KS272 4 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztes LB-Medium inokuliert und für 6 h bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. 400 µl dieser Vorvorkultur wurde anschließend verwendet, um eine Vorkultur in 360 ml Mineralsalzlösung, supplementiert mit 40 ml 20 %iger w/v Glucoselösung, 4 ml 1 M MgCl₂, 400 µl einer 10 mg/ml Thiaminhydrochlorid-Lösung sowie dem entsprechenden Antibiotikum zu inokulieren. Diese Vorkultur wurde für 20 h bei 30 °C und 180 rpm kultiviert.

Das Fermentergefäß wurde mit 7 l Mineralsalzlösung gefüllt, im Autoklaven sterilisiert und das Kulturmedium durch Zugabe von 800 ml 20 %iger w/v Glucoselösung, 80 ml 1 M MgCl₂, 8 ml einer 10 mg/ml Thiaminhydrochlorid-Lösung, 4 ml einer 35 g/l Fe₃Cl-Lösung, 4 ml einer 8 g/l Zn-Acetat-Lösung, 10 ml Spurenelementlösung (Schiweck & Skerra, 1995) und dem entsprechenden Antibiotikum komplettiert. Nachdem das Kulturmedium in dem mit Sensoren bestückten Fermenter auf einen pH-Wert von 7,0 und eine Temperatur von 30 °C eingestellt war, wurde der Fermenter mit der gesamten Vorkultur inokuliert und Schaumbildung durch Zugabe von 1 ml einer 20 %igen Antifoam Y-30 Lösung (Sigma Aldrich) unterdrückt. Die Temperatur wurde nach der Inokulation für weitere 2 h bei 30 °C belassen, anschließend über einen Zeitraum von 2 h linear auf 25 °C gesenkt und für die restliche Dauer der Fermentation auf 25 °C belassen. Um eine ausreichende Versorgung der Bakterienkultur mit Kohlenstoff zu gewährleisten, wurde eine 50 %ige w/v Glucoselösung bei Erreichen einer Zelldichte von OD₅₅₀ = 7,5 mit 14 ml/h, 20 ml/h bei OD₅₅₀ = 12,5, 30 ml/h bei OD₅₅₀ = 18,5 und 40 ml/h ab OD₅₅₀ = 22,5 zugeführt. Zusätzlich wurden der Kultur bei Erreichen von OD₅₅₀ = 15 nochmals 4 ml der Fe₃Cl- und Zn-Acetat-Lösungen, 10 ml Spurenelementlösung und 4 ml des entsprechenden Antibiotikums zugesetzt. Die Expression des Fab-Fragments wurde bei Erreichen von OD₅₅₀ = 30 durch Zugabe von Anhydrotetracyclin mit einer Konzentration von 0,5 mg/l induziert. Die Kultivierung wurde für 2,5 h weitergeführt und die Bakterienzellen anschließend durch Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm (Sorvall™ RC 12BP Plus mit H-12000 Rotor; Thermo Fisher Scientific) für 30 min sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das erhaltene Zellsediment in einem geeigneten Volumen von eiskaltem Periplasma-Aufschlusspuffer (Volumen [ml] = OD₅₅₀ x Kulturvolumen [l] x 2), versetzt

mit 250 µg/ml Lysozym und 15 mM EDTA, unter ständiger Kühlung auf Eis resuspendiert und für 30 min bei 4 °C auf einem Magnetrührer inkubiert. Der Periplasmaextrakt wurde anschließend durch drei Zentrifugationsschritte bei 4 °C und 5000 rpm (Sorvall™ RC 6 Plus mit SLA-1500 Rotor), gefolgt von zwei Zentrifugationen bei 11000 rpm, bei einer Dauer von jeweils 40 min von den Sphäroplasten getrennt. Der so erhaltene Periplasmaextrakt wurde durch fünfmalige Dialyse gegen je 5l Chromatographiepuffer für die Metallchelataffinitätschromatographie vorbereitet und durch einen 0,45 µm Filter filtriert.

2.7.3 Gentechnische Herstellung PASylierter Proteine

Die gentechnische Herstellung und Reinigung der in dieser Arbeit im ELISA, SPR oder Western Blot verwendeten PASylierten Proteine ist hinreichend in vorausgegangen Doktorarbeiten und Veröffentlichungen beschrieben worden (Breibeck & Skerra, 2018; Morath *et al.*, 2015; Rauth *et al.*, 2016; Schlapschy *et al.*, 2013). Nur die gentechnische Herstellung des PASylierten grün-fluoreszierenden Proteins (*Green Fluorescent Protein*, GFP) wurde in keiner vorausgegangen Arbeit dokumentiert. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung und chromatographischen Reinigung dieses rekombinanten Proteins findet sich in Veröffentlichung 2 (Schilz *et al.*, 2022).

2.7.4 Chromatographische Reinigung von Antikörperfragmenten und PASylierten Proteinen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten chromatographischen Verfahren wurden FPLC-Anlagen des Modells ÄKTA Pure (GE Healthcare) verwendet. Chromatographieläufe wurden mit einer vom Hersteller für die jeweilige Säulenart empfohlenen Flussrate durchgeführt und Proben vor dem Auftragen auf die Chromatographiesäule durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen für die in dieser Arbeit gereinigten Proteine ist in den Abschnitten zur jeweiligen Reinigungsstrategie und den beiden eingebundenen Veröffentlichungen angegeben (Schilz *et al.*, 2021; Schilz *et al.*, 2022).

Metallchelataffinitätschromatographie

Das Prinzip der Metallchelataffinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC) zur Reinigung gentechnisch hergestellter Proteine mit Polyhistidin-Affinitätsanhängsel wurde in der Einleitung bereits hinreichend erläutert, weshalb hier nur das methodische Vorgehen beschrieben wird.

Eine Chromatographiesäule mit geeigneter Bindekapazität (typischerweise 200 mg) wurde mit einem halben Säulenvolumen einer 100 mM Ni-Sulfat-Lösung beladen und mit 3 Säulenvolumina Wasser durchspült. Um gegebenenfalls überschüssige Ni²⁺-Ionen von der Säule zu waschen, wurde diese mit 2 Säulenvolumina des imidazolhaltigen Elutionspuffers (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol) durchspült und anschließend in Laufpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 300 mM NaCl) äquilibriert. Die Probe wurde entweder mit

Hilfe einer 50 ml Probenschleife (Superloop) oder, im Fall von größeren Probenvolumina, über eine Probenpumpe aufgetragen. Die Säule wurde bis zum Erreichen der Basislinie des UV-Signals bei 280 nm mit Laufpuffer gespült. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten von 0 bis 300 mM Imidazol in Laufpuffer über 15 Säulenvolumina. Im Fall der Reinigung eines im Laborfermenter hergestellten Fab-Fragments wurden unspezifisch gebundene Proteine mit einem linearen Imidazol-Konzentrationsgradienten von 0 bis 30 mM in Laufpuffer über 3 Säulenvolumina, gefolgt von 2 Säulenvolumina mit konstanten 30 mM Imidazol in Laufpuffer, entfernt. Die Elution des Fab-Fragments erfolgte mit einem linearen Konzentrationsgradienten von 30 bis 300 mM Imidazol in Laufpuffer über 10 Säulenvolumina. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und zur Vermeidung schwermetallvermittelter Präzipitation mit einer Endkonzentration von 5 mM mit 500 mM EDTA/NaOH, pH 8.0 versetzt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit und Proteingehalt untersucht und bis zur weiteren Verwendung bis zu 3 Tage bei 4 °C oder für längere Dauer bei -20 °C gelagert. Die IMAC-Säule wurde nach der Reinigung mit 3 Säulenvolumina 50 mM EDTA, 1 M NaCl durchspült, um die komplexierten Metallionen zu entfernen und die Säule für ein erneutes Beladen vorzubereiten.

Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie (*Ion Exchange Chromatography*, IEX) beruht auf Ladungs/Ladungs-Wechselwirkungen zwischen geladenen Proteinen und der entgegengesetzt geladenen Chromatographiematrix. Durch die Wahl eines Puffers mit einem pH-Wert oberhalb oder unterhalb des isoelektrischen Punktes (pI) des Zielproteins kann dessen Nettoladung dementsprechend beeinflusst werden. Für die Kationenaustauschchromatographie der Antikörperfragmente wurde der pH-Wert des Puffers hierzu 1 bis 1,5 pH-Einheiten unterhalb oder im Fall einer Anionenaustauschchromatographie entsprechend oberhalb des pI des Zielproteins eingestellt. Für die Reinigung der in dieser Arbeit produzierten rekombinanten Proteine wurden im Fall der Kationenaustauschchromatographie Resource S Säulen mit Sulfoethylgruppen und im Fall der Anionenaustauschchromatographie Resource Q Säulen mit quartären Ammoniumgruppen eingesetzt (beide von GE Healthcare). Da die Elution der gebundenen Proteine über einen Salz-Konzentrationsgradienten erfolgt, musste die Salzkonzentration der Proteinprobe vor der Ionenaustauschchromatographie durch Dialyse gegen einen geeigneten Chromatographiepuffer auf ein Minimum reduziert werden. Um eine ausreichende Löslichkeit der Antikörperfragmente zu gewährleisten, wurde mit einer Konzentration von 50 mM NaCl im Laufpuffer gearbeitet. Bei dieser Salzkonzentration war eine erfolgreiche Separierung der Antikörperfragmente von anderen Proteinen möglich, bei gleichzeitig minimalem Verlust an rekombinantem Protein aufgrund Aggregation während der Dialyse. Für die zu reinigenden Antikörperfragmente wurden folgende Laufpuffer verwendet: 50 mM NaCl, 20 mM

HEPES/NaOH, pH 6.5 für Fab-Fragmente 1.1, 1.2, 2.1 und 2.2; 50 mM NaCl, 50 mM MES/NaOH, pH 6.5 für Fab-Fragmente 3.1 und 3.2.

Die entsprechende Chromatographiesäule wurde zunächst mit 5 Säulenvolumina des jeweiligen Chromatographiepuffers äquilibriert. Die Probe wurde abhängig vom Volumen entweder über die 50 ml Probenschleife oder direkt über die Probenpumpe aufgetragen. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule anschließend bis zum Erreichen der Basislinie des UV₂₈₀-Signals mit Laufpuffer gespült. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines linearen Konzentrationsgradienten von 50 bis 500 mM NaCl über 20 Säulenvolumina. Das Eluat wurde in Fraktionen gesammelt und hinsichtlich Reinheit und Proteingehalt per SDS-PAGE untersucht.

Größenausschlusschromatographie

In der Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) erfolgt die Trennung von Proteinen anhand deren Größe und Form. In dieser Arbeit wurde die SEC insbesondere zum Zweck der Feinreinigung, zum Abtrennen von Aggregaten oder Oligomeren, zum Pufferaustausch, zur Bestimmung der apparenten Molekülmasse oder zur Isolierung von Proteinkomplexen eingesetzt. Das Trennverfahren der SEC-Säulen beruht auf einer Chromatographiematrix aus sphärischen porösen Partikeln, welche mit sinkender Molekülgröße zunehmend durchdrungen werden. Für präparative Anwendungen wurden Superdex 10/300 GL Säulen und für analytische Zwecke Superdex 16/60 pg Säulen (beide von GE Healthcare) verwendet. Je nach Größe des Zielproteins wurde entweder Superdex 75 (für Proteine ≤ 70 kDa) oder Superdex 200 (für Proteine > 70 kDa) Säulenmaterial verwendet. Im Fall PASylierter Proteine wurde aufgrund des vergrößerten hydrodynamischen Volumens generell Superdex 200 Säulenmaterial eingesetzt. Um ein Überladen der SEC-Säulen zu vermeiden, wurde ein Probenvolumen von maximal 2 % des Säulenbettvolumens injiziert. Gegebenenfalls wurde das Probenvolumen zuvor mit Hilfe von Amicon-Konzentratoreinheiten (Merck Millipore, Billerica, MA) durch Zentrifugation eingeengt. Die Säule wurde vor dem Beladen mit der Proteinprobe mit mindestens 1,5 Säulenvolumina Puffer äquilibriert, bis sich ein konstantes Signal für die Konduktivität eingestellt hatte. Die Probe wurde mittels einer Probenschleife mit geeignetem Volumen aufgetragen. Die Auftrennung der in der Probe enthaltenen Proteine erfolgte durch isokratische Elution mit Chromatographiepuffer über ein Säulenvolumen. Die Größenausschlusschromatographie wurde generell mit PBS als Laufpuffer durchgeführt. Sollte das zu reinigende Antikörperfragment allerdings im nächsten Schritt der Kristallisation unterzogen werden, so wurde ein phosphatfreier Puffer mit geringer Konzentration an Puffersubstanz, geringer Ionenstärke sowie neutralem pH-Wert verwendet, beispielsweise 10 mM HEPES/NaOH, 70 mM NaCl, pH 7,5. Analog zu IMAC und IEX wurde das Eluat in Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE auf Reinheit und Proteingehalt untersucht.

Zur Bestimmung der apparenten Molekülgröße wurden die analytischen Gelfiltrationssäulen Superdex 75 10/300 GL oder Superdex 200 10/300 GL (beide GE Healthcare) mit einem Bettvolumen von 24 ml verwendet. Eine Kalibrierung der Säulen wurde mit den folgenden Standardproteinen (alle von Sigma-Aldrich) durchgeführt: Apoferritin (443 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Transferrin (81 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und Ovalbumin (43 kDa), während die Bestimmung des Totvolumens der Säulen mit Dextranblau (Sigma-Aldrich) erfolgte. Die apparente molekulare Masse des zu untersuchenden Proteins wurde anschließend anhand des Elutionsvolumens durch lineare Regression bestimmt.

2.8 Reinigung PASylierter Proteine mittels anti-PAS Affinitätschromatographie

Die im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeiten zu Veröffentlichung 2 (Schilz *et al.*, 2022) entwickelte anti-PAS Affinitätschromatographie basiert auf der Bindungswechselwirkung eines an dem Säulenmaterial immobilisierten anti-PAS Antikörperfragments mit der PAS#1-Polypeptidkette PASylierter Proteine. Die kovalente Kopplung des anti-PAS Fab 1.2 über dessen freie Lysin-Aminogruppen erfolgte mit Hilfe der reaktiven NHS-Gruppen des Säulenmaterials (NHS-aktivierte Sepharose; GE Healthcare) und ist in der genannten Veröffentlichung detailliert beschrieben. Alle Reinigungen mit der so hergestellten 1 ml anti-PAS Chromatographiesäule wurden an einer mit Multiwellenlängen-Detektor ausgestatteten ÄKTA Pure FPLC Anlage bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Als Laufpuffer diente 1x SA-Puffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA); die Elution erfolgte mittels 1 M L-Prolinamid (Carbosynth, Compton, Vereinigtes Königreich) in Laufpuffer. Eine kompetitive Elution durch L-Prolinamid wird erzielt, da dieser einfache Ligand nicht nur eine Prolingruppe enthält, die einen wiederkehrenden Hauptbestandteil von PAS-Sequenzen bildet (Schlapschy *et al.*, 2013), sondern seine Carboxamidgruppe auch die Peptidbindung mit dem darauffolgenden Aminosäurerest initiiert. Zur Lagerung wurde die Säule in Laufpuffer unter Zusatz von 0,1 % (w/v) Natriumazid bei 4 °C aufbewahrt. Bei der Reinigung von *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) wurde die Absorption neben der üblichen Wellenlänge von 280 nm auch bei 488 nm verfolgt, um die intrinsische Fluoreszenz des eGFP zu detektieren.

Aufgrund von spektroskopisch aktiven Verunreinigungen des L-Prolinamids wurde bei Anlegen der 1 M L-Prolinamidlösung ein Anstieg der Absorption bei 280 nm beobachtet, der mit der Absorption des eluierenden Proteins überlagerte. Um diesen Effekt zu korrigieren, wurde ein Chromatogramm ohne Proteinprobe unter ansonsten gleichen Bedingungen als Referenz aufgenommen. Das erhaltene Elutionsprofil wurde bei der Auswertung des Chromatographielaufs für die Proteinprobe mithilfe der Unicorn 7.04 Software als Leerwert

abgezogen, um ein Chromatogramm zu erhalten, welches nur noch die Absorption des eluierenden Proteins bei 280 nm zeigt.

In der Praxis wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert und die Proteinprobe anschließend über eine 2 ml Probenschleife aufgetragen, gefolgt von weiteren 2 Säulenvolumina Laufpuffer zum Spülen der Säule. Im Fall der Reinigung eines PASylierten Proteins aus Periplasmaextrakt wurde ein Volumen von 20 ml mit einer Probenschleife aufgetragen. Die Elution erfolgte durch Injektion von 2 ml 1 M L-Prolinamid in Laufpuffer mit Hilfe einer 2 ml Probenschleife. Fraktionen des Eluats wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE auf Reinheit und Proteingehalt geprüft. Die Regenerierung der Säule erfolgte durch Spülen mit Laufpuffer bis zum Erreichen der Basislinie der Konduktivitäts- und UV-Signale.

2.9 Biophysikalische Methoden

2.9.1 ESI-Massenspektrometrie

In *E. coli* hergestellte Proteine wurden durch massenspektrometrische Analyse auf korrekte Molekülmasse und quantitative Ausbildung von Disulfidbrücken untersucht. Dies erfolgte mit einem maXis Q-TOF Massenspektrometer (*Quadrupol Time of Flight*, Bruker Daltonics, Bremen) ausgestattet mit einer Elektrospray-Ionisations-Quelle (ESI). Dazu wurde 100 µl der zu analysierenden Proteinlösung mit Hilfe von Mikrodialyseeinheiten (MWCO: 10 kDa, Thermo Fisher Scientific) zweimal gegen 2 l 10 mM Ammoniumacetat pH 6,5 dialysiert. Direkt vor der Messung wurde die Probe mit 20 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Ameisensäure versetzt. Die erhaltenen Spektren wurden mit Hilfe der Software Compass Data Analysis v4.0 (Bruker Daltonics) dekonvolviert.

2.9.2 Fluoreszenztitration

Um die Bindungskonstante des synthetischen Peptids *Abz*-APAPAAPA (Peptide Specialty Laboratories – PSL, Heidelberg) gegenüber den anti-P/A#1 Antikörperfragmenten zu bestimmen, wurde die Methode der Fluoreszenztitration angewendet (Lundblad *et al.*, 1996). Hierbei wurde die Abnahme der intrinsischen Tyr/Trp-Fluoreszenz des Fab-Fragments bei Komplexbildung mit dem Peptidliganden, der mit einer N-terminalen *o*-Aminobenzoesäure (*Abz*) als strahlungsloser Energieakzeptor derivatisiert war, ermittelt. Die Messungen wurden an einem LS-50B *Luminescence Spectrometer* (Perkin Elmer, Waltham, MA) in einer auf 25 °C temperierten 2 ml Quarzküvette bei Wellenlängen von 280 nm für die Anregung und 340 nm für die Fluoreszenzdetektion durchgeführt, wobei das Signal über einen Zeitraum von 5 s integriert wurde. Hierbei wurden 2 ml einer 1 µM Lösung des Fab-Fragments in 100 mM Tris/HCl pH 7,5 mit einer 5 mM Lösung des *Abz*-APAPAAPA Peptids im gleichen Puffer in Aliquots von je 1 µl in insgesamt 22 Schritten titriert. Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden auf eine initiale Fluoreszenz von 100 % normalisiert und gegen die jeweils

resultierende Konzentration an titriertem Liganden aufgetragen. Eine Anpassung der Kurve erfolgte durch nichtlineare Regression mit dem Programm Kaleidagraph mit der Formel

$$F = ([P]_t - [L]_t - K_D) \frac{f_P}{2} + ([P]_t + [L]_t + K_D) \frac{f_{PL}}{2} + (f_P - f_{PL}) \sqrt{\frac{([P]_t + [L]_t + K_D)^2}{4} - [P]_t [L]_t}$$

nach Vogt & Skerra (2004), wobei die Parameter f_{PL} , f_P und K_D angepasst wurden. $[P]_t$ und $[L]_t$ stehen hierbei für die Gesamtkonzentrationen von Protein (P) und Ligand (L) bei jedem Titrationsschritt, f_P und f_{PL} für die molaren Fluoreszenzkoeffizienten des freien Proteins und des Protein-Ligand-Komplexes, und K_D stellt die Dissoziationskonstante des Komplexes dar. Eine Korrektur des inneren Filtereffektes erfolgte durch analoge Titration einer 5 μ M Lösung von *N*-Acetyl-Tryptophanamid in 100 mM Tris/HCl pH 7,5 mit dem *Abz*-APAPAAPA Peptid (Vopel *et al.*, 2005).

2.10 Proteinkristallisation

Alle für Kristallisationsansätze verwendeten rekombinanten Proteine wurden frisch hergestellt und zur Homogenität gereinigt. Das jeweilige gereinigte Protein wurde mit Amicon Ultra-4 oder Ultra-15 Konzentratoren auf 8-14 mg/ml konzentriert und anschließend durch Zentrifugen-Filtereinheiten (Merck, Darmstadt) mit einer Porengröße von 0,45 μ m filtriert. Die mit dem NanoDrop 2000 Photometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmten und zur Kristallisation verwendeten Proteinkonzentrationen und Kristallisationsbedingungen sind der eingebundenen Veröffentlichung 1 zu entnehmen (Schilz *et al.*, 2021). Zur Kokristallisation wurden die anti-PAS Fab-Fragmente anschließend bei 4 °C für 1 h mit der dreifachen molaren Menge des jeweiligen Peptids (gelöst in Reinstwasser) inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das eingesetzte Volumen des gelösten Peptids maximal 5 % des Volumens der gesamten Lösung ausmachte, um die Proteinkonzentration nicht unnötig zu verringern. Die erhaltene Lösung wurde anschließend mit Hilfe des Kristallisationsroboters FreedomEvo (Tecan, Männedorf, Schweiz) in einem institutseigenen Satz von Präzipitationsbedingungen unter Verwendung der Dampfdiffusionsmethode (McPherson & Gavira, 2014) im sitzenden Tropfen in 96-Well CrystalQuick-Platten (Thermo Fisher Scientific) auf Kristallbildung getestet. Hierbei wurden Tropfenvolumina von insgesamt 300-1000 nl angesetzt, wobei jeweils die Proteinlösung mit der Präzipitationslösung in einem Volumenverhältnis von 1:1 gemischt wurde. So hergestellte Kristallisationsansätze wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, OH) luftdicht verschlossen und bei exakt 20 °C inkubiert. Im Fall von Kristallwachstum wurden die jeweiligen Bedingungen in manuellen Ansätzen in 24-Well Platten (Crystalgen, Commack, NY) wiederholt angesetzt und hinsichtlich Größe und Streufähigkeit der Proteinkristalle durch iterative Variation von pH-Wert und Salz- oder Fällungsmittelkonzentration optimiert. Die Tropfengröße dieser manuellen Ansätze im sitzenden Tropfen betrug 1 μ l Proteinlösung gemischt mit 1 μ l Reservoirlösung. Die Tropfen

wurden dazu auf silanisierte Deckgläschen pipettiert, umgedreht auf einem am Rand mit einer Öl/Vaseline-Mischung beschichteten Reservoir dicht platziert und daraufhin gegen 1 ml Reservoirlösung äquilibriert. Die Zusammensetzung der Kryo-Lösungen zum Ernten und Schockfrieren der Kristalle sowie die Datensammlung am Synchrotron und das Vorgehen bei der Strukturlösung sind ausführlich in der eingebundenen Veröffentlichung 1 beschrieben (Schilz *et al.*, 2021). Atomkoordinaten und Strukturkoordinaten der im Rahmen dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen sind in der *Protein Data Bank* (PDB) unter folgenden Codes deponiert: 7O30 (Fab 1.1), 7O31 (Fab 1.2), 7O2Z (Fab 2.2) und 7O33 (Fab 3.1).

2.11 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme

Adobe Creative Suite 4	Erstellen von Abbildungen und Bildbearbeitung (Adobe, San José, CA)
ANTICALigN	Analyse und Annotation von Immunglobulinsequenzen (Jarasch <i>et al.</i> , 2016)
Biacore X100 Evaluation ver. 2.0.1	Analyse und Auswertung von Rohdaten aus der Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie (GE Healthcare)
BioDocAnalyse 2.2	Bilddokumentation von SDS- und Agarosegelen (Biometra, Göttingen)
CCP4 ver. 7.0.078	Softwarepaket für die makromolekulare Röntgen- Kristallographie (Winn <i>et al.</i> , 2011)
CLIQS ver. 1.2.044	Quantifizierung von Signalintensitäten im SPOT-Array (TotalLab, Newcastle-upon-Tyne, UK)
Compass Data Analysis v4.0	Analyse und Dekonvolierung von Massenspektren (Bruker Daltonik, Bremen)
Coot ver. 0.8.9.	Modellierung von Proteinkristallstrukturen (Emsley & Cowtan, 2004)
Cryscreen ver.2.0	Software zur robotergestützten Proteinkristallisation (Tecan Group, Männedorf, Schweiz)
Endnote X8	Literaturverwaltung (Thomson Reuters, New York, NY)
Gemini ver. 4.2.17.304	Software zur robotergestützten Proteinkristallisation (Tecan Group)
Gen5 ver.1.09.7	Datenerfassungs- und Analysesoftware für ELISA- Experimente (BioTek Instruments, Winooski, VT)
Gentle ver. 1.9.4	Analyse, Annotation, Bearbeitung und Verwaltung von DNA-Sequenzen (Manske, 2006)
KaleidaGraph ver. 4.03	Kurvenanpassung und statistische Analysen (Synergy Software, Reading, PA)
MultiPep ver. 1.5.07	Programmierung und Durchführung von Peptidsynthesen (Intavis, Köln)

Office Professional 2016	Textverarbeitung und Tabellenkalkulation (Microsoft Corporation, Redmond, WA)
OriginPro 2020	Kurvenanpassung und statistische Analysen (OriginLab Corporation, Northampton, MA)
PyMOL 2.3.3	Dreidimensionale Darstellung und Analyse von Proteinstrukturen (Schrödinger, New York, NY)
Unicorn 7.04	Steuerung der ÄKTA FPLC-Anlagen und Analyse von Chromatogrammen (GE Healthcare)
XDS	Prozessierung von röntgenkristallographischen Beugungsdaten (Kabsch, 2010)

Datenbanken

ExPASy	Portal zur Proteinanalyse www.expasy.org (Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
IMGT	Analyse von Immunglobulinsequenzen www.imgt.org (Brochet <i>et al.</i> , 2008)
PISA	Analyse von intermolekularen Kontaktflächen in Proteinstrukturen www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa (Krissinel & Henrick, 2007)
Protein Data Bank (PDB)	Datenbank für Proteinstrukturen www.rcsb.org (Berman <i>et al.</i> , 2000)

3 Veröffentlichungen

Die in dieser publikationsbasierten Dissertation eingebundenen Veröffentlichungen wurden jeweils durch wissenschaftliche Gutachter auf dem entsprechenden Fachgebiet im Auftrag der Fachzeitschrift geprüft (engl.: *Peer Review*).

3.1 Veröffentlichung in *Journal of Molecular Biology*, Juni 2021 – Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel “Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope” wurde am 20. Juni 2021 (online Version) in der Fachzeitschrift “*Journal of Molecular Biology*” veröffentlicht.

Zitat:

Schilz, J., Binder, U., Friedrich L., Gebauer, M., Lutz, C., Schlapschy, M., Schiefner, A. & Skerra, A. (2021) Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope. *J Mol Biol* **433**, 167113.

Zusammenfassung der Veröffentlichung:

In dieser Veröffentlichung wird die biochemische und strukturelle Charakterisierung von Antikörpern mit Spezifität für Pro/Ala-reiche Sequenzen (PAS) beschrieben. Die PASylierung ist eine innovative Technologie zur Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von Therapeutika, die als biologische Alternative zur PEGylierung entwickelt wurde. Im Rahmen dieser Veröffentlichung wurden Antikörper erzeugt, die als molekulare Werkzeuge in der präklinischen Entwicklung PASylierter Moleküle eingesetzt werden können. Hierbei galt es auch zu klären, wie die flexiblen und strukturell ungeordneten PAS-Polypeptide durch Antikörper spezifisch erkannt und gebunden werden können.

In dieser Studie beschreiben wir die Generierung von Antikörpern durch Immunisierung von Mäusen mit drei verschiedenen an ein immunogenes Trägerprotein gekoppelten PAS-Polypeptiden. Die Charakterisierung der daraus resultierenden Antikörper hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften erfolgte zunächst ausgehend von Kulturüberständen der entsprechenden Hybridomkulturen. Für jede der drei PAS-Polypeptide konnten nur wenige Klone, und darunter jeweils nur ein monoklonaler Antikörper mit hoher Affinität und Spezifität, für die jeweilige PAS-Antigensequenz identifiziert werden. Die Sequenzen der variablen Regionen dieser Antikörper wurden bestimmt und die daraus abgeleiteten rekombinanten Antikörperfragmente für kristallographische Studien in *E. coli* hergestellt. Auf diese Weise konnten, in einem Fall unter Zuhilfenahme eines ternären Komplexbildners, hochauflösende

Proteinstrukturen für vier Antikörperfragmente im Komplex mit dem zugehörigen PAS-Epitopeptid gelöst werden. Die strukturelle Untersuchung dieser Proteinkomplexe ergab, dass die Bindung vor allem durch Wasserstoffbrücken mit dem Rückgrat der Peptide sowie durch Van-der-Waals Kontakte vermittelt wird. Es stellte sich heraus, dass in mehreren dieser Komplexe Alanin, die Aminosäure mit der kleinsten Seitenkette, durch spezifische Kontakte und hohe räumliche Komplementarität im Zentrum des Paratops ein zentrales Element für die Epitoperkennung bildet.

Die in dieser Studie charakterisierten Antikörper stellen vielversprechende Werkzeuge für die präklinische Entwicklung PASylierter Therapeutika wie auch für die Grundlagenforschung mit PASylierten Proteinen dar. Die Ergebnisse der röntgenkristallographischen Untersuchung liefern außerdem einen seltenen Einblick in den molekularen Erkennungsmechanismus von strukturell ungeordneten Immunogenen durch Antikörper.

Beitrag des Autors dieser Dissertation:

Der Autor dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption der wissenschaftlichen Studie sowie der Sammlung, Analyse und Interpretation der Daten beteiligt. Er führte den Großteil der Experimente eigenhändig durch, beispielsweise Charakterisierung der Antikörper aus Kulturüberständen von Hybridomkulturen, Sequenzbestimmung der variablen Regionen ausgewählter Immunglobuline, Epitopbestimmung mittels SPOT-Array, Charakterisierung der Bindungseigenschaften der hergestellten rekombinanten Antikörperfragmente, Planung und Klonierung von Plasmiden sowie Produktion und Reinigung der Antikörperfragmente und Proteinantigene. Die Kristallisation der Proteinkomplexe, die Lösung der Kristallstruktur mittels molekularem Ersatz und Verfeinerung der Strukturmodelle wurden maßgeblich vom Autor dieser Dissertation durchgeführt. Der Autor war für das Verfassen des Manuskripts sowie dessen Überarbeitung verantwortlich.

3.2 Veröffentlichung in Angewandte Chemie International Edition, März 2022 – Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel "Direct affinity purification of long-acting PASylated proteins with therapeutic potential using L-prolinamide for mild elution" wurde am 24. März 2022 (online Version) in der Fachzeitschrift "Angewandte Chemie International Edition" veröffentlicht.

Zitat:

Schilz, J., Clement, C., Greiner, F. & Skerra, A. (2022) Direct affinity purification of long-acting PASylated proteins with therapeutic potential using L-prolinamide for mild elution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, e202200079.

Zusammenfassung der Veröffentlichung:

Die chromatographische Reinigung stellt in der Entwicklung und Produktion von Biotherapeutika einen kritischen und oftmals kostenintensiven Arbeitsschritt dar. Aufgrund strenger Auflagen können bei Therapeutika für den klinischen Einsatz im Menschen keine Affinitätsanhängsel eingesetzt werden, weshalb alternative Reinigungsmethoden eingesetzt werden müssen. Im Rahmen einer vorangegangenen wissenschaftlichen Studie (siehe Abschnitt 3.1) wurden Antikörper generiert und charakterisiert, die spezifisch Pro/Ala-reiche Sequenzen (PAS) binden. Auf Grundlage der daraus abgeleiteten Antikörperfragmente sollte die Entwicklung einer generischen affinitätsbasierten Reinigungsmethode für PASylierte Proteine in Angriff genommen werden.

In dieser Studie beschreiben wir die Auswahl eines niedrigaffinen Antikörperfragments und dessen Kopplung an NHS-aktivierte Sepharose als Affinitätsmatrix für die Reinigung PASylierter Proteine, sowie die Bestimmung geeigneter Elutionsbedingungen. Um einerseits die PASylierten Proteine effektiv an der immobilen Phase anzureichern und diese wieder schonend zu eluieren, wurde das Antikörperfragment des Klons 1.2 mit einer moderaten Affinität von 3.7 μM (bestimmt mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie) zur PAS#1-Sequenz gewählt. Bei der Suche nach geeigneten Elutionsbedingungen zeigte sich die kompetitive Elution mit dem entsprechendem PAS#1-Epitopeptid als anwendbar. Ebenso effizient, und hinsichtlich der Anwendung im präparativen Maßstab vielversprechender, war eine 1 M Lösung L-Prolinamid. Letztere Substanz wurde aufgrund ihrer deutlich geringeren Kosten für die weitere Entwicklung verwendet. Sowohl mit einer Suspension aus Sepharosekügelchen im 20 μl -Maßstab als auch mit einer 1 ml Säule konnte gezeigt werden, dass verschiedene PASylierte Proteine auf der Affinitätsmatrix stabil gebunden und durch Zugabe von 1 M L-Prolinamid im Laufpuffer wieder eluiert werden können, ohne die Affinitätsmatrix oder das zu reinigende Protein zu schädigen. Des Weiteren konnte die

Eignung dieser neuen chromatographischen Methode zur Einschrittreinigung PASylierter Proteine mit therapeutischer Relevanz, His₆-PAS#1(800)-IL1Ra (Powers *et al.*, 2020) und His₆-H1GA-PAS#1(200) (Rauth *et al.*, 2016), aus dem Ganzzell- oder Periplasmaextrakt von *E. coli* gezeigt werden.

Diese Ergebnisse beweisen die Anwendbarkeit der affinitätsbasierten Reinigung von PASylierten Proteinen ohne Notwendigkeit der Einführung eines zusätzlichen Affinitätsanhängsels. Die in dieser Studie entwickelte Reinigungsstrategie stellt somit eine vielversprechende Methode dar, um in der Herstellung PASylierter Proteine breite Anwendung zu finden.

Beitrag des Autors dieser Dissertation:

Der Autor dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption und Durchführung der wissenschaftlichen Studie beteiligt und führte den Großteil der Experimente selbst durch. Hierzu zählen beispielsweise Produktion und Reinigung des Antikörperfragments, dessen Kopplung an NHS-aktivierte Sepharose, Planung der Experimente zur Bestimmung geeigneter Elutionsbedingungen sowie Methodenentwicklung und Durchführung sämtlicher Versuche an Chromatographieanlagen. Der Autor analysierte die entstandenen Daten und war für das Erstellen und Überarbeiten des Manuskripts verantwortlich.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen strukturell ungeordnete Pro/Ala-reiche Sequenzen

Im Arzneimittelentwicklungsprozess von Biotherapeutika sind molekulare Werkzeuge zur Untersuchung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik unabdingbar, um zu verstehen, wie ein Medikament wirkt und wie sich seine Konzentration im Körper oder Zielorgan nach der Verabreichung entwickelt (Baumann, 2006). Sowohl die US-amerikanische FDA als auch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) stellen hohe Anforderungen an die zu ermittelnden Daten und die verwendeten Methoden, um eine maximale Sicherheit für den Patienten zu gewährleisten. Besonders im Rahmen pharmakokinetischer Studien biotherapeutischer Wirkstoffe wird auf Immunoassays zurückgegriffen, um beispielsweise die Verweildauer des Wirkstoffs im Blutplasma zu überwachen, wobei sich monoklonale Antikörper aufgrund ihrer hohen Spezifität für das Zielmolekül als besonders geeignet erwiesen haben (Gorovits *et al.*, 2018).

Allerdings besteht die Notwendigkeit, zuerst für jeden einzelnen biotherapeutischen Wirkstoff einen spezifischen Antikörper zu entwickeln. Im Zusammenhang mit durch die PASylierungstechnologie ausgestatteten Biotherapeutika bietet sich dagegen die Entwicklung universell einsetzbarer Antikörper an. Egal wie differenziert die therapeutisch wirksamen Protein- oder Peptidkomponenten der Wirkstoffe sind, so sind alle PASylierten Biotherapeutika durch ein Merkmal vereint: die damit fusionierten PAS-Polypeptidketten. Die Entwicklung von Antikörpern gegen ebendiese PAS-Polypeptidketten eröffnet somit die Möglichkeit, einen einzigen Antikörper für pharmakokinetische Studien in der Entwicklung sämtlicher mit der gleichen PAS-Sequenz ausgestatteter Biomoleküle verwenden zu können. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keinerlei gegen PAS gerichtete Antikörper vorhanden waren, mussten zuallererst Antikörper generiert werden.

Bei PAS-Polypeptiden handelt es sich um strukturell ungeordnete Sequenzen, für die in vielfachen präklinischen Studien unter wiederholter Verabreichung unterschiedlicher PASylierter Proteine in hohen Dosen eine niedrige Immunogenität gezeigt werden konnte (Bolze *et al.*, 2016; Griffiths *et al.*, 2019; Harari *et al.*, 2014; Richter *et al.*, 2020), weshalb eine Immunisierung von Mäusen mit reinem PAS-Polypeptid keine vielversprechende Option war. Hier bot sich die Kopplung mit dem hoch immunogenen Trägerprotein KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) an, das sich als wirksam erwiesen hat, um die Immunogenität von kurzen Polypeptiden zu steigern (Swaminathan *et al.*, 2014). Mit dieser Methode war es zwar möglich, eine substantielle Immunantwort zu generieren, allerdings konnten unter den für jede der drei PAS-Sequenzen je 40 in Zusammenarbeit mit XL-protein GmbH näher charakterisierten

Hybridomklonen nur wenige einzigartige Klone identifiziert werden, was die sehr schwache Immunogenität der PAS-Polypeptide unterstreicht.

Die Antikörper aus dem Kulturüberstand der von XL-protein GmbH erhaltenen Hybridomzellen wurden zunächst mittels SPR und ELISA durchmustert, da diese beiden Methoden eine zuverlässige Bestimmung der Bindungseigenschaften bei gleichzeitig hohem Durchsatz erlauben. Insbesondere die Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie bietet sich bei der Charakterisierung von Antikörpern an, da sie eine markierungsfreie Echtzeit-Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Komplexbildung zwischen Antikörper und PAS-Polypeptid erlaubt (Davidoff *et al.*, 2015). Auf diese Weise wurden für die PAS#1-, P/A#1- und APSA-Polypeptidantigene je zwei vielversprechende Antikörper identifiziert, von denen jeweils zumindest einer eine hohe Affinität/Avidität im einstelligen nanomolaren oder sogar pikomolaren Bereich aufwies (Schilz *et al.*, 2021). Kriterien für die Auswahl geeigneter Hybridomklone für die weitere Entwicklung waren vor allem eine hohe Affinität zur jeweiligen PAS-Sequenz, aber auch eine durch SPR bestimmte niedrige Dissoziationsrate sowie gegebenenfalls vorteilhafte Kreuzreaktivität zu anderen PAS-Sequenzen. Außerdem wurde die Eignung der Antikörper für den spezifischen Nachweis PASylierter Proteine im Western-Blot bewertet. Während sich Antikörper mit hoher Affinität insbesondere für bioanalytische und diagnostische Zwecke eignen, kann eine moderate Affinitätskonstante dagegen für andere Anwendungsbereiche vorteilhaft sein, wie sich auch im Verlauf dieser Arbeit gezeigt hat.

Mit Hilfe eines SPOT-Arrays konnten für die PAS#1- und P/A#1-Polypeptide die exakte Aminosäuresequenz des Epitops ermittelt werden. Während die gegen PAS#1 gerichteten Antikörper spezifisch für ebendiese Version der PAS-Sequenz waren, zeigten die gegen P/A#1 gerichteten Antikörper eine gewisse Kreuzreaktivität für PAS#1. Erwähnenswert ist hierbei, dass in beiden Fällen ein sechs Aminosäuren langes Epitop an der exakt gleichen Stelle in der repetitiven 20mer Basissequenz (Schlapschy *et al.*, 2013) erkannt wird, trotz der Substitution eines Alanins gegen Serin in der PAS#1-Sequenz. Die charakterisierten Antikörper unterschieden sich jedoch in der Anzahl der pro repetitivem 20mer erkannten Epitope. Während die PAS#1-Antikörper nur ein Epitop pro 20mer erkennen, binden die P/A#1 Antikörper an zwei Epitope pro 20mer. Aufgrund des nur vier Aminosäuren umfassenden repetitiven Motivs der APSA-Sequenz ist in diesem Fall eine noch höhere Epitopdichte vorhanden.

Der Einfluss der Epitopdichte scheint sich auch in der Affinität bzw. Avidität der Antikörper widerzuspiegeln: Für die beiden APSA-Antikörper beziehungsweise deren rekombinante Fab-Fragmente wurden die höchsten Affinitäten gemessen. Die nur ein Epitop pro 20mer bindenden PAS#1 Antikörper hingegen wiesen im Gesamtvergleich die niedrigsten Affinitäten auf. Neben dem Aviditätseffekt auf Seiten des bivalenten Antikörpers scheint also auch die Epitopdichte auf Seite des jeweiligen Antigens eine große Rolle zu spielen, was sich bereits in

anderen Studien mit monoklonalen Antikörpern gezeigt hatte (Liu & Chen, 2005). Obwohl die für die Immunisierung verwendeten PAS#1- und P/A#1-Polypeptide so konzipiert waren, dass mindestens auch eine Kopie des Übergangs zwischen zwei benachbarten 20mer-Sequenzwiederholungen enthalten war, konnten allerdings keine Antikörper identifiziert werden, die diesen Sequenzbereich erkennen.

Für alle sechs ausgewählten Antikörper wurden nach der Sequenzanalyse der variablen Regionen, entweder ausgehend von cDNA aus den Hybridomzellen oder mittels synthetischer Gene, die entsprechenden chimären Fab-Fragmente mit humanen konstanten Domänen in *E. coli* hergestellt (Skerra, 1994). Aufgrund der kurzen Generationszeit dieses gut charakterisierten Labor-Bakteriums können in entsprechenden Nährmedien schnell und kostengünstig hohe Zelldichten erreicht werden (Rosano & Ceccarelli, 2014). Die komplexe Struktur eines kompletten IgG₁-Antikörpers mit seinem Aufbau aus vier Proteinketten und den zahlreichen intra- und interchenaren Disulfidbrücken bringt *E. coli* als Expressionsorganismus jedoch an seine Grenzen (McKenna *et al.*, 2019). Im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas von *E. coli* ist aufgrund der fünf intra- beziehungsweise interchenaren Disulfidbrücken auch die korrekte Faltung eines Fab-Fragments nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die Aminosäuresequenzen der OmpA- und PhoA-Signalpeptide mit den N-termini der schweren beziehungsweise leichten Kette genetisch fusioniert (Skerra, 1994). Über das Sec-Transportsystem werden beide Ketten des Fab-Fragments in den periplasmatischen Raum des Bakteriums geschleust, in dem aufgrund des vorherrschenden oxidierenden Milieus eine korrekte Ausbildung aller Disulfidbrücken und damit eine native Faltung möglich ist (Nakamoto & Bardwell, 2004; Plückthun & Skerra, 1989; Skerra & Plückthun, 1988).

Die so hergestellten Fab-Fragmente wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Affinität zu den PAS-Polypeptiden untersucht. Für alle Fab-Fragmente wurde im Vergleich zum intakten IgG-Antikörper eine um 1-2 Größenordnungen schwächere Dissoziationskonstante im ELISA und SPR festgestellt. Der aufgrund der zwei verfügbaren Bindestellen eines IgG-Antikörpers mögliche Aviditätseffekt manifestiert sich dabei also besonders stark. Betrachtet man die hohe Flexibilität der PAS-Polypeptidkette, so scheint es sehr wahrscheinlich, dass bei der Bindung eines Antikörpers an dieselbe Polypeptidkette beide Paratope besetzt werden. Aufgrund der sehr hohen räumlichen Epitopdichte innerhalb der flexiblen PAS-Polypeptide sowie der Flexibilität des Antikörpers spielt eine Abhängigkeit des Aviditätseffekts von der Distanz der zur Verfügung stehenden Epitope, wie sie in anderen Studien festgestellt wurde (Jendroszek & Kjaergaard, 2021), im Fall langer PAS-Sequenzen offenbar keine Rolle.

Zur Bestimmung der monovalenten Affinität des Fabs 2.2 gegenüber dem P/A#1-Epitoppeptid wurden Fluoreszenztitrationsexperimente mit dem synthetischen Peptid Abz-APAPAAPA durchgeführt, das eine N-terminale *o*-Aminobenzoylgruppe als Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-Akzeptor trägt (Voss & Skerra, 1997). Die so ermittelte Dissoziationskonstante

Durch die Verfügbarkeit von PAS-spezifischen Antikörpern eröffnen sich abgesehen von deren Einsatz zum empfindlichen Nachweis PASylierter Proteine weitere Möglichkeiten zur Anwendung der PASylierungstechnologie. So ist beispielsweise die zielgerichtete Adressierung PASylierter Nanocarrier mittels eines bispezifischen Bindemoleküls, das aus einem für das Zielprotein spezifischen Teil sowie einem anti-PAS Antikörper(-fragment) besteht, vorstellbar. Zudem hat sich die Verwendung von anti-PAS-Antikörperfragmenten zum Zweck der Affinitätsreinigung PASylierter Proteine als anwendbar erwiesen und ist in Veröffentlichung 2 (Schilz *et al.*, 2022) detailliert beschrieben.

4.2 Strukturelle Untersuchung von Komplexen aus Antikörperfragmenten und Pro/Ala-reichen Epitopeptiden

Die hochaffine Wechselwirkung von Antikörpern mit der strukturell ungeordneten und flexiblen PAS-Polypeptidkette ist bemerkenswert, weshalb es von großem wissenschaftlichen Interesse war, die genauen molekularen Interaktionen aufzuklären, die diese Bindung erlauben. Trotz des rasanten Fortschritts, die die Proteinstrukturvorhersage mittels maschinellen Lernens in den letzten Jahren gemacht hat (Jumper *et al.*, 2021; Senior *et al.*, 2020) bleibt die Methode der Röntgen-Kristallographie der Goldstandard für die Bestimmung von Proteinstrukturen mit atomarer Auflösung. Der limitierende Schritt bei dieser Methodik ist meist das Erzeugen von beugungsfähigen Proteinkristallen, die in einem Beugungsexperiment mit Röntgen-Strahlung dazu genutzt werden um Beugungsbilder aufzunehmen. Aus diesen kann die dreidimensionale Verteilung der Elektronendichte für das kristallisierte Protein und damit seine Struktur bestimmt werden. Da aus Beugungsexperimenten lediglich die Intensitäten der Beugungsmaxima verfügbar sind, ergibt sich die Notwendigkeit, die für die Berechnung der Elektronendichte ebenfalls notwendige Phase derselben zu bestimmen (Hauptman, 1991). Dieses sogenannte Phasenproblem spielt besonders bei der *ab-initio*-Bestimmung von Proteinstrukturen eine große Rolle. Wenn bereits aufgeklärte homologe Proteinstrukturen vorliegen, kann dieses Problem wie im Fall der hier untersuchten Fab-Fragmente mittels Molekularem Ersatz gelöst werden, um initiale Phasen zu erhalten, die dann schrittweise verfeinert werden (Rossmann, 1990).

Obwohl auch Kristallstrukturen von kompletten IgG-Antikörpern gelöst werden konnten (Harris *et al.*, 1998; Saphire *et al.*, 2001), bildet die hohe intrinsische Flexibilität eines IgG-Moleküls eine Hürde für die erfolgreiche Kristallisation. Insbesondere die Gelenkregion, welche die erste und zweite konstante Domäne der schweren Kette und damit den Fab- und den Fc-Teil verbindet, erlaubt eine relativ freie Beweglichkeit innerhalb des Antikörpers (Sandin *et al.*, 2004). Die Glycosylierung des Fc-Teils trägt zusätzlich zur strukturellen Heterogenität eines Antikörpers bei, was die Ausbildung von geordneten Proteinkristallen erschwert. Vielversprechender ist dagegen der Ansatz, nur den für die Bindung des Antigens verantwortlichen Teil, das Fab-Fragment, für die Kristallisation zu verwenden.

Diese Vorgehensweise wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt, um die Kristallstrukturen von vier verschiedenen Fab-Fragmenten im Komplex mit ihrem jeweiligen Epitopeptid aufzuklären. Die Beschränkung auf das Fab-Fragment erlaubt deren Produktion als rekombinante Proteine in *E. coli* statt in deutlich zeitraubender Zellkultur. Trotz Wegfalls des Fc-Teils bleibt die Antigenbindung vollständig erhalten, was eine uneingeschränkte Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen ermöglicht. Das Design der Epitopeptide für die Kokristallisation basierte im Fall der P/A#1- und PAS#1-Sequenzen auf den im SPOT-

Assay ermittelten Aminosäuresequenzen der erkannten Epitope, welche N- und C-terminal um jeweils einen Alaninrest erweitert wurden, in Übereinstimmung mit den Aminosäuresequenzen der repetitiven 20mer Bausteine. Im Fall der APSA-Sequenz wurde dagegen ein Oligopeptid aus drei Wiederholungen des APSA-Motivs verwendet, um auch deren Verknüpfungsstellen und hierdurch mögliche Epitopsequenzen abzudecken. Zur Vermeidung von Ladungen an den N-Termini der Eptiopeptide, die in den entsprechenden längeren PAS-Polypeptiden nicht vorkommen, wurden diese mit Pyroglutaminsäure oder durch Acetylierung blockiert.

Die direkte Kokristallisation des Fab-Fragments mit dem jeweiligen Epitopeptid war in drei Fällen erfolgreich, und die entsprechenden Kristallstrukturen der Fabs 1.1, 2.2 und 3.1 konnten bei einer maximalen Auflösung von 2.65 Å, 2.55 Å beziehungsweise 1.85 Å gelöst werden. Für die Fabs 1.2 und 2.1 jedoch wurden auf diese Weise keine beugungsfähigen Proteinkristalle erhalten. Dabei ist zu beachten, dass selbst das Fab-Fragment eines Antikörpers eine hohe Flexibilität aufweist, die insbesondere auf die strukturelle Beweglichkeit in der Ellbogen-Region zurückzuführen ist, welche die konstanten mit den variablen Domänen des Fabs verbindet. Für die Ausrichtung der variablen Domänen in Bezug auf die konstanten Domänen ist der Ellbogen-Winkel maßgeblich, der als der Winkel zwischen den Pseudo-Zweifach-Achsen definiert ist, die die variable schwere mit der variablen leichten Domäne und die erste konstante Domäne der schweren mit der konstanten Domäne der leichten Kette gegenseitig in Verbindung setzen. In früheren Studien wurde für Kristallstrukturen von Fab-Fragmenten mit leichter Kette des Typs kappa eine Variation dieses Winkels im Bereich von 116° bis 226° nachgewiesen (Stanfield *et al.*, 2006), was die strukturelle Flexibilität eindrücklich unterstreicht. Dieser Freiheitsgrad kann für die Ausbildung wohlgeordneter Proteinkristalle von Nachteil sein, da eine gleichmäßige Anordnung und Packung der Fab-Fragmente entropisch erschwert wird.

In der Vergangenheit konnte durch die Einführung von Mutationen in der Ellbogen-Region, welche die Beweglichkeit des Fabs limitieren, Verbesserungen bezüglich der Kristallisierbarkeit erzielt werden (Bailey *et al.*, 2018). Um Aminosäureaustausche und damit eventuell einhergehende Änderungen der Eigenschaften des Fabs zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit allerdings eine andere Strategie, nämlich die Kokristallisation zusammen mit einer für die Ellbogen-Region humaner leichter Ketten des Typs kappa spezifischen V_HH-Domäne als Kristallisationshelfer erwogen. Durch die Bindung der V_HH-Domäne in diesem Bereich wird die Beweglichkeit von Fab-Fragmenten stark eingeschränkt, was die Kristallisation fördert (Ereño-Orbea *et al.*, 2018). Der Komplex aus Fab und V_HH wurde zunächst durch Größenausschlusschromatographie isoliert um eine 1:1-Stöchiometrie zu gewährleisten, und anschließend mit der dreifachen molaren Menge des für die Kokristallisation vorgesehenen Epitopeptids inkubiert. Dieser Ansatz führte im Fall des Fab

1.2 zum Erfolg und erlaubte die Strukturbestimmung des Komplexes aus Fab, Epitopeptid und V_HH-Domäne bei einer Auflösung von 1.55 Å (Abbildung 5A).

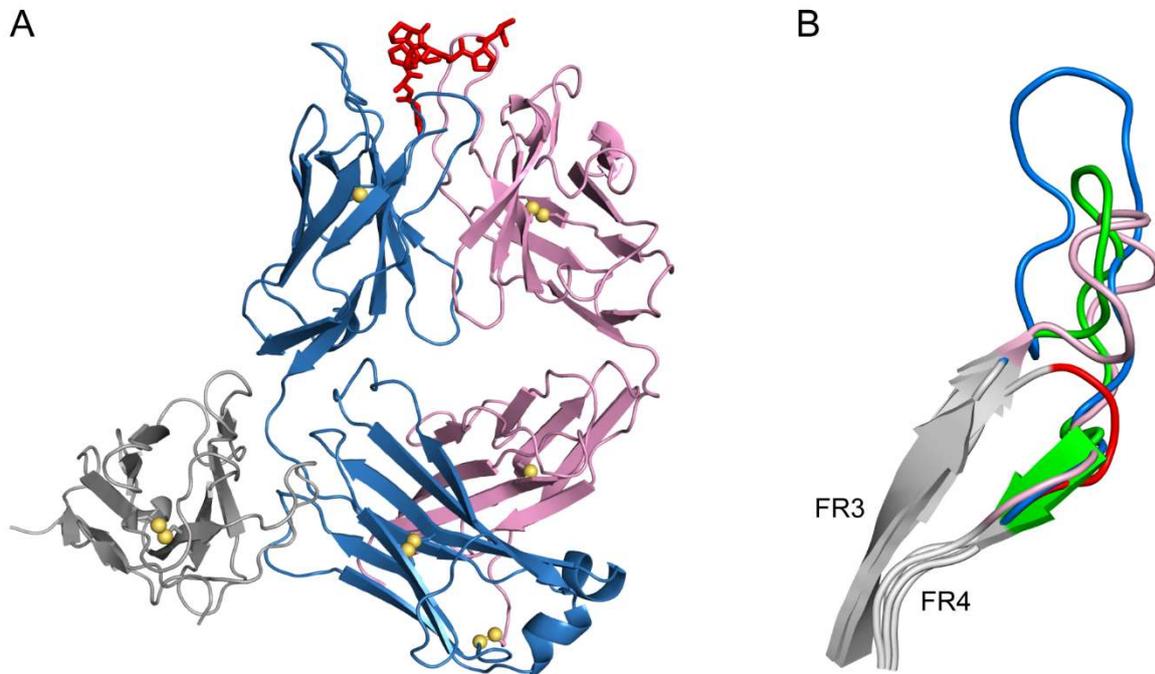


Abbildung 5: (A) Kristallstruktur des Fab 1.2 (leichte Kette: blau; schwere Kette: rosa; PDB-Code: 7O31) in Komplex mit dem PAS-Epitopeptid (rot) und der als Kristallisationshelfer eingesetzten V_HH-Domäne (grau). (B) Überlagerung der Strukturen der CDR-H3 Peptidschleifen der anti-PAS Fabs 1.1 (rosa), 1.2 (blau), 2.2 (grün) und 3.1 (rot) zur Veranschaulichung der extrem kurzen CDR-H3 des Fab 3.1 (abgewandelt nach Schilz *et al.*, 2021).

Die molekularen Wechselwirkungen zwischen Epitopeptid und Antikörperfragment sind in allen vier Strukturen durch Van-der-Waals Kontakte, Wasserstoffbrückenbindungen sowie lokale hydrophobe Interaktionen dominiert. Gemäß der Natur der PAS-Polypeptide, die frei von jeglichen geladenen Aminosäureseitenketten sind, finden sich keinerlei Salzbrücken an der Kontaktfläche zwischen Fab und Epitopeptid. Die Topologie der Paratope weist untereinander dennoch teils große Unterschiede auf. Die Fabs 1.2 und 3.1 besitzen eine Furche im Paratop, in der das Epitopeptid eingebettet ist. Dies führt insbesondere in der Struktur des Fab 3.1 zu einer dichten räumlichen Interaktion, die mit einer begrabenen Oberfläche von 1009 Å² auf Seiten des Epitopeptids sogar im Bereich der Kontaktfläche einer typischen Protein/Protein-Interaktion liegt (Janin *et al.*, 2007). In den Strukturen der Fabs 1.1 und 2.2 hingegen findet sich eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Bindetasche. In diesen beiden Fällen sind einzelne, tief in den Bindetaschen begrabene Aminosäuren die Hauptakteure der Bindung. Überraschenderweise spielt in den Strukturen der Fabs 1.1 und 2.2 jeweils ein Alaninrest im Epitop eine entscheidende Rolle bei der Bindung und der

Vermittlung enger räumlicher Wechselwirkungen. Dies ist insofern erstaunlich, als dieser Aminosäure generell eine inerte Rolle zugesprochen wird, und sie in der Substitutionsanalyse ("Alanin-Scan") zur Aufschlüsselung von für die Protein/Ligand-Bindung wichtigen Resten eingesetzt wird (Cunningham & Wells, 1989). Im Gegensatz zu allen anderen proteinogenen Aminosäuren – ausgenommen Glycin, das aufgrund der fehlenden Seitenkette allerdings erhöhte Rückgratflexibilität bewirkt – bietet die Methylseitenkette des Alanins nur wenige Angriffspunkte für molekulare Interaktionen. Diese Tatsache unterstreicht die besondere Herausforderung für Antikörper bei der Bindung von PAS-Polypeptidketten und die Notwendigkeit der Nutzung jeglicher verfügbarer Wechselwirkungen.

Mit einem vier Aminosäuren umfassenden Typ I β -Turn weisen die PAS#1-Epitoppeptide in den Komplexen mit den Fab-Fragmenten 1.1 und 1.2 eine gewisse Gemeinsamkeit auf. Dieser Turn wird in beiden Strukturen durch zwei intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Auch wenn in vorangegangenen Studien keinerlei Sekundärstrukturelemente für PAS-Polypeptide nachgewiesen werden konnten (Breibeck & Skerra, 2018), könnten solche intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen die konformationelle Entropie reduzieren, was die Bindungsaffinität durch einen Gewinn an freier Energie erhöhen würde (Makabe, 2020; Miyanabe *et al.*, 2018).

Die besonders starke Furchung des Paratops von Fab 3.1 im Komplex mit dem (APSA)₃-Peptid (Abbildung 6A) wird durch eine sehr kurze CDR-H3 möglich gemacht, die mit nur drei Aminosäureresten selbst für die im Vergleich zu humanen CDR-H3 Sequenzen generell kürzeren Sequenzen der Maus-Immunglobuline auffällig wenig Reste aufweist (Wu *et al.*, 1993; Zemlin *et al.*, 2003) (Abbildung 5B). Des Weiteren ermöglicht diese kurze CDR-H3 die exponierte Ausrichtung der hydrophoben Seitenkette eines Tryptophan-Rests im Zentrum des Paratops. Dieses Tryptophan ist in vielfältige Wechselwirkungen mit dem Epitoppeptid involviert und kann als zentraler Rest im Paratop betrachtet werden. Das APSA-Epitoppeptid windet sich um diesen Tryptophanrest, was zu einer bemerkenswerten Interaktion von vier Ringstrukturen führt, in der abwechselnd eine aromatische Aminosäureseitenkette des Antikörpers gegen den Pyrrolidinring jeweils eines Prolinrests im Epitoppeptid gestapelt ist (Abbildung 6B).

Ein Tryptophan als zentraler Rest wurde auch in der Struktur eines anti-PEG Antikörpers beschrieben (Huckaby *et al.*, 2020). In diesem Komplex agiert die ebenfalls exponierte hydrophobe Seitenkette des Tryptophanrests dynamisch, wobei die PEG-Kette nach einer Konformationsänderung der Seitenkette dieses Tryptophanrests eingefangen wird und sich die Wechselwirkungen mit der PEG-Kette hierdurch stabilisieren (Huckaby *et al.*, 2020). Einen solchen dynamischen Bindemechanismus, bei dem die Polymerkette durch Änderung der Konformation einer Aminosäureseitenkette in einer Art Ringstruktur eingefangen wird, wurde in keiner der vier Strukturen der anti-PAS Fabs gefunden.

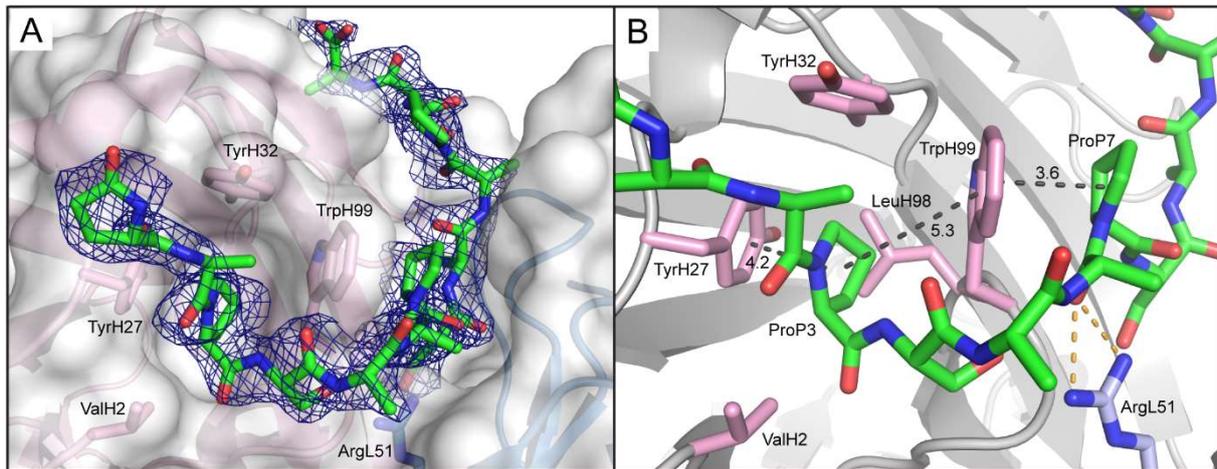


Abbildung 6: Strukturelle Details der Bindungswechselwirkungen zwischen Fab 3.1 und dem (APSA)₃-Peptid (PDB-Code: 7O33). (A) Einbettung des (APSA)₃-Peptids (grün) innerhalb der Furche im Paratop des Fab 3.1 (leichte Kette: blau; schwere Kette: rosa). (B) Stapelwechselwirkungen zwischen Tyr^{H27}, Pro^{P3}, Trp^{H99} und Pro^{P7} (schwarze gestrichelte Linien) des (APSA)₃-Peptids (grün) bzw. der schweren Kette des Fab 3.1 (rosa). Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte ist bei einer Konturebene von 1σ dargestellt (abgewandelt nach Schilz *et al.*, 2021).

Obwohl anti-PEG Antikörper bereits seit Jahrzehnten bekannt sind, wurden erst 2020 die Strukturen von insgesamt drei verschiedenen Komplexen aus anti-PEG Fab und gebundener PEG-Kette gelöst (Huckaby *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020). In allen drei Strukturen bilden zwei anti-PEG Fabs kooperativ einen Dimer-Komplex mit einer einzelnen PEG-Kette. Ein solcher Bindemodus unterscheidet sich stark von den anti-PAS Fabs, die allesamt in einer 1:1-Stöchiometrie an ihr jeweiliges Epitopeptid binden. Die gleichzeitige Bindung zweier Fabs wäre alleine schon wegen der Verwendung der kurzen Epitopeptide für die Kokristallisation nicht möglich gewesen (im Gegensatz zu den hochrepetitiven PEG-Ketten). Außerdem weisen die gebundenen PAS-Epitopeptide in keiner der vier Strukturen eine S-förmig gewundene Struktur auf, wie sie in den Komplexen mit den PEG-Ketten beobachtet wurde. Diese Struktur des PEG-Polymers führt dazu, dass die PEG-Kette aus dem Paratop herausragt, was eine kooperative Bindung zweier Fabs ermöglicht.

Im Gegensatz zum PEG-Polymer weisen die PAS-Polypeptide alleine schon wegen des Peptidrückgrats deutlich mehr chemische Gruppen auf, die als Donor oder Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen fungieren können (Schlapschy *et al.*, 2013). In den Strukturen der anti-PEG Fabs wurden überraschenderweise keine Wasserstoffbrücken zwischen den Sauerstoffatomen der Ethergruppen des PEG und Aminosäuren der Antikörperfragmente identifiziert. Dementsprechend erfolgten die Wechselwirkungen zwischen PEG und Fab hauptsächlich über Van-der-Waals Kontakte. In PAS-Polypeptiden hingegen stehen durch die Peptidbindungen und die in der PAS#1- und APSA-Sequenz enthaltenen Serinreste eine Vielzahl an chemischen Gruppen zur Verfügung, die sich an Wasserstoffbrückenbindungen

beteiligen können. Diese Tatsache machen sich die anti-PAS Antikörper zunutze, um neben Van-der-Waals Kontakten mit zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen eine relativ starke Bindung der PAS-Polypeptide zu erreichen.

In der Kristallstruktur des Fab 1.2 wurden beispielsweise 9 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Fab und Epitopeptid identifiziert. Die drei N-terminalen Reste des Epitopeptids bilden zusammen mit der CDR-H3 ein regelrechtes Wasserstoffbrückennetzwerk aus, das einem kurzen, antiparallelen β -Faltblatt ähnelt. Welchen Beitrag die zahlreichen Wasserstoffbrücken allerdings zur Affinität leisten, bleibt angesichts des begrenzten Energiegewinns von Wasserstoffbrücken in einer konkurrierenden wässrigen Umgebung unklar (Fersht, 1987; Gao *et al.*, 2009).

Trotz größter Bemühungen und mehrerer Herangehensweisen zur Kristallisation des Fab 2.1 konnten in diesem Fall keine beugungsfähigen Proteinkristalle erhalten werden. So wurde sowohl eine Kokristallisation zusammen mit der V_H H-Domäne, die im Fall des Fab 1.2 zum Erfolg führte, als auch die Expression des Fab 2.1 mit humaner leichter Kette des Typs lambda oder als chimäre Version mit murinen konstanten Domänen zur anschließenden Kokristallisation erfolglos versucht. Ein weiterer Ansatz, der in einer weiterführenden Arbeit untersucht werden soll, wäre die direkte Fusion des Epitopeptids mit dem Fab. Hierbei wurde ein Abschnitt der P/A#1-Sequenz mit 16 Aminosäuren, der das vom Fab 2.1 erkannte Epitop in zweifacher Kopie beinhaltet, über einen aus fünf Glycinresten bestehenden Linker mit dem N-Terminus der leichten oder schweren Kette des Fabs fusioniert. In ersten Expressionsexperimenten konnte das Konstrukt mit dem Epitopeptid am N-Terminus der leichten Kette hergestellt werden, wenn auch nur mit geringer Ausbeute. Weitergehend konnte in einem ELISA gezeigt werden, dass dieses Konstrukt im Gegensatz zum unmodifizierten Fab 2.1 nicht mehr in der Lage ist, ein PASyliertes Protein zu binden (siehe Anhang, Abschnitt 8.2, Abbildung S2). Dies lässt darauf schließen, dass das Paratop des Fabs bereits durch das mit dem N-Terminus fusionierte Epitopeptid belegt ist, was die Eignung dieses Konstrukts für die intramolekulare „Ko“-Kristallisation prinzipiell nahelegt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse tragen nicht nur zu einem besseren Verständnis der Erkennung von intrinsisch ungeordneten Peptiden oder Proteinen durch Antikörper bei; die strukturelle Aufklärung der Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und PAS-Polypeptiden eröffnet außerdem Möglichkeiten für das strukturbasierte *Engineering* von anti-PAS Antikörpern mit verbesserten Bindungseigenschaften.

4.3 Entwicklung einer Strategie zur Affinitätsreinigung PASylierter Proteine auf Basis der charakterisierten Antikörperfragmente

Die kosten- und ressourceneffiziente Downstream-Reinigung stellt eine große Hürde in der Entwicklung und Produktion von Biotherapeutika dar. Zahlreiche protein- oder peptidbasierte Anhängsel für die spezifische Detektion und Reinigung von Proteinen werden in der biochemischen Forschung verwendet (Brizzard, 2008; Waugh, 2005), wohingegen deren Einsatz in Fusionsproteinen zur klinischen Behandlung von Patienten allerdings stark eingeschränkt ist. Nachteil dieser Affinitätsanhängsel ist, dass zusätzlich zum pharmazeutisch aktiven Protein eine weitere Komponente in das System eingebracht wird, was dessen Einsatz im Patienten beispielsweise aufgrund potentieller Immunogenität einschränkt. Auf Basis der in dieser Arbeit charakterisierten Antikörper gegen PAS-Polypeptidsequenzen und den hiervon abgeleiteten rekombinanten Antikörperfragmenten wurde eine allgemein anwendbare affinitätsbasierte Reinigungsstrategie für PASylierte Proteine entwickelt. Der größte Vorteil hierbei besteht darin, dass keine zusätzlichen Fremdbestandteile hinzugezogen werden müssen, da die als Affinitätsmatrix genutzten Antikörperfragmente gegen die PAS-Polypeptidkette als pharmakologisch relevante Komponente des Biotherapeutikums gerichtet sind. Ein ähnlicher Ansatz findet sich in der weit verbreiteten Protein A Chromatographie, da hier die Bindung an den konservierten Fc-Teil von IgG-Antikörpern für deren Affinitätsreinigung genutzt wird (Hober *et al.*, 2007).

Neben der funktionellen und strukturellen Charakterisierung der anti-PAS Antikörper war die Evaluierung der Anwendbarkeit ihrer rekombinanten Fab-Fragmente für die Affinitätsreinigung PASylierter Proteine Bestandteil dieser Arbeit. Im Vergleich zu den Affinitäten/Aviditäten der bivalenten anti-PAS Antikörper, die allesamt im einstelligen nanomolaren oder sogar pikomolaren Bereich lagen, wurden für die monovalenten rekombinanten Antikörperfragmente deutlich niedrigere Affinitätswerte mittels SPR bestimmt, teilweise im einstelligen mikromolaren Bereich (Schilz *et al.*, 2021). Im Hinblick auf die affinitätsbasierte Proteinreinigung stellt eine solche eher moderate Bindungswechselwirkung einen Vorteil dar, da nach erfolgter Komplexbildung mit dem Zielmolekül leichter dessen Elution unter milden Bedingungen erreicht werden kann (Götzke *et al.*, 2019; Schmidt & Skerra, 2007; Skerra & Schmidt, 2000). Dies wird insbesondere wichtig, wenn man bedenkt, dass die für die Plasmahalbwertszeitverlängerung verwendete PAS-Polypeptidkette mehrere Kopien der Epitopsequenz beinhaltet, beispielsweise zehn Kopien des von den anti-PAS#1 Fabs erkannten Epitops in einem PAS#1(200) Fusionsprotein. Aufgrund dieser hohen Epitopdichte auf Seiten des PAS-Polypeptids wurde für die Entwicklung einer affinitätsbasierten Proteinreinigungsmethode das anti-PAS#1 Antikörperfragment mit der geringsten Affinität ausgewählt, Fab 1.2. Mit einer im SPR bestimmten monovalenten Affinität von nur $3.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ und einer relativ schnellen Dissoziationskinetik ($\tau_{1/2} = 6.4 \text{ s}$) weist das Fab 1.2 eine deutlich

niedrigere Affinität auf als beispielsweise das ebenfalls in der Immunaффinitätschromatographie eingesetzte Antikörperfragment des c-myc Antikörpers 9E10, welche in Fluoreszenztitrationsexperimenten mit einem synthetischen myc-tag Peptid zu 80 ± 5 nM ermittelt wurde (Schiweck *et al.*, 1997). Dass eine Affinität im mikromolaren Bereich für die Affinitätschromatographie ausreicht, wenn einer der beiden Bindungspartner multivalent ist, wurde bereits im Fall des *Strep*-tag-Affinitätsanhängsels bewiesen. Dieses Affinitätspar eignet sich trotz einer Dissoziationskonstante von nur 37 μ M zur Affinitätschromatographie (Schmidt *et al.*, 1996).

Bei der nicht ortsgerichteten kovalenten Kopplung von Antikörperfragmenten oder anderen Bindemolekülen können im Prinzip auch Reste in der Nähe der Antigenbindestelle konjugiert werden, was die biomolekulare Erkennung des Zielmoleküls beeinträchtigen kann. Deshalb wurden die Positionen der freien Lysin-Aminogruppen des Fab 1.2 vor der Kopplung an das Säulenmaterial anhand der vorhandenen Kristallstruktur überprüft. Da keine für die chemische Kopplung zugänglichen Lysinreste in der Nähe des Paratops identifiziert wurden, konnte eine nachteilige Beeinflussung der Bindungsaktivität ausgeschlossen werden, was sich in späteren Experimenten bestätigte.

Um in den initialen Versuchen zur Ermittlung geeigneter Elutionsbedingungen einen möglichst großen Durchsatz bei vergleichsweise geringem Materialverbrauch zu erzielen, wurden die Experimente in Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml) durchgeführt, bevor die vielversprechendsten Bedingungen im Säulenformat (1 ml) angewandt wurden. Insgesamt wurden drei Modellproteine verwendet: His₆-PAS#1(800)-IL1Ra (Powers *et al.*, 2020), His₆-H1GA-PAS#1(200) (Rauth *et al.*, 2016) und *Strep*II-eGFP-PAS#1(200) (Schilz *et al.*, 2022), wobei sich insbesondere letzteres aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften als Modellprotein anbot. Das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende grün-fluoreszierende Protein (GFP) hat sich aufgrund seiner intrinsischen Fluoreszenz als wertvolles Werkzeug in vielen Bereichen der Molekularbiologie etabliert (Tsien, 1998). Der Vorteil hierbei ist, dass sich bereits kleine Mengen des GFP mit dem bloßen Auge erkennen lassen, was bei der Beurteilung von vollständiger Bindung und Elution auf beziehungsweise von der Affinitätsmatrix von großer Hilfe ist. Des Weiteren ermöglicht die intrinsische Fluoreszenz des GFP die Detektion desselben bei einer zweiten Wellenlänge, zusätzlich zu der für Proteine typischen von 280 nm, was beispielsweise bei der Verwendung von Elutionsreagenzien mit einer Absorption in diesem Wellenlängenbereich Vorteile mit sich bringt. Aufgrund der intensiveren Fluoreszenz und einer schnelleren Maturierungszeit des Chromophors beim *enhanced* GFP (eGFP) (Cormack *et al.*, 1996) wurde hier diese GFP-Mutante verwendet.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei der Kristallstrukturanalyse des Komplexes aus Fab 1.2 und dem PAS#1-Epitopeptid (Abbildung 7B), in dem keinerlei Salzbrücken an der Interaktion beteiligt sind, führten Elutionsbedingungen mit erhöhter Ionenstärke nicht zur

Elution. Neben stringenten Elutionsbedingungen, bei denen beispielsweise durch einen stark erniedrigten pH-Wert eine Elution des PASylierten Proteins ausgelöst wird, bewirken kompetitiv bindende Reagenzien die Elution des Zielproteins. Im Gegensatz zu stringenten Bedingungen, bei denen oftmals eine Schädigung des Affinitätsliganden auftritt (Hari *et al.*, 2010; Shukla *et al.*, 2007), wird bei kompetitiver Verdrängung die Interaktion zwischen den beiden Bindepartnern selektiv beeinflusst. Als besonders vielversprechend stellte sich anfangs eine 2 mM Lösung des PAS#1-Epitopeptids heraus. Obwohl die Elution mittels eines kompetitiv bindenden Peptids nicht unüblich ist (Götzke *et al.*, 2019), wurde dieser Ansatz aufgrund der hohen Kosten für die Peptidsynthese nicht weiter verfolgt. Ebenso effizient, und hinsichtlich der Anwendung im präparativen Maßstab aufgrund der niedrigeren Kosten vielversprechender, war eine Lösung von 1 M L-Prolinamid.

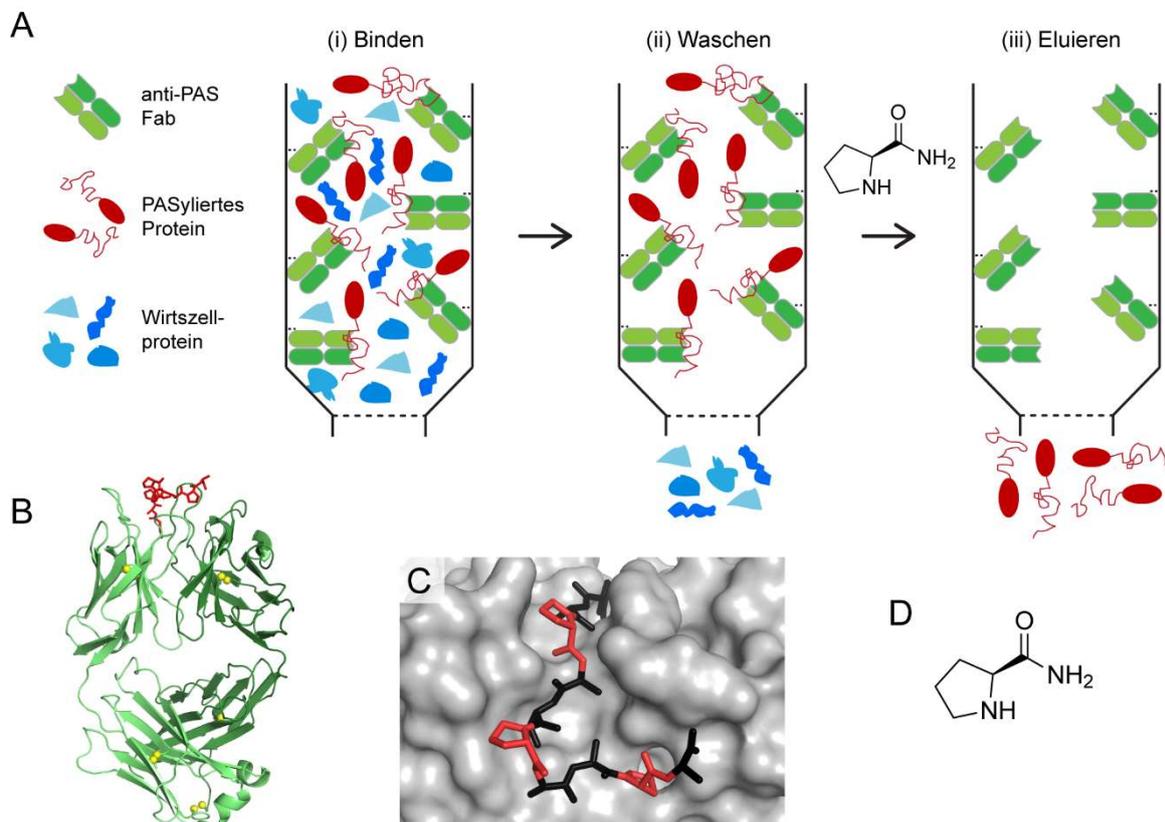


Abbildung 7: Prinzip der Affinitätsreinigung PASylierter Proteine unter Verwendung einer Säule mit dem immobilisiertem anti-PAS Fab 1.2. (A) Schematische Illustration der PAS-Affinitätsreinigung im Einschrittverfahren: (i) Auftragen des Zellextrakts, der das PASylierte Protein von Interesse enthält, (ii) Waschen der Säule mit einem physiologischen Laufpuffer und (iii) Elution des PASylierten Proteins durch Anwendung einer 1 M Lösung von L-Prolinamid in Laufpuffer bei pH 8. (B) Kristallstruktur (PDB-Code: 7O31) des Fab 1.2 (leichte Kette: hellgrün; schwere Kette: dunkelgrün) im Komplex mit seinem PAS#1-Epitopeptid (rot). (C) Aufsicht auf das Paratop von Fab 1.2 mit dem gebundenen minimalen PAS-Epitopeptid dargestellt als Stäbchen mit den L-Prolinamidgruppen darin rot hervorgehoben. (D) Chemische Struktur von L-Prolinamid (Abbildung aus Schilz *et al.*, 2022).

Auch im 1 ml-Säulenformat konnte L-Prolinamid, ein biologisch inaktives und gut lösliches Carboxamidderivat der Aminosäure L-Prolin durch scharfe Elution überzeugen. Aufgrund der zusätzlichen Carboxamidgruppe ähnelt L-Prolinamid der Struktur eines in der PAS#1-Polypeptidkette eingebauten Prolinrestes (Abbildung 7C,D). In der gelösten Kristallstruktur des Komplexes aus Fab 1.2 und dem PAS#1-Epitopeptid wird anhand des Prolins an Position 3 im Peptid, welches als Wasserstoffbrückenakzeptor fungiert und hydrophobe Wechselwirkungen mit zwei Tyrosinresten in CDR-L1 eingeht, die Bedeutung dieser Aminosäure für die Bindung deutlich (Schilz *et al.*, 2021). Im strukturellen Verlauf des PAS#1-Epitopeptids ist die Amidgruppe der C-terminalen Peptidbindung dieses Prolins zu Alanin für eine weitere Wasserstoffbrücke verantwortlich, was die Bedeutung der Carboxamidgruppe im L-Prolinamid hervorhebt und erklärt, weshalb eine Elution mit der Iminosäure L-Prolin alleine auch in hohen Konzentrationen nicht zum Erfolg führte. Unter der Annahme, dass eine weitere N- und/oder C-terminale Derivatisierung des L-Prolinamids zur Erhöhung der Ähnlichkeit zum Peptidrückgrat möglicherweise zu einem noch effektiveren Elutionsreagenz führt, wurden die durch Dr. Markus Anneser am Lehrstuhl synthetisierten und freundlicherweise zur Verfügung gestellten Derivate N-Methyl-pyrrolidin-2-carboxamid, Acetylpyrrolidin-2-carboxamid und Acetyl-N-methyl-pyrrolidin-2-carboxamid im 1 ml-Säulenmaßstab untersucht. Allerdings erreichte keine der getesteten Substanzen die Elutionseffizienz des L-Prolinamids (Daten nicht gezeigt).

Nachdem zunächst das Funktionsprinzip der anti-PAS Affinitätssäule (Abbildung 7A) mit drei vorgereinigten PASylierten Proteinproben bewiesen wurde, konnte auch die Anwendbarkeit zur Einschrittreinigung aus *E. coli* Ganzzell- oder Periplasmaextrakten gezeigt werden. Dass die Interaktion mit der Affinitätsmatrix durch die PAS-Polypeptidkette herrührt, wurde in einem Versuch mit nicht PASyliertem *StreptII*-eGFP nachgewiesen, in dem keine Bindung an die Säule beobachtet wurde. Da für eine praktische Anwendung die Stabilität der Affinitätsmatrix und die Reproduzierbarkeit der Reinigung von großer Relevanz ist, wurden 20 identische Reinigungsläufe hintereinander durchgeführt und dabei die Fläche sowie Höhe des Elutionspeaks analysiert. Hierbei stellte sich heraus, dass die Elutionsprofile bei Standardabweichungen von nur 1,8 % und 0,8 % für Peakfläche beziehungsweise Peakhöhe sehr hohe Reproduzierbarkeit aufwiesen und kein Kapazitätsverlust der Säule zu erkennen war (Schilz *et al.*, 2022). Obwohl bei der Verwendung einer biologisch inaktiven Substanz wie L-Prolinamid in einem Puffer mit neutralem pH-Wert von 8.0 zur Elution keinerlei Auswirkungen auf die makromolekulare Struktur des gereinigten Proteins zu erwarten war, wurden verschiedene Proteine nach der Elution einer analytischen Größenausschlusschromatographie unterzogen. Hierbei zeigten alle über die anti-PAS-Affinitätssäule gereinigten Proteine monomeres Verhalten, ohne Anzeichen von

Oligomerisierung oder Aggregatbildung, sodass die so gereinigten PASylierten Proteine direkt nach der Elution beispielsweise in molekularbiologischen Assays verwendet werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte anti-PAS-Affinitätschromatographie zeigt ein weiteres vielversprechendes Anwendungsgebiet für die in dieser Arbeit charakterisierten anti-PAS-Antikörper auf. Zusammen mit den nun als molekulare Werkzeuge zur Verfügung stehenden Antikörpern bietet diese Chromatographietechnik eine weitere Methode, die bei der Entwicklung und Herstellung PASylierter Biotherapeutika von Nutzen sein kann.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die Bedeutung proteinbasierter Therapeutika, sogenannter Biopharmazeutika, stark zugenommen. Die Wirksamkeit vieler dieser innovativen Arzneimittel wird allerdings durch eine kurze Plasmahalbwertszeit limitiert, da diese trotz höheren Molekulargewichts im Vergleich zu niedermolekularen Wirkstoffen immer noch über die Niere ausgeschieden werden. Mit der PASylation®-Technologie, einer biologischen Alternative zur PEGylierung, wurde eine innovative Strategie entwickelt, um durch genetische Fusion mit einer Pro/Ala-reichen Sequenz (PAS) Biotherapeutika mit verlängerter Verweildauer im Blutplasma zu schaffen. Neben der Plasmahalbwertszeit stellt die Reinigung von Biotherapeutika eine große Herausforderung im Entwicklungsprozess dar, da aufgrund strenger Auflagen für die Anwendung im Menschen auf in der Forschung übliche Affinitätsanhängsel verzichtet werden muss.

Das Ziel dieser Arbeit war es, für die Diagnostik interessante Antikörper gegen PAS-Sequenzen zu charakterisieren und deren Anwendbarkeit als molekulare Werkzeuge in der Entwicklung PASylierter Biotherapeutika zu untersuchen. Die flexible und strukturell ungeordnete PAS-Polypeptidkette stellt eine Sonderform intrinsisch ungeordneter Proteine und eine schwierige Zielstruktur für Bindemoleküle dar. Eine kristallographische Aufklärung des Bindemodus und der beteiligten molekularen Wechselwirkungen ist deshalb von großem wissenschaftlichem Interesse. Ausgehend von den charakterisierten Antikörpern sollte die Anwendbarkeit der daraus abgeleiteten Antikörperfragmente für die Entwicklung einer affinitätsbasierten Reinigungsstrategie für PASylierte Proteine untersucht werden.

Nach Konjugation eines je vierzig Aminosäuren langen Polypeptids an ein hochimmunogenes Trägerprotein und mehrmaliger Immunisierung konnte für die drei PAS-Sequenzen PAS#1, P/A#1 und APSA jeweils eine Immunantwort in Mäusen hervorgerufen werden. Mittels Oberflächenplasmon-Resonanzspektroskopie und *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* wurden Antikörper aus dem Kulturüberstand von Hybridomzellen hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften untersucht und vielversprechende Klone für die weitere Entwicklung ausgewählt. Die Fähigkeit der Antikörper zur spezifischen Detektion PASylierter Proteine wurde im Western-Blot bewiesen. Die genaue Lage der linearen Epitope in den PAS-Sequenzen konnte für die ausgewählten Antikörper mittels SPOT-Technologie bestimmt werden.

Nach der Bestimmung der Nukleotidsequenzen der variablen Regionen dieser Antikörper mittels PCR mit geeigneten Primern wurden entsprechende Antikörperfragmente (Fab) zum Zweck der Proteinkristallisation als chimäre Version periplasmatisch in *E. coli* produziert. In vier Fällen war es auf diese Weise möglich, die hochauflösende Proteinstruktur des Komplexes aus Antikörperfragment und Epitopeptid zu lösen. Um Proteinkristalle des Fab

1.2 zu erhalten, wurde eine Strategie zur Verbesserung der Kristallisierbarkeit von Fabs unter Zuhilfenahme einer kameliden V_HH Domäne mit Spezifität für die Gelenkregion der humanen leichten Kette des Typs kappa als „Kristallisationschaperon“ angewendet.

Die Kristallstrukturen zeigten, dass die Bindung zwischen Epitopeptid und Antikörperfragment aufgrund der Abwesenheit von geladenen oder großen hydrophoben Aminosäureseitenketten in den PAS-Polypeptiden durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptidrückgrat und Van-der-Waals Kontakte geprägt ist. In einigen Fällen wies das Paratop ausgeprägte räumliche Komplementarität zum Epitopeptid auf, was zu einer großen begrabenen Oberfläche führte (1009 Å² im Fall des vom Fab 3.1 gebundenen Epitopeptids). Überraschenderweise zeigte sich, dass Alanin, die Aminosäure mit der kleinsten Seitenkette, in mehreren Strukturen ein zentrales Element im Epitop darstellt und an essentiellen Wechselwirkungen beteiligt ist. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die apparente Affinität stark vom Aviditätseffekt der bivalenten Antikörper und der Länge der PAS-Polypeptidkette mit multiplen Epitopen abhängig war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Anwendbarkeit der charakterisierten Antikörper zur Verwendung in einer affinitätsbasierten Reinigungsstrategie für PASylierte Proteine untersucht. Hierfür wurde auf das monovalente Fab 1.2 mit einer moderaten Affinität von 3.7 µM zurückgegriffen, um nach der selektiven Adsorption der PASylierten Zielmoleküle an die Säulenmatrix auch eine effektive Elution unter milden Bedingungen zu ermöglichen. Nach der Kopplung dieses Fabs an Sepharose konnten im Mikromaßstab vielversprechende Elutionsbedingungen identifiziert werden. Die kompetitive Elution in Gegenwart von 1 M L-Prolinamid bei pH 8 erwies sich als besonders geeignet und wurde im 1 ml Säulenmaßstab auf einer automatisierten Chromatographieanlage getestet. Die Anwendbarkeit der so hergestellten Affinitätssäule wurde durch die erfolgreiche Einschrittreinigung verschiedener PASylierter Proteine aus Ganzzell- oder Periplasmaextrakt von *E. coli* demonstriert. Ein nachteiliger Einfluss der Reinigungsprozedur oder des L-Prolinamids auf die PASylierten Proteine oder die Affinitätsmatrix wurde nicht beobachtet. Mit einer Standardabweichung von nur 1,8 % und 0,8 % für Peakfläche beziehungsweise Peakhöhe über zwanzig aufeinanderfolgende Chromatographieläufe wurde die Stabilität der Affinitätssäule und die hohe Reproduzierbarkeit demonstriert.

Sowohl mit den charakterisierten Antikörpern als auch mit der neu entwickelten affinitätsbasierten Reinigungsstrategie konnten in dieser Arbeit vielversprechende molekulare Werkzeuge für die präklinische und klinische Entwicklung von PASylierten Wirkstoffen sowie eine innovative Reinigungsstrategie für PASylierte Proteine bereitgestellt werden.

6 Abkürzungen

Abz	<i>ortho</i> -Aminobenzoessäure
AEX	Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Buried Surface Area
cDNA	kodierende Desoxyribonukleinsäure
CDR	Complementarity Determining Region
CEX	Kationenaustauschchromatographie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced GFP
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fab	„Fragment Antigen Binding“ eines Immunglobulins
Fc	„Fragment Crystallizable“ eines Immunglobulins
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD_x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
p.a.	pro analysi
PAS	Pro/Ala-reiche Sequenzen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglycol
PDB	Protein Data Bank at RCSB
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PPA	Periplasmaaufschluss
RMSD	Root Mean Square Deviation
rpm	Rounds per Minute

Abkürzungen

SAC	<i>Strep</i> Tactin Affinitätschromatographie
scFv	„Single Chain Variable Fragment“ eines Immunglobulins
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPOT	Synthetic Peptides on Transfer Membrane
SPR	Surface Plasmon Resonance
V _H	“Variable Heavy Chain” eines Immunglobulins
V _{HH}	“Variable Heavy Chain” eines kameliden Immunglobulins
V _L	“Variable Light Chain” eines Immunglobulins
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume

7 Literaturverzeichnis

- Armstrong, J.K., Hempel, G., Kolling, S., Chan, L.S., Fisher, T., Meiselman, H.J. & Garratty, G. (2007) Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* 110, 103-111.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G.E. & Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 48, 1-13.
- Bailey, L.J., Sheehy, K.M., Dominik, P.K., Liang, W.G., Rui, H., Clark, M., Jaskolowski, M., Kim, Y., Deneka, D., Tang, W.-J. & Kossiakoff, A.A. (2018) Locking the elbow: Improved antibody Fab fragments as chaperones for structure determination. *J. Mol. Biol.* 430, 337-347.
- Barlow, D.J., Edwards, M.S. & Thornton, J.M. (1986) Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature* 322, 747-748.
- Baumann, A. (2006) Early development of therapeutic biologics--pharmacokinetics. *Curr Drug Metab* 7, 15-21.
- Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G. & Shopp, G. (1998) Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicol Sci* 42, 152-157.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. & Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. & Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13703-13708.
- Binder, U. & Skerra, A. (2012) Half-Life Extension of Therapeutic Proteins via Genetic Fusion to Recombinant PEG Mimetics. In Kontermann, R. (Ed.) *Therapeutic Proteins*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Binder, U. & Skerra, A. (2020) PASylated thymosin alpha1: A long-acting immunostimulatory peptide for applications in oncology and virology. *Int J Mol Sci* 22(1), 124.
- Blankenship, K. (2020) The top 20 drugs by global sales in 2019. Fierce Pharma, Abgerufen am 24. Juni 2021, <https://www.fiercepharma.com/special-report/top-20-drugs-by-global-sales-2019>.
- 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.
- Brandl, F., Busslinger, S., Zangemeister-Wittke, U. & Plückthun, A. (2020) Optimizing the anti-tumor efficacy of protein-drug conjugates by engineering the molecular size and half-life. *J Control Release* 327, 186-197.
- Breiback, J. & Skerra, A. (2018) The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers* 109, e23069.
- Brilhante-da-Silva, N., de Oliveira Sousa, R.M., Arruda, A., Dos Santos, E.L., Marinho, A.C.M., Stabeli, R.G., Fernandes, C.F.C. & Pereira, S.D.S. (2021) Camelid single-domain antibodies for the development of potent diagnosis platforms. *Mol Diagn Ther* 25, 439-456.
- Brinkmann, U. & Kontermann, R.E. (2021) Bispecific antibodies. *Science* 372, 916-917.
- Brizzard, B. (2008) Epitope tagging. *BioTechniques* 44, 693-695.

- Brochet, X., Lefranc, M.P. & Giudicelli, V. (2008) IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 36, W503-508.
- Bullock, W.O. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* 5, 376-379.
- Chardès, T., Villard, S., Ferrières, G., Piechaczyk, M., Cerutti, M., Devauchelle, G. & Pau, B. (1999) Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family. *FEBS Lett* 452, 386-394.
- Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. (1985) Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol* 186, 651-663.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M. & Anfinsen, C.B. (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 636-643.
- Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244, 1081-1085.
- Davidoff, S.N., Ditto, N.T., Brooks, A.E., Eckman, J. & Brooks, B.D. (2015) Surface Plasmon Resonance for Therapeutic Antibody Characterization. In Fang, Y. (Ed.) *Label-Free Biosensor Methods in Drug Discovery*. Springer New York, New York, NY.
- Davis, F.F. (2002) The origin of pegnology. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 457-458.
- Dozier, J.K. & Distefano, M.D. (2015) Site-specific PEGylation of therapeutic proteins. *Int J Mol Sci* 16, 25831-25864.
- Dübel, S., Hust, M., Frenzel, A., Schirrmann, T. & Breitling, F. (2019) *Rekombinante Antikörper*. Springer-Verlag.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126-2132.
- Ereño-Orbea, J., Sicard, T., Cui, H., Carson, J., Hermans, P. & Julien, J.P. (2018) Structural basis of enhanced crystallizability induced by a molecular chaperone for antibody antigen-binding fragments. *J Mol Biol* 430, 322-336.
- Ey, P.L., Prowse, S.J. & Jenkin, C.R. (1978) Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 15, 429-436.
- Fersht, A.R. (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* 12, 301-304.
- Fonda, I., Kenig, M., Gaberc-Porekar, V., Pristovaek, P. & Menart, V. (2002) Attachment of histidine tags to recombinant tumor necrosis factor-alpha drastically changes its properties. *Sci. World J.* 2, 1312-1325.
- Foquet, L., Hermsen, C.C., van Gemert, G.J., Van Braeckel, E., Weening, K.E., Sauerwein, R., Meuleman, P. & Leroux-Roels, G. (2014) Vaccine-induced monoclonal antibodies targeting circumsporozoite protein prevent Plasmodium falciparum infection. *J Clin Invest* 124, 140-144.
- Frank, R. (2002) The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 267, 13-26.
- Gagnon, P. (2012) Technology trends in antibody purification. *J Chromatogr A* 1221, 57-70.
- Gao, J., Bosco, D.A., Powers, E.T. & Kelly, J.W. (2009) Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins. *Nat Struct Mol Biol* 16, 684-690.

- Garvey, L.H. & Nasser, S. (2021) Anaphylaxis to the first COVID-19 vaccine: is polyethylene glycol (PEG) the culprit? *Br J Anaesth* 126, e106-e108.
- 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.
- Goel, A., Colcher, D., Koo, J.S., Booth, B.J., Pavlinkova, G. & Batra, S.K. (2000) Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochim Biophys Acta* 1523, 13-20.
- Goh, G.K.-M., Dunker, A.K. & Uversky, V.N. (2016) Correlating Flavivirus virulence and levels of intrinsic disorder in shell proteins: protective roles vs. immune evasion. *Molecular BioSystems* 12, 1881-1891.
- Gokarn, Y.R., McLean, M. & Laue, T.M. (2012) Effect of PEGylation on Protein Hydrodynamics. *Mol. Pharmaceutics* 9, 762-773.
- Gorovits, B., Baltrukonis, D.J., Bhattacharya, I., Birchler, M.A., Finco, D., Sikkema, D., Vincent, M.S., Lula, S., Marshall, L. & Hickling, T.P. (2018) Immunoassay methods used in clinical studies for the detection of anti-drug antibodies to adalimumab and infliximab. *Clin Exp Immunol* 192, 348-365.
- Götzke, H., Kilisch, M., Martínez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., Engels, N., Jungmann, R., Stenmark, P., Opazo, F. & Frey, S. (2019) The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nat. Commun.* 10, 4403.
- Griffiths, K., Binder, U., McDowell, W., Tommasi, R., Frigerio, M., Darby, W.G., Hosking, C.G., Renaud, L., Machacek, M., Lloyd, P., Skerra, A. & Foley, M. (2019) Half-life extension and non-human primate pharmacokinetic safety studies of i-body AD-114 targeting human CXCR4. *MAbs* 11, 1331-1340.
- Guan, D. & Chen, Z. (2014) Challenges and recent advances in affinity purification of tag-free proteins. *Biotechnol Lett* 36, 1391-1406.
- Guy, A.J., Irani, V., MacRaid, C.A., Anders, R.F., Norton, R.S., Beeson, J.G., Richards, J.S. & Ramsland, P.A. (2015) Insights into the immunological properties of intrinsically disordered malaria proteins using proteome scale predictions. *PLoS One* 10, e0141729.
- Hamano, Y., Grunkemeyer, J.A., Sudhakar, A., Zeisberg, M., Cosgrove, D., Morello, R., Lee, B., Sugimoto, H. & Kalluri, R. (2002) Determinants of Vascular Permeability in the Kidney Glomerulus. *J. Biol. Chem.* 277, 31154-31162.
- Harari, D., Kuhn, N., Abramovich, R., Sasson, K., Zozulya, A.L., Smith, P., Schlapschy, M., Aharoni, R., Koster, 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.
- Hari, S.B., Lau, H., Razinkov, V.I., Chen, S. & Latypov, R.F. (2010) Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: Molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry* 49, 9328-9338.
- Harris, L.J., Skaletsky, E. & McPherson, A. (1998) Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol* 275, 861-872.
- Hauptman, H.A. (1991) The phase problem of X-ray crystallography. *Rep. Prog. Phys.* 54, 1427-1454.
- Heathcote, E.J., Shiffman, M.L., Cooksley, W.G., Dusheiko, G.M., Lee, S.S., Balart, L., Reindollar, R., Reddy, R.K., Wright, T.L., Lin, A., Hoffman, J. & De Pamphilis, J. (2000) Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C and cirrhosis. *N Engl J Med* 343, 1673-1680.

- Heo, Y.A., Syed, Y.Y. & Keam, S.J. (2019) Pegaspargase: A review in acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs* 79, 767-777.
- Hillman, M.C., Yang, L.S., Sun, S., Duke, J.L., O'Neil, K.T., Kochie, J.E., Karjoo, A., Nath, P., Breth, L.A., Murphy, K., Ross, O.H., Burn, T.C., Hollis, G.F. & Wynn, R. (2001) A comprehensive system for protein purification and biochemical analysis based on antibodies to c-myc peptide. *Protein Expression Purif.* 23, 359-368.
- Hober, S., Nord, K. & Linhult, M. (2007) Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 848, 40-47.
- Huang, J. & Honda, W. (2006) CED: a conformational epitope database. *BMC Immunol* 7, 7.
- Huckaby, J.T., Jacobs, T.M., Li, Z., Perna, R.J., Wang, A., Nicely, N.I. & Lai, S.K. (2020) Structure of an anti-PEG antibody reveals an open ring that captures highly flexible PEG polymers. *Commun. Chem.* 3, 124.
- Janin, J., Rodier, F., Chakrabarti, P. & Bahadur, R.P. (2007) Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63, 1-8.
- 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.
- Jendroszek, A. & Kjaergaard, M. (2021) Nanoscale spatial dependence of avidity in an IgG1 antibody. *Sci Rep* 11, 12663.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. & Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 1-7.
- Kabsch, W. (2010) Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 125-132.
- Karlsson, R., Katsamba, P.S., Nordin, H., Pol, E. & Myszkka, D.G. (2006) Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal Biochem* 349, 136-147.
- Khan, F., Legler, P.M., Mease, R.M., Duncan, E.H., Bergmann-Leitner, E.S. & Angov, E. (2012) Histidine affinity tags affect MSP1(42) structural stability and immunodominance in mice. *Biotechnol J* 7, 133-147.
- Kimple, M.E., Brill, A.L. & Pasker, R.L. (2013) Overview of affinity tags for protein purification. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 73, 9.9.1-9.9.23.
- Klein, W. (2003) Calmodulin-binding peptide as a removable affinity tag for protein purification. *Methods Mol. Biol.* 205, 79-97.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774-797.
- Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., Steenbeke, T.D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, P.W., Robinson, J., Van Ryk, D., Wang, L., Burton, D.R., Freire, E., Wyatt, R., Sodroski, J., Hendrickson, W.A. & Arthos, J. (2002) HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420, 678-682.
- Leavy, O. (2010) Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 297-297.

- Lee, C.-C., Su, Y.-C., Ko, T.-P., Lin, L.-L., Yang, C.-Y., Chang, S.S.-C., Roffler, S.R. & Wang, A.H.J. (2020) Structural basis of polyethylene glycol recognition by antibody. *J. Biomed. Sci.* 27, 12.
- Lipsky, P.E., Calabrese, L.H., Kavanaugh, A., Sundy, J.S., Wright, D., Wolfson, M. & Becker, M.A. (2014) Pegloticase immunogenicity: the relationship between efficacy and antibody development in patients treated for refractory chronic gout. *Arthritis Res Ther* 16, R60.
- Liu, W. & Chen, Y.H. (2005) High epitope density in a single protein molecule significantly enhances antigenicity as well as immunogenicity: a novel strategy for modern vaccine development and a preliminary investigation about B cell discrimination of monomeric proteins. *Eur J Immunol* 35, 505-514.
- Loers, G., Cui, Y.F., Neumaier, I., Schachner, M. & Skerra, A. (2014) A Fab fragment directed against the neural cell adhesion molecule L1 enhances functional recovery after injury of the adult mouse spinal cord. *Biochem J* 460, 437-446.
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J. & Wu, H.-C. (2020) Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* 27, 1.
- Lundblad, J.R., Laurance, M. & Goodman, R.H. (1996) Fluorescence polarization analysis of protein-DNA and protein-protein interactions. *Mol. Endocrinol.* 10, 607-612.
- MacRaild, C.A., Seow, J., Das, S.C. & Norton, R.S. (2018) Disordered epitopes as peptide vaccines. *Pept. Sci.* 110, e24067.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea, A.G., 3rd, Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A. & Guan, C.D. (1988) An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74, 365-373.
- Makabe, K. (2020) Molecular basis of flexible peptide recognition by an antibody. *J. Biochem.* 167, 343-345.
- Mandaci, S.Y., Caliskan, M., Sariaslan, M.F., Uversky, V.N. & Coskuner-Weber, O. (2020) Epitope region identification challenges of intrinsically disordered proteins in neurodegenerative diseases: Secondary structure dependence of alpha-synuclein on simulation techniques and force field parameters. *Chem Biol Drug Des* 96, 659-667.
- Mankarious, S., Lee, M.L., Fischer, S., Pyun, K.H., Ochs, H.D., Oxelius, V.A. & Wedgwood, R. (1988) The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J. Lab. Clin. Med.* 112 5, 634-640.
- Manske, M. (2006) GENTle, a free multi-purpose molecular biology tool. *Universität zu Köln*.
- McKenna, R., Lombana, T.N., Yamada, M., Mukhyala, K. & Veeravalli, K. (2019) Engineered sigma factors increase full-length antibody expression in Escherichia coli. *Metab Eng* 52, 315-323.
- McPherson, A. & Gavira, J.A. (2014) Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 70, 2-20.
- Meerman, H.J. & Georgiou, G. (1994) Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Bio/Technology* 12, 1107-1110.
- 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.

- Miyanabe, K., Akiba, H., Kuroda, D., Nakakido, M., Kusano-Arai, O., Iwanari, H., Hamakubo, T., Caaveiro, J.M.M. & Tsumoto, K. (2018) Intramolecular H-bonds govern the recognition of a flexible peptide by an antibody. *J. Biochem.* 164, 65-76.
- 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.
- Moser, A.C. & Hage, D.S. (2010) Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments. *Bioanalysis* 2, 769-790.
- Muyldermans, S. (2013) Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 775-797.
- Nakamoto, H. & Bardwell, J.C. (2004) Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the Escherichia coli periplasm. *Biochim Biophys Acta* 1694, 111-119.
- Ng, E.W., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Jr., Guyer, D.R. & Adamis, A.P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 5, 123-132.
- Otto, R., Santagostino, A., Schrader, U., Lösch, M., Keeling, D., Sugahara, A., Moss, R., Nörtershäuser, J., Silberzahn, T., Fuhr, T., Rutten, P., Bauer, K.W., Boeck, P. & Ebel, T. (2014) *From science to operations: Questions, choices and strategies for success in biopharma*. McKinsey & Company.
- Padlan, E.A. (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol. Immunol.* 31, 169-217.
- Peplau, E., De Rose, F., Reder, S., Mittelhauser, M., Scafetta, G., Schwaiger, M., Weber, W.A., Bartolazzi, A., Skerra, A. & D'Alessandria, C. (2020) Development of a chimeric antigen-binding fragment directed against human Galectin-3 and validation as an immuno-positron emission tomography tracer for the sensitive in vivo imaging of thyroid cancer. *Thyroid* 30, 1314-1326.
- Plückthun, A. & Skerra, A. (1989) Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in Escherichia coli. *Methods Enzymol.* Academic Press.
- Powers, N.E., Swartzwelter, B., Marchetti, C., de Graaf, D.M., Lerchner, A., Schlapschy, M., Datar, R., Binder, U., Edwards, C.K., 3rd, Skerra, A. & Dinarello, C.A. (2020) PASylation of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) retains IL-1 blockade and extends its duration in mouse urate crystal-induced peritonitis. *J Biol Chem* 295, 868-882.
- Raghavan, M., Gastinel, L.N. & Bjorkman, P.J. (1993) The class I major histocompatibility complex related Fc receptor shows pH-dependent stability differences correlating with immunoglobulin binding and release. *Biochemistry* 32, 8654-8660.
- Rauth, S., Hinz, D., Borger, 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.
- Richter, A., Knorr, K., Schlapschy, M., Robu, S., Morath, V., Mendler, C., Yen, H.Y., Steiger, K., Kiechle, M., Weber, W., Skerra, A. & Schwaiger, M. (2020) First in-human medical imaging with a pasylated ⁸⁹Zr-labeled anti-HER2 Fab-fragment in a patient with metastatic breast cancer. *Nucl Med Mol Imaging* 54, 114-119.
- Rodriguez, E.L., Poddar, S., Iftekhar, S., Suh, K., Woolfork, A.G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S. & Hage, D.S. (2020) Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1157, 122332.
- Rosano, G.L. & Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front Microbiol* 5, 172.
- Rossmann, M. (1990) The molecular replacement method. *Acta Cryst.* 46, 73-82.

- Rüker, F. & Wozniak-Knopp, G. (2021) *Introduction to antibody engineering*. 1st ed. Springer International Publishing.
- Sambrook, J.F. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sandin, S., Öfverstedt, L.-G., Wikström, A.-C., Wrangé, Ö. & Skoglund, U. (2004) Structure and flexibility of individual immunoglobulin G molecules in solution. *Structure* 12, 409-415.
- Saphire, E.O., Parren, P.W.H.I., Pantophlet, R., Zwick, M.B., Morris, G.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Stanfield, R.L., Burton, D.R. & Wilson, I.A. (2001) Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: A template for vaccine design. *Science* 293, 1155.
- Schilz, J., Binder, U., Friedrich, L., Gebauer, M., Lutz, C., Schlapschy, M., Schiefner, A. & Skerra, A. (2021) Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope. *J Mol Biol* 433, 167113.
- Schilz, J., Clement, C., Greiner, F. & Skerra, A. (2022) Direct affinity purification of long-acting PASylated proteins with therapeutic potential using L-prolinamide for mild elution. *Angew. Chem., Int. Ed.*, e202200079.
- 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.
- Schiweck, W., Buxbaum, B., Schätzlein, C., Neiss, H.G. & Skerra, A. (1997) Sequence analysis and bacterial production of the anti-c-myc antibody 9E10: the VH domain has an extended CDR-H3 and exhibits unusual solubility. *FEBS Letters* 414, 33-38.
- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, 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.
- 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.
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. & Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255, 753-766.
- Senior, A.W., Evans, R., Jumper, J., Kirkpatrick, J., Sifre, L., Green, T., Qin, C., Židek, A., Nelson, A.W.R., Bridgland, A., Penedones, H., Petersen, S., Simonyan, K., Crossan, S., Kohli, P., Jones, D.T., Silver, D., Kavukcuoglu, K. & Hassabis, D. (2020) Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature* 577, 706-710.
- Shukla, A.A., Gupta, P. & Han, X. (2007) Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography: Case study for an Fc fusion protein. *J. Chromatogr. A* 1171, 22-28.
- Skerra, A. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991) The Functional Expression of Antibody Fv Fragments in *Escherichia coli*: Improved Vectors and a Generally Applicable Purification Technique. *Bio/Technology* 9, 273-278.
- Skerra, A. (1994) A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene* 141, 79-84.
- Skerra, A. & Schmidt, T.G. (2000) Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* 326, 271-304.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.

- Stanfield, R.L., Zemla, A., Wilson, I.A. & Rupp, B. (2006) Antibody elbow angles are influenced by their light chain class. *J Mol Biol* 357, 1566-1574.
- Steimer, K.S., Scandella, C.J., Skiles, P.V. & Haigwood, N.L. (1991) Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to Gp120. *Science* 254, 105-108.
- Strohl, W.R. (2015) Fusion proteins for half-life extension of biologics as a strategy to make biobetters. *BioDrugs* 29, 215-239.
- 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.
- Swaminathan, A., Lucas, R.M., Dear, K. & McMichael, A.J. (2014) Keyhole limpet haemocyanin – a model antigen for human immunotoxicological studies. *Br J Clin Pharmacol* 78, 1135-1142.
- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- Vazquez-Martinez, J.A., Gomez-Lim, M.A., Morales-Rios, E., Gonzalez, Y.M.J.A. & Ortiz-Navarrete, V. (2020) Short disordered epitope of CRTAM Ig-like V domain as a potential target for blocking antibodies. *Int J Mol Sci* 21, 8798.
- Vogt, M. & Skerra, A. (2004) Construction of an artificial receptor protein ("anticalin") based on the human apolipoprotein D. *Chembiochem* 5, 191-199.
- Vopel, S., Mühlbach, H. & Skerra, A. (2005) Rational engineering of a fluorescein-binding anticalin for improved ligand affinity. *Biol Chem* 386, 1097-1104.
- 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.
- Walsh, G. (2018) Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nat Biotechnol* 36, 1136-1145.
- Waugh, D.S. (2005) Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 23, 316-320.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A. & Wilson, K.S. (2011) Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 67, 235-242.
- Wu, T.T., Johnson, G. & Kabat, E.A. (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16, 1-7.
- Xue, B., Blocquel, D., Habchi, J., Uversky, A.V., Kurgan, L., Uversky, V.N. & Longhi, S. (2014) Structural disorder in viral proteins. *Chem Rev* 114, 6880-6911.
- Yang, Q., Jacobs, T.M., McCallen, J.D., Moore, D.T., Huckaby, J.T., Edelstein, J.N. & Lai, S.K. (2016) Analysis of pre-existing IgG and IgM antibodies against polyethylene glycol (PEG) in the general population. *Anal Chem* 88, 11804-11812.
- 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.
- Zemlin, M., Klinger, M., Link, J., Zemlin, C., Bauer, K., Engler, J.A., Schroeder, H.W., Jr. & Kirkham, P.M. (2003) Expressed murine and human CDR-H3 intervals of equal length exhibit distinct repertoires that differ in their amino acid composition and predicted range of structures. *J Mol Biol* 334, 733-749.

8 Anhang

8.1 Anhang I: Nachdruck der eingebundenen Veröffentlichungen

Veröffentlichung 1

Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope

Autoren: Jonas Schilz, Uli Binder, Lars Friedrich, Michaela Gebauer, Christina Lutz, Martin Schlapschy, André Schiefner und Arne Skerra

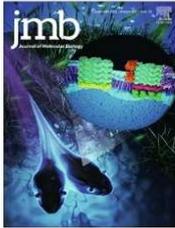
Fachzeitschrift: Journal of Molecular Biology
433, 167113

Verlag: Elsevier Ltd.

Publikationsdatum: 20. Juni 2021 (online Version)

DOI: 10.1016/j.jmb.2021.167113

Der vollständige Originalartikel wurde unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution CC BY License sowie zusätzlicher Genehmigung des Verlags Elsevier Ltd. (Erlaubnis erteilt am 17. August 2021) in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt.



Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope

J. Schilz¹, U. Binder², L. Friedrich², M. Gebauer², C. Lutz¹, M. Schlapschy¹, A. Schiefner¹ and A. Skerra^{1,2*}

¹ - Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany
² - XL-protein GmbH, Lise-Meitner-Strasse 30, 85354 Freising, Germany

Correspondence to A. Skerra: skerra@tum.de (A. Skerra)

<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167113>

Edited by S. Koide

Abstract

Pro/Ala-rich sequences (PAS) are polypeptides that were developed as a biological alternative to polyethylene glycol (PEG) to generate biopharmaceuticals with extended plasma half-life. Like PEG, PAS polypeptides are conformationally disordered and show high solubility in water. Devoid of any charged or prominent hydrophobic side chains, these biosynthetic polymers represent an extreme case of intrinsically disordered proteins. Despite lack of immunogenicity of PAS tags in numerous animal studies we now succeeded in generating monoclonal antibodies (MAbs) against three different PAS versions. To this end, mice were immunized with a PAS#1, P/A#1 or APSA 40mer peptide conjugated to keyhole limpet hemocyanin as highly immunogenic carrier protein. In each case, one MAb with high binding activity and specificity towards a particular PAS motif was obtained. The apparent affinity was strongly dependent on the avidity effect and most pronounced for the bivalent MAb when interacting with a long PAS repeat. X-ray structural analysis of four representative anti-PAS Fab fragments in complex with their cognate PAS epitope peptides revealed interactions dominated by hydrogen bond networks involving the peptide backbone as well as multiple Van der Waals contacts arising from intimate shape complementarity. Surprisingly, Ala, the L-amino acid with the smallest side chain, emerged as a crucial feature for epitope recognition, contributing specific contacts at the center of the paratope in several anti-PAS complexes. Apart from these insights into how antibodies can recognize feature-less peptides without secondary structure, the MAbs characterized in this study offer valuable reagents for the preclinical and clinical development of PASylated biologics.

© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introduction

Intrinsically disordered proteins (IDPs) or protein domains are common in nature and play important roles in mediating signal transduction and protein trafficking, where the conformational flexibility of IDPs allows interactions with multiple targets at moderate affinity.^{1–3} IDPs are also abundant in many pathogens and, thus, represent potential targets to combat infectious diseases.⁴ In contrast to

the specific interactions with structured proteins, the biophysical properties of disordered peptides or polypeptide segments often pose a challenge for the immune system in the generation of cognate antibodies, a feature that even seems to be exploited by pathogens to evade an immune response.^{5,6}

Common antigens of the immune system are mostly proteins or peptides whose surface epitopes act as points of interaction for the

specific recognition by antibodies. Epitopes are generally divided into two categories, (i) linear epitopes that are defined by their primary structure and (ii) conformational or discontinuous epitopes, where the key amino acids are separated in the amino acid sequence but brought into close proximity by the three-dimensional fold.⁷ It has long been assumed that potent epitopes are predominantly discontinuous;⁷ in fact, more recent analyses suggest that such conformational epitopes constitute about 90% of all B-cell epitopes present in native proteins.⁸

While intermolecular interactions involving disordered proteins have been analysed in detail,^{9–11} only a few studies have addressed the structural aspects of complex formation between flexible protein antigens and rigid binding partners such as antibodies.^{12,13} Structural analyses of a large dataset of protein antigens have shown that residues in unstructured linear epitopes are more likely involved in hydrogen bonds and salt bridges than those in conformational epitopes. Furthermore, IDPs present smaller epitopes than folded antigens whereas they appear to have more extensive contacts per residue and a higher shape complementarity with their cognate antibody.¹² In general, the interfaces formed by unstructured peptides and their antibodies are dominated by hydrogen bonds, often involving the peptide backbone, and they tend to bind in a more planar fashion if compared to folded proteins; moreover, the peptide interfaces are enriched in large hydrophobic side chains, such as Phe, Leu, Trp, Tyr and Ile, which serve as hot spot for binding.¹⁴

In the last decade, designed structurally disordered polypeptides have gained attention in the field of pharmaceutical biotechnology, where they are used to extend the *in vivo* half-life of protein fusion partners or drug conjugates as a biodegradable alternative to poly-ethylene glycol (PEG).^{15,16} In particular, long polypeptides comprising the small, uncharged L-amino acids Pro, Ala and/or Ser (PAS) show high solubility and macromolecular properties closely similar to the hydrophilic and structurally disordered PEG.¹⁷ Indeed, PASylation of pharmacologically active proteins or peptides dramatically expands their hydrodynamic volume and prolongs the *in vivo* half-life by effectively retarding renal filtration.¹⁸

PAS polypeptides are devoid both of charged and of bulky hydrophobic side chains, which normally play a role for molecular recognition in the immune response.¹⁹ On the other hand, their strong hydrophilicity is explained by the exposure of the polar peptide groups to the aqueous solvent in the absence of secondary structure.¹⁷ In addition, their random coil behaviour under physiological conditions poses a huge entropic cost for the disorder-to-order transition upon complex formation with antibodies. In fact, in numerous *in vivo* imaging studies with PASylated antibody fragments as well

as in preclinical animal experiments involving repeated administration of PASylated protein drugs at high doses, neither unspecific binding to any receptors nor a PAS-specific immune response was evident.^{20–24}

To investigate potential mechanisms how the immune system may recognize structurally disordered PAS (poly)peptides, which provide an extreme model of natural IDPs with a virtually feature-less amino acid sequence, we set out to elicit antibodies against different PAS peptides and elucidate the resulting antigen-antibody complexes at the structural level.

Results

We have raised mouse monoclonal antibodies (MAbs) against three different PAS polypeptides: PAS#1, P/A#1 and APSA (Figure 1). To this end, five animals per antigen were immunized with the corresponding synthetic N-terminally protected 40mer peptide, which had been chemically coupled via the unique C-terminal carboxylate group to mariculture keyhole limpet hemocyanin (KLH) as a highly immunogenic T-cell dependent carrier antigen.²⁵ In the case of PAS#1 and P/A#1 the 40mer covered exactly two copies of the designed 20mer sequence repeat as published before,^{16,17} whereas the “APSA” peptide comprised 10 copies of a short 4-residue motif and may be considered as a simplified kind of Pro/Ala-rich sequence. The PAS#1 and P/A#1 peptide immunogens were designed to include at least one copy of the junction between two adjacent 20mer sequence repeats, which can also potentially contribute an epitope in longer recombinant PAS polypeptides.

After four to six rounds of intensive immunization as well as a final boost, each with 25–50 µg antigen, spleen cells were isolated from the mouse with the highest signal in a serum ELISA for each antigen and fused with Sp2/0 myeloma cells to generate hybridomas.²⁶ Prescreening of 960 hybridoma culture supernatants obtained for each of these mice in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against a suitable PAS fusion protein revealed around 10% positive clones. Antibodies from the top 40 hybridoma clones were subsequently characterized in detail by ELISA, using recombinant fusion proteins comprising the corresponding PAS polypeptide (200–600 residues in conjunction with a Fab fragment, IL-1Ra or GMCSF; for details, see Materials and Methods), with the goal of (i) screening for sequence-specific and context-independent recognition of PAS-sequences and (ii) potentially identifying antibodies that show cross-reactivity between different PAS sequences. To this end, IgG capture ELISAs with hybridoma culture supernatants were performed, applying the PAS fusion protein in a concentration-dependent manner in order to determine the dissociation con-

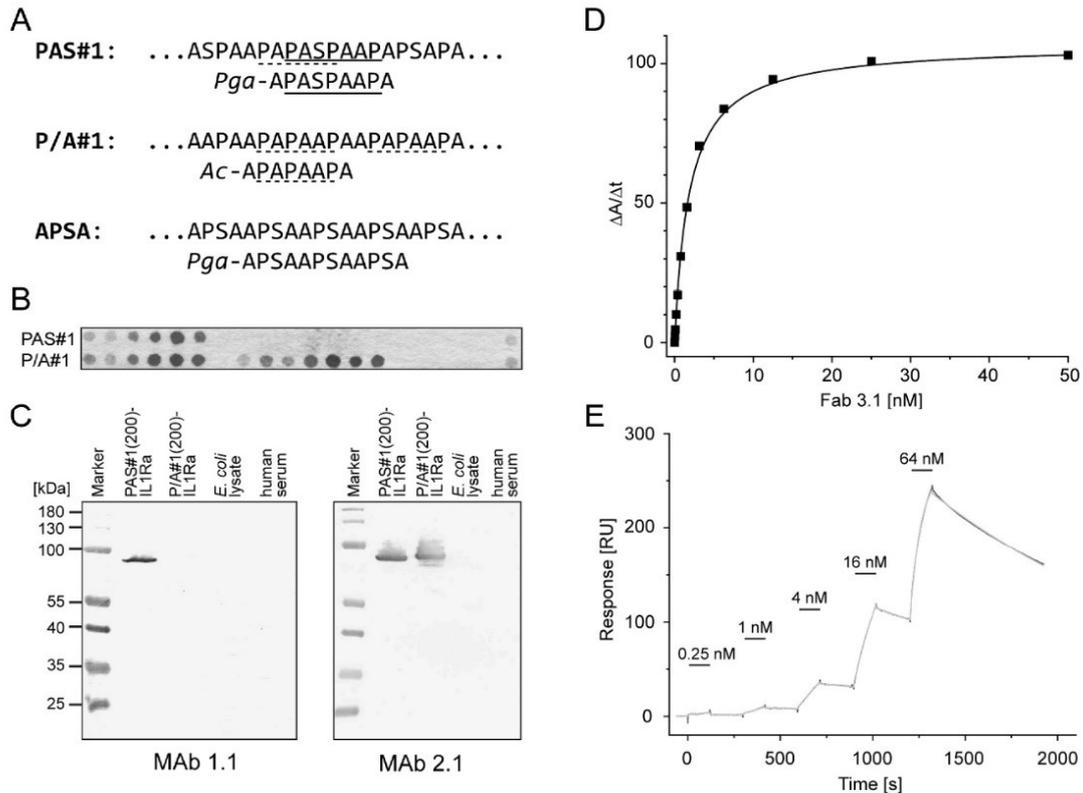


Figure 1. Functional properties of anti-PAS MAbs. (A) Amino acid sequence of the basic repetitive 20mer units of PAS#1 and P/A#1 polypeptides as well as a 20mer stretch comprising 5 copies of the APSA sequence motif. Epitope sequences evident from the SPOT assay for the anti-PAS#1 and anti-P/A#1 (broken line) MAbs are underlined. The corresponding synthetic peptides with blocked N-termini that were used for co-crystallization experiments are aligned underneath (*Pga*: pyroglutamyl; *Ac*: acetyl). (B) Exemplary SPOT assay for the Fab 2.1. Consecutive 12-mer peptides from the PAS#1 (upper row) and P/A#1 (lower row) repeat units, each shifted by one residue, where synthesized C-terminally anchored on a hydrophilic membrane. The results of all SPOT assays are shown in Supplementary Figure S5. (C) Detection of PASylated fusion proteins on western blots with the hybridoma culture supernatants of clones 1.1 and 2.1. (D) Direct ELISA with the Fab 3.1 and APSA(200)-IL1Ra adsorbed to the microtiter plate, followed by a secondary antibody. (E) SPR sensorgram for Fab 3.1 as analyte with biotinylated TrxA-APSA(200) as immobilized ligand. Injection phases are labeled with black bars, together with the corresponding concentration of injected analyte (black, raw signal trace; gray, curve fit).

stants (K_D). Hybridoma culture supernatants harbouring promising MAb candidates were further characterized with regard to antigen affinity and binding kinetics by real-time surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. Exemplary ELISA and SPR results are shown in the [Supplementary Information \(Figures S1–S3\)](#).

Based on the K_D values resulting from the ELISA and SPR measurements (also considering the absorption amplitudes in the concentration-dependent ELISAs), 3–8 non-redundant clones with distinct properties were selected from the immunization with PAS#1(40)-KLH, P/A#1(40)-KLH and APSA(40)-KLH, respectively. Of these, the two most promising hybridoma clones for each

PAS antigen were selected for further analysis using both their affinities to the target sequences as well as signs of cross-reactivity with other PAS sequences as criteria: MAbs 1.1 and 1.2 for PAS#1, MAbs 2.1 and 2.2 for P/A#1, MAbs 3.1 and 3.2 for APSA. To verify applicability of these MAbs for the detection of PASylated fusion proteins, the corresponding hybridoma culture supernatants were finally tested in western blotting experiments wherein the specific detection of PASylated fusion proteins was confirmed ([Figures 1 and S4](#)). Notably, no cross-reactivity with the non-PASylated fusion partner, human serum proteins or an *E. coli* whole cell protein extract was observed.

These MABs were further tested for linear epitope recognition using the Synthetic Peptides On Transfer membranes (SPOT) technique.²⁷ This assay revealed the same predominant peptide motif “PASPAAP” for the anti-PAS#1 MABs 1.1 and 1.2 whereas the peptide motifs “PAPAAP” and also “PAPASP” were recognized by both anti-P/A#1 MABs 2.1 and 2.2 (Figures 1(A) and S5). Due to the simpler and highly repetitive nature of the APSA target sequence, a SPOT substitution analysis was performed for the two most promising MABs selected against this antigen. Therefore, a 10mer peptide comprising the sequence AAPSAAPSAA was systematically substituted at positions 3 to 8 by all 20 proteinogenic amino acids. This analysis revealed the importance of the linear “PSAA(PS)” epitope for recognition by both anti-APSA MABs 3.1 and 3.2 (Figures 1(A) and S5). As result of the SPOT epitope analysis, MABs generated by immunization with PAS#1(40)-KLH only recognize the PAS#1 polypeptide sequence (MAB 1.1 and MAB 1.2), while both MABs from the P/A#1(40)-KLH immunization (MAB 2.1 and MAB 2.2) show cross-reactivity with PAS#1 in addition to the P/A#1 epitope. Tentatively, a generalized sequence motif recognized by all MABs, including those raised against the APSA sequence, emerged as “(P/S)A(A/S)P”.

In the next step, the V_H and V_L sequences of the six MABs were determined from each hybridoma mRNA (Figure 2). All sequences showed the typical pattern of mouse immunoglobulin (Ig) V-regions, and the complementarity-determining regions (CDRs) were easily identifiable. Notable features were (i) a very long CDR-L1 in all six MABs, with 4–6 residues inserted at the middle according to the Kabat numbering scheme,²⁸ (ii) the very short CDR-H3 sequences of MABs 3.1 and 3.2, with only three and five residues, respectively, as well as (iii) an unpaired Cys residue in the framework region (FR) 2 of MAB 3.2. For subsequent production of the recombinant Fab fragments in *E. coli*, suitable coding regions were derived by reverse-transcription of mRNA and cDNA amplification via polymerase chain reaction (PCR), or obtained as synthetic DNA fragments, and inserted into a bacterial expression vector which encoded already the first human IgG1 heavy chain and κ light chain constant regions.^{29,30} The chimeric Fab fragments were produced in a functional state by periplasmic secretion in *E. coli* both at the shake flask and at the bench top fermenter scale and purified to homogeneity.

The recombinant Fabs were investigated in quantitative ELISAs and real-time SPR measurements in comparison with the corresponding MABs from the hybridoma culture supernatants in order to precisely determine their K_D values towards the different PAS polypeptides (Table 1). These measurements essentially confirmed the findings from the preliminary hybridoma screening study described above. In

each case, just one antibody with outstanding affinity was identified for the different PAS antigens as judged from a K_D value in the lower nM range measured in the ELISA for the monovalent Fab: 23 nM versus PAS#1 (Fab 1.1), 2 nM versus P/A#1 (Fab 2.1) and 2 nM versus APSA (Fab 3.1). Of note, compared with the results for the hybridoma culture supernatants, the affinities measured for the Fabs in the ELISA were typically by 1–2 orders weaker. This was most likely due to the avidity effect that arises when the bivalent MAB interacts with a long PAS polypeptide which harbours multiple copies of the epitope – such as, for example, 30 copies of the repetitive PAS#1 amino acid stretch in a 600-residue PAS polypeptide. Remaining differences between the values measured by SPR and ELISA can be explained by the variations in the experimental setup. Interestingly, both anti-P/A#1 Fabs showed cross-reactivity with the PAS#1 sequence as noted for their respective MABs in the SPOT assay described above, whereas the anti-APSA Fab 3.2 and also the MAB 3.2 showed weaker cross-reactivity with both PAS#1 and P/A#1 polypeptides (Table 1).

Finally, the structural mechanism of antigen recognition was analyzed for several of these anti-PAS Fabs via X-ray crystallography. To this end, co-crystallization experiments were performed with the cognate synthetic peptides, whose sequences were either based on the findings of the SPOT epitope search as described above or, in case of the simple APSA motif, comprised a 12-residue stretch with three APSA repeats. To avoid charges at the N-termini, which would be absent in longer PAS (poly)peptides, these were blocked with pyroglutamic acid (Pga) or by acetylation. Diffraction quality crystals were directly obtained for the Fab-peptide complexes 1.1, 2.2 and 3.1 (Table S1) whereas in the case of the Fab 1.2 a recently published strategy employing an anti-human kappa light chain V_HH domain to facilitate (co)-crystallization³¹ was successfully applied.

Analysis of these crystal structures (Figure 3) showed that the different PAS peptides are bound to all four Fabs in a more or less relaxed conformation, covering a wide area of the antigen-binding site with at least four of the six CDRs involved. Due to the lack of pronounced hydrophobic as well as polar side chains – except for one Ser residue in the PAS#1 epitope peptide and three Ser residues in the (APSA)₃ peptide – the interactions are predominantly mediated through hydrogen bonds with the peptide main-chain groups (Table S2) as well as Van der Waals contacts (Table S3). As expected, salt bridges are completely absent. In the structures of the Fabs 1.2 and 3.1, some of these hydrogen bond interactions are mediated by water molecules. Surface representations illustrating electrostatic and hydrophobic properties reveal hydrophobic

```

VH
1      10      20      30      35AB  40      52A      60
Mab 1.1 QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTGYGVN--WVRQPPGKLENLGMIW-GDGIIDYNSALKSRL
Mab 1.2 ...V...G...Q.GG..KLS.AA...TFSS..MS--...T.D.R..LVAT.NSNG.S.Y.LDSV.G.F
Mab 2.1 ..T.....ILQ..T..L..SF....ST.DMGVG.I...S.....AN..-WNDNKY.....
Mab 2.2 ..T.....ILQ..T..L..SF....NT..MGVG.I...S.....W.AN.W-TDDKY...V...
Mab 3.1 .V..QQ..AE..R.GA.VKLS.KAL.YTF.DYEMH--..K.T.VH...I.V.HP.S.N.V..QKFQGKA
Mab 3.2 ...QQ..AE..R.GA.VKLS.KAL.YTF.D.EMF--..K.T.VH...CI.T.HP.S.G.A..QKF.GKA
          ==CDRH1==
          =====CDRH2=====

70      82ABC  90      100ABCDEF  110
Mab 1.1 SIISKDNSKSOVFLKMNLSLQDDTARYYCARDYYGRRYYAM--DYWGQTSVTVSS
Mab 1.2 T..R.KA.NTLY.Q.S..KSE..M...V.GGSYDGYDYAM.....
Mab 2.1 T...T.NN...IS.VDAT..T...QMRDNYGVWF--AF...L...A
Mab 2.2 T...TFNN...IS.VD.A..T...QLA.HDNVWF--A...L...A
Mab 3.1 TLTA.K.S.TAYMEVS..TSE.S.V..NLW-----GR...TL...
Mab 3.2 TLTA.K.S.TAYMELS..TSE.S.V..T.NDR-----GS...TL...
          =====CDRH3=====

VL
1      10      20      27ABCDEF  30      40      50      60
Mab 1.1 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSS--SGYNMFWYQQKPGQPPLLIYLASNLESGVPRFRWFG
Mab 1.2 .....Q...T--SYSY.H.F.....KY.....A..S.
Mab 2.1 ..MS..S.....V.EKV.M..KS.Q.LFYSNREK..LA.....S.....W..TR.....T.
Mab 2.2 ..MS..S.....V.EKV.L..KS.Q.LLYSNQK.YLA.....S.....W..TR.....T.
Mab 3.1 .V.M..T.VT.S.NI..P.S...KSGQ.LLHS-DGKTYLN.LL.R..S..R..KYV.D.D.....TS
Mab 3.2 .V...T.LT.S.TI..P.S...S.Q.LLNS-DGKTFLN.LL.R..LS..R...V.K.D.....T.
          =====CDRL1=====
          =CDRL2=

70      80      90      100
Mab 1.1 SGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLELKR
Mab 1.2 .....T.....WEI.....
Mab 2.1 .....T.SN.KA..L.V...QYNYN...
Mab 2.2 .....T.SS.KA..L.V...QYNYN...G...I..
Mab 3.1 .....E.SR..A..LGV...WQGFTHY.H..G...I..
Mab 3.2 .....K.SR..A..LGV...WQGFTHF.H..G...I..
          ==CDRL3==

```

Figure 2. Amino acid sequence alignment for the V_H and V_L domains of the Avi-PA(S) MABs described in this study (prior to the introduction of flanking restriction sites for subcloning) using ANTI/CALiGn software.⁷⁴ CDRs are labelled, and conserved amino acid positions are shown as “.” whereas gaps are indicated by “-”. For better comparison, sequences in this alignment are numbered according to Kabat²⁸ whereas in the text and the other Figures, like in the PDB coordinate sets, sequential numbering has been used. Contact residues in the paratopes are coloured blue or, if germline-encoded, red.

Table 1 Affinities of the MABs and corresponding Fabs towards their cognate PAS (poly)peptides measured by ELISA and SPR.

			Antigen					
			PAS#1		P/A#1		APSA	
Avi-PA(S) MAb			1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
Format	Assay	Target						
MAb	SPR	PAS#1(200)-IL1Ra	1.0 ± 0.1 nM	44 ± 1 nM	1.7 ± 0.1 nM	22 ± 1 nM	n.q.	80 ± 3 nM
MAb	ELISA	hu4D5-PAS#1(200)	37 ± 10 pM	162 ± 11 pM	113 ± 11 pM	n.q.	n.q.	294 ± 92 pM
Fab	SPR	PAS#1(200)-IL1Ra	8.8 ± 0.4 μM	3.7 ± 0.2 μM	4.4 ± 0.4 μM	n.d.	n.d.	n.q.
Fab	ELISA	PAS#1(600)-Leptin	23 ± 5 nM	123 ± 20 nM	2.2 ± 0.1 nM	n.q.	n.q.	311 ± 16 nM
MAb	SPR	P/A#1(200)-IL1Ra	n.q.	n.q.	429 ± 23 pM	1.1 ± 0.1 nM	n.q.	20 ± 1 nM
MAb	ELISA	hu4D5-P/A#1(200)	n.q.	n.q.	170 ± 31 pM	69 ± 9 pM	n.q.	400 ± 100 pM
Fab	SPR	P/A#1(200)-IL1Ra	n.d.	n.d.	648 ± 29 nM	7.0 ± 0.2 μM	n.d.	446 ± 34 nM
Fab	ELISA	P/A#1(600)	n.q.	n.q.	2.0 ± 0.2 nM	8 ± 1 nM	n.q.	48 ± 4 nM
MAb	SPR	APSA(200)-IL1Ra	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	19 ± 1 pM	108 ± 2 pM
MAb	ELISA	APSA(200)-IL1Ra	n.q.	n.q.	n.q.	n.q.	118 ± 2 pM	251 ± 5 pM
Fab	SPR	APSA(200)-TrxA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.5 ± 0.1 nM	137 ± 8 nM
Fab	ELISA	APSA(200)-IL1Ra	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.9 ± 0.1 nM	1.6 ± 0.1 nM

n.q.: not quantifiable; n.d.: not determined.

areas with slightly negative potential for all paratopes, except for one cavity with slightly positive potential in the structure of the Fab 3.1 (Figure S6). Interestingly, in each case at least one Ala residue of the PAS epitope peptide is

involved in relevant interactions with the anti-PAS Fab.

In the crystal structure of the Fab 1.1 in complex with the PAS#1 epitope peptide, the peptide ligand extends across a large area of the

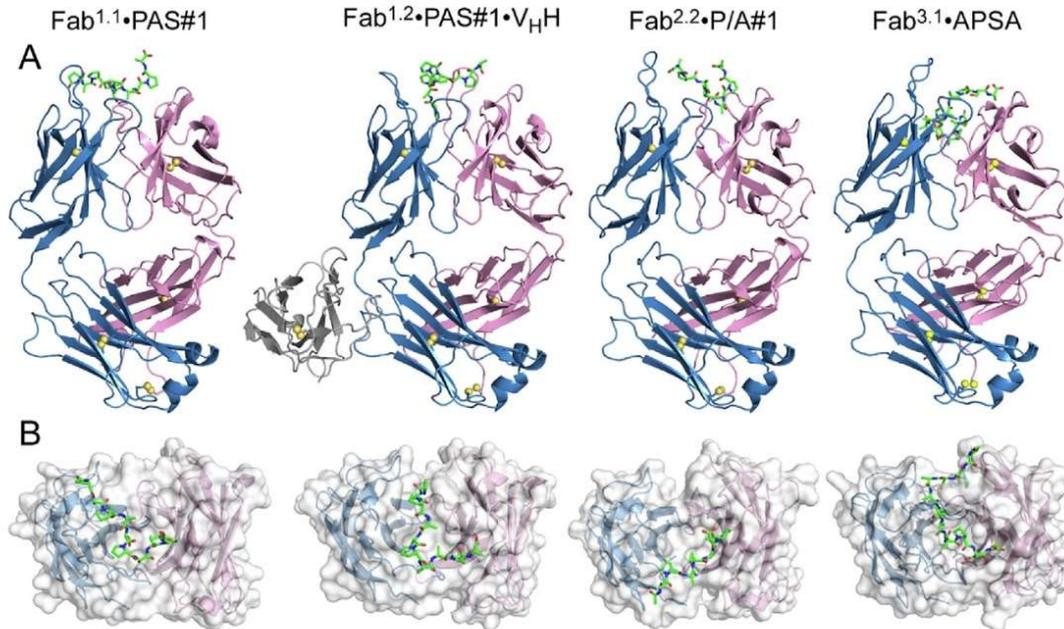


Figure 3. Crystal structures of the Fabs 1.1, 1.2, 2.2 and 3.1 in complex with PAS peptides. (A) Cartoon representation of the full Fab (light chain: blue; heavy chain: pink), each with its bound epitope peptide (green). Disulphide bonds are depicted as ball-and-sticks with sulphur atoms coloured yellow. The anti-human κ light chain V_HH domain that served as crystallization helper for the Fab 1.2 is shown in grey. (B) Top view on the antigen-binding sites, colouring as in (A), and Fv regions displayed with translucent surfaces.

paratope, engaging 579 Å² of its accessible surface area (ASA). The peptide forms a turn with its residues Ser^{P5}–Ala^{P8} at the center of the paratope which, together with the N-terminal residues Ala^{P2}–Ala^{P4}, is responsible for the majority of contacts. In contrast, the three C-terminal amino acids point away from the antigen-binding site into the solvent and are only sparsely involved in the complex. The peptide backbone forms three hydrogen bonds with the Fab residues Tyr^{L36} (CDR-L1), which is bound to Pro^{P3}, and Arg^{H103} (CDR-H3), which is bound to both Ser^{P5} and Pro^{P9} (Table S2). In addition, there is a hydrogen bond from the hydroxyl group of the only polar side chain in the epitope peptide, Ser^{P5}, to the carbonyl oxygen of Ser^{L95} in CDR-L3. Apart from that, the paratope exhibits distinct hydrophobic surface patches to accommodate the non-polar atomic groups of the peptide. For example, Tyr^{L34} has its aromatic ring positioned next to Ala^{P2} and, together with Leu^{L54}, provides a suitable hydrophobic environment for the methyl side chain. Another Ala residue of the PAS peptide, Ala^{P7}, plays a central role for the complex formation: its small side chain points right into a hole with slightly negative potential in the antigen-binding site which is shaped by the residues

Ser^{L95}, Arg^{L96}, Glu^{L97}, Leu^{L98} and also Leu^{L100} in CDR-L3 and Tyr^{H105} in CDR-H3 (Figure 4(A) and Table S3). This hole and the methyl side chain show perfect shape complementarity, allowing dense interaction between the Fab and the PAS#1 epitope peptide (Table S4).

In the structure of the Fab 1.2 in complex with the same peptide, the PAS#1 epitope is bound in a groove formed by the light chain CDRs on one side and CDR-H3 on the other (Figure 4(B)), thereby involving a peptide ASA of 652 Å². Again, its N-terminal residues are well accommodated and provide the majority of interactions with the Fab (Table S3). In particular, Ala^{P2} is tightly nestled within the groove, with >90% of its ASA buried (Table S4) by the side chains of Tyr^{L34}, Tyr^{L36} and Tyr^{L54} from the antibody light chain, which form a hydrophobic cage around this residue (Figure 4(D)). Residues in CDR-H3 mediate five of in total seven hydrogen bonds to the peptide main chain. The three N-terminal residues of the peptide are engaged in a hydrogen bond network with the main chain of CDR-H3 that resembles a short antiparallel β -sheet (Figure 4(F)). Similar to the Fab 1.1 in complex with the PAS#1 peptide, the Fab 1.2 targets the only polar side chain, Ser^{P5}, this time by forming a hydrogen

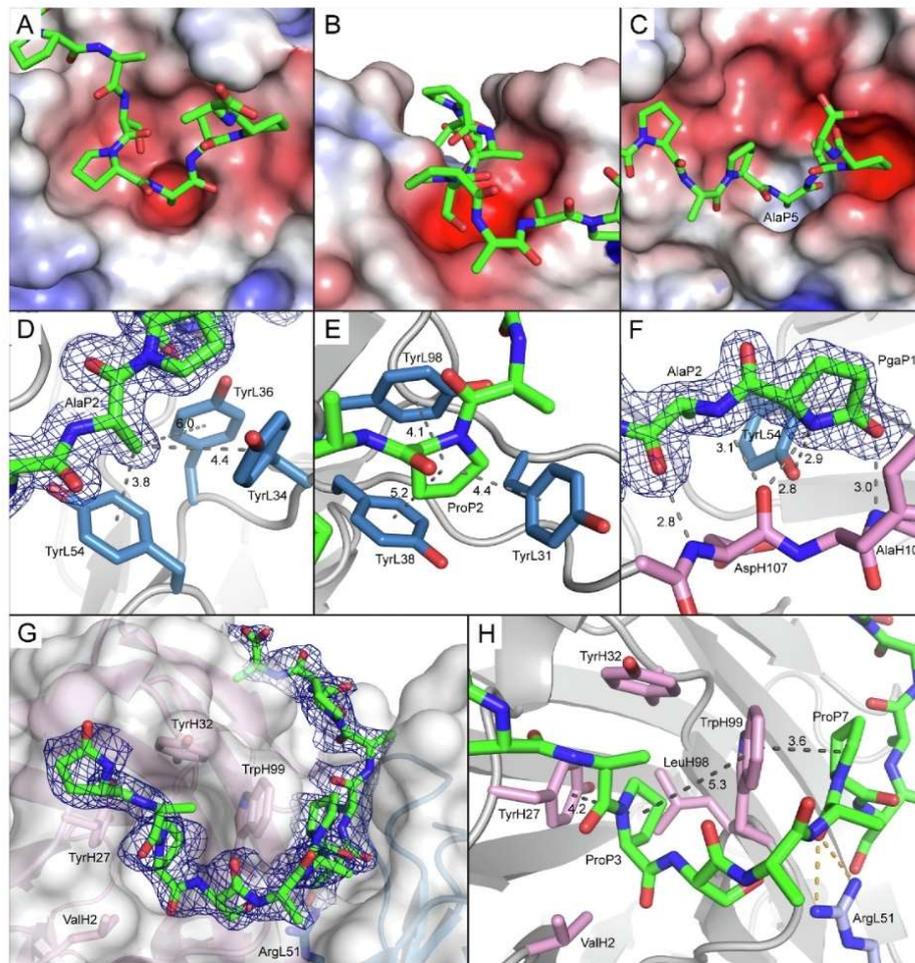


Figure 4. Structural details of PAS peptide recognition. (A-C) Electrostatic surface representations of anti-PAS MAb binding sites with negative potential coloured red ($-5 \text{ k}_B T/e$) and positive potential coloured blue ($5 \text{ k}_B T/e$). (A) Paratope of Fab 1.1 with Ala^{P7} pointing right into a central hole. (B) Paratope of Fab 1.2 with the N-terminal residues of the PAS epitope peptide nestled in the groove formed by the light chain CDRs and CDR-H3. (C) Binding pocket of Fab 2.2 burying Ala^{P5} at the centre of the epitope. (D-F) Close-up view on interactions between Fabs and the bound PAS peptides. Relevant distances are indicated as grey dashed lines with values given in Å. Cages of Tyr side chains are formed around part of the PAS peptides by the Fab 1.2 (D) and Fab 2.2 (E). (F) Backbone hydrogen bond network between the Fab 1.2 and the bound PAS#1 epitope peptide, including the N-terminal Pga group. (G) Accommodation of the (APSA)₃-peptide within the paratope of Fab 3.1 and (H) stacking interactions between Tyr^{H27}, Pro^{P3}, Trp^{H99} and Pro^{P7} (black dashed lines) as well as the bifurcated hydrogen bonding by Arg^{L51} (orange dashed lines) in Fab 3.1. The 2F_O-F_C electron density map is displayed at a contour level of 1σ (D, F and G).

bond with the main chain carbonyl oxygen of Trp^{L96} (CDR-L3). Notably, the N-terminal Pga group of the peptide contributes to complex formation with three hydrogen bonds to Tyr^{L54} (CDR-L2), Asp^{H107} and Ala^{H109} (the latter residues in CDR-H3). These hydrogen bonds would not be possible in a complex with a longer PAS#1 (poly)peptide where the position of the Pga residue would be occupied by Pro. While the Pro residue itself could perfectly

fit at this position within the paratope, its further N-terminal extension as part of a polypeptide would lead to a steric clash.

The antigen-binding site of the Fab 2.2 with the bound P/A#1 epitope peptide forms a pronounced pocket to accommodate the central region of the peptide ligand with an ASA of 521 \AA^2 buried, a value in a similar range as the peptide complexes described above. The three N-terminal peptide

residues form contacts with light chain CDRs only, while the C-terminal part is predominantly bound by the heavy chain CDRs. The main chain peptide groups give rise to five hydrogen bonds with residues located in CDRs H2, H3 and L3 (**Table S2**). Tyr^{L98} deserves special mention in this context as it acts as a hydrogen bond donor with its side chain hydroxyl group (to the oxygen atom of the N-terminal acetyl group of the P/A#1 peptide) and as a hydrogen bond acceptor with its main chain carbonyl oxygen (from the amide hydrogen of Ala^{P3}). On the side of the peptide, two Pro residues play an important role for the interaction with the Fab: Pro^{P2} is bound in a hydrophobic cage (**Figure 4(E)**) formed by three Tyr residues, Tyr^{L31} and Tyr^{L38} in CDR-L1 as well as Tyr^{L98} in CDR-L3, whereas Pro^{P7} is sandwiched between Asp^{H104} (CDR-H3) and Tyr^{H60} (CDR-H2). Overall, the shape of the combining site allows tight interactions with six residues of the epitope peptide, positioning residue Ala^{P5} at its centre, whose side chain becomes entirely buried upon complex formation (**Figure 4(C)** and **Table S4**). Furthermore, the carbonyl oxygen of Ala^{P5} is involved in two hydrogen bonds with Asn^{H52} and Trp^{H54}, both within CDR-H2, which emphasizes the role of this central Ala residue as a hot spot for antibody interactions with the P/A#1 epitope.

In contrast, the structure of the Fab 3.1 in complex with the (APSA)₃ peptide reveals a furrowed paratope, with the epitope peptide bound in a curled fashion between V_H and V_L, involving residues from all three APSA repeats. This peculiar mode of interaction permits tight complex formation, involving 94% of all peptide atoms and burying 1009 Å² of the peptide ASA, which is by far the largest value amongst the four Fab complexes investigated here. This is achieved by an exceptionally short CDR-H3 (**Figure 5(A)**) comprising only three residues. As a consequence, a small hydrophobic pocket is formed between CDR-H1 and CDR-H3, which perfectly accommodates residue Pro^{P3} of the peptide, thus providing a similar hydrophobic environment as the Tyr cage formed by the CDRs L1 and L3 in the structure of the Fab 2.2 in complex with the P/A#1 peptide described above. Furthermore, this allows the N-terminal half of the peptide to curl around the exposed hydrophobic side chain of Trp^{H99} (**Figures 4(G)** and **(H)**), which emerges as the key residue in the paratope by mediating 24% of all atom contacts with the peptide (**Table S3**). In addition, Trp^{H99} is involved in interactions with Pro^{P3} and Pro^{P7} where, if including the side chain of Tyr^{H27} on the other side of Pro^{P3}, in total four carbon rings are stacked in one line (**Figure 4(G)** and **(H)**). Similar to the other three Fab structures, six hydrogen bonds originating from the main chain peptide groups – including a bifurcated hydrogen bond between the Ala^{P6} amide and the Arg^{L51}

guanidinium group (**Figure 4(H)**) – as well as two from Ser hydroxyl side chains stabilize the complex. Finally, there are local hydrophobic contacts with several peptide Pro and Ala side chains. Unlike the Fab structures 1.1 and 2.2, there is no pronounced pocket for a single Ala side chain in the paratope; yet, several Ala residues in the (APSA)₃ epitope play important roles in mediating hydrogen bonds and Van-der-Waals interactions (**Tables S2** and **S3**).

To elucidate potential conformational similarities between the bound PAS#1 peptides in the complexes with the Fabs 1.1 and 1.2, a superposition between their structures was performed (**Figure 5(B)**). Interestingly, the four residues Ser^{P5} to Ala^{P8} showed a good match of their C_α positions, with a root mean square deviation (RMSD) of just 0.15 Å. Secondary structure analysis with STRIDE³² identified a type I β-turn for this four-residue stretch. Apart from the intramolecular hydrogen bond between the Ser^{P5} carbonyl oxygen and the Ala^{P8} amide hydrogen, this turn is stabilized by a hydrogen bond between the Ser^{P5} hydroxyl oxygen and the Ala^{P7} amide hydrogen (**Figure 5(B)**). This type of β-turn is classified as SPXX turn and occurs in gene regulatory proteins where it acts as DNA-binding motif.³³ However, despite their mutual similarity in the two Fab complexes, these turns are bound in different orientations: in the complex with the Fab 1.1 this peptide moiety nestles into the binding pocket of the paratope, whereas it is exposed to the solvent in the complex with the Fab 1.2 (**Figure 5(C)** and **(D)**). Whether this turn represents a local low energy conformation only in the complex state or may also prevail in a free PAS (poly)peptide in solution remains elusive. However, one would expect a much higher antibody affinity, at least for the Fab, in case of a preformed rigid epitope conformation. On the other hand, the experimentally observed strongly expanded hydrodynamic volume of PAS polypeptides in solution¹⁷ suggests high conformational flexibility along the entire amino acid chain. Furthermore, no defined secondary structure elements were detectable for the P/A#1 epitope peptide in the complex with the Fab 2.2 or for the (APSA)₃ peptide in complex with the Fab 3.1.

Discussion

In this study, we generated MAbs that specifically recognize linear epitopes in structurally disordered PAS (poly)peptides with three different sequences. Such MAbs, or their recombinant versions and fragments, offer valuable bioanalytical and diagnostic tools for the biochemical research as well as biopharmaceutical development of PASylated drug candidates,^{18,23,34} including bioassays for clinical studies.

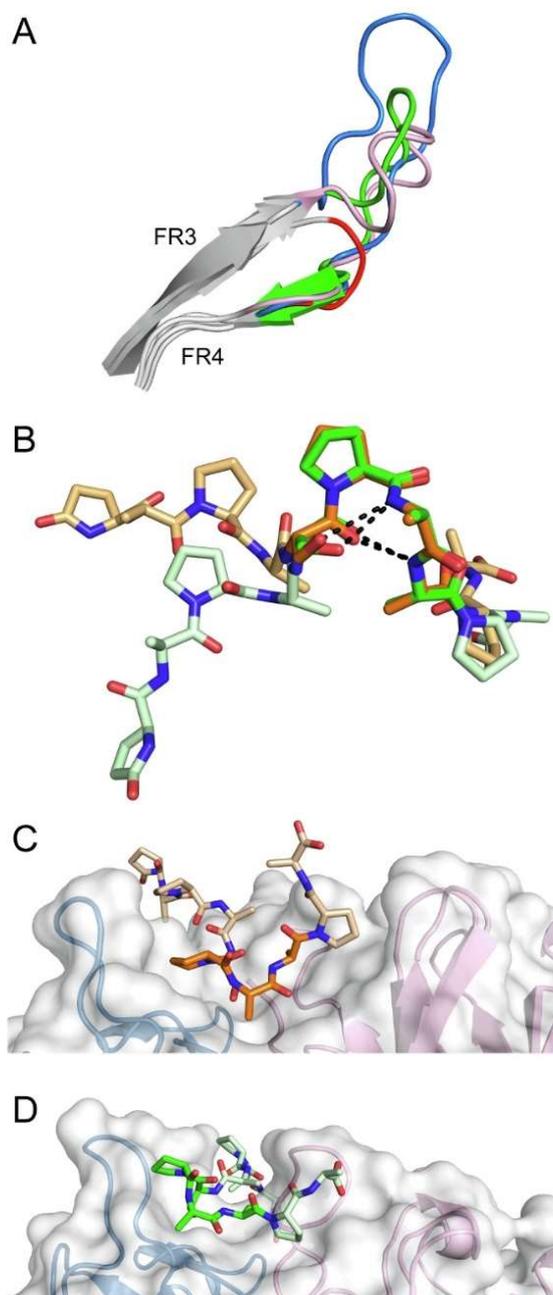


Figure 5. Structural details of the anti-PAS Fab-peptide complexes. (A) Superposition of the CDR-H3 hairpin loops of anti-PAS Fabs 1.1 (light pink), 1.2 (blue), 2.2 (green) and 3.1 (red), illustrating the extremely short CDR-H3 of Fab 3.1. (B) Superposition of the PAS#1 epitope peptide which adopts a type I β -turn in the complexes with both Fabs 1.1 (shades of orange) and 1.2 (shades of green). The peptides were aligned via the C_{α} atoms of residues Ser^{P5} to Ala^{P8} (RMSD = 0.15 Å). Intramolecular hydrogen bonds are shown as black dashed lines. (C and D) Differing orientations of the bound PAS#1 epitope peptide in the complexes with Fab 1.1 (C) and Fab 1.2 (D).

Despite elevated effort to raise these MABs, involving relatively high antigen doses of PAS peptide conjugates with a strongly immunogenic carrier protein, extended boosting schemes and immunization of 5 animals per antigen, only a few independent hybridoma clones secreting IgG antibodies with decent binding activity were identified. Notably, low affinities in the nM range were only measurable for the MABs with long PAS chains exhibiting multiple copies of the epitope sequence, obviously owing to the avidity effect. When the corresponding monovalent Fab fragments were tested, the dissociation constants were much higher, up to the μM range (see Table 1). Taken together, these findings indicate that structurally disordered PAS polypeptides represent poor immunogens and, if formed during an immune response, cognate IgG antibodies show poor to moderate affinities at best. This is in line with numerous animal studies that have been conducted with PASylated proteins so far, including repeated dosing in monkeys, where no immune response against the PAS moiety was evident.^{20,21,24,35}

Nevertheless, the small set of viable MABs that emerged from the present endeavour allowed functional studies as well as structural investigation of the corresponding recombinant Fab fragments. In general, antigen affinity was higher for the P/A#1 and APSA sequences than for PAS#1. One simple explanation may be twice the number of linear epitopes within the P/A#1 sequence repeat seen for the MABs 2.1 and 2.2 (cf. Figure 1(A)) and even higher epitope density in the APSA sequence due to the short repetitive four-residue motif. Furthermore, the presence of Ser residues in the PAS#1 sequence¹⁶ makes this prototypic PAS biopolymer slightly more hydrophilic than the P/A#1 polypeptide.¹⁷ The latter sequence carries no polar side chains at all, whereas its favourable interaction with the aqueous solvent is dominated by the many hydrogen bond donors and acceptors in the polypeptide backbone that get fully exposed due to the absence of detectable secondary structure.

Our crystallographic studies of in total four different anti-PAS Fabs shed light on the mechanisms of molecular recognition of such low-complexity IDP sequences. Interestingly, the relative orientation of each epitope peptide within the antigen-binding site varies among these Fab complexes. The PAS#1 and (APSA)₃ peptides are oriented along the interface between V_H and V_L in the Fabs 1.1, 1.2 and 3.1, whereas the P/A#1 peptide in complex with the Fab 2.2 is bound across the V_L/V_H interface (see Figure 3(B)).

The loss of conformational entropy upon complex formation generally lowers the free energy of binding between conformationally disordered peptides and folded proteins, including antibodies. A comprehensive structural analysis using a

database of high-resolution structures of peptide-protein complexes revealed that peptides are often bound such that changes in the three-dimensional structure of the binding protein are minimized, while on the other hand the enthalpy gain through Van der Waals packing and hydrogen bonding is maximized.¹⁴ Indeed, the structure of the Fab 2.2 in complex with the P/A#1 epitope peptide illustrates a binding mechanism that was described to be typical for disordered antigens:¹² the peptide binds deeply within a concave paratope and buries a large proportion of its residues (75% of the ASA of the six central epitope residues on average; cf. Table S4). This notion is further supported by the structure of the Fab 3.1 in complex with the (APSA)₃ peptide, with 68% of the total peptide ASA buried in a distinct furrow of the paratope.

Comparison of the amino acid sequences of the variable domains of the different anti-PAS MABs (see Figure 2) shows that there is high sequence similarity between MABs raised against the same antigen: MABs 1.1 and 1.2 with 88% identity for V_L, MABs 2.1 and 2.2 with 87% amino acid identity for V_H and 94% for V_L, and MABs 3.1 and 3.2 with 89% identity for V_H as well as V_L. This indicates the use of related germline genes, which were identified in an IMGT³⁶ database search (Table S5), revealing the same light and heavy chain V-gene families for MABs 2.1 and 2.2 as well as 3.1 and 3.2, respectively. In contrast, the V_H sequences of MABs 1.1 and 1.2 show a lower sequence identity of 53%, in agreement with different germline V-genes, IGHV2-6-7 and IGHV5-6-3, respectively. On the other hand, the fact that certain amino acid positions are functionally conserved between related MABs is nicely illustrated for the light chain CDR residues Tyr^{L34} and Tyr^{L36} of MABs 1.1 and 1.2. In both crystallized complexes, Tyr^{L34} forms a hydrophobic contact with the peptide residue Ala^{P22} while Tyr^{L36} is engaged in a hydrogen bond with the carbonyl oxygen of Pro^{P3}. Among the four crystallized Fabs, in total 66 contact residues were identified in the paratopes (Table S3) of which only 13 are not derived from germline sequences (Figure 2). Interestingly, all Trp contact residues are germline encoded (V or D). Also, all contact residues of Fab 1.2 correspond to germline sequences. Overall, this suggests a limitation in the number of ways how antibodies can recognize the feature-less PAS sequences, which may provide a structural explanation for their poor immunogenicity.

In all crystallized complexes of the anti-PAS Fab fragments, a high abundance of Tyr residues in the paratope is evident. These residues are responsible for the majority of hydrophobic contacts with the bound peptides (Table S3), thus creating surfaces well suited to bind antigens poor in charge or polar side chains. In fact, 62%, 49%, 43% and 23% of all contacts ≤ 4.0 Å are mediated

by Tyr in the MAbs 2.2, 1.2, 1.1 and 3.1, respectively. Interestingly, the Fab 2.2 revealed the highest Tyr content and also showed a comparably high affinity. This observation is in line with previous analyses suggesting that a high prevalence of Tyr in antibody paratopes generally contributes to enhanced antigen specificity and affinity.^{19,37–39} Notably, a high proportion of Trp and Tyr was also reported for two murine anti-PEG antibodies whose crystal structures were recently published.^{40,41} However, in both cases a peculiar ternary association mode was observed, involving two Fabs that bind face to face to the same region of one flexible PEG molecule.

Furthermore, in one of these studies the paratope seemed to give rise to a kind of dynamic ring structure which can capture PEG by wrapping around an exposed Trp side chain.⁴¹ Hence, the structural mechanisms of binding a conformationally disordered polymer chain by antibodies share only remote resemblance between PEG and PAS antigens. A sequence alignment between the anti-PAS MAbs and the published anti-PEG antibodies 3.3, 2B5 and 6-3^{40,41} did not reveal any particular similarities; neither could we identify a preference for germline genes. The only noticeable finding was a structurally equivalent position for Trp^{H99} (Kabat²⁸ position H95) in the anti-PAS Fab 3.1 when compared with the exposed Trp side chain at Kabat position H96 in the anti-PEG Fab 6-3 mentioned above (Figure S7), which might be caused by the short CDR-H3 in both antibodies (with three and five residues, respectively). Advances in the understanding of how antibodies can bind highly dynamic polymers such as PEG or PAS is of interest not only in the development of biopharmaceuticals with extended half-life but also in the context of COVID-19 vaccination. The two approved COVID-19 mRNA vaccines from Pfizer/BioNTech and Moderna both rely on PEGylated nanoparticles and clinical data have raised suspicions that the PEG moiety may be responsible for cases of anaphylactic shock in vaccine recipients, possibly after sensitization by PEG from cosmetics.^{42,43}

Up to now, Ala, the amino acid with the smallest side chain – apart from the achiral Gly, which has no side chain at all – has been regarded to play a negligible role in protein–protein or -peptide recognition. In fact, the strategy of alanine-scanning mutagenesis⁴⁴ has found wide application to dissect critical residues for receptor–ligand or antibody–antigen binding,⁴⁵ assuming a quasi inert role of the methyl side chain for molecular interactions. Astonishingly, our studies have revealed for the first time that Ala actually can adopt a central role in epitope recognition by antibodies, as exemplified in particular with the crystal structures of the Fabs 1.1 and 2.2 in complex with a PAS#1 and a P/A#1 peptide, respectively. Fully buried in the binding pocket, and with its carbonyl oxygen involved in two hydrogen bonds, Ala^{P5} acts in fact

as a kind of “hot spot” residue⁴⁶ at the centre of the antibody–peptide interface of the complex between Fab 2.2 and the P/A#1 epitope peptide (cf. Figure 4(C)). Even more strikingly, the structure of the Fab 1.1 reveals a pronounced hole in the middle of the antigen-binding site which is perfectly molded to accommodate the methyl group of Ala^{P7} within the PAS#1 epitope, resulting in high shape complementarity and a densely packed interface (cf. Figure 4(A)). A prominent role for Ala in molecular recognition is also reflected by the structure of the Fab 3.1 in complex with the (APSA)₃ peptide, where the three epitope residues Ala^{P6}, Ala^{P9} and Ala^{P10} are densely involved in interface formation and hydrogen bonding (Tables S2 and S4). Indeed, the SPOT substitution analysis experimentally supports the importance of these Ala residues, as binding decreased significantly when Ala was replaced by any other amino acid, even including Gly (Figure S5).

Our data offer insight into the mechanism of molecular recognition of structurally disordered peptide epitopes by antibodies. With no salt bridges and no pronounced hydrophobic side chain interactions arising from the PAS epitope in all of the assessed Fab structures, complex formation is mainly driven by hydrogen bonds involving the peptide backbone (Table S2) as well as tight Van der Waals contacts (Table S3, Figure 4(D) and (E)). It appears that due to the feature-less nature of the PAS peptides, the few atom groups in the antigen that are capable of polar interactions need to be capitalized by the antibody efficiently. The fact that at least four of the six CDRs are involved in the peptide–antibody interactions in all Fab complexes highlights the importance of an extended interface to more or less intimately bind the structurally flexible epitope. This is also nicely demonstrated by the structure of the Fab 1.2, where a short segment of the backbone hydrogen bond network with the PAS#1 peptide resembles an antiparallel β -sheet. Moreover, in both Fab complexes with the PAS#1 epitope peptide, comprising one prominent Ser residue, the antibody engages the only available polar side chain for formation of hydrogen bonds. The same is the case in the structure of the Fab 3.1, where two of the three Ser side chains are involved in hydrogen bonding. Notably, however, the MAbs 1.1 and 1.2 do not much functionally benefit from this kind of interaction if considering their significantly lower affinity compared with the anti-P/A#1 MAbs (see Table 1), which is in line with the expected limited energy gain of hydrogen bonds in a competing aqueous environment.^{47,48}

In conclusion, by solving the complex structures of MAbs directed against different PAS sequences with their respective peptide antigens, our work sheds light onto how antibodies can bind to the seemingly inert PAS polypeptides with high specificity. These reagents, dubbed Avi-PA(S)TM

MAbs, offer valuable tools for biomedical research as well as clinical application of PASylated proteins and peptides exerting pharmacological activity.

Materials & Methods

Preparation of PAS peptide conjugates for immunization

Three different peptides were obtained by solid phase synthesis (Peptide Specialty Laboratories – PSL, Heidelberg, Germany and Almac Sciences, Edinburgh, Scotland): Pga-PAS#1(40)-Ahx (Pga-ASPAAAPASPAAPAPSAPAASPAAPASPAA PAPSAPA-Ahx); Pga-P/A#1(40)-Ahx (Pga-AAPAA PAPAAPAAPAPAAPAAAPAPAAPAPAAPAA PAAPA-Ahx); Pga-APSA(40)-Ahx (Pga-APSAAP SAAPSAAPSAAPSAAPSAAPSAAPSAAP SAAPSA-Ahx). As all peptides contained only chemically inert side chains and had a blocked N-terminus (Pga: pyroglutamyl), their unique C-terminal carboxylate groups (at the end of an aminohexanoic acid spacer, Ahx) were selectively activated and used for directed chemical conjugation with the ϵ -amino groups of Lys side chains of KLH, which was employed as a highly immunogenic carrier protein. To this end, 50 mg of each peptide was dissolved in 1450 μ l dimethylsulfoxide (DMSO) and activated with a 10fold molar amount of each 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate (TBTU; Iris Biotech, Marktredwitz, Germany) and N,N-diisopropylethylamine (DIPEA; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). 10 mg KLH (Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) was dissolved in water, dialyzed against PBS (4 mM KH_2PO_4 , 16 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl), adjusted to a concentration of 2.3 mg/ml in a volume of 4.35 ml and mixed with the activated peptide solution. After incubation on ice for 30 min, the solution was dialyzed against 25 mM Na-borate pH 9.0 and the conjugate was purified by anion exchange chromatography (AEX) on a Source 15Q column (GE Healthcare, Munich, Germany) equilibrated with the same buffer. The conjugate was eluted in a linear concentration gradient of 0–500 mM NaCl in running buffer (monitored at 280 nm). Eluate fractions of the main peak were pooled, dialyzed against PBS, concentrated to 2 mg/ml, sterile-filtered through a 0.22 μ m Millex-GV PVDF filter (Merck, Darmstadt, Germany) and flash-frozen in liquid nitrogen.

Immunization of mice and generation of hybridoma cells

Using the PAS peptide-KLH conjugates described above as antigens, BALB/c mice were immunized and hybridomas were prepared according to standard procedures (ProMab Biotechnologies, Richmond, CA). For each

antigen, five mice were immunized subcutaneously with 50 μ g antigen together with Freund's complete adjuvant (CFA). Three weeks after priming, three booster injections (five for APSA(40)-KLH), each with 25 μ g antigen and Freund's incomplete adjuvant, were applied at intervals of two weeks. A final boost with 50 μ g of antigen without adjuvant was administered intraperitoneally two weeks after the last boost. Spleen cells were harvested from animals and fused with Sp2/0 myeloma cells for hybridoma clone generation.⁴⁹

Characterization of antibodies from hybridoma cell culture supernatants via SPR and ELISA

IgG isotypes were determined by ProMab Biotechnologies using the mouse MoAb ID KIT (Zymed Laboratories, San Diego, CA). Promising hybridoma clones were cultivated in DMEM (Biochrom, Berlin, Germany) containing 10% v/v FCS (Ultra low IgG One Shot; Life Technologies, Carlsbad, CA), 6 mM L-alanyl-L-glutamine (Biochrom), 1:100 penicillin/streptomycin (Biochrom), further supplemented with 10% v/v Hybridoma Premium Medium (ProMab Biotechnologies), at 37 °C and under 5% CO_2 atmosphere. After initial screen by ELISA (see text), promising secreted anti-PAS MAbs in the hybridoma culture supernatants were characterized by real-time SPR spectroscopy and ELISA.

SPR measurements were performed at 25 °C either on a Biacore X100 or on a Biacore T200 instrument (GE Healthcare) using a Mouse Antibody Capture Kit and CM3 sensor chips (GE Healthcare). Hybridoma culture supernatants were diluted 1:5 in HBS-ET buffer (0.01 M HEPES/NaOH pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% v/v Tween20), and a 30 μ l MAb sample was injected at a flow rate of 10 μ l/min. A concentration series of the following test antigens, as appropriate, was then injected onto the sensor chip at a flow rate of 30 μ l/min using single cycle kinetics:⁵⁰ PAS#1(200)-IL1Ra, P/A#1(200)-IL1Ra, P/A#1(600)-GMCSF, APSA(200)-IL1Ra and hu4D5-P/A#1(200).^{16,17} The sensor chip was regenerated with 10 mM Gly/HCl pH 1.7 for 100 s. Data were analyzed using the Biacore X100 evaluation software ver. 2.0.1 (GE Healthcare) with a bivalent analyte fit after subtraction of signals from both a reference channel and a blank baseline measured with HBS-ET buffer.

Characterization of MAbs by ELISA was performed using NUNC Maxisorp F 96-well plates (Thermo Fisher Scientific) coated with 50 μ l of a 5 μ g/ml solution of anti-mouse IgG Fc-specific goat antibody (Sigma-Aldrich) in PBS for 1 h, followed by twice washing with PBS and blocking with 3% w/v bovine serum albumin (BSA) in PBS/T (PBS containing 0.1% v/v Tween 20) for 1 h. After washing with PBS/T, the wells were

incubated for 1 h with 50 μ l of each hybridoma culture supernatant diluted 1:100 in PBS/T and washed again. Then, 50 μ l solutions of the following PASylated proteins (each 8 nM) were applied in 1:2 dilution series with PBS/T and incubated for 1 h: hu4D5-PAS#1(200), hu4D5-P/A#1(200) or APSA(200)-IL1Ra, the latter labeled with DIG-NHS (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) according to the manufacturer's instructions. After washing with PBS/T, 50 μ l of a 1:1000 dilution of anti-human kappa light chain antibody alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich) or anti-DIG-Fab alkaline phosphatase conjugate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), respectively, was applied to each well and incubated for 1 h. After final washing with PBS, 50 μ l of 0.5 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate (Merck) in AP buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) was added and signal development was recorded at 405 nm for 15 min at 1 min intervals using a Synergy 2 photometer (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Germany). The concentration-dependent signals ($\Delta A/\Delta t$) were evaluated using the Voss&Skerra equation.⁵¹

Cloning of V-genes from hybridomas

Hybridoma cells were mechanically lysed and total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), followed by cDNA synthesis using the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) with an oligo(dT)₁₈ primer. Ig V-gene regions were PCR-amplified from this cDNA with Q5 DNA polymerase (New England Biolabs, Frankfurt/M. Germany) using a set of 63 forward primers covering all mouse germline V_L/V_H gene segments⁵² together with the reverse primers RMK (5'-GAC CTC CAC GGA GTC AGC-3') for the light chain and RMG (5'-AGG TCG CCA CAC GTG TGG-3') for the heavy chain.⁵³ Forward primers were initially applied in pools of 5–15 different oligodeoxynucleotides, in order to reduce the required number of PCRs, and then individually, after an amplification product was identified, to generate a homogenous PCR product. DNA fragments with suitable size were isolated after separation by agarose gel electrophoresis using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) and subjected to double-stranded DNA sequencing using the Mix2-Seq Kit (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

Construction of bacterial expression plasmids for Fab fragments

For cloning of the V-genes on the bacterial expression vector pASK88,²⁹ the products from the V-gene amplification described above were PCR-amplified with primer pairs that were designed to introduce suitable flanking restriction sites according to a published procedure.^{53,54} The result-

ing PCR products were cut with the corresponding restriction enzymes, isolated by agarose gel electrophoresis, and the V_H and V_L genes were inserted into the appropriately digested pASK88 in two consecutive ligations. The coding regions for the MAbs 1.2, 2.1 and 3.1 were obtained by gene synthesis with optimized *E. coli* codon usage and suitable flanking restriction sites (Thermo Fisher Scientific) based on V-gene sequences determined by Pro-Mab Biotechnologies.

E. coli production and purification of Fab fragments

pASK88 derivatives harbouring the corresponding V-genes were used to express the chimeric Fab fragments (i.e., murine variable domains from the hybridomas fused to human constant domains) either in 2 l shake flask cultures using *E. coli* strain JM83⁵⁵ or via 8 l bench top fermentation using the strain KS272⁵⁶ following published procedures.^{29,30} The recombinant proteins were purified from the periplasmic cell extract via immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC), followed by cation exchange chromatography (CEX) on a Resource S 6 ml column and by size exclusion chromatography (SEC) on a HiLoad 16/60 Superdex75 prep grade column (both from GE Healthcare). Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm using calculated extinction coefficients⁵⁷ of 77405 M⁻¹ cm⁻¹, 66405 M⁻¹ cm⁻¹, 88405 M⁻¹ cm⁻¹, 89895 M⁻¹ cm⁻¹, 69955 M⁻¹ cm⁻¹ or 57465 M⁻¹ cm⁻¹ for the chimeric Fab fragments 1.1, 1.2, 2.1, 2.2, 3.1 or 3.2, respectively. Protein integrity and purity were checked by SDS-PAGE⁵⁸ and by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) using a maXis Q-TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) in the positive ion mode.

E. coli production and purification of the anti-human kappa light chain V_HH domain

A previous study had shown that an anti-human kappa V_HH domain may facilitate the (co)-crystallization of Fab fragments containing a human κ light chain.³¹ Since the sequence information for the anti-hu κ V_HH domain crystallized in complex with a Fab was missing in the PDB coordinate set 6ANA³¹ the polypeptide chain SEQ ID NO: 1 from a patent publication⁵⁹ was fitted into the well-defined electron density calculated from the deposited structure factors using Coot.⁶⁰ The corresponding coding region was generated by gene synthesis (Eurofins Genomics) and cloned via *Xba*I and *Hin*dIII on the generic expression vector pASK75⁶¹ in frame with a C-terminal His₆-tag. The V_HH domain was produced in shake flask culture using the *E. coli* strain Origami B⁵² grown at 30 °C in LB medium⁴⁹ supplemented with 100 mg/l ampicillin. Gene expression was induced at OD₅₅₀ = 0.5 for

3 h by adding anhydrotetracycline (Acros Organics, Geel, Belgium) to a final concentration of 0.2 µg/ml. After centrifugation, the bacterial pellet was resuspended in IMAC buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl), which was supplemented with 10 mM 2,2-dithiodipyridine (Sigma-Aldrich) to promote quantitative formation of the intramolecular disulphide bond, and the bacteria were lysed using a French pressure cell (SLM Aminco, Urbana, IL). The whole cell lysate was clarified by centrifugation and the supernatant was subjected to IMAC using a 5 ml HisTrap HP column (GE Healthcare). The recombinant protein was eluted using a concentration gradient of 0–300 mM imidazole/HCl in IMAC running buffer. Eluted protein fractions were identified by SDS-PAGE, pooled and dialyzed twice against CEX buffer (50 mM Na-acetate pH 5.5, 20 mM NaCl). The protein solution was then applied to a 6 ml Resource S column (GE Healthcare) and the anti-huk V_HH domain was eluted in a linear concentration gradient of 0–250 mM NaCl in CEX buffer. Finally, fractions containing the protein were concentrated and applied to a HiLoad 16/60 Superdex75 prep grade column (GE Healthcare) pre-equilibrated with IMAC buffer. Protein purity was checked by SDS-PAGE and ESI-MS as above using a calculated extinction coefficient of 23045 M⁻¹ cm⁻¹.

Antigen affinity measurements by ELISA and SPR

A NUNC Maxisorp F 96-well plate was coated with 50 µl of 10 µg/ml P/A#1(600) polypeptide¹⁷ in PBS for the Fabs 2.1 and 2.2, with 50 µl of 10 µg/ml PAS#1(600)-Leptin⁶³ in PBS for the Fabs 1.1 and 1.2, or with 50 µl of 10 µg/ml APSA(200)-IL1Ra¹⁷ for the Fabs 3.1 and 3.2 and incubated at 4 °C overnight. After washing with PBS/T, the wells were blocked with 3% w/v BSA (NeofROXX, Einhausen, Germany) in PBS/T for 1 h, followed by 3x washing and 1 h incubation with 50 µl of an appropriate dilution series of each purified Fab fragment in PBS/T. The wells were washed again with PBS/T, followed by incubation with 50 µl of a 1:1000 dilution of anti-human kappa light chain goat antibody conjugated to alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich) in PBS/T for 1 h. After final washing twice each with PBS/T and PBS, signals were developed with *p*-nitrophenyl phosphate and measured and evaluated as described above.

SPR measurements with the purified Fab fragments were performed on a Biacore X100 instrument (GE Healthcare) at 25 °C. PAS#1(200)-IL1Ra, P/A#1(200)-IL1Ra or thioredoxin A (TrxA)-APSA(200) were biotinylated with a 20-fold molar amount of succinimidyl-6-(biotinamido) hexanoate (Sigma Aldrich) and individually immobilized as ligands on a biotin CAPture chip (GE Healthcare) according to the manufacturer's protocol. Prior to immobilisation of the ligand protein, the sensorchip was regenerated with two

consecutive injections of 30% v/v acetonitrile, 0.25 M NaOH for 120 s as well as 6 M guanidine/HCl, 0.25 M NaOH for 120 s. Subsequently, a concentration series of the recombinant Fab fragment was injected as analyte onto the sensorchip at a flow rate of 30 µl/min using single cycle kinetics. After subtraction of signals from both a reference channel and a blank baseline measured with HBS-ET buffer, data were fitted using the Biacore X100 evaluation software ver. 2.0.1 (GE Healthcare) using a 1:1 binding model. The equilibrium dissociation constant was calculated as $K_D = k_{off} / k_{on}$, whereby its statistical error was calculated from the standard deviations of the individual kinetic constants as described.⁶⁴

SPOT synthesis of immobilized peptide arrays and epitope mapping

Arrays of 20 overlapping 12mer peptides covering the entire amino acid sequence of the PAS#1 or P/A#1 amino acid sequence repeat, or of a 10mer peptide comprising the sequence AAPSAAPSAA, including substitution by all 20 proteinogenic amino acids at positions 3 to 8, were synthesized on a hydrophilic membrane using a MultiPep SPOT synthesizer (Intavis, Köln, Germany) according to a standard protocol.²⁷ Detection of antibody binding activity on the membranes was performed using a published procedure⁶⁵ after incubation with either the purified Fab fragment (applied at 1 µg/ml in MBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Tris/HCl pH 8, 0.05% v/v Tween-20, 1% w/v sucrose) or the hybridoma culture supernatant containing the secreted MAB (diluted 1:5000 in MBS), followed by an anti-human kappa light chain antibody alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich) or anti-mouse IgG Fc-specific goat antibody alkaline phosphatase conjugate (Sigma-Aldrich), respectively. After chromogenic reaction, the spot intensities were quantified with CLIQS ver. 1.2.044 software (TotalLab, Newcastle-upon-Tyne, UK).

Detection of PASylated proteins by western blotting

To test hybridoma culture supernatants for detection of PASylated proteins on western blots, a set of different PASylated proteins, PAS#1(200)-IL1Ra, P/A#1(200)-IL1Ra and APSA(200)-IL1Ra, was subjected to SDS-PAGE, followed by semi-dry electrotransfer onto a nitrocellulose membrane. An *E. coli* BL21 whole cell lysate and human serum (PL), pooled (SEQENS IVD / H2B, Limoges, France), which was diluted 1:200 in water and spiked with 1 µg IL-1Ra (Anakinra/Kineret[®]; Swedish Orphan Biovitrum, Stockholm, Sweden), were applied in parallel as controls. After washing with PBS/T, the membrane was incubated with a 1:2000 dilution in PBS/T of the hybridoma culture supernatants or a 1:200.000

dilution of the purified MAbs 2.1. Bound MAbs were detected using a 1:50.000 dilution of an anti-mouse IgG Fc-specific goat antibody conjugated with alkaline phosphatase in PBS/T followed by chromogenic reaction as above.

Co-crystallization of Fab fragments with PAS peptides, X-ray data collection and model building

The purified recombinant Fab fragments 1.1, 2.2 and 3.1 were directly co-crystallized with their cognate PAS epitope peptides, whereas in the case of Fab 1.2 a complex with an anti-hu κ V_HH domain was prepared. To this end, the purified Fab was incubated for 1 h at 4 °C with a three-fold molar amount of the purified V_HH domain from above. The protein mixture was subjected to SEC on a HiLoad 16/60 Superdex75 prep grade column using 10 mM HEPES/NaOH pH 6.5, 70 mM NaCl as running buffer, and the Fab•V_HH complex was separated from excess V_HH domain and isolated in one peak.

The different Fab solutions were concentrated using Amicon Ultracel centrifugal filter units (MWCO 10 kDa; Millipore, Billerica, MA) as follows: Fab 1.1 at 8.4 mg/ml and Fab 1.2 in complex with V_HH at 13.7 mg/ml, both in 10 mM HEPES/NaOH pH 6.5, 70 mM NaCl; Fab 2.2 at 9.6 mg/ml in 20 mM HEPES/NaOH pH 6.5, 80 mM NaCl; Fab 3.1 at 9.2 mg/ml in 10 mM HEPES, pH 6.5, 100 mM NaCl. Each concentrated protein solution was mixed with the appropriate synthetic peptide from a > 50 mM stock solution in water (see Table S1) at a molar ratio of 1:3 (Fab:peptide) and incubated for 1 h at 4 °C. Subsequently, protein crystallization screens were performed via the sitting drop vapour diffusion method with equal volumes of protein and reservoir solutions, leading to a total drop volume in the range of 300–1000 nl, using an in-house precipitant screen. For refinement of promising crystallization conditions, further screens were set up using the hanging drop vapour diffusion method with a reservoir volume of 1 ml and droplets composed of 1 μ l protein and 1 μ l reservoir solutions. Crystals appeared within one week at 20 °C under the conditions listed in Table S1. Protein crystals were harvested, transferred into the precipitant buffer supplemented with 20% v/v ethylene glycol for Fab 1.1 and Fab 1.2, 20% w/v PEG200 for Fab 2.2 and 20% v/v glycerol for Fab 3.1, and immediately frozen in liquid nitrogen.

For each crystal of the Fabs 1.1, 1.2 and 2.2, a single-wavelength synchrotron X-ray cryo-diffraction data set was collected at BESSY beamline 14.2 operated by the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany.⁶⁶ In case of the Fab 3.1, the protein crystallography beamline X06SA-PXI at the Swiss Light Source (SLS), Villigen-PSI, Switzerland, was used. The diffraction data (Table S1)

were reduced and scaled with the XDS program package,⁶⁷ and molecular replacement was carried out with Phaser⁶⁸ using the constant and variable domains of the functionally unrelated anti-human RSV Fab 101F (PDB ID: 3QQ9), which shares similarity in the amino acid sequence, as search models to first solve the structure of the Fab 2.2 in complex with the P/A#1 epitope peptide. The structures of Fab 1.1 and Fab 1.2, both with the bound PAS#1 epitope peptide, were subsequently solved by molecular replacement with the refined crystal structure of the Fab 2.2 as search model, additionally including coordinates for the anti-hu κ V_HH domain (PDB ID: 6ANA) in the latter case. Finally, the structure of Fab 3.1 in complex with the (APSA)₃ peptide was solved by molecular replacement using the refined structure of Fab 1.2 as search model.

The initial protein models were manually adjusted with Coot⁶⁹ and iteratively refined with Refmac5.⁶⁹ The PAS#1, P/A#1 and (APSA)₃ epitope peptides and water molecules were manually built into emerging electron densities in the course of the refinement process. The final structural models, showing R_{free} values of 23–27% (Table S1), were validated using the MolProbity server.⁷⁰ Crystal contact sites as well as accessible and buried surface areas (ASA and BSA, respectively; calculated with the light and heavy chains renumbered as a continuous amino acid chain in the input file to ensure proper calculation) were analysed with PISA.⁷¹ Molecular graphics were prepared with PyMOL (Schrödinger, Cambridge, MA) using the APBS module⁷² for calculation of electrostatics. Atomic distances were calculated with CONTACT.⁷³

Polypeptides were denoted L for each Ig light chain, H for each heavy chain and P for each bound PAS peptide whereas the anti-human kappa V_HH domain was assigned the chain identifier X. In case of the Fab 1.1 with two Fab•peptide complexes in the asymmetric unit the one with the higher average crystallographic B-factor was assigned chain identifiers A, B and Q, respectively. The atom coordinates and structure factors of the four refined crystal structures have been deposited at the Protein Data Bank (PDB), Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (Rutgers University, New Brunswick, NJ), under accession codes 7O30 (Fab 1.1), 7O31 (Fab 1.2), 7O2Z (Fab 2.2) and 7O33 (Fab 3.1).

Accession numbers

PDB: 7O30, 7O31, 7O2Z, 7O33.

CRedit authorship contribution statement

J. Schilz: Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing. **U.**

Binder: Conceptualization, Investigation, Writing - review & editing. **L. Friedrich:** Resources, Writing - review & editing. **M. Gebauer:** Resources, Writing - review & editing. **C. Lutz:** Resources, Writing - review & editing. **M. Schlapschy:** Investigation, Writing - review & editing. **A. Schiefner:** Investigation, Writing - review & editing. **A. Skerra:** Conceptualization, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Acknowledgement

The authors wish to thank Klaus Wachinger (TUM) for assistance with fermentation of *E. coli*, Dr. Hyun-Jin Kim (XL-protein) for help in some ELISAs, Stefan Achatz (TUM) for ESI-MS and Dr. Andreas Eichinger, Dr. Eva Huber and Prof. Dr. Michael Groll (all at TUM) for crystallographic data collection. The authors are grateful to the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, for allocation of synchrotron radiation beamtime and travel support and Dr. Thomas Hauß for technical support at BESSY beamline 14.2 as well as Dr. John Henry Beale for technical support at SLS beamline X06SA-PXI.

Declaration of Competing Interest

A.Sk., M.S. and U.B. are shareholders of XL-protein GmbH. The other authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167113>.

Received 26 April 2021;

Accepted 15 June 2021;

Available online 20 June 2021

Keywords:

Avi-PA(S) MAb;
disordered antigen;
intrinsically disordered protein;
natively unfolded protein;
PASylation

References

- Wright, P.E., Dyson, H.J., (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 18–29.
- Tantos, A., Han, K.H., Tompa, P., (2012). Intrinsic disorder in cell signaling and gene transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **348**, 457–465.
- Snead, D., Eliezer, D., (2019). Intrinsically disordered proteins in synaptic vesicle trafficking and release. *J. Biol. Chem.*, **294**, 3325–3342.
- Feng, Z.P., Zhang, X., Han, P., Arora, N., Anders, R.F., Norton, R.S., (2006). Abundance of intrinsically unstructured proteins in *P. falciparum* and other apicomplexan parasite proteomes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **150**, 256–267.
- Goh, G.K., Dunker, A.K., Uversky, V.N., (2016). Correlating Flavivirus virulence and levels of intrinsic disorder in shell proteins: Protective roles vs. immune evasion. *Mol. BioSyst.*, **12**, 1881–1891.
- Giri, R., Kumar, D., Sharma, N., Uversky, V.N., (2016). Intrinsically disordered side of the Zika virus proteome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **6**, 144.
- Barlow, D.J., Edwards, M.S., Thornton, J.M., (1986). Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. *Nature*, **322**, 747–748.
- Huang, J., Honda, W., (2006). CED: A conformational epitope database. *BMC Immunol.*, **7**, 7.
- Mészáros, B., Tompa, P., Simon, I., Dosztányi, Z., (2007). Molecular principles of the interactions of disordered proteins. *J. Mol. Biol.*, **372**, 549–561.
- Fong, J.H., Shoemaker, B.A., Garbuzynskiy, S.O., Lobanov, M.Y., Galzitskaya, O.V., Panchenko, A.R., (2009). Intrinsic disorder in protein interactions: Insights from a comprehensive structural analysis. *PLoS Comput. Biol.*, **5**, e1000316
- Uversky, V.N., (2019). Intrinsically disordered proteins and their “mysterious” (meta)physics. *Front. Phys.*, **7**, 10
- MacRaid, C.A., Richards, J.S., Anders, R.F., Norton, R.S., (2016). Antibody recognition of disordered antigens. *Structure*, **24**, 148–157.
- Fassolari, M., Chemes, L.B., Gallo, M., Smal, C., Sanchez, I.E., de Prat-Gay, G., (2013). Minute time scale prolyl isomerization governs antibody recognition of an intrinsically disordered immunodominant epitope. *J. Biol. Chem.*, **288**, 13110–13123.
- London, N., Movshovitz-Attias, D., Schueler-Furman, O., (2010). The structural basis of peptide-protein binding strategies. *Structure*, **18**, 188–199.
- Schellenberger, V., Wang, C.W., Geething, N.C., Spink, B. J., Campbell, A., To, W., et al., (2009). A recombinant polypeptide extends the *in vivo* half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat. Biotechnol.*, **27**, 1186–1190.
- Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kislung, S., et al., (2013). PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng. Des. Sel.*, **26**, 489–501.
- Breibeck, J., Skerra, A., (2018). The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers*, **109**, e23069
- Binder, U., Skerra, A., (2017). PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **31**, 10–17.
- Wang, M., Zhu, D., Zhu, J., Nussinov, R., Ma, B., (2018). Local and global anatomy of antibody-protein antigen recognition. *J. Mol. Recognit.*, **31**, e2693

20. Bolze, F., Morath, V., Bast, A., Rink, N., Schlapschy, M., Mocek, S., et al., (2016). Long-acting PASylated leptin ameliorates obesity by promoting satiety and preventing hypometabolism in leptin-deficient lep^{ob/ob} mice. *Endocrinology*, **157**, 233–244.
21. Harari, D., Kuhn, N., Abramovich, R., Sasson, K., Zozulya, A.L., Smith, P., et al., (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.
22. Mandler, C.T., Friedrich, L., Laitinen, I., Schlapschy, M., Schwaiger, M., Wester, H.J., et al., (2015). High contrast tumor imaging with radio-labeled antibody Fab fragments tailored for optimized pharmacokinetics via PASylation. *MAbs*, **7**, 96–109.
23. Richter, A., Knorr, K., Schlapschy, M., Robu, S., Morath, V., Mandler, C., et al., (2020). First in-human medical imaging with a PASylated ⁸⁹Zr-labeled anti-HER2 Fab-fragment in a patient with metastatic breast cancer. *Nucl. Med. Mol. Imaging*, **54**, 114–119.
24. Griffiths, K., Binder, U., McDowell, W., Tommasi, R., Frigerio, M., Darby, W.G., et al., (2019). Half-life extension and non-human primate pharmacokinetic safety studies of i-body AD-114 targeting human CXCR4. *MAbs*, **11**, 1331–1340.
25. Swaminathan, A., Lucas, R.M., Dear, K., McMichael, A.J., (2014). Keyhole limpet haemocyanin – a model antigen for human immunotoxicological studies. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **78**, 1135–1142.
26. Köhler, G., Milstein, C., (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495–497.
27. Frank, R., (2002). The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J. Immunol. Methods*, **267**, 13–26.
28. Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., Foeller, C., (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institute of Health, Bethesda, MD.
29. 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.
30. Skerra, A., (1994). A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments. *Gene*, **141**, 79–84.
31. Ereño-Orbea, J., Sicard, T., Cui, H., Carson, J., Hermans, P., Julien, J.P., (2018). Structural basis of enhanced crystallizability induced by a molecular chaperone for antibody antigen-binding fragments. *J. Mol. Biol.*, **430**, 322–336.
32. Frishman, D., Argos, P., (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins*, **23**, 566–579.
33. Suzuki, M., Yagi, N., (1991). Structure of the SPXX motif. *Proc. Biol. Sci.*, **246**, 231–235.
34. Gebauer, M., Skerra, A., (2018). Prospects of PASylation[®] for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action. *Bioorg. Med. Chem.*, **26**, 2882–2887.
35. Längin, M., Mayr, T., Reichart, B., Michel, S., Buchholz, S., Guethoff, S., et al., (2018). Consistent success in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature*, **564**, 430–433.
36. Brochet, X., Lefranc, M.P., Giudicelli, V., (2008). IMGTV-QUEST: The highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*, **36**, W503–W508.
37. Birtalan, S., Zhang, Y., Fellouse, F.A., Shao, L., Schaefer, G., Sidhu, S.S., (2008). The intrinsic contributions of tyrosine, serine, glycine and arginine to the affinity and specificity of antibodies. *J. Mol. Biol.*, **377**, 1518–1528.
38. Birtalan, S., Fisher, R.D., Sidhu, S.S., (2010). The functional capacity of the natural amino acids for molecular recognition. *Mol. BioSyst.*, **6**, 1186–1194.
39. Peng, H.P., Lee, K.H., Jian, J.W., Yang, A.S., (2014). Origins of specificity and affinity in antibody-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, E2656–E2665.
40. Lee, C.-C., Su, Y.-C., Ko, T.-P., Lin, L.-L., Yang, C.-Y., Chang, S.S.-C., et al., (2020). Structural basis of polyethylene glycol recognition by antibody. *J. Biomed. Sci.*, **27**, 12.
- [41]. Huckaby, J.T., Jacobs, T.M., Li, Z., Perna, R.J., Wang, A., Nicely, N.I., et al., (2020). Structure of an anti-PEG antibody reveals an open ring that captures highly flexible PEG polymers. *Commun. Chem.*, **3**, 124.
42. Garvey, L.H., Nasser, S., (2021). Anaphylaxis to the first COVID-19 vaccine: Is polyethylene glycol (PEG) the culprit? *Br. J. Anaesth.*, **126**, e106–e108.
43. Moghimi, S.M., (2021). Allergic reactions and anaphylaxis to LNP-based COVID-19 vaccines. *Mol. Ther.*, **29**, 898–900.
44. Cunningham, B.C., Wells, J.A., (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science*, **244**, 1081–1085.
45. Morrison, K.L., Weiss, G.A., (2001). Combinatorial alanine-scanning. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 302–307.
46. Clackson, T., Wells, J.A., (1995). A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*, **267**, 383–386.
47. Fersht, A.R., (1987). The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 301–304.
48. Gao, J., Bosco, D.A., Powers, E.T., Kelly, J.W., (2009). Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 684–690.
49. Sambrook, J.F., Russell, D.W., (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y..
50. Karlsson, R., Katsamba, P.S., Nordin, H., Pol, E., Myszka, D.G., (2006). Analyzing a kinetic titration series using affinity biosensors. *Anal. Biochem.*, **349**, 136–147.
51. 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.
52. Chardès, T., Villard, S., Ferrières, G., Piechaczyk, M., Cerutti, M., Devauchelle, G., et al., (1999). Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family. *FEBS Lett.*, **452**, 386–394.
53. Loers, G., Cui, Y.F., Neumaier, I., Schachner, M., Skerra, A., (2014). A Fab fragment directed against the neural cell adhesion molecule L1 enhances functional recovery after injury of the adult mouse spinal cord. *Biochem. J.*, **460**, 437–446.

- [54]. Peplau, E., De Rose, F., Reder, S., Mittelhaeuser, M., Scafetta, G., Schwaiger, M., et al., (2020). Development of a chimeric Fab directed against human galectin-3 and validation as an immune-PET tracer for the sensitive *in vivo* imaging of thyroid cancer. *Thyroid*, **30**, 1314–1326.
55. 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.
56. Meerman, H.J., Georgiou, G., (1994). Construction and characterization of a set of *E. coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins. *Biotechnology (N Y)*, **12**, 1107–1110.
57. 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.
58. 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.
59. Hermans, W.J.J., Ten Haaf, M.R., Overweel, A., (2006). Method for affinity purification. *WO 2006/059904 A1*.
60. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 486–501.
61. 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.
62. Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J., Georgiou, G., (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13703–13708.
63. Morath, V., Bolze, F., Schlapschy, M., Schneider, S., Sedlmayer, F., Seyfarth, K., et al., (2015). PASylation of murine leptin leads to extended plasma half-life and enhanced *in vivo* efficacy. *Mol. Pharm.*, **12**, 1431–1442.
- [64]. Schönfeld, D., Matschiner, G., Chatwell, L., Trentmann, S., Gille, H., Hülsmeier, M., et al., (2009). An engineered lipocalin specific for CTLA-4 reveals a combining site with structural and conformational features similar to antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8198–8203.
65. Zander, H., Reineke, U., Schneider-Mergener, J., Skerra, A., (2007). Epitope mapping of the neuronal growth inhibitor Nogo-A for the Nogo receptor and the cognate monoclonal antibody IN-1 by means of the SPOT technique. *J. Mol. Recognit.*, **20**, 185–196.
- [66]. Gerlach, M., Mueller, U., Weiss, M.S., (2016). The MX beamlines BL14.1-3 at BESSY II. *J. Large-Scale Res. Fac.*, **2**, A47
67. Kabsch, W., (2010). XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 125–132.
68. McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Read, R.J., (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, **40**, 658–674.
69. Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., et al., (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 355–367.
70. Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., et al., (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.*, **27**, 293–315.
71. Krissinel, E., Henrick, K., (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.*, **372**, 774–797.
- [72]. Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., McCammon, J.A., (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10037–10041.
73. Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., et al., (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 235–242.
- [74]. Jarasch, A., Skerra, A., (2017). Aligning, analyzing, and visualizing sequences for antibody engineering: Automated recognition of immunoglobulin variable region features. *Proteins*, **85**, 65–71.

- 1 -

Supplementary Information

Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope

J. Schilz¹, U. Binder², L. Friedrich², M. Gebauer², C. Lutz¹, M. Schlapschy¹, A. Schiefner¹, A. Skerra^{1,2*}

- 2 -

Table S1: X-ray diffraction and refinement statistics.

	Anti-PAS Fab 1.1	Anti-PAS Fab 1.2 + V _H H	Anti-PAS Fab 2.2	Anti-PAS Fab 3.1
Peptide ligand	Pga-APASPAAPA	Pga-APASPAAPA	Ac-APAPAAPA	Pga-APSAAPSAAPSA
Crystallization condition	18% w/v PEG3350 100 mM HEPES pH 7.5 200 mM MgCl ₂	22% w/v PEG3350 300 mM K- acetate	11% w/v PEG6000 100 mM Tris/HCl pH 8 200 mM MgCl ₂	20% w/v PEG3350 200mM LiNO ₃
Data collection statistics				
Wavelength (Å)	0.9184	0.9184	0.9184	1
Resolution range (Å)*	35 - 2.65 (2.75 - 2.65)	35 - 1.55 (1.65 - 1.55)	35 - 2.55 (2.65 - 2.55)	30 - 1.85 (1.95 - 1.85)
Space group	<i>P4₂2₁2</i>	<i>C2</i>	<i>I422</i>	<i>C2</i>
Unit cell a, b, c (Å)	102.6, 102.6, 199.9	141.3, 44.4, 93.0	122.0, 122.0, 138.4	94.9, 61.3, 78.6
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 109.1, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 106.3, 90.0
Assemblies per asym. unit	2	1	1	1
Unique reflections	30855 (3054)	77314 (12963)	17370 (1866)	36237 (5351)
Multiplicity	22.2 (18.3)	6.9 (6.8)	26.2 (25.2)	3.0 (3.1)
Completeness (%)	96.9 (93.3)	97.2 (95.8)	99.9 (100)	97.7 (99.3)
Mean I/σ	24.3 (2.1)	15.0 (1.6)	17.0 (5.1)	9.2 (2.1)
Wilson B-factor (Å ²)	63.3	30.7	28.3	36.5
R _{meas} (%)	11.2 (167.5)	6.3 (107.0)	21.3 (75.1)	8.3 (74.6)
Refinement statistics				
Resolution (Å)	34.13 - 2.65 (2.72 - 2.65)	33.39 - 1.55 (1.59 - 1.55)	34.63 - 2.55 (2.62 - 2.55)	45.6 - 1.85 (1.898 - 1.85)
R _{work} (%)	22.0 (39.4)	19.4 (34.1)	19.5 (26.2)	20.9 (35.7)
R _{free} (%)	26.9 (37.8)	23.2 (35.4)	23.8 (32.0)	24.8 (44.6)
Number of non-H atoms:				
Protein/peptide	6662 / 122	4374 / 61	3379 / 50	3298 / 78
Solvent	53	388	125	197
Average B value (Å ²)				
Protein/peptide	73.8 / 58.5	28.7 / 25.7	29.6 / 42.8	45.0 / 60.5
Solvent	46.2	34.5	24.7	42.1
RMS (bonds/angles)	0.004 / 1.357	0.011 / 1.685	0.004 / 1.327	0.009 / 1.538
Ramachandran statistics [#]				
Favored (%)	94.1	97.7	96.8	97.5
Outliers (%)	0.2	0	0	0
Rotamer outliers (%)	2.9	0	1.5	1.3
Clash score [#]	2.47	1.6	1.63	2.54
PDB ID	7O30	7O31	7O2Z	7O33

*Values for the highest resolution shell are shown in brackets.

[#]Calculated with MolProbity (Williams et al., 2018).

Table S2: Hydrogen-bond interactions between Fabs and the PAS epitope peptides.

Structure	Peptide atom	Fab atom	Distance [Å]
Fab^{1.1}•PAS#1	Pro ^{P3} -O	Tyr ^{L36} -O ⁿ	2.61
	Ser ^{P5} -N	Arg ^{H103} -O	2.87
	Ser ^{P5} -O ^y	Ser ^{L95} -O	2.46
	Pro ^{P9} -O	Arg ^{H103} -N ⁿ²	2.42
Fab^{1.2}•PAS#1	Pga ^{P1} -N	Asp ^{H107} -O	2.80
	Pga ^{P1} -N	Tyr ^{L54} -O ⁿ	2.89
	Pga ^{P1} -O ^ε	Ala ^{H109} -N	2.96
	Ala ^{P2} -N	Asp ^{H107} -O	3.05
	Ala ^{P2} -O	Asp ^{H107} -N	2.79
	Pro ^{P3} -O	Tyr ^{L36} -O ⁿ	2.59
	Ala ^{P4} -N	Gly ^{H105} -O	2.99
	Ser ^{P5} -O ^y	Trp ^{L96} -O	2.50
Ala ^{P10} -O ^{ox}	Asp ^{H104} -N	3.09	
Fab^{2.2}•P/A#1	Ace ^{P1} -O	Tyr ^{L98} -O ⁿ	2.47
	Ala ^{P3} -N	Tyr ^{L98} -O	2.85
	Ala ^{P5} -O	Asn ^{H52} -N ^{δ2}	3.17
	Ala ^{P5} -O	Trp ^{H54} -N ^{ε1}	2.94
	Pro ^{P7} -O	Asp ^{H104} -O ^{δ2}	2.67
Fab^{3.1}•APSA	Pga ^{P1} -O	Ile ^{H28} -N	2.95
	Ser ^{P4} -O ^y	Trp ^{H99} -O	2.66
	Ala ^{P6} -O	Arg ^{L51} -N ⁿ¹⁺²	2.95
	Ser ^{P8} -O ^y	Arg ^{L51} -N ⁿ²	3.01
	Ser ^{P8} -O	Asn ^{L39} -N ^{δ2}	2.85
	Ala ^{P10} -N	Gly ^{L96} -O	3.21
	Ser ^{P12} -N	Glu ^{H33} -O ^{ε2}	2.68
Ala ^{P13} -N	Glu ^{H33} -O ^{ε2}	3.01	

- 4 -

Table S3: Atom contacts between the Fabs and the PAS epitope peptides (≤ 4.0 Å).

Structure	Peptide residue	Number of contacts	Fab residues
Fab^{1.1}•PAS#1	Pga ^{P1}	4	Tyr ^{L34}
	Ala ^{P2}	10	Tyr ^{L34} , Tyr ^{H104}
	Pro ^{P3}	11	Ser ^{L32} , Tyr ^{L34} , Tyr ^{L36} , Tyr ^{H104}
	Ala ^{P4}	7	Tyr ^{L36} , Arg ^{H103}
	Ser ^{P5}	21	Tyr ^{L36} , Ser ^{L95} , Arg ^{H103} , Tyr ^{H104} , Tyr ^{H105}
	Pro ^{P6}	7	Ser ^{L31} , Tyr ^{L36} , Arg ^{L96}
	Ala ^{P7}	11	Ser ^{L95} , Arg ^{L96} , Glu ^{L97} , Leu ^{L98} , Tyr ^{H105}
	Ala ^{P8}	-	-
	Pro ^{P9}	10	Trp ^{H52} , Ile ^{H56} , Arg ^{H103}
	Ala ^{P10}	-	-
Fab^{1.2}•PAS#1	Pga ^{P1}	30	Lys ^{L53} , Tyr ^{L54} , Tyr ^{H106} , Asp ^{H107} , Tyr ^{H108} , Ala ^{H109}
	Ala ^{P2}	15	Tyr ^{L34} , Tyr ^{L54} , Tyr ^{H106} , Asp ^{H107}
	Pro ^{P3}	13	Tyr ^{L34} , Tyr ^{L36} , Gly ^{H105}
	Ala ^{P4}	13	Tyr ^{L36} , Ile ^{H102} , Gly ^{H105} , Tyr ^{H106} , Asp ^{H107}
	Ser ^{P5}	16	Tyr ^{L36} , Trp ^{L96}
	Pro ^{P6}	3	Thr ^{L31} , Trp ^{L96}
	Ala ^{P7}	7	Trp ^{L96} , Glu ^{L97}
	Ala ^{P8}	2	Trp ^{L96} , Ile ^{H102}
	Pro ^{P9}	7	Ile ^{L98} , Ile ^{H102} , Tyr ^{H103}
	Ala ^{P10}	7	Tyr ^{H103} , Asp ^{H104}
Fab^{2.2}•P/A#1	Ac ^{P1}	5	Tyr ^{L98}
	Ala ^{P1}	8	Tyr ^{L31} , Tyr ^{L98}
	Pro ^{P2}	25	Tyr ^{L31} , Tyr ^{L38} , Tyr ^{L98}
	Ala ^{P3}	10	Tyr ^{L98} , Asn ^{L99} , Tyr ^{L100}
	Pro ^{P4}	5	Tyr ^{L97} , Tyr ^{L98} , Tyr ^{L100} , Pro ^{H106}
	Ala ^{P5}	18	Tyr ^{L100} , Pro ^{L101} , Trp ^{H49} , Asn ^{H52} , Trp ^{H54} , Tyr ^{H60}
	Ala ^{P6}	17	Trp ^{H54} , Tyr ^{H60} , Asp ^{H104} ,
	Pro ^{P7}	22	Trp ^{H54} , Trp ^{H55} , Thr ^{H56} , Asp ^{H58} , Tyr ^{H60} , Asp ^{H104}
	Ala ^{P8}	-	-
Fab^{3.1}•APSA	Pga ^{P1}	11	Tyr ^{H27} , Ile ^{H28} , Tyr ^{H32}
	Ala ^{P2}	9	Tyr ^{H27} , Tyr ^{H32}
	Pro ^{P3}	23	Val ^{H2} , Tyr ^{H27} , Tyr ^{H32} , Leu ^{H98} , Trp ^{H99} , Arg ^{H101}
	Ser ^{P4}	14	Arg ^{L51} , Trp ^{H99} , Arg ^{H101}
	Ala ^{P5}	3	Tyr ^{L54} , Trp ^{H99}
	Ala ^{P6}	23	Arg ^{L51} , Tyr ^{L54} , Leu ^{L55} , Trp ^{H99}
	Pro ^{P7}	18	Arg ^{L51} , Trp ^{H99}
	Ser ^{P8}	32	Tyr ^{L37} , Asn ^{L39} , Arg ^{L51} , Trp ^{L94} , Gly ^{L96} , Trp ^{H99} , Gly ^{H100}
	Ala ^{P9}	16	Tyr ^{L37} , Gly ^{L96} , His ^{L101}
	Ala ^{P10}	16	His ^{L31} , Tyr ^{L37} , Gly ^{L96}
	Pro ^{P11}	9	Glu ^{H33}
	Ser ^{P12}	9	Leu ^{L99} , Glu ^{H33} , Val ^{H59}
	Ala ^{P13}	16	Glu ^{H33} , His ^{H52} , Asn ^{H57} , Val ^{H59}

Table S4: ASA and BSA of peptide residues bound to the four Fabs as analysed with PISA.

Structure	Peptide residue	ASA [\AA^2]	BSA [\AA^2]	BSA [%]
Fab^{1.1}•PAS#1	Pga ^{P1}	193.61	21.03	10.9
	Ala ^{P2}	95.35	74.62	78.3
	Pro ^{P3}	122.8	67.2	54.7
	Ala ^{P4}	81.43	42.44	52.1
	Ser ^{P5}	69.74	67.5	96.8
	Pro ^{P6}	142.1	86.2	60.7
	Ala ^{P7}	102.59	84.31	82.2
	Ala ^{P8}	40.6	30.11	74.2
	Pro ^{P9}	139.32	106.08	76.1
	Ala ^{P10}	162.87	0.17	0.1
Fab^{1.2}•PAS#1	Pga ^{P1}	201.22	143.62	71.4
	Ala ^{P2}	86.35	81.2	94.0
	Pro ^{P3}	129.32	62.14	48.1
	Ala ^{P4}	81.65	56.78	69.5
	Ser ^{P5}	64.63	58.62	90.7
	Pro ^{P6}	147.89	42	28.4
	Ala ^{P7}	97.62	53.03	54.3
	Ala ^{P8}	38.63	19.16	49.6
	Pro ^{P9}	127.88	82.13	64.2
	Ala ^{P10}	165.43	53.5	32.3
Fab^{2.2}•P/A#1	Ace ^{P1}	170.44	72.7	42.7
	Ala ^{P1}	144.73	30.29	20.9
	Pro ^{P2}	127.6	94.85	74.3
	Ala ^{P3}	102.2	43.2	42.3
	Pro ^{P4}	90.53	51.97	57.4
	Ala ^{P5}	121.18	121.03	99.9
	Ala ^{P6}	60.34	52.2	86.5
	Pro ^{P7}	134.8	119	88.3
	Ala ^{P8}	167.51	8	4.8
Fab^{3.1}•APSA	Pga ^{P1}	199.51	80.18	40.2
	Ala ^{P2}	78.86	46.17	58.5
	Pro ^{P3}	145.3	142.72	98.2
	Ser ^{P4}	72.2	51.48	71.3
	Ala ^{P5}	115.03	32.47	28.2
	Ala ^{P6}	70.13	64.46	91.9
	Pro ^{P7}	110.47	91.67	83.0
	Ser ^{P8}	129.27	123.11	95.2
	Ala ^{P9}	76.94	68.68	89.3
	Ala ^{P10}	82.39	77.44	94.0
	Pro ^{P11}	130.53	31.72	24.3
	Ser ^{P12}	110.59	71.67	64.8
	Ala ^{P13}	163.61	127.05	77.7

- 6 -

Table S5: IgG isotypes and germline origins identified in an IMGT database search (Brochet et al., 2008) of the anti-PAS MAbs described in this study.

		Antigen					
		PAS#1		P/A#1		APSA	
		Hybridoma clone					
IgG isotype		1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
		IgG1/κ	IgG1/κ	IgG1/κ	IgG2b/κ	IgG1/κ	IgG1/κ
V_H germline	V-gene	IGHV2-6-7	IGHV5-6-3	IGHV8-11	IGHV8-8	IGHV1-15	IGHV1-15
	J-gene	IGHJ4	IGHJ4	IGHJ3	IGHJ3	IGHJ2	IGHJ2
	D-gene	IGHD1-1	IGHD2-3	IGHD3-3	IGHD2-10	IGHD2-13	IGHD3-2
V_L germline	V-gene	IGKV3-12	IGKV3-7	IGKV8-30	IGKV8-30	IGKV1-135	IGKV1-135
	J-gene	IGKJ5	IGKJ5	IGKJ5	IGKJ2	IGKJ2	IGKJ2

- 7 -

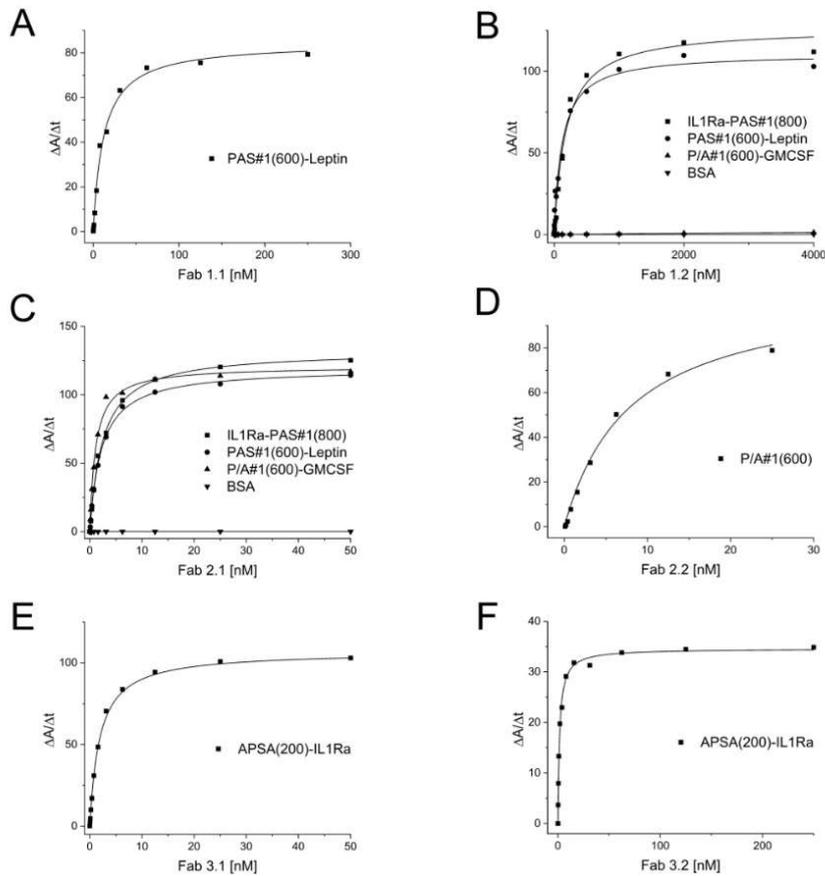


Figure S1: Exemplary binding studies of anti-PAS Fabs by ELISA. (A) ELISA with the Fab 1.1 and PAS#1(600)-Leptin as test substance pre-adsorbed to the microtiter plate. (B+C) ELISA with the Fab 1.2 (B) or the Fab 2.1 (C) and IL1Ra-PAS#1(800), PAS#1(600)-Leptin and P/A#1(600)-GMCSF as test substances as well as BSA as negative control. (D) ELISA with the Fab 2.2 and P/A#1(600) as test substance. (E) ELISA with the Fab 3.1 and APSA(200)-IL1Ra as test substance. (F) ELISA with the Fab 3.2 and APSA(200)-IL1Ra as test substance.

- 8 -

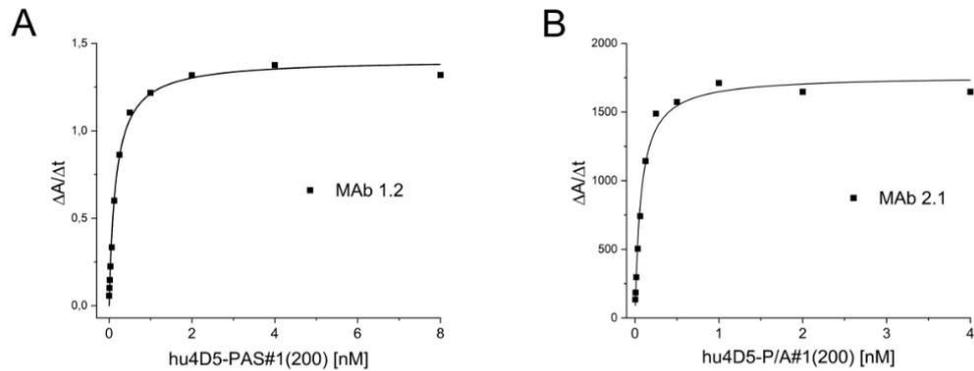


Figure S2: Exemplary binding studies of anti-PAS MAbs by ELISA. (A) ELISA with the hybridoma culture supernatant of MAbs 1.2, captured using an anti-mouse IgG Fc specific antibody from goat pre-adsorbed to the microtiter plate, then applying hu4D5-PAS#1(200) as test substance, which was detected with an anti-human kappa light chain antibody alkaline phosphatase conjugate. (B) MAbs capture ELISA with the hybridoma culture supernatant of MAbs 2.1 and hu4D5-P/A#1(200) as test substance.

- 9 -

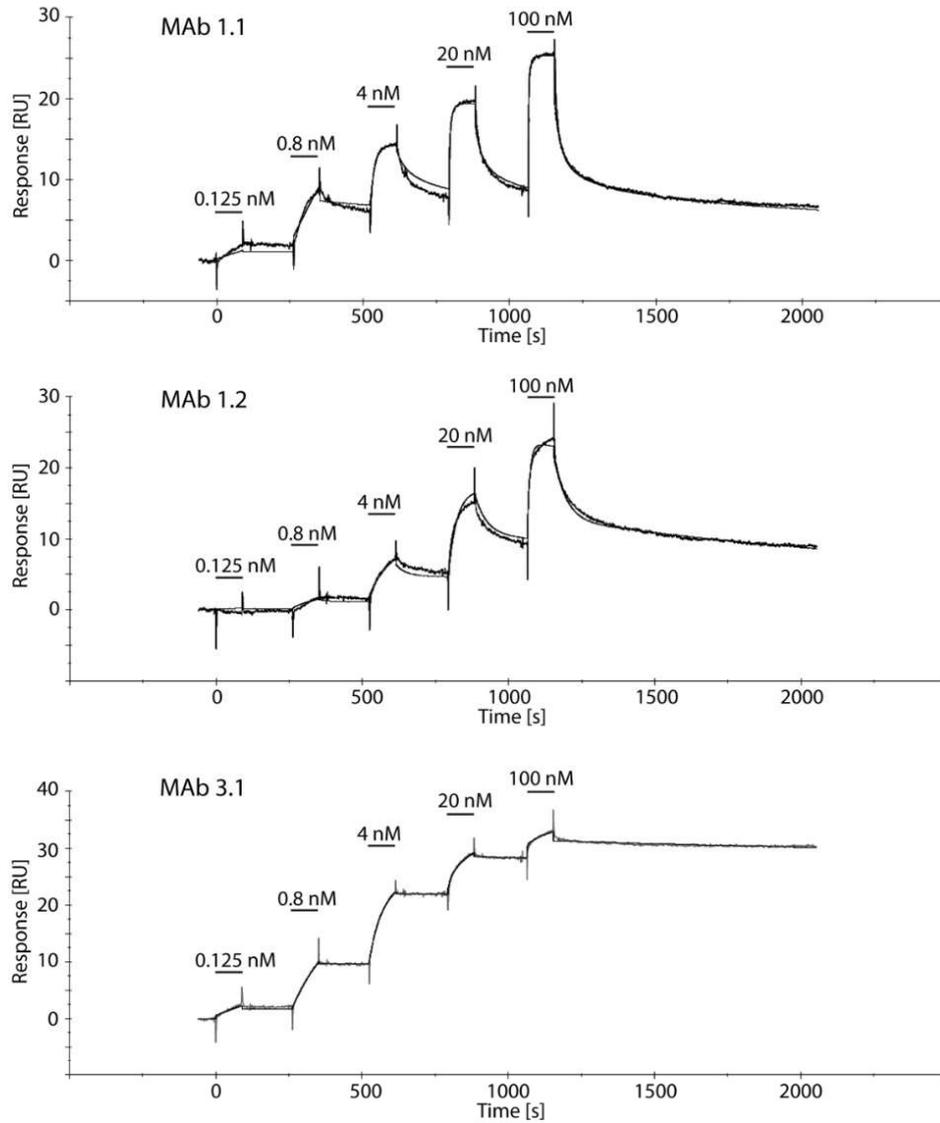
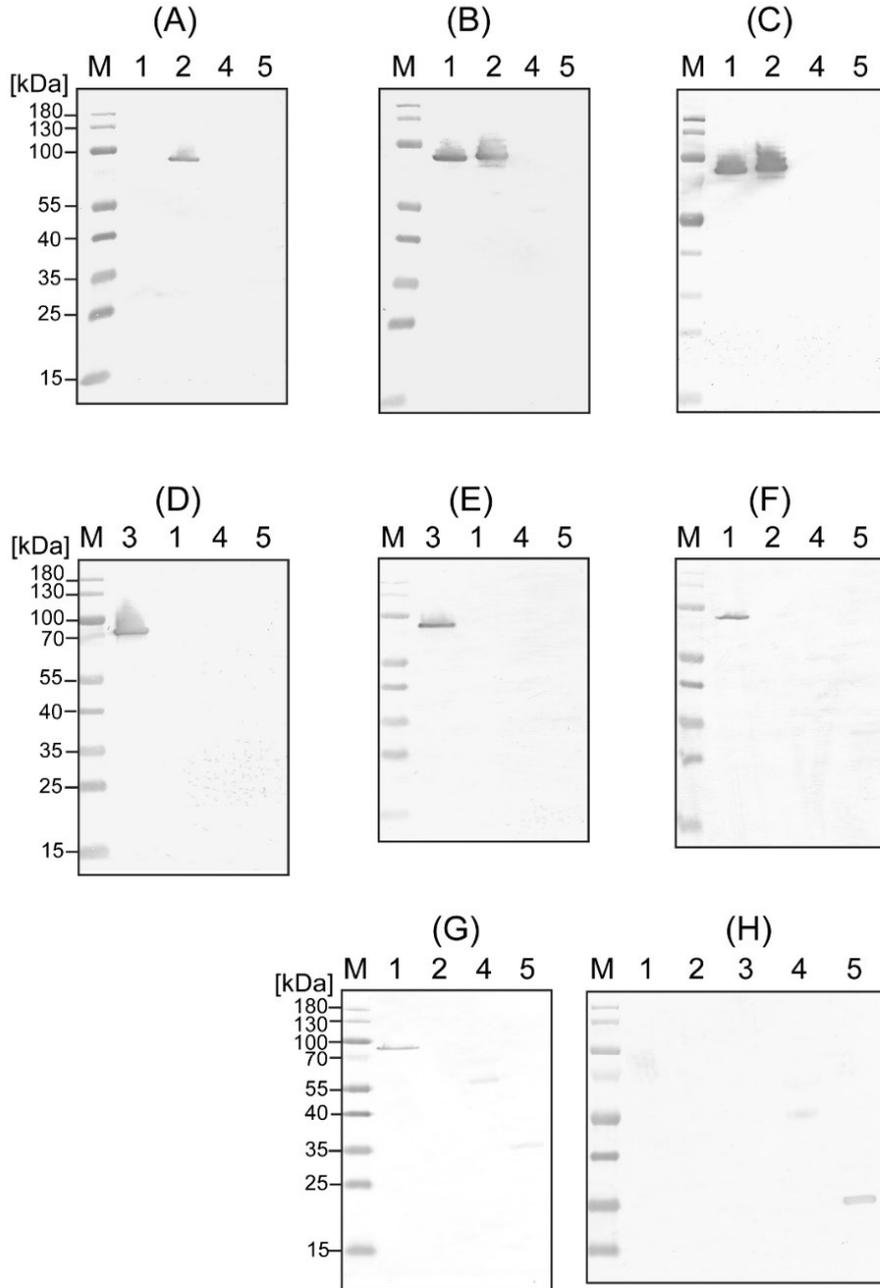


Figure S3: Exemplary SPR sensorgrams for MABs 1.1 and 1.2 using PAS#1(200)-IL1Ra as analyte and MAb 3.1 using APSA(200)-IL1Ra as analyte, measured on a Biacore X100 instrument. Hybridoma culture supernatants were applied to a CM3 sensorchip coated with an anti-mouse capture antibody. Injection phases are labeled with black bars, together with the corresponding concentration of injected analyte.

- 10 -

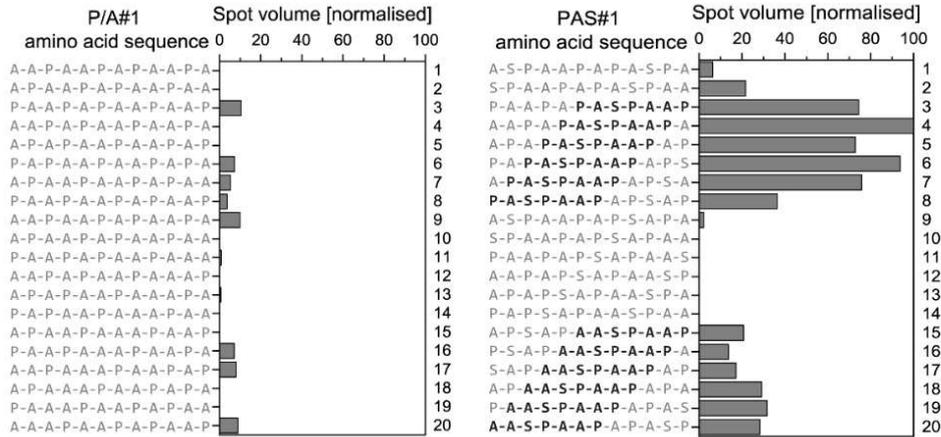


- 11 -

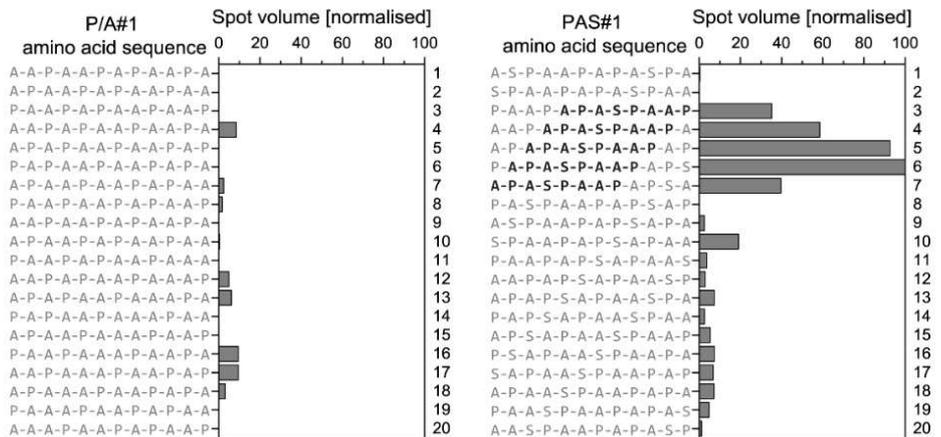
Figure S4: Western blot analysis to test anti-PAS MAbs for detection of PASylated fusion proteins. The following protein samples were applied to SDS-PAGE for western blotting: M: PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific); 1: PAS#1(200)-IL1Ra; 2: P/A#1(200)-IL1Ra; 3: APSA(200)-IL1Ra; 4: pooled human serum (SEQENS IVD / H2B), 1:200 diluted in ddH₂O and spiked with 1 µg IL1Ra (Kineret / Anakinra, SOBI); 5: *E. coli* BL21 whole cell protein, lysed in SDS sample buffer. Western blots were incubated with hybridoma culture supernatant or purified MAbs of the following hybridoma clones: (A) MAb 2.2, (B) MAb 2.1, (C) purified MAb 2.1, (D) MAb 3.1, (E) MAb 3.2, (F) MAb 1.1, (G) MAb 1.2, (H) the anti-mouse IgG Fc-specific alkaline phosphatase secondary antibody reagent as control.

- 12 -

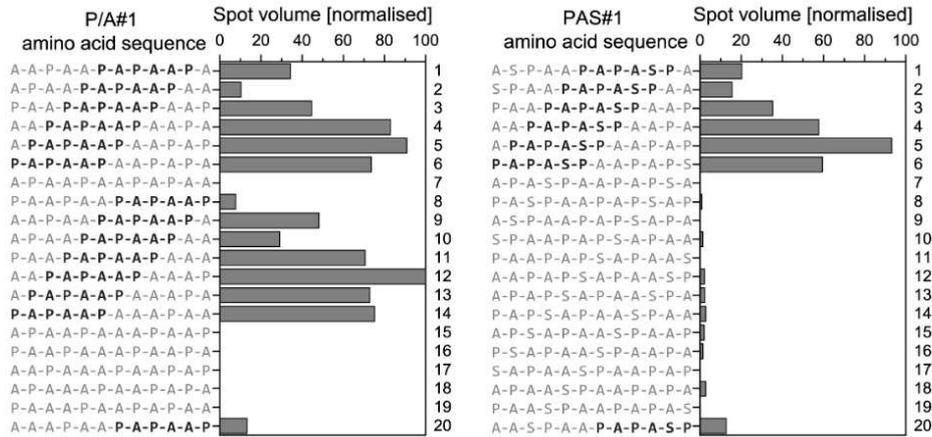
MAb 1.1



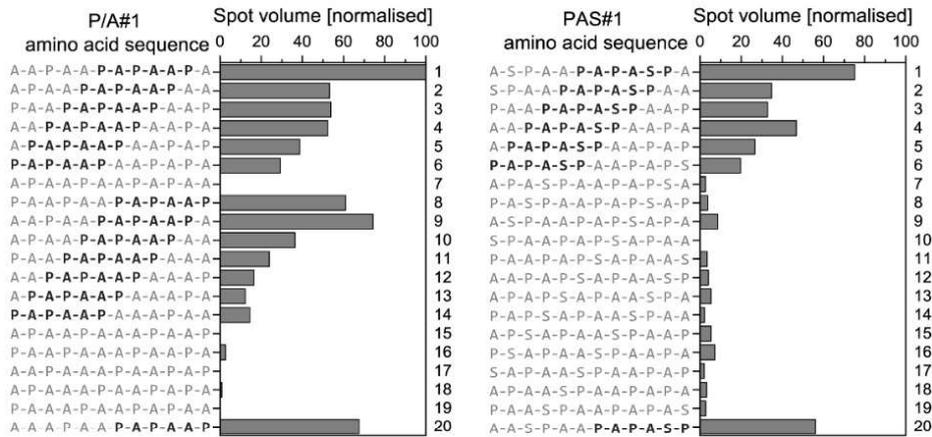
MAb 1.2



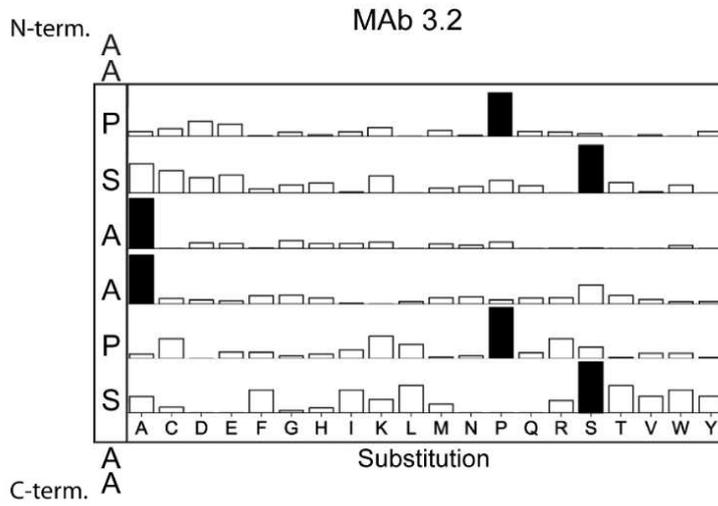
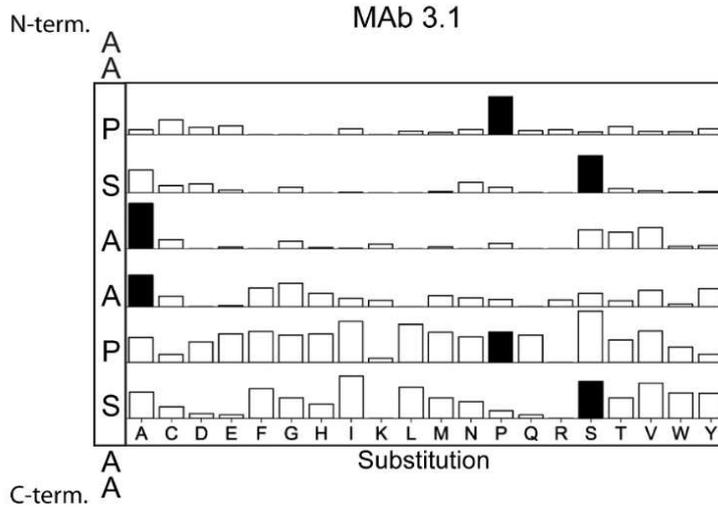
Fab 2.1



MAb 2.2



- 14 -



- 15 -

Figure S5: SPOT assay results with hybridoma culture supernatants of clones 1.1, 1.2, 2.2, 3.1 and 3.2 as well as the purified recombinant Fab 2.1. Consecutive 12mer peptides from the PAS#1 and P/A#1 repeats, each shifted by one residue, were synthesized C-terminally anchored on a hydrophilic membrane. After colour development, spot intensities were scanned, quantified and displayed as bar graphs. Emerging epitope sequences are highlighted in bold. In case of the MAbs 3.1 and 3.2, a 10-mer peptide comprising the sequence AAPSAAPSAA was synthesized, whereby positions 3 to 8 were systematically substituted by all 20 proteinogenic amino acids. Bars corresponding to the original residue in the APSA sequence are shown in black.

- 16 -

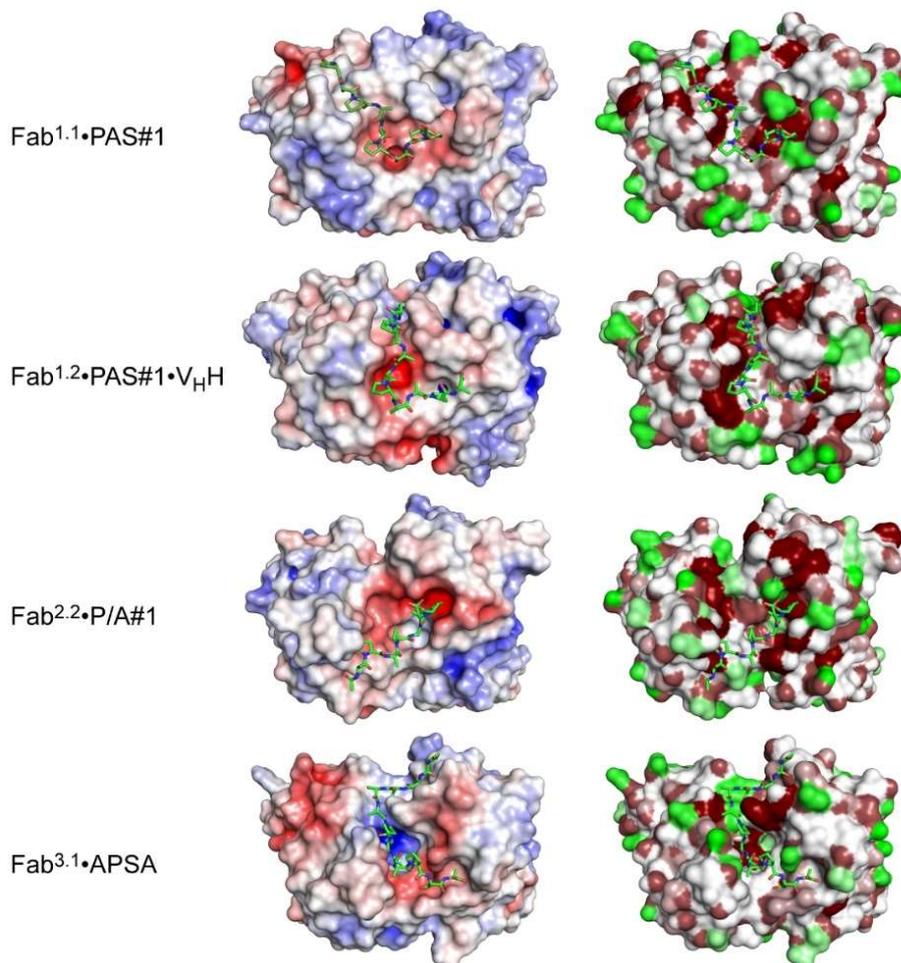


Figure S6: (Left) Electrostatic surface representation of the anti-PAS MAb paratopes with negative potential coloured red ($-5 k_B T/e$) and positive potential coloured blue ($5 k_B T/e$). (Right) Hydrophobic surface representation of the antigen-binding sites coloured according to increasing hydrophobicity, from green (hydrophilic) to white (neutral, including the polypeptide backbone) to brown (hydrophobic) using a group-wise parameter set (Eichinger et al., 2007). The bound PAS peptides are shown in stick representation (green).

- 17 -

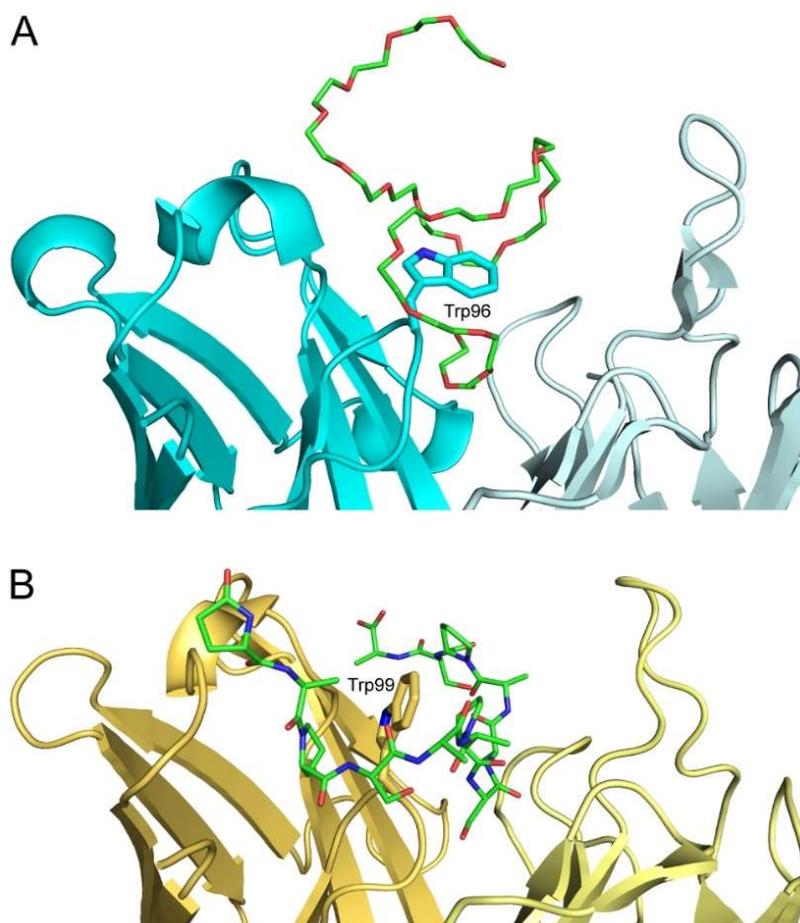


Figure S7: Comparison of the crystal structures of anti-PEG Fab 6-3 (top; PDB ID: 6VL9) (Huckaby et al., 2020) and anti-PAS Fab 3.1 (bottom). Fab heavy and light chains are coloured cyan and pale cyan for anti-PEG Fab 6-3 and yellow and pale yellow for anti-PAS Fab 3.1. The key residues in the paratope, Trp^{H96} (anti-PEG Fab 6-3) and Trp^{H99} (anti-PAS Fab 3.1), are depicted as sticks while the corresponding bound PEG and APSA chains are shown as slim sticks with carbon atoms coloured green.

Supplementary References

- Brochet, X., Lefranc, M.P., and Giudicelli, V. (2008). IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 36, W503-508.
- Eichinger, A., Nasreen, A., Kim, H.J., and Skerra, A. (2007). Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem* 282, 31068-31075.
- Huckaby, J.T., Jacobs, T.M., Li, Z., Perna, R.J., Wang, A., Nicely, N.I., and Lai, S.K. (2020). Structure of an anti-PEG antibody reveals an open ring that captures highly flexible PEG polymers. *Commun Chem* 3, 124.
- Williams, C.J., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Prisant, M.G., Videau, L.L., Deis, L.N., Verma, V., Keedy, D.A., Hintze, B.J., Chen, V.B., *et al.* (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci* 27, 293-315.

Veröffentlichung 2

Direct affinity purification of long-acting PASylated proteins with therapeutic potential using L-prolinamide for mild elution

Autoren: Jonas Schilz, Charlotte Clement, Franziska Greiner und Arne Skerra

Fachzeitschrift: Angewandte Chemie, International Edition
e202200079

Verlag: Wiley-VCH GmbH

Publikationsdatum: 24. März 2022 (online Version)

DOI: 10.1002/anie.202200079

Der vollständige Originalartikel wurde unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution CC BY License sowie zusätzlicher Genehmigung des Verlags Wiley-VCH GmbH (Erlaubnis erteilt am 16. Mai 2022) in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt.


Protein Purification Hot Paper

How to cite:

International Edition: doi.org/10.1002/anie.202200079

German Edition: doi.org/10.1002/ange.202200079

Direct Affinity Purification of Long-Acting PASylated Proteins with Therapeutic Potential Using L-Prolinamide for Mild Elution

*Jonas Schilz, Charlotte Clement, Franziska Greiner, and Arne Skerra**

Abstract: Both insufficient plasma half-life (circulation for only few hours or less) and laborious downstream purification can be bottleneck for biological drug development. We report a novel strategy for the efficient and gentle affinity purification of pharmacologically relevant proteins modified by PASylation for prolonged action *in vivo*. We previously described antibodies specific for Pro/Ala-rich sequences (PAS) covering a range of binding characteristics. Our present approach relies on a chromatography matrix functionalized with a low-affinity PAS-specific antibody Fab fragment for specific adsorption of the PASylated protein from a macromolecular mixture. With the complete absence of hydrophobic/aromatic or ionic groups in the PAS sequence epitope, binding is mediated by Van der Waals contacts and distinct hydrogen bonds only. Surprisingly, selective competitive elution is achieved by application of the highly soluble and biologically inactive imino acid derivative L-prolinamide. Based on the specific but strongly dynamic biomolecular interaction, our procedure allows the direct one-step purification of PASylated proteins from a cell extract or culture supernatant while avoiding harsh elution conditions as they are often needed for conventional affinity chromatography.

fusion of the pharmacologically active protein with a dedicated affinity tag, e.g. the His₆-, Flag- or Strep-tag,^[3] is the most common method today for selective protein purification both in research laboratories and in the biotechnological industry. Corresponding fusion proteins are produced by recombinant gene expression in a microbial or mammalian host cell as well as preparation of a suitable cell extract or culture supernatant, which is followed by chromatographic purification via the specific interaction with an appropriately functionalized solid matrix. However, despite wide use in research, potential immunogenicity and/or the need for subsequent proteolytic removal of the affinity tag^[4] compromise the benefits and hamper the application for biopharmaceutical development and drug manufacturing.^[5] Consequently, there is a strong desire for tag-free affinity purification techniques that are specific but still amenable to a wide group of relevant biological drug candidates. One prominent example is the protein A affinity chromatography for the purification of recombinant or monoclonal antibodies (MAbs) which is based on the interaction with a conserved part of the antibody molecule such that no additional tag is needed.^[6] However, the harsh acidic conditions required for the quantitative elution from the protein A chromatography matrix can lead to chemical protein modification and undesired product inhomogeneity.^[7]

Apart from the currently expanding area of therapeutic MAbs, classical protein and peptide drugs, including growth hormones, cytokines, incretins, or their antagonists, as well as enzymes, offer attractive opportunities for the development of improved versions of established biopharmaceuticals, so-called biobetters.^[8] In contrast to MAbs, these biopharmaceuticals do not provide for a generic purification scheme and they also suffer from a short circulation both in patients and, even more pronounced, in small animal models. Therefore, the use of artificial structurally disordered fusion polypeptides to extend the half-life and boost the *in vivo* activity of protein and peptide drug candidates has attracted considerable interest in pharmaceutical biotechnology.^[9] In particular, the conjugation with long polypeptides comprising the three small natural L-amino acids Pro, Ala and/or Ser, known as PASylation[®] technology, dramatically expands the hydrodynamic volume of biopharmaceuticals and strongly prolongs their plasma half-life by retarding renal filtration, depending on the length of the PAS chain (typically in the range of 200–800 residues).^[10] The poor immunogenicity of such feature-less PAS biopolymers was evident in multiple preclinical studies involving repeated administration of various PASylated proteins at

Biotherapeutics, in particular therapeutic proteins and peptides, have become the fastest growing sector in the pharmaceutical industry^[1] and continue to pose challenges for innovators as well as manufacturers to stay competitive. Among these, the rapid and efficient purification of recombinant proteins remains an issue both at the drug discovery or optimization stage and during development as well as manufacturing, with downstream purification accounting for a significant proportion of the total production cost.^[2] Affinity chromatography, which involves the genetic

[*] J. Schilz, C. Clement, F. Greiner, Prof. Dr. A. Skerra
 Lehrstuhl für Biologische Chemie,
 Technische Universität München
 Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising (Weihenstephan)
 (Germany)
 E-mail: skerra@tum.de

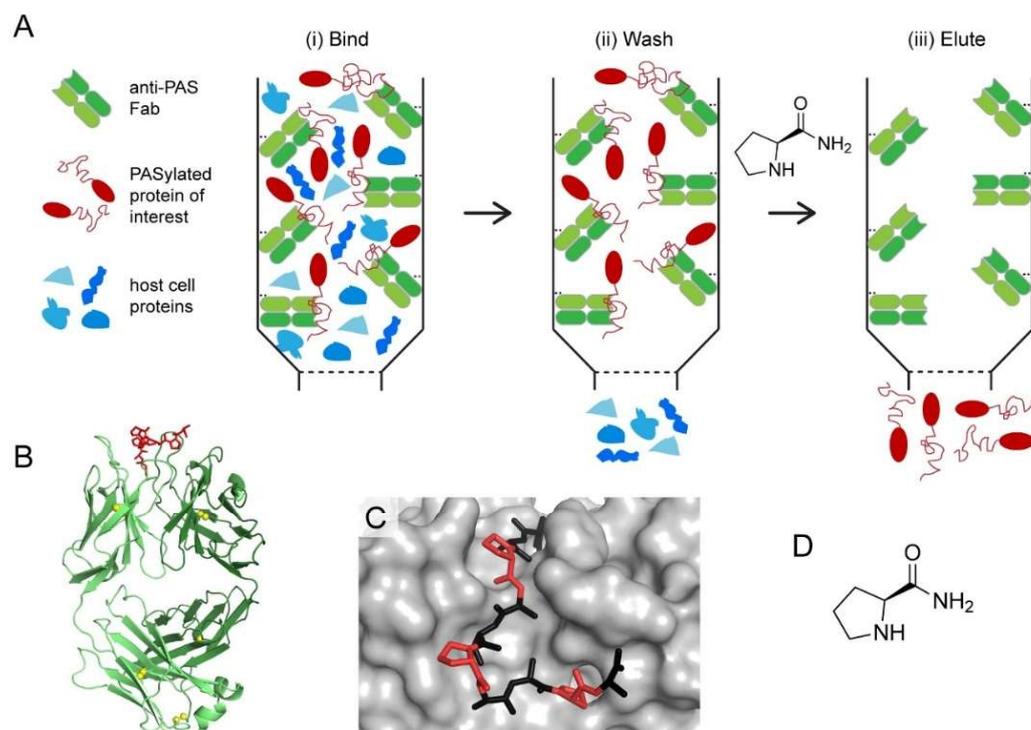
© 2022 The Authors. Angewandte Chemie International Edition published by Wiley-VCH GmbH. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

high doses, where no PAS-specific antibody response was observed.^[11] However, by applying a tenacious immunization scheme, involving a PAS peptide conjugate with a strongly immunogenic carrier protein and repeated boosting in mice, we recently succeeded in raising a few MABs that recognize PAS sequences with pronounced specificity.^[11a] While the few high-avidity MABs that were identified in this preceding study provide valuable tools for diagnostic assay development on the route to clinical translation,^[11b] those MABs with intermediate affinity and, consequently, faster association/dissociation kinetics appeared attractive as binding partners for affinity purification purposes. Thus, we sought to combine the polypeptide tag as part of all PASylated proteins with the monovalent antigen-binding fragment (Fab) of a less tightly interacting anti-PAS MAB in order to functionalize a cognate affinity matrix.

Based on the previously published biochemical characterization of MABs, and corresponding Fabs, that were specifically raised against a set of PAS sequences,^[11a] we decided to employ the recombinant anti-PAS Fab 1.2 (Scheme 1) as a binding partner to prepare a novel affinity support. Fab 1.2 exhibits rather modest affinity towards the

PAS#1 sequence, with a monovalent K_D value of $3.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and a relatively fast dissociation kinetics ($\tau_{1/2} = 6.4 \text{ s}$). This is similar to the rate of dissociation determined for the interaction between the His₆-tag and Ni²⁺•NTA.^[12] Thus, a sharp elution of the affinity-captured protein of interest can be expected. A moderate to weak binding interaction becomes even more important in the context of a potential avidity effect when dealing with proteins that are fused with a long PAS polypeptide, e.g. PAS#1(200). In such a case, 10 copies of the repetitive 20mer PAS#1 sequence motif are present (Scheme S1),^[9a] which leads to much enhanced binding activity for the corresponding bivalent MAB.^[11a]

The next question was to identify a suitable mild buffer that efficiently competes with the affinity interaction of the PASylated protein and enables its quick elution from the column. To this end, we set up small scale binding and elution experiments using a 20 μL volume of *N*-hydroxysuccinimide (NHS)-activated Sepharose beads charged with the covalently immobilized recombinant Fab. Subsequently, binding and elution of the PASylated target protein was monitored by SDS-PAGE analysis of the supernatant after resuspension of the beads and gentle centrifugation in a



Scheme 1. Principle of the affinity purification of PASylated proteins using a column with the immobilised anti-PAS Fab 1.2. A) Schematic illustration of the one-step PAS affinity purification: (i) application of the cell extract containing the PASylated protein of interest, (ii) column washing with a physiological running buffer and (iii) elution of the PASylated protein by applying a 1 M solution of L-prolinamide in running buffer at pH 8. B) Crystal structure (PDB ID: 7O31) of Fab 1.2 (light chain: light green; heavy chain: dark green; for the amino acid sequences, see Scheme S1) in complex with its PAS#1 epitope peptide (red). C) Top view on the paratope of Fab 1.2 with the bound minimal PAS epitope peptide shown as sticks and L-prolinamide moieties therein highlighted red. D) Chemical structure of L-prolinamide.

small reaction vessel, involving three steps: (i) incubation of the Fab matrix with a solution of the PASylated protein, (ii) washing of the beads with buffer and (iii) incubation with the elution agent. Following this approach, and employing the pre-purified PASylated enhanced green fluorescent protein (eGFP) as a model analyte, we tested various elution conditions: low or high pH, elevated ionic strength, chaotropic salts, denaturants, organic solvents, polyethylene-glycol as well as several small molecule competitors.

Buffers with elevated ionic strength did not effect elution, in agreement with our findings from the crystal structure of the corresponding Fab•PAS peptide complex where no salt-bridges were observed due to the complete absence of charged amino acids in the PAS sequence. Low pH, denaturing buffers (1–4 M urea, 1–2 M Gdn•HCl, 0.5–3 % (w/v) SDS) and certain small molecule competitors showed more promising results. Hence, we focused on the latter as a less detrimental influence on protein integrity was anticipated. Indeed, among the specific small molecule competitors the N-terminally blocked minimal PAS epitope peptide—amino acid sequence: Pga-APASPAAPA (Pga: pyroglutamy)—led to efficient elution of the PASylated eGFP at 2 mM concentration. However, this approach was not further elaborated due to the high cost of synthetic peptides which precludes wider application, in particular at

preparative scale. Surprisingly, a 1 M solution of the single derivatized amino acid L-prolinamide appeared to be equally effective in disrupting the binding interaction, evoking quantitative elution of the bound PASylated protein.

To mimic a more typical research application using an automated chromatography system, a HiTrap NHS-activated Sepharose column with 1 ml bed volume was covalently charged with 5 mg of the recombinant anti-PAS Fab 1.2. Using again *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) as test protein, pre-purified from an *E. coli* total cell extract via Strep-Tactin affinity chromatography,^[13] we found that the PASylated protein is tightly captured on the PAS affinity column whereas elution occurs in a sharp peak after applying 1 M L-prolinamide in a mild running buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) as mobile phase (Figure 1A).

In the next step, the PAS affinity chromatography was employed for the single-step purification of a PASylated protein directly from the whole cell extract of *E. coli*. As result, the *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) test protein was recovered from the column in a highly pure form while the host cell proteins were completely washed away in the flow-through (Figure 1C,D). As a control experiment, the non-PASylated *StrepII*-eGFP was subjected to the chromatog-

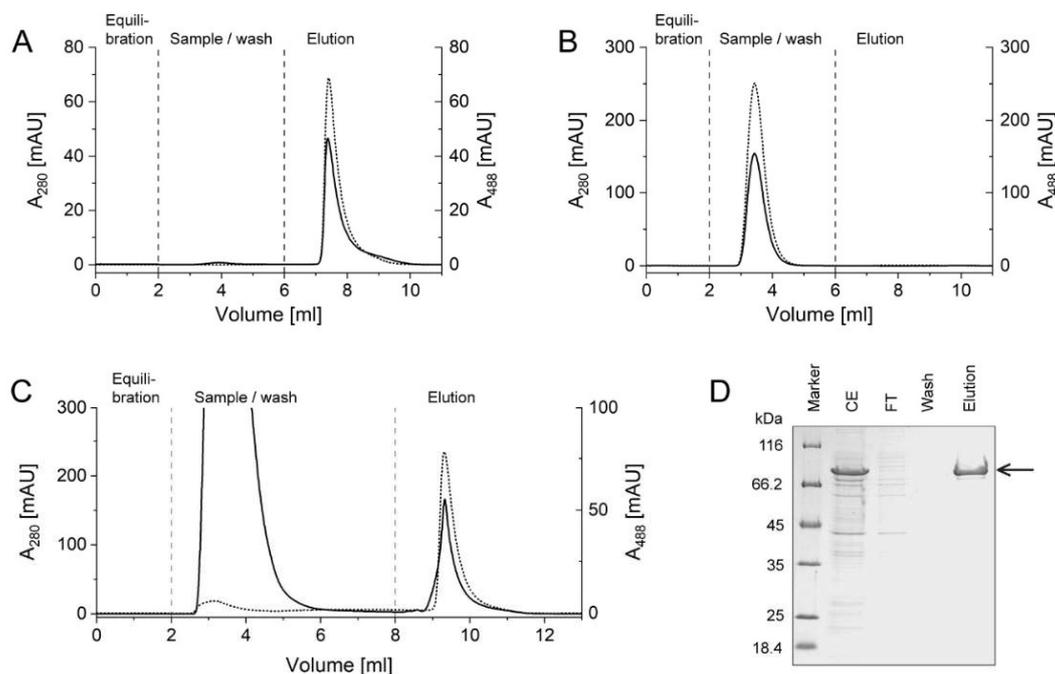


Figure 1. Chromatograms illustrating PAS affinity chromatography runs with A) pre-purified *StrepII*-eGFP-PAS#1(200), B) pre-purified, non-PASylated *StrepII*-eGFP (negative control) and C) *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) from an *E. coli* whole cell extract. Monitoring of UV absorption is shown for wavelengths of 280 nm indicative of protein Tyr/Trp absorption (solid black line, corrected for background absorbance) and of 488 nm to detect the eGFP fluorophore (dotted line). D) SDS-PAGE of representative samples from (C) including whole cell extract (CE), flow-through (FT), washing fraction and the affinity-purified *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) protein in the prolinamide elution fraction (arrow).

raphy, where no binding to the column was observed (Figure 1B).

Finally, practical applicability of the PAS affinity chromatography was demonstrated for two therapeutically relevant PASylated proteins (Figure 2): a PASylated cytokine which has shown superior efficacy in a mouse model of peritonitis, PAS#1(800)-IL1Ra,^[14] and a PASylated Anticlin that inhibits aggregation and prevents A β cytotoxicity in neuronal cell culture, H1GA-PAS#1(200)-His₆.^[15] In each case, purification of the recombinant protein from either the periplasmic or the whole cell fraction of *E. coli* was achieved by means of PAS affinity chromatography in one step.

Apart from the high specificity of the anti-PAS Fab, hence proven under chromatography conditions, the PAS affinity matrix appeared to be remarkably robust and the purification process was highly reproducible during multiple use. This was demonstrated by performing 20 repeated purification runs on the same 1 mL PAS affinity column under identical conditions, each time loading 500 μ g *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) as sample and applying 3 ml of 1 M L-prolinamide in running buffer for elution. The 20 superimposed chromatograms showed perfect match (Figure S1D), with standard deviations of merely 1.8% for the peak area and 0.8% for the peak height, thus indicating little or no variation in binding capacity and elution behaviour of the PAS chromatography matrix.

Furthermore, the integrity of the PASylated protein after the PAS affinity purification was investigated by analytical size exclusion chromatography (SEC). Comparison of the resulting peaks in SEC from three different protein samples before and after the affinity purification each demonstrated a homogeneous peak without signs of protein oligomerization or aggregation (Figure S1A–C). Thus, the PAS affinity chromatography allows protein recovery in the native state, obviously owing to the avoidance of harsh elution conditions such as low pH. After appropriate dilution, the isolated PASylated protein can be directly applied to functional assays, for example ELISA or SPR measurements, cell culture assays and the like. If necessary, the L-prolinamide can be easily removed by dialysis or with the help of a desalting column.

Using three different PASylated proteins, we have demonstrated that the newly developed anti-PAS chromatography matrix allows the one-step purification of proteins modified by PASylation technology without the need for additional affinity tags. Due to the pronounced specificity, albeit moderate affinity, of the anti-PAS Fab that was chosen as binding partner^[11a] bacterial cell proteins were efficiently removed while only the target protein bound to the chromatography matrix via its PAS moiety (Scheme 1A). Combined with the use of L-prolinamide as a highly soluble and biochemically rather inert substance^[16] for

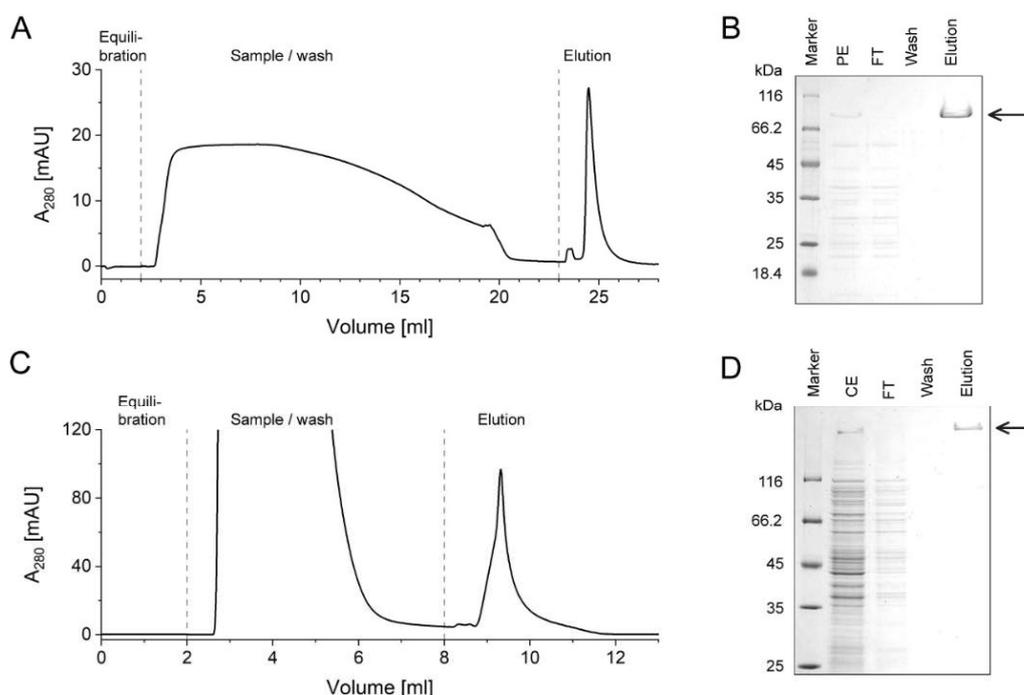


Figure 2. Chromatograms (A,C) and SDS-PAGE (B,D) documenting the one-step PAS affinity purification of H1GA-PAS#1(200)-His₆ from the periplasmic extract (A,B) and of PAS#1(800)-IL1Ra from the whole cell extract (C,D) of *E. coli*. Arrows indicate the bands corresponding to both PASylated proteins.

competitive elution, PAS affinity chromatography offers a mild procedure for the rapid and facile isolation of many different PASylated proteins.^[10]

Apart from the quest for selective binding of the molecule of interest, a common challenge in affinity chromatography is the search for elution conditions that neither affect the integrity of the purified biomolecule nor harm the affinity matrix, thus enabling repeated purification cycles. However, many well established affinity chromatography procedures, including protein A and protein G chromatography for antibody purification as well as MAb-based affinity purification of proteins fused with an epitope tag (e.g. the anti-myc MAb 9E10 or anti-FLAG Mab M1), or S-tag chromatography, involve acid pH and/or high ionic strength for elution, for example 0.2 M citrate pH 2.^[3] Such harsh conditions can disrupt the native fold, lead to aggregate formation or even provoke chemical modification of the purified protein, in particular Asn/Gln deamidation.^[7b,d,17]

In contrast, the concept of the biochemically mild PAS affinity chromatography takes advantage of structural insights into the antibody/epitope interaction.^[11a] During our previous X-ray crystallographic analysis, we found that hydrogen bond networks involving the peptide backbone (Figure S2) as well as multiple Van der Waals contacts arising from intimate shape complementarity dominate the interactions between the fully uncharged PAS polypeptide and its cognate antibodies. Thus, it was not surprising that elution conditions based on elevated ionic strength or pH shift did not lead to success whereas, in principle, a competitive ligand should be capable of interfering with these biomolecular interactions. Unexpectedly, the small molecule L-prolinamide turned out to offer this function. Notably, this simple ligand does not only exhibit the proline moiety that constitutes a major repeated building block of PAS sequences,^[9a] but also its carboxamide part mimics the peptide bond with the subsequent amino acid residue, usually L-Ala (Scheme 1C,D). This carboxamide modification abolishes a negative charge, which is in line with the lack of electrostatic interactions as seen in the native Fab•PAS complex. For comparison, no efficient elution from the PAS affinity column was observed with solutions of the zwitterionic L-proline (at pH 8) up to 2 M concentration. Besides, L-prolinamide, a well-known protein-stabilizing osmolyte compound in many organisms,^[18] is a harmless substance and readily available from various suppliers at a price (≈ 0.5 € per gram) comparable to other chemicals commonly used in therapeutic protein production (e.g., pure Gdn•HCl) and, therefore, even suitable at larger purification scale. In addition, the binding interaction between L-prolinamide itself and the chromatography matrix is negligible such that regeneration of the PAS affinity column is simply achieved by washing with 2–3 bed volumes of running buffer. Nevertheless, apart from the elution reagent the cost and the binding capacity of the affinity resin, as well as additional steps for DNA and endotoxin removal, need to be considered prior to industrial adaptation.

In conclusion, the PAS affinity chromatography described herein has proven applicability to N- and C-terminally PASylated proteins carrying PAS tags comprising 200–800 residues by taking advantage of an anti-PAS Fab with high specificity in conjunction with fast association/dissociation kinetics. On the other hand, an anti-PAS Fab with higher intrinsic affinity^[11a] might be advantageous for the purification of fusion proteins with shorter PAS tags. Thus, beyond their utility for bioanalytical and diagnostic assays in the context of the preclinical and clinical development of PASylated biopharmaceuticals, our recently generated anti-PAS MAb^[11a] considerably facilitate the routine affinity purification of corresponding drug candidates in a native state, thus obviating the need for any additional—and potentially immunogenic—purification tag.

Experimental Section

Full description of the experimental details is provided in the Supporting Information for this article.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Martin Schlapschy and Uli Binder for helpful discussions and scientific input and Ina Theobald for preparation of cellular extracts. This work was financially supported by XL-protein GmbH. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available in the Supporting Information of this article.

Keywords: Affinity Chromatography · Antibody · L-Prolinamide · PASylation · Protein Purification

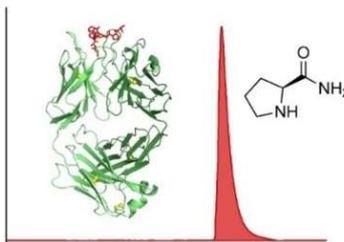
- [1] a) R. Otto, A. Santagostino, U. Schrader, McKinsey & Company, **2014**; b) R. A. Rader, E. S. Langer, *Biopharma Manufacturing Trends*, Putman Media, Schaumburg, IL, **2018**, pp. 4–11.
- [2] Y. Li, D. Stern, L. L. Lock, J. Mills, S. H. Ou, M. Morrow, X. Xu, S. Ghose, Z. J. Li, H. Cui, *Acta Biomater.* **2019**, *95*, 73–90.
- [3] K. Terpe, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 523–533.
- [4] B. A. Fong, W. Y. Wu, D. W. Wood, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 272–279.
- [5] F. Khan, P. M. Legler, R. M. Mease, E. H. Duncan, E. S. Bergmann-Leitner, E. Angov, *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 133–147.
- [6] S. Hober, K. Nord, M. Linhult, *J. Chromatogr. B* **2007**, *848*, 40–47.
- [7] a) A. A. Shukla, P. Gupta, X. Han, *J. Chromatogr. A* **2007**, *1171*, 22–28; b) E. Lopez, N. E. Scott, B. D. Wines, P. M. Hogarth, A. K. Wheatley, S. J. Kent, A. W. Chung, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2415; c) S. B. Hari, H. Lau, V. I. Razinkov, S. Chen, R. F. Latypov, *Biochemistry* **2010**, *49*, 9328–9338; d) Y. Xu, D. Wang, B. Mason, T. Rossomando, N. Li, D. Liu, J. K. Cheung, W. Xu, S. Raghava, A. Katiyar, C. Nowak, T.

Communications

Protein Purification

J. Schilz, C. Clement, F. Greiner,
A. Skerra* [e202200079](#)

Direct Affinity Purification of Long-Acting
PASylated Proteins with Therapeutic Potential
Using L-Prolinamide for Mild Elution



PASylation of pharmacologically active proteins or peptides drastically expands their hydrodynamic volume and, thus, retards renal filtration, which results in prolonged in vivo half-life. We have now developed an antibody-based affinity chromatography that permits the one-step purification of PASylated molecules in the native state using L-prolinamide as mild elution reagent.



Supporting Information

Direct Affinity Purification of Long-Acting PASylated Proteins with Therapeutic Potential Using L-Prolinamide for Mild Elution

*J. Schilz, C. Clement, F. Greiner, A. Skerra**

- 2 -

Supporting Methods

E. coli production and purification of Fab fragments

The anti-PAS Fab 1.2 was expressed and purified as previously described.^[1] In brief, pASK88 derivatives harboring the corresponding V-genes were used to express the chimeric Fab fragment with human IgG1/ κ domains and a His₆ tag fused to the heavy chain using the *E. coli* strain KS272^[2] via 8 liter bench top fermentation in line with published procedures.^[3] The recombinant Fab was purified to homogeneity from the periplasmic bacterial extract via immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) followed by cation exchange chromatography (CEX).

E. coli production and purification of PASylated test proteins

The PASylated fusion proteins PAS#1(800)-IL1Ra and H1GA-PAS#1(200)-His₆ were expressed in the cytoplasm or via periplasmic secretion, respectively, and purified as previously described.^[4] Yields from cytoplasmic expression were around ≥ 10 mg and those from periplasmic secretion ≤ 1 mg per liter bacterial culture. *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) was produced as soluble protein in the cytoplasm of the *E. coli* strain BL21^[5] using the generic expression vector pASK75^[6] in 2 liter shake flask culture. The bacteria were lysed via sonication with a Digital Sonifier 250 (Branson, Danbury, CT) and the protein was purified by *Strep*-Tactin affinity chromatography^[7] as well as size exclusion chromatography (SEC) on a Superdex200 16/60 pg column (GE Healthcare, Munich, Germany).

Coupling of the anti-PAS Fab to NHS-activated Sepharose

The purified Fab was concentrated to 2.5–5 mg/ml in 200 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8.3 (adjusted with NaOH) using an Amicon Ultra 10 kDa centrifugal filter (Millipore, Eschborn, Germany). Coupling to NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) was performed according to the manufacturer's instructions in the same buffer using 5 mg purified Fab for 2 ml resuspended bead slurry, corresponding to 1 ml settled resin, with an incubation for 3 h at room temperature. Washing of the Sepharose beads was performed by

- 3 -

resuspension in a 15 ml centrifuge tube and centrifugation for 1 min at 1000 rpm in a 4K centrifuge (Sigma Laborzentrifugen, Osterode, Germany) in six alternating steps, each with 6 ml of the following two buffers: (i) 100 mM Tris/HCl pH 8.0 (to inactivate excess reactive groups) and (ii) 100 mM Na-acetate, 500 mM NaCl, pH 4.0. Alternatively, coupling to a prepacked 1 ml NHS-activated HiTrap HP column (GE Healthcare) was performed, again following the manufacturer's instructions, using 5 mg Fab per column for a total incubation time of 90 min at room temperature. To this end, the protein solution was recirculated through the column from time to time using a pair of syringes attached to both ends. Blocking of excess reactive groups and removal of non-covalently bound protein was subsequently achieved by washing on an ÄKTA pure system (GE Healthcare) in six alternating steps, each with 6 ml of with the following buffers: (i) 500 mM ethanolamine/HCl, 500 mM NaCl, pH 8.3 and (ii) 100 mM Na-acetate, 500 mM NaCl, pH 4.0. SDS-PAGE analysis of the supernatant and column flow-through after the coupling step confirmed essentially complete immobilization of the Fab. Fab-charged beads and columns were stored at 4 °C in binding buffer supplemented with 0.1 % (w/v) NaN₃ to prevent microbial growth.

Screening for suitable elution conditions with the anti-PAS Fab chromatography matrix

Initial tests for binding of PASylated proteins and suitable elution conditions from the PAS affinity matrix were performed in 1.5 ml microcentrifuge tubes using 40 µl of a 50 % (v/v) slurry of Sepharose 4 Fast Flow beads charged with the anti-PAS Fab 1.2 as described above. Beads were first washed with binding buffer by repeated pipetting with a truncated plastic tip. After centrifugation at 2000 rpm for 1 min in a Minispin Plus tabletop microcentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) the clear supernatant was withdrawn. Then, 80 µl of 0.2 mg/ml H1GA-PAS#1(200)-His₆ in binding buffer was mixed with the beads and incubated for 1 min. After sedimentation by centrifugation, the beads were washed twice with 160 µl binding buffer each. Then, the beads were mixed with 80 µl of the respective elution buffer and incubated for 5 min, again followed by centrifugation. To avoid accidental carry-over of beads at this step, only the upper 40 µl of the clear supernatant was withdrawn

- 4 -

for sampling of the eluted PASylated protein via SDS-PAGE. To test whether the elution condition had affected the activity of the affinity matrix, the entire procedure was repeated in a second cycle of binding and elution, again followed by SDS-PAGE analysis.

Production of cell extracts containing PASylated test proteins

To investigate the applicability of our PAS affinity chromatography for the one-step purification of PASylated proteins from cellular extracts, total cell extract (CE) or periplasmic extract was prepared for in total three PASylated proteins. In the first case, *E. coli* BL21 was transformed with the corresponding expression plasmid for *StreptII-eGFP-PAS#1(200)* or *PAS#1(800)-IL1Ra* and grown at 30 °C to $OD_{600} \approx 0.5$. Recombinant gene expression was induced by the addition of 0.2 µg/ml anhydrotetracycline (Acros Organics, Geel, Belgium) or 1 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (Formedium, Hunstanton, UK), respectively. After 3 h, the bacteria were harvested by centrifugation at 4500 rpm (Sorvall RC 12BP Plus with H-12000 rotor; Thermo Fisher Scientific, Munich, Germany) and the bacterial pellet was resuspended in binding buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA), followed by cell lysis via sonication as described above. Cell debris was sedimented by centrifugation for 40 min at 15.000 rpm in a Sorvall RC 6C Plus centrifuge (Thermo Fisher Scientific) and the supernatant was sterile-filtered through a 0.45 µm membrane (Sartorius, Göttingen, Germany). To prepare the periplasmic extract (PE) containing H1GA-PAS#1(200)-His₆, *E. coli* JM83 transformed with the corresponding expression plasmid^[8] was grown at 22 °C to $OD_{600} \approx 0.6$ and recombinant gene expression was induced for 3 h by the addition of 0.2 µg/ml anhydrotetracycline. Again, the bacteria were harvested by centrifugation at 4500 rpm and the PE was prepared by incubating the cells in a hyperosmotic buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM sucrose, 1 mM EDTA), followed by separation of the spheroplasts via centrifugation as previously described.^[3b, 4b]

- 5 -

PAS affinity chromatography with a packed 1 ml column on an automated HPLC system

All purification runs with the 1 ml bed volume HiTrap HP column charged with the anti-PAS Fab 1.2 as described above were performed on an ÄKTA pure HPLC system (GE Healthcare) equipped with a multiwavelength detector and using 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA as running buffer at a flow rate of 1 ml/min. After an initial equilibration step with 2 column volumes (CV) of running buffer, the PASylated protein sample was injected from a capillary loop, followed by column washing with running buffer. In case of the purification of *StrepII*-eGFP-PAS#1(200) or PAS#1(800)-IL1Ra from the *E. coli* whole cell extract (CE), up to 1 ml of the sterile-filtered CE was applied to the column. For the purification of H1GA-PAS#1(200)-His₆ from the periplasmic cell extract (PE), 15 ml sterile-filtered PE was applied using two 10 ml sample loops operated in series. Elution of the bound PASylated protein was achieved by applying 2–3 CV of elution buffer (1 M L-prolinamide, 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH adjusted to 8.0 with HCl). Regeneration of the column was achieved by washing with 2–3 CV of running buffer. Due to an apparent impurity in the commercial L-prolinamide substance (Carbosynth, Bratislava, Slovakia) that led to a background absorption at 280 nm, a blank chromatogram (without application of a PASylated protein) was recorded and used for subtraction to obtain the corrected chromatogram. Such a correction was not necessary when detecting the PASylated eGFP absorption at 488 nm via its fluorophore.

Protein analysis via SEC

Analytical SEC was performed on an ÄKTA pure HPLC system using a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare) with 20 mM HEPES/NaOH pH 7.5, 150 mM NaCl as running buffer at a flow rate of 0.5 ml/min. Chromatograms and retention volumes of conventionally purified *StrepII*-eGFP-PAS#1(200), PAS#1(800)-IL1Ra and H1GA-PAS#1(200)-His₆ were compared with the respective protein preparation obtained using the 1 ml PAS affinity column as described above.

- 6 -

Supporting References

- [1] J. Schilz, U. Binder, L. Friedrich, M. Gebauer, C. Lutz, M. Schlapschy, A. Schiefner, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* **2021**, 167113.
- [2] H. J. Meerman, G. Georgiou, *Bio/technology* **1994**, *12*, 1107-1110.
- [3] a) W. Schiweck, A. Skerra, *Proteins* **1995**, *23*, 561-565; b) A. Skerra, *Gene* **1994**, *141*, 79-84.
- [4] a) N. E. Powers, B. Swartzwelter, C. Marchetti, D. M. de Graaf, A. Lerchner, M. Schlapschy, R. Datar, U. Binder, C. K. Edwards, 3rd, A. Skerra, C. A. Dinarello, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 868-882; b) S. Rauth, D. Hinz, M. Börger, M. Uhrig, M. Mayhaus, M. Riemenschneider, A. Skerra, *Biochem. J.* **2016**, *473*, 1563-1578.
- [5] P. Daegelen, F. W. Studier, R. E. Lenski, S. Cure, J. F. Kim, *J. Mol. Biol.* **2009**, *394*, 634-643.
- [6] A. Skerra, *Gene* **1994**, *151*, 131-135.
- [7] T. G. M. Schmidt, A. Eichinger, M. Schneider, L. Bonet, U. Carl, D. Karthaus, I. Theobald, A. Skerra, *J. Mol. Biol.* **2021**, *433*, 166893.
- [8] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, *Gene* **1985**, *33*, 103-119.
- [9] a) J. Breibeck, A. Skerra, *Biopolymers* **2018**, *109*, e23069; b) M. Schlapschy, U. Binder, C. Börger, I. Theobald, K. Wachinger, S. Kisling, D. Haller, A. Skerra, *Protein Eng., Des. Sel.* **2013**, *26*, 489-501.

- 7 -

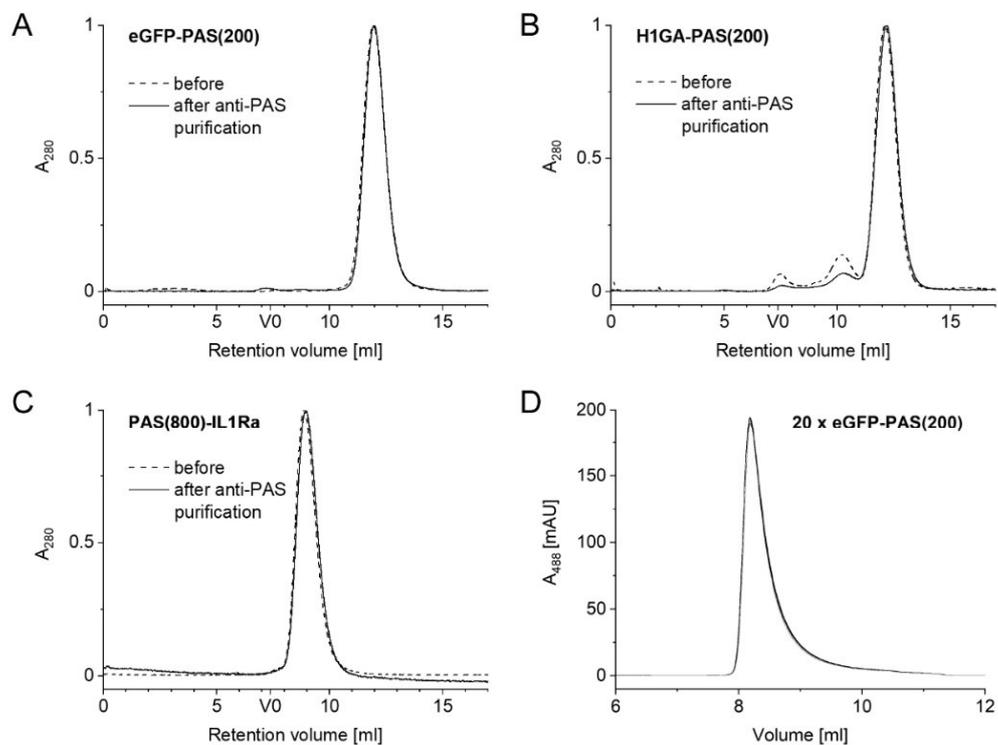


Figure S1: Analytical SEC of purified *StreptII*-eGFP-PAS#1(200) (A), H1GA-PAS#1(200)-His₆ (B) and PAS#1(800)-IL1Ra (C) before (dashed line) and after (solid line) one cycle of PAS affinity chromatography. (D) Superposition of chromatograms from 20 repeated PAS affinity purification runs of pre-purified *StreptII*-eGFP-PAS#1(200) on a 1 ml PAS affinity column monitored at a wavelength of 488 nm, indicative of the eGFP fluorophore.

- 8 -

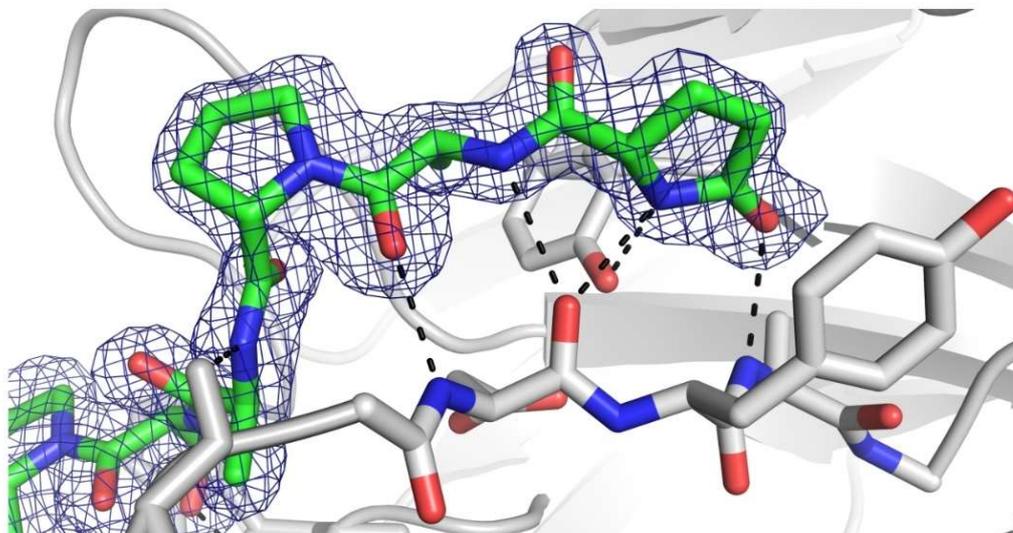


Figure S2: Detailed interactions between the Fab 1.2 (grey) and the bound PAS#1 epitope peptide (green), including the N-terminal pyroglutamyl group of the peptide that was used for co-crystallization. The $2F_o - F_c$ electron density map is displayed at a contour level of 1σ (PDB ID: 7O31). Hydrogen bonds are indicated by black dashes.

- 9 -

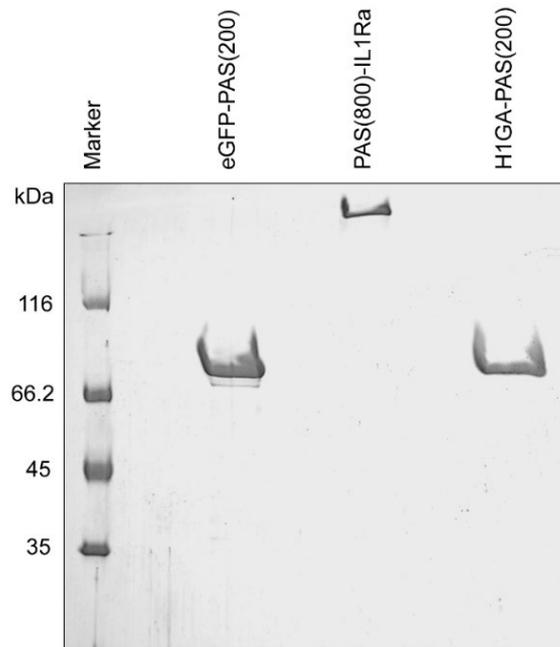


Figure S3: Coomassie brilliant blue stained SDS-PAGE showing *StreptII*-eGFP-PAS#1(200), PAS#1(800)-IL1Ra and H1GA-PAS#1(200)-His₆ directly purified from the whole cell extract or periplasmic extract of *E. coli* by one-step PAS affinity purification and elution with L-prolinamide using an elevated sample load of 26 μ g, 85 μ g and 10 μ g protein, respectively. Please note that PASylated proteins get poorly stained with Coomassie brilliant blue with increasing length of the PAS tag.^[9]

8.2 Anhang II: Ergänzende Ergebnisse

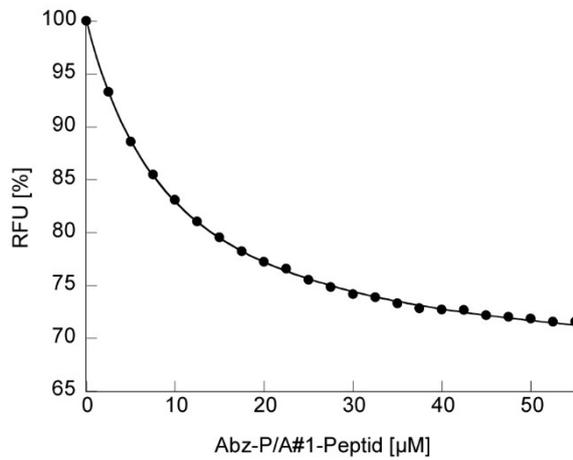


Abbildung S1: Fluoreszenztitration des gereinigten Fab 2.2 mit dem Peptid *Abz-APAPAAPA* (RFU: *Relative Fluorescence Units*). Eine Kurvenanpassung gemäß der bimolekularen Komplexbildung ergab eine Dissoziationskonstante von $K_D = 9.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$.

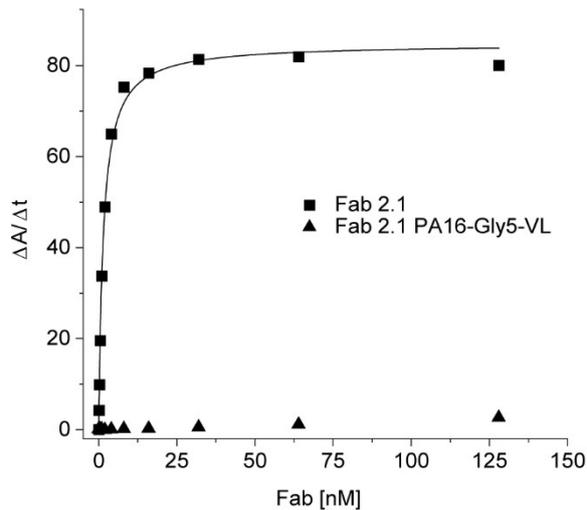


Abbildung S2: ELISA mit dem Fab 2.1 im Vergleich mit Fab 2.1 P/A₁₆-Gly₅-V_L. Letzteres Proteinkonstrukt ist am N-terminus der leichten Kette über einen Glycinlinker mit einem 16 Aminosäuren umfassenden Abschnitt der P/A#1-Sequenz fusioniert, der zwei Kopien des Epitops enthält. Als Antigen wurde P/A#1(200)-IL1Ra an der Mikrotiterplatte adsorbiert; die Detektion erfolgte nach Zugabe eines Sekundärantikörpers mit *p*-Nitrophenylphosphat als chromogenem Substrat. Das Fab 2.1 P/A₁₆-Gly₅-V_L ist im Gegensatz zum Fab 2.1 nicht mehr in der Lage, das an der Mikrotiterplatte adsorbierte P/A#1(200)-IL1Ra zu binden.

8.3 Anhang III: Liste aller klonierten Antikörpersequenzen

Fab 1.1 – Nukleotidsequenz der schweren Kette:

GAAGTTAAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCGTCTCA
GGTTCTCATTAAACCGGCTATGGTGTAAATTTGGGTTCCGACGCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATG
ATATGGGGTGATGGAATCACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACCTCCAAG
AGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCAGGTACTACTGTGCCAGGGATTACTAC
GGTAGGAGGTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGT
GTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC
TACATCTGCAACGTTAATCACAAACCCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGCCATCAC
CACCATCACCAT

Fab 1.1 – Nukleotidsequenz der leichten Kette:

GACATCGAGCTCACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCATGCAGGGCC
AGCAAAAGTGTGAGTTCATCTGGCTATAATTATATGTTCTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTC
CTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGACAGGTTCTGGGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTC
ACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCAGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCTCTTA
ACGTTCCGGTGTGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAAGTA
CAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGT

Fab 1.1 – Aminosäuresequenz der schweren Kette:

EVKLQESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKLEWLGMWGDGITDYN SALKSRLSISKDNSK
SQVFLKMNSLQTD DDTARYYCARDYYGRYYAMDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCHH
HHHH

Fab 1.1 – Aminosäuresequenz der leichten Kette:

DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSSSGYNYMFYQKPGQPPKLLIYLASNLESV PDRFWGSGS GTFDF
TLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

Fab 1.2 – Nukleotidsequenz der schweren Kette:

GAAGTTCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGCCTGGTGGTAGCCTGAAACTGAGCTGTGCAGCAAGC
GGTTTTACCTTTAGCAGCTATGGTATGAGCTGGGTTTCGTCAGACACCGGATAAACGCTCTGGAACCTGGTTGCCACC
ATTAATAGCAATGGTGGTAGTACCTATTATCTGGATAGCGTGAAAGGTCGCTTTACCATTAGCCGTGATAAAGCA
AAAAACACCCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAAAAGCGAAGATACCGCAATGTATTATTGTGTTCGTGGTGGC
AGCATTTATGATGGCTATGATTATGCTATGGATTATTGGGGTCAGGGCACCTCGGTCACCGTTAGCAGCGCAAGC
ACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCACCCGAGCAGCAAAGCACCAGCGGTGGCACCGCAGCACTGGGTTGT
CTGGTTAAAGATTATTTTTCCGGAACCGGTTACAGTTAGCTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGTGGTGTTCATACC
TTTCCGGCAGTTCTGCAAAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGAGCAGCGTTGTTACC GTTCCGAGCAGTAGCCTGGGC
ACCCAGACCTATATTTGTAATGTTAATCATAAGCCGAGCAACACCAAAGTGGACAAAAAAGTTGAACCGAAAAGC
TGTCATCACCACCATCACCAT

Fab 1.2 – Nukleotidsequenz der leichten Kette:

GATATTGTTCTGACCCAGAGTCCGGCAAGCCTGGCCGTTAGCCTGGGTCAGCGTGCAACCATTAGCTGTGCTGCA
AGCCAGAGCGTTAGCACACGAGCTATAGTTATATGCATTGGTTTCAGCAGAAAACCGGGTCAGCCTCCGAAAACCTG
CTGATCAAATATGCAAGCAATCTGGAATCAGGTGTTCCGGCACGTTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGATTTT
ACCCTGAACATTCATCCGGTTGAAGAAGAAGATACAGCCACCTATTATTGTCAGCATAGCTGGGAAATTCGCTG
ACTTTGGCGCAGGTACAAAACCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAAGTA
CAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTC
ACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGT

Fab 1.2 – Aminosäuresequenz der schweren Kette:

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFSSYGMSSWRQTPDKRLELVATINSNGGSTYYLDSVKGRFTISRDKA
KNTLYLQMSLLKSEDTAMYYCVRGGSIYDGYDYAMDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKDKVEPKS
CHHHHHH

Fab 1.2 – Aminosäuresequenz der leichten Kette:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWFQPKGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGSTDF
TLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab 2.1 – Nukleotidsequenz der schweren Kette:

GAAGTTAAACTGCAGGAAAGCGGTCCGGGTATTCTGCAACCGAGTCAGACCCTGAGCCTGACCTGTAGCTTTAGC
GGTTTTAGCCTGAGCACCTATGATATGGGTGTTGGTTGGATTTCGTCAGCCGAGCGGTAAAGGCTGGAATGGCTG
GCCAATATTTGGTGGAAATGATAACAAATACTACAACAGCGCACTGAAAAGCCGTCTGACCATTAGCAAAGATACC
AGCAATAATCAGGTGTTTCTGAAAATTAGCAGCGTTGATGCAACCGATAACCGAACCTATTATTGTGCACAGATG
CGTGATAATTATGGTGTGTGGTTTTGCATTTTTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTTAATCACAACCCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGCCAT
CACCACCATCACCAT

Fab 2.1 – Nukleotidsequenz der leichten Kette:

GACATCGAGCTCAGCCAGAGTCCGAGCAGCCTGGCAGTTAGCGTTGGTGAAAAAGTTACCATGAGCTGTAAAAGC
AGCCAGAGCCTGTTTTATAGCAATCGCGAAAAAACTATCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGTCAGAGCCCCG
AAACTGCTGATTTATTGGGCAAGCACCCGTGAAAGCGGTGTTCCGGATCGTTTTACCGGTAGCGGTAGTGGCACC
GATTTACCCTGACCATTTCAAATGTTAAAGCAGAGGATCTGGCCGTGATTATTGTGACAGTATTATAACTAT
CCGACCTTTGGTGCAGGTACAAAACCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTGTTGTGTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTACAAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGT

Fab 2.1 – Aminosäuresequenz der schweren Kette:

EVKLQESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLSTYDMGVGWRQPSGKGLEWLANIWWNDNKYNSALKSRLTISKDT
SNNQVFLKISSVDATDTATYYCAQMRDNYGVWFQWQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKDKVEPKSCH
HHHHH

Fab 2.1 – Aminosäuresequenz der leichten Kette:

DIELSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLFYSNREKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT
DFTLTISNVKAEDLAVYYCQYYNYPTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab 2.2 – Nukleotidsequenz der schweren Kette:

GAAGTTAAACTGCAGGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCTCT
GGTTTTACTGAACACTTATGGTATGGGTGTAGGTTGGATTTCGTCAGCCTTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTG
GCCAACATTTGGTGGACTGATGATAAGTACTATAATTAGTCCTGAAGAGCCGGCTACAATCTCAAGGATACC
TTCAACAACCAGGTATTCCTCAAGATCTCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCAACTA
GCCTATCATGATAACCCCTGGTTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG
GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC
AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTTAATCACAACCCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGCCAT
CACCACCATCACCAT

Fab 2.2 – Nukleotidsequenz der leichten Kette:

GACATCGAGCTCTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTCTGAGCTGCAAGTCC
AGTCAGAGCCTTTTATATAGTAACAATCAAAAGAAGTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCT
AAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACA
GATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAACTAT
CCCACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGT

Fab 2.2– Aminosäuresequenz der schweren Kette:

EVKLQESGPGILQPSQTLSTLCSFSGFSLNTYGMVGVWIRQPSGKLEWLANIWWTDDKYNSVLKSRLLTISKDT
FNNQVFLKISSVDTADTATYYCAQLAYHDNPWFAYWQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCH
HHHHH

Fab 2.2– Aminosäuresequenz der leichten Kette:

DIELSQSPSSLAVSVGEKVTLSCKSSQSLLYSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT
DFTLTISSVKAEDLAVYYCQYYNYPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab 3.1 – Nukleotidsequenz der schweren Kette:

GAAGTTAAACTGCAGCAGAGCGGTGCAGAACTGGTTCGTCCGGGTGCAAGCGTTAAACTGAGCTGTAAAGCACTG
GGTTATATCTTACCGATTATGAAATGCATTGGGTGAAACAGACACCGGTTTCATGGTCTGGAATGGATTGGTGT
ATTCATCCTGGTAGCGGTAATACCGTGTATAACCAGAAATTTAGGGTAAAGCAACCTGACCGCAGATAAAAGC
AGCAGCACCGCATATATGGAAGTTAGCAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCAGTTTATTACTGTAATCTGTGGGGT
CGTTGGGGTACAGGCACACCGGTCACCGTTAGCAGCGCAAGCACCAAAGGTCGAGCGTTTTTCCGCTGGCACCG
AGCAGCAAAAGCACCGGTCACCGGTCACCGCAGCAGTGGGCTGTCTGGTTAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTACA
GTTAGCTGGAATAGCGGTGCACCTGACCGTGGTGTTCATACCTTTCCGGCAGTGTGCAAAGCAGCGGTTCTGTAT
AGCCTGAGCAGCGTTGTTACCGTTCGAGCAGTAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGTAATGTTAATCATAAG
CCGAGCAACACCAAAGTGGACAAAAAAGTTGAACCGAAAAGCTGCCATCACCATCATCATCAT

Fab 3.1 – Nukleotidsequenz der leichten Kette:

GATGTTGTTATGACCCAGACTCCGGTTACACTGAGCGTTAATATTGGTTCAGCCTGCAAGCATTAGCTGTAAAAGC
GGTCAGAGCCTGCTGCATAGTGATGGTAAAACCTATCTGAATTGGCTGCTGCAACGTCGGGGTCAGAGTCCGAAA
CGTCTGATTTATCTGGTTAGCGATCTGGATTAGGTTTCCGGATCGTTTTTACCAGCAGCGGTAGCGGCACCGAT
TTTACACTGGAATTAGCCGTGTTGAAGCCGAAGATCTGGGTGTGTATTATTGTTGGCAGGGCACCCATCTGCCG
CATACTTTGGCGGTGGTACAAAACCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGT

Fab 3.1 – Aminosäuresequenz der schweren Kette:

EVKLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYIFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGVIHPGSGNTVYNQKRFQKATLTADKS
SSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCNLWGRWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCHHHHHH

Fab 3.1 – Aminosäuresequenz der leichten Kette:

DVVMTPVPTLSVNIQGPASISCKSGQSLHSDGKTYLNLWLLQRPQSPKRLIYLVSDLDGVPDRFTSSGSGTD
FTLEISRVEAEDLVYYCQWQGTHLPHTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Fab 3.2 – Nukleotidsequenz der schweren Kette:

GAAGTTAAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCTGCAAGGCTTTG
 GGCTACACATTTACTGACTATGAAATGTTCTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGTATTGGA
 ATTCATCCAGGAAGTGGTGGAACTGCCTACAATCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCC
 TCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACGTCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACAAGAAATGAC
 AGAGGCTCCTGGGGCCAAGGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTG
 GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG
 GTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA
 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTTAAT
 CACAAACCCAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGCCATCACCACCATCACCAT

Fab 3.2 – Nukleotidsequenz der leichten Kette:

GACATCGAGCTCACCCAGACTCCACTCACTTTGTGCGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATCTCTTGCAGGTCA
 AGTCAGAGCCTCTTAAATAGTGATGGGAAGACATTTTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCTGTCTCCAAAG
 CGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGCAGAGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGAT
 TTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCT
 CACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTCGAGATCAAACGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA
 TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
 GTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
 AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 GTCACCCATCAGGGCCTGAGTTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGAGAGTGT

Fab 3.2 – Aminosäuresequenz der schweren Kette:

EVKLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMFWVKQTPVHGLECI GTIHPGSGGTAYNQKFKGKATLTADKS
 SSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTRNDRGSWGQGT VTVVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
 VTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCHHHHHH

Fab 3.2 – Aminosäuresequenz der leichten Kette:

DIELTQTPLTSLVTLGQPASISCRSSQSLLSNDGKTFLNWLLQRPGLSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTD
 FTLKISRVEAEDLGVIYCWQGT HFPHTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC