

**Mechanismen der zielgerichteten antitumoralen Wirksamkeit von
Dianthin-Panitumumab-Konjugaten in Kombination mit dem
glykosylierten Triterpenoid SO1861**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Alexandra Trautner
Berlin
2020

Die praktischen Arbeiten dieser Dissertation wurden am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hendrik Fuchs angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hendrik Fuchs
Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig
Institut für Pharmazie
Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 05.10.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebs	1
1.2	Konventionelle Behandlungsstrategien des Krebsleidens	3
1.3	Zielgerichtete Tumorthherapie.....	4
1.4	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC) als zielgerichtete Tumorthapeutika	7
1.5	Ribosomen inaktivierendes Protein Dianthin	11
1.6	Endosomal Escape	13
1.7	Zielsetzung.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Antikörper	17
2.1.2	Bakterienstämme	17
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Eukaryotische Zelllinien und zugehöriges Medium.....	19
2.1.5	Geräte	19
2.1.6	Kits	21
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.8	Versuchstiere.....	23
2.1.9	Computer Software	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1	Transformation	24
2.2.2	Plasmidpräparation und Sequenzierung	24
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	25
2.3.1	Expression und Extraktion von Dianthin	25
2.3.2	IMAC	25
2.3.3	Chitin-Affinitätschromatographie	27
2.3.4	Protein A-Affinitätschromatographie.....	27
2.3.5	SDS-PAGE.....	28
2.3.6	Coomassie-Färbung.....	29
2.3.7	Westernblot	29
2.3.8	Dialyse von Proteinlösungen.....	30
2.3.9	Aufkonzentrieren von Proteinlösungen.....	30
2.3.10	Modifizierung mit Hydrazinnicotinamid (HYNIC)	31
2.3.11	Biokonjugation (chemische Kopplung)	31
2.3.12	Radionuklidmarkierung mit ^{99m} Tc	33

2.4	Methoden zur Proteincharakterisierung.....	33
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.4.2	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ϵ von Dianthin.....	34
2.4.3	<i>N</i> -Glykosidaseaktivitätstest.....	34
2.4.4	2-Sulfobenzaldehyd-Assay.....	35
2.4.5	Farbstoffmarkierung mit Cy3.....	35
2.4.6	Berechnung des Derivatisierungsgrades.....	36
2.4.7	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR).....	36
2.4.8	Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation (MALDI).....	37
2.5	Zellbiologische Methoden.....	37
2.5.1	Kultivierung adhärenter Tumorzellen.....	37
2.5.2	Kryokonservierung humaner Tumorzellen.....	38
2.5.3	Mykoplasmen-Nachweis.....	38
2.5.4	SO1861-Verwendung und -Vorbehandlung.....	38
2.5.5	Zytotoxizitäts- und Vitalitätsassay.....	38
2.5.6	MTT-Assay.....	39
2.5.7	IncuCyte® S3-Echtzeitmessung.....	40
2.5.8	3D-Sphäroid Assay.....	40
2.5.9	Nachweis der Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität.....	41
2.6	<i>In-vivo</i> -Methoden.....	42
2.6.1	Akute Toxizität-Studie an BALB/c.....	42
2.6.2	Tumorstadiumsrate.....	42
2.6.3	Dosis-Wirkungsbeziehung im Xenograft-Modell.....	45
2.6.4	Histopathologische Untersuchung.....	46
2.6.5	Bestimmung der Blutparameter.....	46
2.6.6	Biodistribution und Bildgebung über SPECT/CT.....	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Sequenzanalyse von Dianthin.....	48
3.2	Expression und Reinigung von Dianthin.....	49
3.3	Molekularer Extinktionskoeffizient von Dianthin.....	50
3.4	Modifizierung mit HYNIC und Cy3.....	51
3.5	Biokonjugation zur Erzeugung von DPan, D(H)Pan, DPan(H).....	52
3.6	Charakterisierung von DPan, D(H)Pan und DPan(H).....	57
3.6.1	Molekulare Masse der Immunotoxine.....	57
3.6.2	Enzymatische Aktivität.....	58
3.6.3	Bindungsaffinität zu EGFR.....	59
3.7	<i>In-vitro</i> -Versuche.....	61

3.7.1	Untersuchung der Zytotoxizität von DPan.....	63
3.7.2	HCT116-Sphäroide unter Kombinationsbehandlung mit DPan / SO1861	67
3.7.3	Antikörper abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)	68
3.8	<i>In-vivo</i> -Studien.....	71
3.8.1	Akute Toxizität.....	71
3.8.2	Tumorwachstumsrate	75
3.8.3	Dosis-Wirkungsbeziehung der Kombinationstherapie DPan/SO1861	76
3.8.4	Biodistribution von ^{99m} Tc markiertem DPan	82
4	Diskussion	89
4.1	Aufbau des Antikörper-Toxin-Konjugates DPan	89
4.2	Charakterisierung von DPan	94
4.3	Bewertung des zytotoxischen Potentials von DPan in Kombination mit SO1861	96
4.4	DPan vermittelte Rekrutierung von Effektorzellen der Immunantwort	98
4.5	Untersuchung der <i>In-vivo</i> -Wirksamkeit und Biodistribution von DPan im Xenograft-Modell	100
4.6	Ausblick	107
5	Zusammenfassung	109
6	Conclusion.....	111
7	Literaturverzeichnis.....	113
8	Publikationen.....	131

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-sBA	2-Sulfobenzaldehyd
ADC	Antikörper-Wirkstoff-Konjugate
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>
ALT	Alaninaminotransferase
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartataminotransferase
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Bettvolumen
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Complement-Dependent Cytotoxicity</i>
CPP	Zellpenetrierendes Peptid
D(H)	Dianthin-HYNIC
D(H)Pan	Dianthin(HYNIC)-Panitumumab
D(H)-SH	Dianthin(HYNIC)-SH
D(H)-SPDP	Dianthin(HYNIC)-SPDP
DAR	<i>Drug-to-Antibody Ratio</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPan	Dianthin-Panitumumab
DPan(H)	Dianthin-Panitumumab(HYNIC)
DPBS	Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung
D-SH	Dianthin-SH
D-SPDP	Dianthin-SPDP
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	<i>Half Maximal Effective Concentration</i>
EDDA	2,2'-(1,2-Ethandiyl-diimino)diessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	<i>Endosomal Escape</i>
EEE	<i>Endosomal Escape Enhancer</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
FcγR	Fcγ-Rezeptor
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramm
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
His	Histidin
HYNIC	Hydrazinnicotinamid
i.v.	Intravenös
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
IT	Immunotoxin
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Stoffmengenkonzentration

MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation
min	Minuten
MMAE/MMAF	Monomethylauristatin E/F
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltretrazoliumbromid
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOAEL	Höchst verträgliche Dosis ohne schwerwiegende Nebeneffekte
NTA	Nitriloessigsäure
Pan(H)	Panitumumab-HYNIC
Pan(H)-NEM	Panitumumab(HYNIC)-NEM
Pan(H)-NEM-SPDP	Panitumumab(HYNIC)-NEM-SPDP
Pan-NEM	Panitumumab-NEM
Pan-NEM-SPDP	Panitumumab-NEM-SPDP
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBSB	PBSB-Brij
PD-L1	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
RIP	Ribosomen inaktivierendes Protein
ROS	<i>Reaktive Oxygen Spezies</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
s	Sekunden
s.c.	Subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SMCC	N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate
SMD	<i>Small-molecule drug</i>
SPDB	<i>N-Succinimidyl 4-(2'-pyridyldithio)butyrate</i>
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VOI	Volumes Of Interests

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs gehört zu den führenden frühzeitigen Todesursachen und im Jahr 2016 führte dies weltweit zu einem Sterben von 4.5¹ Millionen Erkrankten, wobei die Sterblichkeitsrate vor allem in Ländern mit niedrigem Lebensstandard besonders hoch ist [1]. Gemäß des *World Cancer Reports* (2020) wird von 27 Millionen Neuerkrankten im Jahr 2040 ausgegangen, was einem 50 %igen Wachstum ausgehend von 18.1 Millionen Erkrankten im Jahr 2018 entspricht [2]. Dabei gehört Lungenkrebs mit 2.1 Millionen Neuerkrankten (2018) zu der häufigsten Krebsart bei Männern und zweithäufigsten bei Frauen mit einer Sterblichkeitsrate von insgesamt 1.8 Millionen Menschen [3]. Mit 2.1 Millionen Neuerkrankten und 627 000 Toten im Jahre 2018 gehört Brustkrebs bei Frauen zu der häufigsten Krebsart gefolgt von dem kolorektalen Karzinom, welches bei Männern nach Prostatakrebs (2018: 1.3 Millionen Neuerkrankte, 360 000 Tote) ebenfalls zu der dritthäufigsten Tumorart zählt. Hier erkrankten 2018 insgesamt 1.8 Millionen Menschen, wobei 880 000 verstarben [3]. Besonders der Konsum von Tabak und Alkohol [4] sowie solare UV-Exposition [5, 6] als auch die Luftverschmutzung [7] gelten als karzinogene Faktoren, ebenso wie bakterielle und virale Infektionen [8].

Dabei ist der Differenzierungsprozess einer gesunden und normalen Zelle hin zu einer entarteten Tumorzelle komplex. So benannten Hanahan und Weinberg wesentliche Merkmale, die eine Neoplasie ausmachen: die Aufrechterhaltung der proliferativen Signalübertragung, die Umgehung von Wachstumssuppressoren, die Zelltodresistenz, die Ermöglichung der replikativen Unsterblichkeit, die Induktion der Angiogenese, die Aktivierung der Invasion und Metastasierung, die Umgehung der Zerstörung durch das Immunsystem sowie die Umprogrammierung des Energiemetabolismus [9]. Einer der wichtigsten intrazellulären Tumorsuppressoren p53, auch genannt *guardian of the genome* [10], erkennt Genomschäden sowie suboptimale Verhältnisse an Nukleotiden, wachstumsfördernden Signalen sowie Glukose und kann infolgedessen die Progression des Zellzyklus anhalten oder aber bei schwerwiegenden Schäden die Apoptose einleiten [11]. Bei Mutationen innerhalb seines Gens ist p53 nicht mehr voll funktionsfähig, die oben genannten Schutzmaßnahmen können nicht mehr greifen und es kommt zu einem unkontrollierten Wachstum von Zellen mit beschädigtem Genom [12, 13]. Mutationen im Protoonkogen RAS hingegen führen zu dessen unkontrollierter Aktivierung, was den Verlust der GTPase-Aktivität bedeutet und ein dauerhaftes,

¹ In dieser Arbeit wird der Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet

wachstumsstimulierendes Signal übermittelt [14]. Eine besonders kritische Funktion nimmt das Zytokin *Transforming Growth Factor* (TGF- β) ein, ein Wachstumsfaktor, der eine wesentliche Rolle in der Differenzierung von Zellen und Geweben spielt [15]. Bei normaler Funktion und im frühen Krebsstadium fungiert er als Tumorsuppressor und beeinflusst die Zellproliferation und -differenzierung sowie Apoptose [16]. Bei einer erhöhten Aktivität hingegen fördert er die Epithelial-mesenchymale Transition der Tumorzelle [17]. Die gefolgte Herunterregulierung von unter anderem E-Cadherin, ein wichtiger Faktor für die Zell-Zell-Adhäsion, als auch der Verlust der Zellpolarität ermöglichen der Tumorzelle die Wanderung durch die Basalmembran, was letztlich die Metastasierung bedeutet [18, 19]. Ebenso besitzt TGF- β eine anti-inflammatorische Funktion und schützt so den Tumor effektiv vor dem Immunsystem [20]. Ein ebenso bedeutender Faktor ist das Tumormikromilieu [21]. So besteht der Tumor nicht nur aus den eigentlichen Krebsstammzellen, welche Mutationen auf den Onkogenen und Tumorsuppressorgenen tragen, sondern auch aus verschiedenen Zellarten wie Endothel-, Immunzellen, Fibroblasten und Perizyten, welche insgesamt als Zellverband miteinander agieren und effektiv an der Tumorgenese beteiligt sind [21]. Die Hauptaufgaben des angeborenen und adaptierten Immunsystems sind die Erkennung und Beseitigung von Pathogenen aber auch von gealterten und beschädigten Zellen, zu welchen aufgrund ihrer Veränderung auch Krebszellen gehören [22]. Jedoch können Krebszellen durch Ausschüttung von Chemokinen regulatorische T-Zellen rekrutieren, deren Hauptaufgabe die Unterdrückung von ungewollten Immunreaktionen ist, und somit antitumorale Immunreaktionen unterdrücken [23]. Makrophagen des Typs 2 gelten als Tumor assoziierte Makrophagen und werden von Tumorzellen durch Ausschüttung von Interleukinen, TGF- β oder dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aktiviert und wirken anti-inflammatorisch und begünstigen die Tumorgenese [24]. Ebenso können Krebszellen dem Immunsystem durch Maskierung entgehen, indem sie den sogenannten *Programmed Death-Ligand 1* (PD-L1) exprimieren, welcher an das von T-Zellen tragende PD-1-Antigen bindet und somit die Tumorevasion bewirkt [25].

Die Komplexität und Heterogenität des Tumors sowie dessen Mikromilieu und die dabei involvierten Mechanismen und Signalwege der Tumorgenese erfordern zwingend die Verbesserung und Weiterentwicklung bestehender Therapien als auch das Finden neuer Therapieansätze, um einen erfolgreichen und langanhaltenden antitumoralen Effekt zu erzielen.

1.2 Konventionelle Behandlungsstrategien des Krebsleidens

Die zu wählende Behandlungsstrategie ist immer abhängig von der Krebsart und kann nicht standardisiert werden. Aktuell gilt nach wie vor der chirurgische Eingriff als *first line of choice* bei der Behandlung von soliden Tumoren [26]. Dabei ist dieser von der Größe, des Typs und der Lokalisierung des Tumors abhängig als auch von dem gesundheitlichen Zustand des Patienten. Ebenso beinhaltet dies folgende Nachteile. Der Tumor kann nur entfernt werden, wenn er auch gut zugänglich ist und dessen vollständige Exzision kann nicht garantiert werden. So können die am Randbereich der chirurgischen Inzision noch weiterhin befindlichen Tumorzellen zu einer Remission führen [27]. Ebenso ist diese Behandlungsart auf solide Tumoren beschränkt und kann nicht für Leukämien und nur schlecht für Metastasen angewandt werden. Zu erwähnen ist hier, dass vor allem Metastasen einen tödlichen Verlauf der Krankheit bedeuten [28]. Infolgedessen wird der chirurgische Eingriff zumeist mit einer Chemo- oder Radiotherapie begleitet, entweder prä- oder postoperativ.

Bei der Radiotherapie, ebenso eine der häufigsten Behandlungsarten, wird hoch energetische Strahlung wie Röntgen-, Gamma- oder Elektronenstrahlung auf den Tumor gerichtet [29]. Aufgrund ihrer hohen Energie erzeugt die ionisierende Strahlung reaktive Radikale, welche über Radikalkettenreaktion zu einer Schädigung von biologischen Strukturen führt. Vor allem Wassermoleküle, welche dominant in biologischen Systemen vorliegen, werden in Anwesenheit von Sauerstoff zu Hydroxyl-Peroxyl-Radikalen ($\text{HO}_2\cdot$) radikalisiert sowie weitere reaktive Oxygen Spezies (ROS) erzeugt [30]. Folglich ist der Erfolg hier maßgeblich von der Sauerstoffkonzentration im Tumor abhängig. Aufgrund der annähernd gleichen Vaskularisierung können kleine Tumore hier besser adressiert werden [30]. Neben der Schädigung von Proteinen und Lipiden ist aber vor allem der Einfluss auf die DNA wesentlich [31]. Die über ROS erzeugten Doppelstrangbrüche können zwar bis zu einem bestimmten Maß über DNA-Reparaturmechanismen kompensiert werden, jedoch resultieren fehlerhafte oder nicht reparierte DNA-Schäden im Zelltod, der entweder kontrolliert als Apoptose [31] oder mitotische Katastrophe [32] erfolgt. Weiterhin kann die ionisierende Strahlung zelluläre Signalkaskaden aktivieren, die mitunter auch kontraproduktiv zu der eigentlichen antitumoralen Behandlung sind und zu einer Radioresistenz führen [33]. So kann eine ROS vermittelte Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) erfolgen welches wiederum Transkriptionsfaktoren aktiviert und die Zellproliferation anregt [34]. Weiterhin wird durch Bestrahlung die Internalisierung und der Transport von EGFR durch Caveolin-1 gefördert, was wiederum die DNA-abhängige Proteinkinase DNA-PK und weitere Zellrepariermechanismen aktiviert [35, 36]. Ebenso beeinflusst EGFR die DNA-

Reparaturproteine XRCC1 und ATM, welche zusätzlich die Ausbildung einer Radioresistenz begünstigen [37].

Eine weitere Art der häufigsten Krebsbehandlungen stellt die Chemotherapie dar. Hierbei werden Zytostatika wie Alkylantien [38], Platinverbindungen [39] oder spezielle Antibiotika [40, 41] verabreicht, die meist auf DNA-Ebene die Zellproliferation verhindern. Jedoch erfolgt der Effekt unspezifisch und affiziert besonders Zellen mit einer hohen Proliferationsrate, welche neben Tumorzellen auch Epithelien, Follikel und Blutzellen sind [42]. Der Vorteil der breiten Anwendung mit keiner lokalen Beschränkung des Tumors geht allerdings einher mit wesentlichen Nebeneffekten wie Alopezie, Vomitus oder Fatigue und kann in akuten Fällen sogar zu einer akuten myeloischen Leukämie führen [43, 44]. Wie im Falle der Radiotherapie kann es auch hier zu einer Chemoresistenz kommen. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des DNA-Exzisionsreparaturproteins ERCC-1 in Patienten mit Ovarialkarzinom mit einer Cis-Platin-Resistenz korreliert [45, 46].

Die Beschränkung eines chirurgischen Eingriffs auf lokale, gut erreichbare Tumore sowie die mit teils immensen Nebenwirkungen korrelierenden und zu Resistenzen ausbildenden Chemo- und Radiotherapien verstärkten das Interesse an der Findung von neuen, zielgerichteten und somit tumorspezifisch wirkenden Therapeutika.

1.3 Zielgerichtete Tumorthherapie

Im Gegensatz zu den eingangs erklärten klassischen Krebstherapien ermöglicht die zielgerichtete Tumorthherapie durch Erkennung und Bindung spezifischer Antigene oder Moleküle eine selektive antitumorale Wirkung. Die für die Tumorgenese wichtigen Bestandteile befinden sich entweder auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zelle und Bindung an diese führt durch Inhibierung von Signalkaskaden sowie zellulärer Prozesse, welche eine Zellproliferation bewirken, zum Zelltod. Dabei können zum einen *Small-Molecule Drugs* (SMD) oder monoklonale Antikörper eingesetzt werden.

Erstere sind zumeist Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Alectinib, welches in der Behandlung von Lungenkrebs eingesetzt wird und dort gezielt die ALK-Tyrosinkinase blockiert und so die Apoptose einleitet [47]. Ebenfalls zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms wird Erlotinib, ein selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGFRs, sowie Afatinib, welcher alle ErbB-Rezeptortyrosinkinasen inhibiert, eingesetzt [48, 49]. Zur Behandlung des metastasierenden Brustkarzinoms und des kolorektalen Karzinoms seien hier Lapatinib und Regorafenib genannt [50, 51]. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern jedoch gelten SMDs als weniger spezifisch [52].

Paul Ehrlich beschrieb 1908 mit seiner *lateral chain theory* erstmals immunologische Prozesse sowie die darin verwickelten Immunglobuline und unterteilte sie in ihre Untergruppen. Der enorme Erfolg dieser sogenannten Antikörper bei der Behandlung von Infektionen und Vergiftungen führte zu einem verstärkten Interesse dieser und so wurde versucht das Applikationsgebiet auf weitere Krankheiten auszudehnen [53]. So gelang Cesar Milstein und Georg Köhler in den 70er Jahren erstmals die Herstellung von monoklonalen Antikörpern murinen Ursprungs [54]. Aufgrund deren Ursprungs und damit verbundener immunologischer Abwehrmechanismen gegen diese körperfremden Proteine war der Behandlungserfolg jedoch gering und erst durch das Austauschen der Effektordomäne (Fc-Teil, **Abb. 1.1**) gegen eine menschlichen Ursprungs, resultierend in einem chimären Antikörper, öffnete die Tür für zahlreiche Applikationsarten. Weitere genetische Veränderungen ermöglichten die rekombinante Herstellung von humanisierten und vollständig humanen Antikörpern einhergehend mit einer deutlich reduzierten Immunantwort gegen diese [55]. Die drei Hauptfunktionen des Antikörpers können folgendermaßen unterteilt werden (**Abb. 1.1**). Zum einen blockieren sie durch Bindung an den Rezeptor dessen Bindungsstelle und führen so zu Inhibierung von Signalwegen, welche am Zellwachstum und der Tumorgenese involviert sind [56]. Eine weitere Funktion ist die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Über den Fc-Teil des Antikörpers können Effektorzellen des angeborenen Immunsystems wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen aktiviert werden, welche nach Bindung an den Antikörper (Aktivierung) Interferon- γ und zytotoxische Proteine (wie Perforin und Granzym) ausschütten und so die Lyse der Tumorzelle oder deren Apoptose bewirken. Die Bindung an den Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) ist dabei abhängig von dem Isotyp des Antikörpers. So binden Immunglobulin G1 (IgG1)-Antikörper vorwiegend an den von NK-Zellen präsentierten Fc γ RIIIa (*Cluster of Differentiation* CD16) und Monozyten spezifischen Fc γ RIIb (CD32), wohingegen IgG2-Antikörpern nur und weniger affin an Fc γ RIIa (CD32) binden. IgG3-Antikörper binden hoch affin an Fc γ RIa (CD64), welcher auf Makrophagen und Monozyten zu finden ist, sowie ebenfalls an Fc γ RIIa, Fc γ RIIb und Fc γ RIIIa [57-59]. Der dritte Mechanismus stellt die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) dar, welche vorwiegend durch IgG1-, IgG3- und IgM-Antikörper und nur schwach von IgG2-Antikörpern ausgelöst wird. Diese binden an die C1q-Komponente des klassischen Komplementsystems und leiten so eine Komplementkaskade ein, welche über Bildung eines

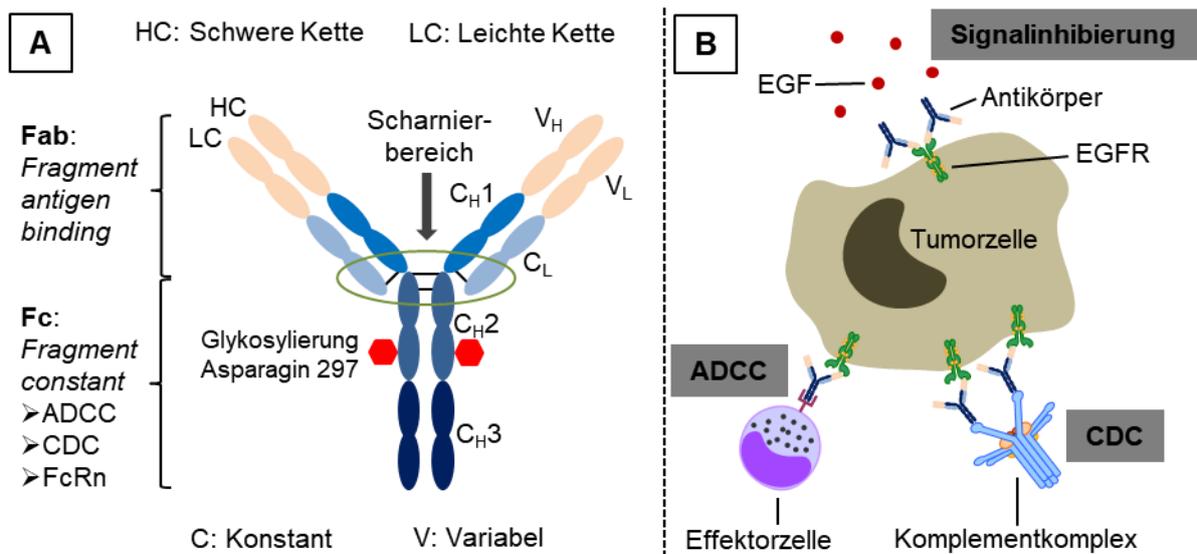


Abb. 1.1: Schematische Struktur (A) und Wirkmechanismus (B) von IgG Antikörpern. A) zeigt schematisch den strukturellen Aufbau eines IgG-Antikörpers sowie dessen funktionelle Bestandteile wie die schwere und leichte Kette HC / LC sowie das antigenbindende und kristallisierbare Fragment Fab / Fc. B) zeigt die über Antikörper-an-Rezeptorbindung vermittelten Hauptfunktionen; die Signalinhibierung, die Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ADCC sowie die komplementabhängige Zytotoxizität CDC.

Membranangriffkomplexes die Perforierung der Zellmembran bewirkt und somit zur Zelllyse führt [60]. Basierend auf der stark verringerten Immunogenität, der hohen Bindungsaffinität an das entsprechende Antigen sowie der Auslösung von gewollten Effektorfunktionen wie ADCC oder CDC wurden fortan Antikörper dazu benutzt, Krebszellen mit hyperaktivierten, überexprimierten Oberflächenrezeptoren zu adressieren. In Krebszellen soll so die Hemmung der Angiogenese sowie die Indizierung der Apoptose bewirkt und zudem antitumorale Immunreaktionen ausgelöst werden [61]. Vor allem ist hier die Anwendung nicht auf solide Tumoren beschränkt. So wurde 1997 Rituximab, ein CD20-Antikörper, als erster monoklonaler Antikörper für die Behandlung des Non-Hodgkin Lymphoms durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen [62]. Weitere Antikörper fanden ihre Anwendung für die Behandlung unterschiedlicher Krebsarten. So adressiert Trastuzumab den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (HER2), welcher vermehrt auf der Oberfläche von Tumorzellen des metastasierenden Mammakarzinoms exprimiert wird [63]. Bevacizumab hingegen ist gegen den VEGF gerichtet und unterbindet die Bindung von VEGF an dessen Rezeptor und hemmt so die Angiogenese [64]. Diese gilt als einer der wichtigsten Mechanismen des Tumors, um dessen Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen über das vaskuläre System zu gewährleisten als auch dessen Wachstum und Metastasierung zu ermöglichen [53]. Der chimäre Antikörper Cetuximab sowie der vollständig humane Antikörper Panitumumab sind gegen EGFR gerichtet und werden zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms angewandt. Diese beiden Antikörper zeichnen sich vor allem durch ihre hohe

Bindungsaffinität zu EGFR aus, welche für Panitumumab im Vergleich zu Cetuximab doppelt so hoch ist, wobei Cetuximab bereits eine achtfach höhere Affinität zu EGFR besitzt als EGF [65]. Mechanistisch betrachtet führt die Bindung von EGF an die extrazelluläre Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR zur Formierung von Homo- oder Heterodimeren, gefolgt von der intrazellulären Autophosphorylierung der Tyrosine des Rezeptor-Komplexes. Verschiedene Signalkaskaden werden infolgedessen aktiviert, unter anderem die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase. Hierbei binden die Adapterproteine Grb2 und SOS an den aktivierten Rezeptor, wobei letzteres wiederum das kleine G-Protein Ras in seine aktivierte Form Ras-GTP überführt. Dieser entscheidende Schritt führt zur sukzessiven Phosphorylierung der Kinasen Raf, Mek und Erk1,2, wobei letzteres in den Nukleus wandert und dort durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren das Zellwachstum, die Zellproliferation und -differenzierung bewirkt [14]. Die Bindung von Panitumumab und Cetuximab an EGFR verhindert die Dimerisierung und Phosphorylierung des Rezeptors und stoppt somit die Zellproliferation. Jedoch ist die Anwendung der Antikörper auf KRAS-Wildtyp Tumoren beschränkt. KRAS, ein Ras-Protein, ist wiederum in einer Vielzahl an Tumoren mutiert und infolgedessen konstant aktiviert [66]. Per se eignen sich Antikörper sehr gut zur selektiven Adressierung von Tumorzellen und zudem können sie wie eingangs erwähnt antitumorale Effekte wie ADCC und CDC auslösen [67]. Um jedoch die eben beschriebenen Resistenzen, welche auch im Fall von Trastuzumab beobachtet werden konnten [68], entgegen zu wirken, sind weiterführende Strategien für eine erfolgreiche Krebsbehandlung gefragt.

Der Aufbau von zielgerichteten Toxinen stellt eine solche dar, bei welcher hoch toxische Proteine, Zytokine oder Radionuklide spezifisch zur Tumorzelle transportiert werden [69]. Hierbei können Antikörper als die zielgerichtete Funktion agieren [70].

1.4 Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADC) als zielgerichtete Tumortherapeutika

Bis dato existieren acht durch die FDA zugelassene ADCs (**Tab. 1.1**) und über 60 befinden sich in klinischen Phasen [71, 72], wobei von einer jährlichen Wachstumsrate von 19.4 % bis 2030 ausgegangen wird [73]. Dabei erbringt die Biokonjugation von zwei Molekülen folgende Vorteile: ein verbessertes zielgerichtetes und Krankheit spezifisches Targeting; Toxizitätserniedrigung; optimierte Pharmakokinetik sowie verbesserte Effizienz, Sicherheit und Verträglichkeit [74, 75]. Der toxische Wirkstoff ist hierbei kovalent über einen spaltbaren oder nicht spaltbaren Linker an den Antikörper gebunden, wobei dies vorrangig über freie Lysine und Cysteine des Antikörpers ermöglicht wird [76].

Tab. 1.1 Von der FDA bis dato zugelassene Antikörper-Wirkstoff-Konjugate ADC.

Medikament	Ziel	Wirkstoff	Linker	Zulassung	Referenz
Trodelvy™ Sacituzumab Govitecan- hziy	Trop-2	SN-38 ²	CL2A	2020	[72]
PADCEV™ Enfortumab Vedotin-ejfv	Nectin4	MMAE ³	Valin-Citrullin	2019	[71]
POLIVY™ Polatuzumab Vedotin	CD79b	MMAE	Valin-Citrullin	2019	[71]
LUMOXITI™ Moxetumumab Pasudotox- tdfk	CD22	PE38 ⁴	Recombinant	2018	[71]
Mylotarg® Gemtuzumab Ozogamicin	CD33	N-Acetyl-γ- Calicheamicin	4-(4'-Acetylphenoxy)- butanoic acid	2000/2017	[71]
Besponsa® Inotuzumab Ozogamicin	CD22	N-Acetyl-γ- Calicheamicin	4-(4'-Acetylphenoxy)- butanoic acid	2017	[71]
Kadcycla® Ado-Trastuzumab Emtansine	HER2	DM1 ⁵	4-(N-Maleimidomethyl) cyclohexane-1- carboxylate	2013	[71]
Adcetris® Brentuximab Vedotin	CD30	MMAE	Valin-Citrullin	2011	[71]

Entscheidend für die Effizienz und Biodistribution der ADCs ist das Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnis (DAR), welches typischerweise zwischen zwei und vier liegen sollte [77, 78]. Hierbei ist vor allem wichtig, dass aufgrund der Modifikation des Antikörpers dessen Antigenbindungsspezifität nicht verloren geht.

Ein ebenso essentieller Punkt ist die Auswahl des geeigneten Linkers, welcher zum einen eine gute Plasmastabilität gewährleisten muss, um ein vorzeitiges Freisetzen des Toxins zu unterbinden, aber zum anderen ebenso in der Lage sein muss, das Toxin am Wirkort freizusetzen [79]. Die Verwendung von chemisch spaltbaren Linkern macht sich hierbei biologische Unterschiede zwischen Blutplasma und den zellulären Kompartimenten zu nutze. So wird ein Hydrazon-Linker erst im sauren Milieu, welches in den Endosomen (pH 5.0–6.5) und Lysosomen (4.5–5.0) vorherrscht, hydrolysiert, jedoch nicht bereits im Blutplasma unter physiologischen Bedingungen (pH 7.3–7.5) [80, 81]. Disulfid-Linker sind in Gegenwart von Thiolgruppen chemisch labil und mit Glutathion, dessen Konzentration im Zytoplasma um das

² Aktiver Metabolit von Irinotecan

³ Monomethyl-Auristatin E

⁴ 38 kDA Fragment von *Pseudomonas* exotoxin A

⁵ Maytansin-Derivat DM1

1 000fache erhöht ist, kann die Disulfidbindung des ADCs eine Austauschreaktion eingehen. Häufig verwendete Linker sind hier *N-Succinimidyl 4-(2'-pyridyldithio)pentanoate* und *N-Succinimidyl 4-(2'-pyridyldithio)butyrate* (SPDB) [82, 83]. Weiterhin existieren enzymatisch spaltbare Peptidbasierte Linker wie der Valin-Citrullin-Linker. Dieser wird proteolytisch durch Enzyme (wie Cathepsin oder Plasmin) gespalten, wobei diese aufgrund des ungünstigen pH-Milieus und von Serumproteaseinhibitoren nicht im extrazellulären Bereich sondern in den Lysosomen akkumulieren und so die hochspezifische intrazelluläre Abspaltung des Toxins vom Antikörper ermöglichen [84, 85]. Dabei konnte die Hydrolyse durch Cathepsin B *in vitro* bereits erfolgreich nachgewiesen werden [86]. Im Vergleich zu ihren analogen auf Hydrazon-Bindung basierten Konjugaten zeigen Peptid-Linker basierte Konjugate eine verbesserte Plasmastabilität [87]. Eine nicht spaltbare Alternative stellt der heterobifunktionelle Maleimid-Linker *N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate* (SMCC) dar, welcher eine Thioetherverbindung zwischen dem SMCC modifizierten Antikörper und Thiolen des Toxins ausbildet. Die Freilassung des Toxins erfolgt hierbei durch die proteolytische Degradierung des Antikörpers in den Lysosomen. Aufgrund der nicht spaltbaren Komponente konnte eine verbesserte *In-vivo*-Stabilität im Vergleich zum Disulfid-Analogon beobachtet werden [82]. Ein erstmals durch die FDA 2000 zugelassenes ADC der ersten Generation, Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®), besteht aus einem IgG4-Antikörper, welcher gegen den CD33-Rezeptor der akuten myeloischen Leukämie gerichtet ist, und ein über einen spaltbaren Hydrazon-Linker gebundenes Calicheamicin, welches den Doppelstrangbruch der DNA bewirkt. Die Kopplungsmethode über Lysine führte hier jedoch zu einer hohen ADC-Heterogenität mit einem DAR von 1–8 sowie fast 50 % ungebundenem Antikörper [88, 89]. Hier wurde besonders deutlich, dass die Wahl des passenden Linkers keinesfalls trivial ist und weitreichende negative Folgen mit sich ziehen kann. So musste Mylotarg® 2010 aufgrund schwerwiegender toxischer Nebeneffekte, welche auf die Plasmastabilität des Linkers einhergehend mit einer unspezifischen Toxizität zurückzuführen war, vom Markt genommen werden, gleichwohl es 2017 mit veränderter Dosis wieder Anwendung fand [90, 91]. Reagierend auf diese Vorkommnisse wurden ADCs der zweiten Generation entwickelt, zu welchen Trastuzumab-Emtansin (Kadcycla®), Brentuximab Vedotin (Adcetris®) und Inotuzumab Ozogamicin (Besponsa®) gehören [71]. Neben der häufigen Verwendung von IgG1-Antikörpern wurden hier um 100–1 000fach potentere Toxinkomponenten eingesetzt. Zu diesen gehören Maytansinoide wie Emtansin [92] und Auristatine wie Monomethylauristatin E und F (MMAE / MMAF), welche den Zelltod durch Depolymerisierung der Microtubuli erzeugen [93], sowie das DNA interkalierende

Doxorubicin oder aber Topoisomerase-Inhibitoren wie SN38 (aktiver Metabolit von Irinotecan) [94]. Das favorisierte DAR war hier 4:1. Auch hier wurden die ADCs über Antikörper-Lysine oder -Cysteine erzeugt, welches wie bereits erwähnt zu einer nicht oder nur wenig kontrollierbaren Heterogenität führt. Dem wurde durch Generierung der dritten Generation an ADCs entgegen gewirkt, indem diese über ortsspezifische Konjugation erzeugt wurden, resultierend in einem besser zu kontrollierendem DAR und einer verbesserten *In-vivo*-Stabilität und -Sicherheit [95, 96]. Als Beispiele seien hier MEDI4276, ein über einen nicht spaltbaren Linker mit Tubulysin modifizierter biparatropischer Antikörper [97], sowie Vadastuximab Talirin, ein IgG-Antikörper verbunden über einen Peptid-Linker an das Pyrrolobenzodiazepin-Dimer [98], genannt. Interessanterweise fungieren in zwei Drittel der bisher in Untersuchung befindenden ADCs als toxische Komponente Maytansinoide oder Auristatine [99]. Einer der wenigen zugelassenen ADCs Moxetumumab Pasudotox-tdfk (LUMOXITI™) trägt ein bakterielles Protein, PE38, und somit wesentlich größeres Toxin. Dies verdeutlicht wie schwer die richtige Wahl der toxischen Komponente ist [99].

Mechanistisch betrachtet wird nach Bindung an den Rezeptor der Antikörper-Rezeptor-Komplex über Clathrin vermittelte Endozytose von der Zelle in Vesikel aufgenommen (**Abb. 1.2**) [100]. Dieser Prozess erfolgt mithilfe der Proteine AP2 sowie Clathrin, welche intrazellulär die Vesikel beschichten. Nach Internalisierung und Abschnürung der Vesikel durch Dynamin erfolgt die endosomale Reifung vom frühen zum späten Endosom, was mit einer pH-Erniedrigung von 6.8 auf 5.9 einhergeht. Dies ermöglicht die Ablösung des Antikörpers vom Rezeptor, welcher wieder zur Oberfläche zurück transportiert wird. Im Anschluss fusionieren die das ADC beinhaltenden späten Endosomen mit Lysosomen (pH 4.0—5.0) und werden dort proteolytisch abgebaut als auch die toxische Komponente vom Antikörper abgetrennt [70, 101]. Alternativ kann der Antikörper oder auch das ADC über den neonatalen FcRn-Rezeptor wieder zur Zelloberfläche recycelt werden.

Die lysosomale Degradierung ist jedoch auch ein besonders kritischer Schritt für die Wirksamkeit der ADCs, da hier die toxische Funktionalität in das Zytosol eintreten muss, um dort ihre Wirkung entfalten zu können, andernfalls verliert sie beim Verbleib im Lysosom ihre eigentliche Funktion als Toxin [100, 102].

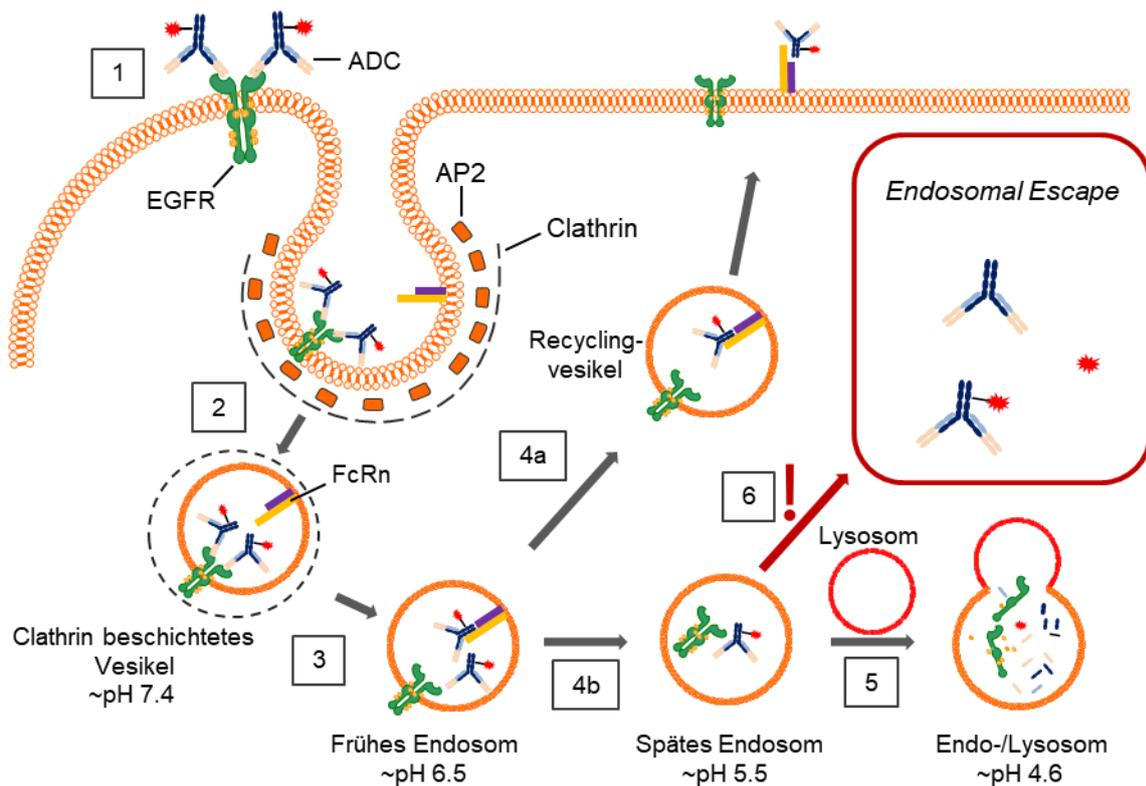


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Rezeptor vermittelten Endozytose des ADCs. 1) Nach Bindung an den Oberflächenrezeptor kommt es zur Clathrin vermittelten Internalisierung des Antikörper-Rezeptor-Komplexes [100] und 2) Abschnürung zu einem Clathrin beschichteten Vesikel. 3) Nach Entfernung des Clathrins kommt es im Zuge der endosomalen Reifung zu einem frühen Endosom zu einer pH-Erniedrigung auf ~ 6.5 , welches die Dissoziation des ADCs vom Rezeptor ermöglicht. Aufgrund der pH-Erniedrigung bindet das ADC entweder an FcRn und wird so 4a) zur Zelloberfläche recycelt oder 4b) verbleibt im Endosom [100, 102], welches zu einem späten Endosom übergeht, in welchem der pH-Wert wiederum auf ~ 5.5 herabgesetzt ist. 5) Nach Fusionierung mit einem Lysosom kommt es zur endo-/lysosomalen Degradierung der Proteine im sauren Milieu von ~ 4.6 [70, 101]. Dieser Schritt ist besonders kritisch und wirksamkeitslimitierend für das ADC und vor allem das Toxin, sofern es nicht in intakter Form 6) in das Zytosol gelangen kann.

1.5 Ribosomen inaktivierendes Protein Dianthin

Ein erstmals großes Interesse an Ribosomen inaktivierenden Proteinen (RIP) entstand in den 1970er Jahren, als Untersuchungen der pflanzlichen Toxine Abrin aus *Abrus precatorius* L. und Rizin aus *Ricinus communis* L. an neoplastischen Zellen einen zytotoxischen Effekt zeigten, wohingegen normale Zellen im Vergleich wenig beeinflusst wurden [103-105]. Man fand heraus, dass beide Toxine heterodimere Strukturen besaßen bestehend aus je einer Peptidkette A und B, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Erstere vermittelt die enzymatische Aktivität und letztere ermöglicht als Galaktose bindendes Lektin die Zellbindung [106, 107]. Das toxische Potential der hier beschriebenen Typ II RIPs, da zwei Domänen, basiert auf ihrer N-Glykosidaseaktivität welche die Abspaltung des Adenins in Position 4324 (bezogen auf Ratte) der 28S ribosomalen RNA Untereinheit bewirkt. Infolgedessen kommt es zu einer Unterbrechung der Proteinbiosynthese resultierend im Zelltod [108, 109]. Stirpe *et al.* fanden heraus, dass die pflanzlichen Toxine Croton aus *Croton tiglium* und Curcin aus *Jatropha*

curcas ebenfalls eine solche enzymatische Aktivität besaßen, allerdings nicht im Besitz der zellbindenden Domäne waren [110] und folglich als RIPs des Typs I bezeichnet wurden. Ferner fand man heraus, dass deren *N*-Glykosidaseaktivität nicht nur auf die Deadenylierung der 28S rRNA beschränkt war, sondern auch in DNA, poly(A), mRNA, tRNA sowie der bakteriellen rRNA und viralen RNA stattfand [111]. Nach Identifizierung des *Antiviral Pokeweed Protein* aus *Phytolacca americana* als RIP Typ II durch Irvin *et al.* [112] war man bestrebt, weitere pflanzliche Proteintoxine mit analoger Wirkung zu finden. Als solche wurden unter anderem Gelonin (*Gelonium multiflorum* A.Juss), Bouganin (*Bougainvillea spectabilis* Willd.), Saporin-S6 (*Saponaria officinalis* L.) und Dianthin-30 (*Dianthus caryophyllus* L., fortan Dianthin genannt) identifiziert. Aufgrund des Fehlens einer zellbindenden Domäne, welche zu einer unspezifischen zellulären Toxizität führt, aber hervorragender toxischer Eigenschaften, wurde damit begonnen, diese Proteine mit zielgerichteten Funktionalitäten wie Antikörpern zu kombinieren. So konnten selektiv und spezifisch wirkende Immunotoxine (IT) generiert werden [113-118], wobei ein Augenmerk besonders auf Saporin basierenden ITs lag [119, 120], vermutlich aufgrund seiner molekularen Struktur assoziierten thermodynamischen Stabilität [121, 122]. Da Dianthin eine hohe Homologie zu Saporin-S6 besitzt, zeichnet es sich ebenfalls durch eine hohe Stabilität aus [123]. Jedoch kann es in weitaus höheren Mengen in einem einfachen Expressionssystem exprimiert werden und Untersuchungen bezüglich der Immunogenität beider Proteine zeigte eine geringere Immunogenität für Dianthin [124, 125]. Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde der Entschluss gefasst, Dianthin für den Aufbau eines Immunotoxins zu verwenden. Das aus den Blättern von *Dianthus caryophyllus* L. extrahierte basische Glykoprotein Dianthin besitzt einen isoelektrischen Punkt (pI) von 8.65, an welchem es sich nach außen hin elektrisch neutral verhält [126]. Die Struktur von Dianthin setzt sich aus zwei Domänen zusammen, wobei die N-terminale Domäne vorwiegend eine β -Faltblattstruktur und die C-terminale Domäne eine α -Helixstruktur aufweist (**Abb. 1.3**) [127]. Das katalytische Zentrum bestehend aus den Aminosäuren Tyr-73, Tyr-121, Glu-177 und Arg-180 befindet sich in der Spalte zwischen den beiden Domänen und weist ein negatives sowie positives Potential auf, im Gegensatz zu Saporin in welchem das katalytische Zentrum ausschließlich ein negatives Potential aufweist [127]. Die Struktur deckt sich gut mit denen von anderen RIPs, bis auf eine Verkürzung der β -Faltblätter β 7, β 8 und β 9 in der C-terminalen Region in Nähe zum katalytischen Zentrum. Hier wird angenommen, dass so eine verbesserte Substratzugänglichkeit ermöglicht wird resultierend in einer erhöhten enzymatischen Aktivität im Vergleich zu den RIPs *Antiviral Pokeweed Protein*, Momordin und Rizin (A-Kette) [127].

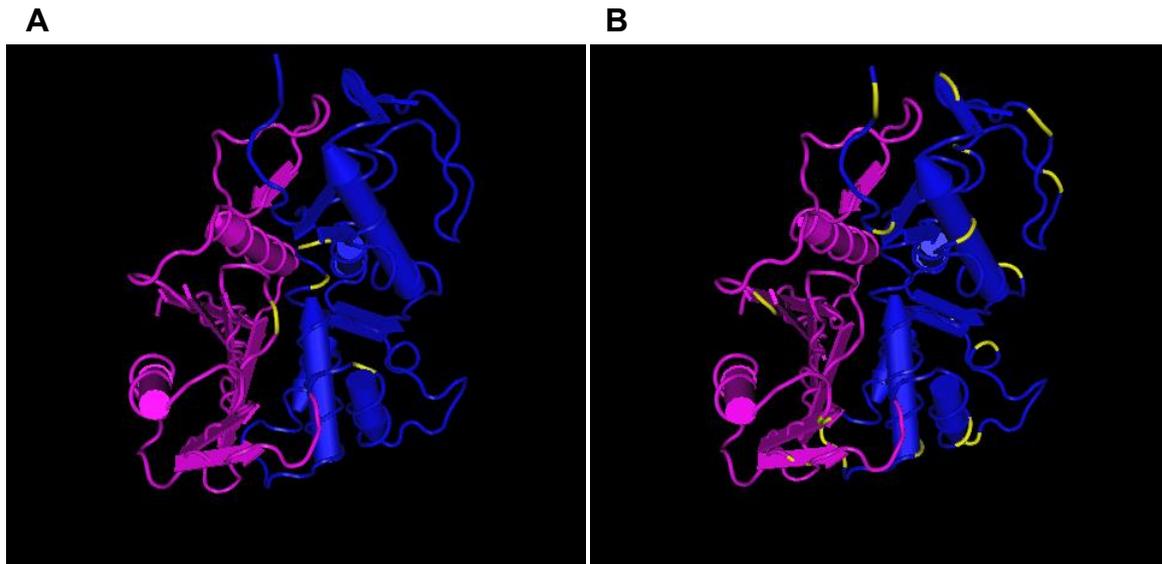


Abb. 1.3 Sekundärstruktur von Dianthin-30 (PDB 1RL0). Dargestellt ist die N-terminale (violett) sowie C-terminale Domäne (blau) von Dianthin, wobei die Aminosäuren des A) katalytischen Zentrums (Tyr-73, Tyr-121, Glu-177 und Arg-180) sowie B) Lysine gelb markiert sind. Die Proteinstruktur wurde über die Software Cn3D 4.3 erstellt.

Mit seinen 19 Lysin, über welche sehr einfach Modifikationen ermöglicht werden können, eignet es sich zudem hervorragend für den Aufbau von Biokonjugaten und hier im speziellen Immunotoxinen / ADCs.

1.6 Endosomal Escape

Neben der selektiven Aufnahme zielgerichteter Proteintoxine ist deren Erfolg maßgeblich abhängig von deren Fähigkeit, an den eigentlichen Wirkort, welcher im Fall von RIPs das Zytosol ist, zu gelangen. So erfolgt die Zellaufnahme der RIPs des Typs I als auch deren Immunotoxine über Clathrin vermittelte Endozytose (**1.4, Abb. 1.2**) [128, 129] und im Gegensatz zu bakteriellen Toxinen wie dem *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A sowie RIPs des Typs II können diese aufgrund der fehlenden Peptidkette B nicht über die Endoplasmatisch Retikulum assoziierte Degeneration (ERAD) in das Zytosol gelangen. Dabei gilt dieser streng effektivitätslimitierende Faktor nicht nur zielgerichteten Tumortherapeutika [130], sondern auch für auf nanomedizinisch und genterapeutisch basierenden Konzepten [131, 132]. Obwohl Dianthin als auch Saporin nachweislich in das Zytosol gelangen können, um dort aktiv zu wirken, ist dieser noch unbekannt Prozess streng dosisabhängig und somit insuffizient und über dies hinaus einhergehend mit schweren Nebeneffekten [133]. Spezielle Bakterien als auch Viren verfügen hierbei über Mechanismen, um der lysosomalen Degradierung zu entkommen. So benutzt das Humane Immundefizienz-Virus 1 eine an kationischen Aminosäuren reiche Peptidsequenz (TAT Protein) zur Durchdringung von Plasmamembranen [134, 135]. Diese

sogenannten zellpenetrierenden Peptide (CPP) oder Proteintransduktionsdomänen (PTD) können an Proteine oder Biomoleküle fusioniert werden. So erzeugte Lorenzetti *et al.* Transferrin-CPP-Dianthin-Konjugate, welche eine verbesserte Zytotoxizität im Vergleich zu deren Analogon ohne CPP zeigte, gleichwohl diese nur gering ausfiel. Das von Shin *et al.* fusionierte Gelonin-TAT-Protein führte ebenfalls zu einer verbesserten Zytotoxizität vergleichend zu Gelonin, jedoch war dieser Effekt nicht zellspezifisch [136]. Weitere Möglichkeiten wurden gesucht, um die Integrität von Endosomen und Lysosomen zu beeinflussen. Eine proteinunabhängige Technik stellt die Photochemische Internalisierung dar. Hierbei werden photosensitive, nicht toxische, Substanzen nach Zellaufnahme mit Licht angeregt und die so ROS führen zur Ruptur der endosomalen Membran [137]. So konnte die Zytotoxizität des ITs Cetuximab-Saporin *in vitro* positiv beeinflusst werden [138] und führte im Falle eines zielgerichteten Fusionsproteins mit Gelonin in 33 % zu einer vollständigen Tumorregression in tumortragenden Mäusen [139]. Ebenso stellt die Verwendung von chemischen Substanzen wie Polyethylenimin und Chloroquine eine zellintegritätsschädigende Möglichkeit dar, wobei vor allem der Einsatz von Polyethylenimin aufgrund seiner Eigentoxizität als problematisch gilt [140, 141].

Eine weitere Gruppe hoch wirksamer *Endosomal Escape Enhancer* (EEE) stellen sogenannte sekundäre Pflanzenstoffe, die Saponine, dar [142], hier im Speziellen Oleanane / Sapogenine mit einem glykosylierten Triterpen-Aglycon, welches sich biogenetisch vom Squalen ableitet [143, 144]. Dabei sind die Zuckerseitenketten am C-3- und C-28-Kohlenstoffatom des Grundgerüsts sowie eine Aldehydgruppe am C-4-Kohlenstoffatom maßgeblich für dessen Verstärkerfunktion verantwortlich [145]. Aufgrund des unpolaren triterpenoiden Grundgerüsts sowie der polaren Zuckerketten besitzt es einen amphiphilen Charakter und befähigt es zur Interaktion mit hydrophilen als auch lipophilen Verbindungen sowie Zellmembranen [146]. Wie der Name von Saponin (*sapo* = lateinisch für Seife) bereits impliziert, können sie in wässrigen Lösungen stabile Schäume bilden und darüber hinaus als membranpermeabilisierendes Agens hämolytische Aktivität zeigen [147]. Das unterstützt die These von Saponin, welches vermehrt in den Wurzeln und Blättern vorhanden ist, als sekundärer Pflanzenstoff im Schutz vor natürlichen Fraßfeinden [148]. Ferner finden sie aufgrund ihrer antiviralen, antiallergischen und entzündungshemmenden Wirkungen Anwendung in der Phytotherapie [149, 150]. Für diese Arbeit von besonderem Interesse war, dass spezielle triterpenoide Saponine aus *Saponaria officinalis* L. den zytotoxischen Effekt von RIPs des Typs I enorm verstärken und dass diese Effektverstärkung außerdem abhängig von der Proteinsequenz des RIPs ist [151, 152]. Ebenso spielt die Ladung des Saponins eine

entscheidende Rolle und Thakur *et al.* kamen zu dem Schluss, dass Saponine aus eben genannter Pflanze mit einer relativen elektrophoretischen Mobilität von 0.59 eben solche effektverstärkende Eigenschaften besaßen [153]. Weiterhin fanden Bachran *et al.* heraus, dass die Fähigkeit des Saponins den *Endosomal Escape* (EE) des Toxins zu ermöglichen in Abhängigkeit des pH-Wertes geschah und erst unter sauren Bedingungen, wie im späten Endosom und Lysosom vorherrschend, ermöglicht wurde [154]. Bis dato ist der genaue Wirkmechanismus jedoch nicht geklärt. Saponinum Album, ein Saponingemisch aus *Gypsophila paniculata* L., konnte die Zytotoxizität von Saporin an MCF-7 Zellen um das 385 000fache verstärken [151]. Dabei war der Effekt nicht nur auf das Toxin beschränkt, sondern funktionierte auch auf dessen chimäres Analogon Saporin-EGF sowie das IT Saporin-Rituximab, wobei hier reines Saponin SA1641 (aus *Gypsophila spec.*) beziehungsweise SO1861 (aus *Saponaria officinalis* L.) eine Toxizitätssteigerung um das >4 000 000 und 700fache erzielte [152, 155]. Das sehr reine und potente SO1861 bewies auch in Kombination mit Dianthin-EGF, -Cetuximab, -Panitumumab und -Trastuzumab eine hervorragende Verstärkerfunktion und wurde daher auserkoren, um in dieser Arbeit als EEE zu fungieren.

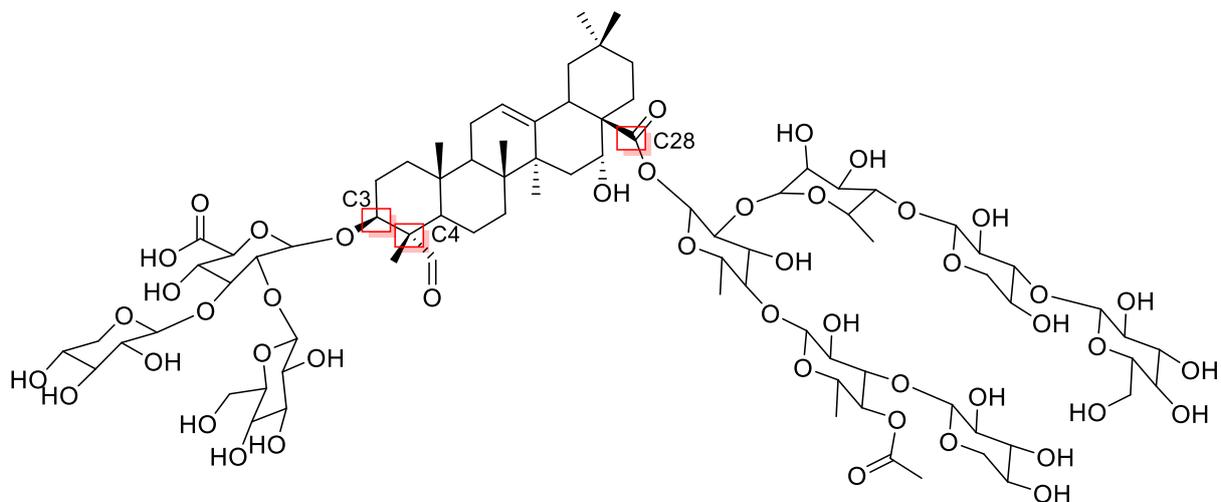


Abb. 1.4 Struktur von Saponin SO1861. Schematische Darstellung des glykosylierten Triterpenoids SO1861 [156] aus *Saponaria officinalis* L. mit den für die Verstärkerfunktion maßgeblichen Zuckerketten an C3 und C28 sowie der Aldehydgruppe an C4.

1.7 Zielsetzung

Als eine der maßgeblichsten zum frühzeitigen Tod führenden Krankheiten bedarf es an einer ständigen Verbesserung von konventionellen Krebstherapien [2]. So gelten die Chemo- und Radiotherapie als auch der chirurgische Eingriff weiterhin als die Primärtherapien, jedoch gehen erst genannte mit nicht unerheblichen Nebenwirkungen basierend auf ihrem zellunspezifischen Agieren einher [37, 45]. Antikörper und Antikörper-basierte Tumortherapien wie ADCs zeigen eine hohe Zellspezifität sowie Antigenbindungsaffinität und somit auch geringere Nebenwirkungen. Jedoch wird der therapeutische Nutzen durch Faktoren, wie die lysosomale Degradierung nach der Zellaufnahme des Antikörpers oder ADCs über Rezeptor-vermittelte Endozytose, beeinträchtigt [70, 96]. Aktuell werden zu zwei Dritteln Auristatine oder Maytansinoide als toxische Funktion für den Aufbau eines ADCs benutzt [99] und verdeutlicht ebenso die Schwierigkeit der Wahl eines geeigneten Toxins. [68, 99, 157] Dianthin als RIP des Typs I (**1.5**) zeichnet sich durch seine hervorragende Toxizität aus, welche in Kombination mit dem glykosylierten Triterpenoid SO1861 bemerkenswert gesteigert werden kann. Ziel dieser Arbeit war es deswegen, ein ADC / IT bestehend aus dem gegen EGFR gerichteten IgG2-Antikörper Panitumumab und Dianthin herzustellen, wobei die Konjugation über einen spaltbaren SPDP-Linker erfolgen sollte. Dabei sollte die Kombination mit der endosomalen / lysosomalen Befreiungskomponente Saponin SO1861 eingehend *in vitro* und *in vivo* vergleichend zu den Einzelkomponenten untersucht werden.

Für die experimentelle Durchführung erfolgte eine Unterteilung in drei Hauptgebiete:

- Die Expression sowie Aufreinigung von Dianthin und Herstellung des Dianthin-Panitumumab-Konjugates (DPan). Eine intensive Charakterisierung von DPan mit Ermittlung der enzymatischen Aktivität über einen *Adenine Release Assay* sowie die Bestimmung der molekularen Masse und des DARs über MALDI-TOF-MS. Untersuchung des Bindungsverhalten von DPan an den Zielrezeptor EGFR.
- Beurteilung der *In-vitro*-Zytotoxizität an EGFR überexprimierenden Zielzellen sowie Nichtzielzellen in Kombination mit SO1861 über zeitaufgelöste Mikroskopie (IncuCyte® S3) sowie die Endpunkt-Messung *via* MTT-Assay.
- Ermittlung der akuten Toxizität an nichttumortragenden BALB/c-Mäusen sowie der antitumoralen Wirkung an tumortragenden NMRI nu/nu-Mäusen. Bestimmung der Biodistribution von DPan über Radionuklid-Markierung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

- Anti-EGFR IgG (Abcam, Cambridge, UK)
- Anti-His IgG HRP (Clontech / Takara, Kusatsu, Japan)
- Anti-human IgG HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)
- Anti-Ki67 IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Panitumumab (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA)

2.1.2 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
- *E. coli* NiCo21(DE3) (New England BioLABS, Frankfurt, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

- Acrylamid 4K Lösung (30 %) Mix 37.5:1 Acrylamid / Bisacrylamid (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Adenin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Agarose NEEO Ultra (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ammoniumpersulfat (APS) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Brij 58 (Euroclone, Pero, Italien)
- Citrat-Dextrose-Lösung (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA)
- p-Coumarsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- L-Cystein (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Coomassie-Brilliantblau R-250 (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- 2,5-Dihydroxybenzoesäure : 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure (super-DHB) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Dithiothreitol (DTT) (Boeringer Mannheim, Deutschland)
- Ethanol, 99.8 %, denaturiert (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 2,2'-(1,2-Ethandiyldiimino)diessigsäure (EDDA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid / N-Hydroxysuccinimid (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland)
- Ficoll-Paque™ Premium (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
- Formalin, 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N-Ethylmaleimid (NEM) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Glycin (Calbiochem, San Diego, CA, USA)
- Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Humanes rhEGFR-Fc Chimera Protein (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
- Imidazol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Isofluran CP (CP Pharma, Burgdorf, Deutschland)
- Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Ketanest S (Esketamin-Hydrochlorid) (Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland)
- Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Luminol (Fluka Analytical / Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Magermilchpulver (Sucofin, Zeven, Deutschland)
- β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Natriumhydroxid (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Nickelsulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) (Pierce / Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Pepton (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Ponceau S (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Rompun 2 % (Xylazin) (Bayer Health Care,)

- Saponin SO1861 aus *Saponaria officinalis* L. (AnalytiCon Discovery, Potsdam, Deutschland)
- 2-Sulfobenzaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Tricin (Acros Organics, Geel, Belgien)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (Santa Cruz, Dallas, TX, USA)
- Trypan Blue (Invitrogen / Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
- Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): 0,25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tween 20 (PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Zinnchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Alle Puffer wurden, wenn nicht anders angegeben, mit ELIX Wasser (Qualität: Reinwasser Typ 2; Wasser spezifischer Widerstand bei 25 °C: 10—15 MΩ×cm) hergestellt. Für molekularbiologische Methoden wurde autoklaviertes Milli-Q Wasser (Qualität: Reinwasser Typ 1; Wasser spezifischer Widerstand bei 25 °C: 18.2 MΩ×cm) verwendet.

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien und zugehöriges Medium

- MDA-MB-453: Brustkarzinom (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland)
- HCT-116: Kolorektale Kolonkarzinomzellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Deutschland)
- Bovines Serumalbumin (BSA) (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- DMEM-Medium Dulbecco's modified Eagle's Medium high Glucose (4.5 g/L) mit L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) ohne / mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (PAA Laboratories, Pasching, Österreich)
- McCoy's 5A mit L-Glutamin, mit Phenolred (EuroClone, Pero, Italien)
- Penicillin / Streptomycin (PS) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.5 Geräte

Gelelektrophorese und Westernblot

- Agarose-Gelkammer Mini-Sub Cell GT System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- BioRad Mini-Protean® 3Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

- Elektrophorese-Kammer Dual Vertical Mini-Gel Unit MGV-202-U (CBS Scientific Company, San Diego, CA, USA)
- MGV-202-U: Dual Vertical Mini-Gel Unit (C.B.S Scientific, Del Mar, CA, USA)
- Optimax X-Ray Filmentwickler (Protec Medizintechnik, Oberstenfeld, Germany)
- Safe Imager 2.0 Blue Light Transilluminator (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Spannungsquelle: E802 power supply (Consort, Turnhout, Belgien)
- Siemens 13 × 18 cm Filmkassette (Siemens, München, Deutschland)
- UV Transilluminator 312 / 254 nm (Intas, Göttingen, Deutschland)

Photometer

- Küvettenphotometer Pharmacia Biotech Ultrospec®3000 (Biochrom Ltd., Cambridge, England)
- Mikroplatten-Photometer SpectraMax 340 PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)
- UV / VIS Spektrophotometer NanoDrop™ ND-1000 (PEQLAB Biotechnology, Erlangen, Deutschland)

Zellkultur

- CellDyn 3700 Hämatologie-Analysegerät (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA)
- CO₂-Inkubator Modell 311 (Thermo Forma / Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Gefriergerät Nicool LM10 (Air Liquide, Berlin, Deutschland)
- IncuCyte® S3 (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)
- Lichtmikroskop Olympus CK30-F200 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan)
- Schüttelwasserbad 1086 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
- Sterile Werkbank HERAsafe Safety Cabinet (Heraeus / Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Zellzähler Luna™ fl. Dual Fluorescence Cell Counter (Logos Biosystems, Annandale, VA, USA)

Zentrifugen

- Hochgeschwindigkeitszentrifuge-Sorvall Evolution RC Superspeed (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- MTS 4 Mikrotiterschüttler (IKA, Staufen, Deutschland)
- Rotor SS-34 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Rotor SLA-3000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

- Tischzentrifuge 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Tischzentrifuge 5417 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R (Heraeus / Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Zellzentrifuge Varifuge 3.0 (Heraeus / Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Sonstige Geräte

- Aktivimeter Isomed 2010 (MED, Dresden, Deutschland)
- Biometra Trio Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Branson Sonifier 250 (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
- Hin- und Her-Schüttler 3016 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
- Inhalationsnarkosegerät Isoflorane Vapor 19.3 (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland)
- Inkubator Certomat 95-1 (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Inkubationsschüttler C25KC (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
- Inkubationsschüttler Unitron (Infors HT, Bottmingen, Schweiz)
- MALDI-TOF-MS Instrument (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland)
Laser: 200 Hz solid-state Smart beam
- NanoSPECT/CTplus (Bioscan / Mediso, Münster, Deutschland)
- Thermoblock QBT (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- ThermoMixer® C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Überkopfschüttler Reax 2 (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland)
- Ultraschallbad Transsonic T420 (Elma Schmidhauer GmbH, Singen, Deutschland)
- Wippschüttler Rocky (Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland)

2.1.6 Kits

- BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific / Pierce, Waltham, MA, USA)
- Classical Monocyte Isolation Kit (human), (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel, Hilden, Deutschland)
- PCR Mycoplasma Test Kit I / C (PromoKine, Heidelberg, Deutschland)

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

- BD Plastipak Einmal-Spritze 1 mL, Luer-Lock (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Chirurgische Schere (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland)

- Chitin Resin (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA)
- DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Dialyseschläuche mit verschiedenen Ausschlussgrenzen (ZelluTrans, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Econo-Pac® Chromatographie-Säulen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Einbettkassetten (R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland)
- Einmachcellophan (Folia® Bringmann, Wendelstein, Deutschland)
- Gewebezange (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland)
- Whatman® Filterpapier (Whatman / GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom)
- IncuCyte CytotoxRed Reagent (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)
- Matrigel (Corning™, Corning, NY, USA)
- Mausinjektionskäfig / Maus Restrainer (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Mikrokonzentriersäulen Amicon mit unterschiedlichen Ausschlussgrenzen (Millipore, Neu-Isenburg, Deutschland)
- Narrow Pattern Forcep (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland)
- Nitrocellulosemembran Protran® (Amersham™ Biosciences, Freiburg, Deutschland)
- Nunc-Immuno™ Module (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- PageRuler™ Prestained #26619 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- PD-10-Säulen (Sephadex G-25) (GE Healthcare, Düren, Deutschland)
- Teqler Adson Pinzette (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 0.5 / 1.5 / 2 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Petrischale 94 / 16 mm (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich)
- Pierce™ Protein A-Agarose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Pipettenspitzen 10 / 100 / 1 000 µL (VWR, Radnor, PA, USA)
- Poly-Prep® Chromatographie-Säulen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Protino Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel, Hilden, Deutschland)
- Röntgenfilme CL-Xposure™ 18 × 24 cm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- Sensorchip CM5 (GE Healthcare, Düren, Deutschland)
- Sterican® Einmalkanülen 24 / 30 G (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Target Plate MTP 384 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland)
- UltraPure Heringssperma-DNA (10 mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- Unstained Protein Molecular Weight Marker #26610 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)
- Zentrifugenröhrchen Falcon™ (15 / 50 mL) (Corning™, Corning, NY, USA)
- 96-Well Zellkulturplatte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Standard-Zellkulturschalen (Falcon / Corning™, Corning, NY, USA)
- Zellzählkammer (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

2.1.8 Versuchstiere

- BALB/cAnNRj, weiblich (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)
- Rj:NMRI-Foxn1 nu/nu, weiblich (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)

2.1.9 Computer Software

- ChemDraw Professional 16.0 / 19.0 (CambridgeSoft / PerkinElmer, Waltham, MA, USA)
- Cn3D 4.3 (NCBI, Bethesda, MD, USA)
- GraphPad Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, USA)
- IncuCyte® S3 Software (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)
- NanoDrop 1 000 Operating Software (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA)
- π.pmod 2.7 (PMOD Technologies LLC, Zürich, Schweiz)
- SoftMax Pro (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation

LB-Medium:	10 g/L Pepton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, pH 7.0; autoklaviert
LB-Agarplatten:	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar; autoklaviert
LB _{Amp} -Medium/LB _{Amp} -Agarplatten:	50 µg/mL Ampicillin; steril filtriert (0.22 µm)

Eine Zellsuspension (25–50 µL) von chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien (Expression: NiCo21(DE3); Midipräparation: DH5α) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 µL (0.1–0.7 µg/mL) Plasmid-DNA (pET11d-6×*His*Dianthin) für 30 Minuten (min) inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 Sekunden (s)) und weiteren 2 min auf Eis erfolgte die Zugabe von 300 µL LB-Medium, gefolgt von einer einstündigen Inkubation (37 °C, 225 rpm, Certomat BS-1). Anschließend wurden 25 µL der transformierten Zellsuspension auf 37 °C vorgewärmte LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht (16 Stunden (h), 37 °C, invertiert) inkubiert. Für die Minipräparation sowie Expression von Dianthin wurden Einzelkolonien gepickt und die Platten bei 4 °C für maximal einen Monat über Kopf gelagert.

2.2.2 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Sequenzierungsprimer SeqAT1f: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3'
Sequenzierungsprimer SeqAT1r: 5'-ATC ATG ACA TTA ACC TAT AAA-3'

In einer Vorkultur wurden 3 mL LB_{Amp}-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert (8 h, 37 °C, 200 rpm), 1:1 000 in 100 mL LB_{Amp}-Medium überführt und über Nacht inkubiert (16 h, 37 °C, 200 rpm). Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Kulturmedium wurde das *NucleoBond Xtra Midi Kit* verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren. Hierbei wird unter alkalischer Lyse DNA freigesetzt und diese *via* Anionenaustauschchromatographie isoliert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die DNA in Milli-Q Wasser (autoklaviert) resuspendiert und die Konzentration mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop[®]ND 1000, λ = 260 nm) bestimmt.

Für die Sequenzierung wurden je 50–100 ng DNA mit 5 µM Vorwärts- (SeqAT1f) bzw. Rückwärts-Primer (SeqAT1r) vorgelegt und mit Milli-Q Wasser auf ein finales Volumen von 10 µL gebracht. Die Sequenzierung erfolgte von Eurofins Genomics nach Sanger.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Expression und Extraktion von Dianthin

Für die Expression von Dianthin wurde der Bakterienstamm *E. coli* NiCo21(DE3) verwendet. Dieser ermöglicht neben der Aufreinigung *via* Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) die Entfernung co-eluierter, bekannter bakterieller Proteine indem in diesen eine Chitin bindende Domäne integriert wird, über welche eine zusätzliche affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgen kann.

LB_{Amp}-Medium (3 mL) wurde mit einer Einzelkolonie inokuliert und bis zu einer deutlichen Trübung inkubiert (ca. 6 h, 37 °C, 200 rpm). Für die Übernachtskultur wurden 50 µL der Vorkultur in 500 mL LB_{Amp}-Medium überführt, über Nacht inkubiert (16 h, 37 °C, 180 rpm) und mit LB_{Amp}-Medium auf 2 L aufgefüllt. Bei einer OD₆₀₀ = 0.9 (Ultrospec 3000 UV/VIS Spectrophotometer) wurde die Expression mit 1 M IPTG gestartet und für 3 h (37 °C, 180 rpm, C25KC Incubator Shaker) fortgeführt. Die Bakterien wurden sodann mittels Zentrifugation (Sorvall Evolution RC Superspeed) geerntet, das resultierende Pellet in 20 mL DPBS resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Extraktion von Dianthin wurden die Zellen zunächst durch Ultraschall am Sonikator (Sonifier 250) lysiert. Hierfür wurde die Bakterienlösung aufgetaut und auf Eis, sowie mit Parafilm abgedichtet, in den Sonikator eingespannt. Die Zellen wurden in 8–10 Zyklen von 30 Ultraschockeinheiten lysiert und Zelltrümmer sowie nicht lysierte Zellen durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 30 000 × g, Sorvall Evolution RC Superspeed) aus dem Zellysate entfernt. Die Aufreinigung der Proteinlösung (Zellüberstand) erfolgte *via* IMAC gefolgt von einer Chitin-Affinitätschromatographie.

2.3.2 IMAC

Waschpuffer W:	50 mM NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, 300 mM NaCl,
E31 / 62 / 125 / 250 / 500:	31.25 / 62.5 / 125 / 250 / 500 mM Imidazol, pH 8.0
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):	150 mM NaCl, 8.33 mM Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O, 1.67 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4

Diese Methode basiert auf der Interaktion der über Nitriloessigsäure (NTA) an Sepharose angereicherten Ni²⁺-Ionen mit der Histidinenreichen (His) Sequenz eines Proteins. Somit wird ermöglicht, His-Tag markierte Proteine von nicht markierten Proteinen (bakterielle Proteine,

Kopplungsproteine) zu separieren und diese über einen Imidazolgradienten (konkurrierend zu His) zu eluieren.

Hierfür wurden 6 mL (3 mL Bettvolumen (BV)) der Ni-NTA Sepharose in einer Schwerkraftsäule (25 mL) vorgelegt, mit 2×10 mL Milli-Q gewaschen sowie mit 1 mL 100 mM NiSO₄-Lösung neu beladen. Nach 5 min Inkubation wurde die Sepharose gewaschen (2×10 mL Milli-Q) sowie mit Waschpuffer equilibriert (3×10 mL). Anschließend wurde die Proteinlösung, in welcher zuvor die Imidazolkonzentration auf 20 mM eingestellt wurde, mit der Ni-NTA Sepharose bei 4 °C (Dianthin: 60 min; Konjugat: 30 min) invertierend inkubiert (Überkopfschüttler REAX 2) und einem festgelegten Eluierschema folgend gereinigt (**Tab. 2.1**).

Tab. 2.1: Wasch- und Eluierschema der Proteinreinigung via IMAC. E: Elutionspuffer, 31–500: Imidazolkonzentration [mM].

Puffer	Dianthin [mL]	Konjugat [mL]	Imidazol [mM]
W	5 × 5.00		20.00
E31	—	5 × 2.00	31.25
E62	—	3 × 2.00	62.50
E125	3 × 10.00	10.00	125.00
E250	1 × 10.00	5.00	250.00
E500	—	10.00	500.00

Zellpellet, Durchlauf, Elutionsfraktionen sowie Säuleninhalt wurden *via* Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Die das gewünschte Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, über Nacht bei 4 °C gegen 1 L des jeweiligen Puffers dialysiert (Dianthin: CBD-; Konjugat: PBS-Puffer) und aufkonzentriert (4 000 × g, Amicon® Ultra-15 3/10 kDa *Molecular Weight Cut Off* (MWCO⁶) bzw. mittels Chitin-Affinitätschromatographie weiter gereinigt.

⁶ Bei einem MWCO von 3/10 kDa werden alle Moleküle mit einer molaren Masse, die größer als 3/10 kDa ist, zurückgehalten.

2.3.3 Chitin-Affinitätschromatographie

CBD-Puffer: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % [v/v] Tween-20, pH 8.0

Die nach IMAC hauptsächlich als Verunreinigung auftretenden bakteriellen Proteine (SlyD, ArnA und Can) wurden in einem weiteren Reinigungsschritt *via* Chitin-Affinitätschromatographie entfernt. Hierfür wurden Chitin-Beads (10 mL BV) in einer Schwerkraftsäule (25 mL) vorgelegt und mit 100 mL CBD-Puffer equilibriert. Nach einstündiger Inkubation (4 °C, Überkopfschüttler REAX 2) der Chitin-Säule mit der Proteinlösung wurde nach Auffangen des Durchlaufes mit CBD-Puffer (3 × 20 mL) gewaschen und der Inhalt der Fraktionen sowie des Säulenmaterials in einem 12 %igen Polyacrylamidgel analysiert. Die das Dianthin enthaltenden Fraktionen wurden gegen 1 L PBS dialysiert (4 °C), mit Pufferwechsel nach 16 h und weiterer Dialyse für mindestens 60 min, und nach Aufkonzentrieren (Amicon® Ultra-15 3 kDa) sowie steril Filtrieren (0.22 µm) bei 4 °C gelagert.

2.3.4 Protein A-Affinitätschromatographie

Waschpuffer I: PBS mit 1 M HCl, pH 7.4
Waschpuffer II: PBS mit 0.5 % Tween-20, pH 7.4
Elutionspuffer E: 100 mM Glycin, pH 2.9
Neutralisationspuffer: 1 M Tris, pH 9

Das aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* stammende Protein A kann aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu der konstanten Region (Fc) der Immunglobuline IgG zur Trennung von freiem / nicht konjugiertem Dianthin und Konjugat genutzt werden.

Hierfür wurde Protein A-Agarose (0.5–1.0 mL BV in Schwerkraftsäule, 11 mL) mit 10 × BV DPBS, 2 × BV Waschpuffer I, 2 × BV Waschpuffer II und final mit 16 × BV DPBS gewaschen. Equilibrierte Protein A-Agarose und Konjugat-Mix wurden vereinigt und 1 h invertierend (4 °C) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die gravimetrische Aufreinigung, wobei zunächst der Durchfluss aufgefangen und die Säule mit DPBS (7 × 2 mL) gewaschen wurde. Anschließend erfolgte die Elution mit Elutionspuffer (7 × 950 µL) in 1.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße, in welche 50 µL Neutralisationspuffer vorgelegt wurde. Die Analyse des Inhalts der Fraktionen sowie der Säule erfolgte mittels einer zweistufigen SDS-PAGE (12/7.5 % [w/v]) *via* Coomassie Brilliantblau Färbung. Die das Konjugat enthaltenen sowie Dianthin-freien Fraktionen wurden gegen PBS pH 7.4 (16 h, 4 °C) dialysiert und weiter über IMAC aufgereinigt.

2.3.5 SDS-PAGE

Trenngelpuffer:	1.5 M Tris-HCl, 0.4 % [w/v] SDS, pH 8.8
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris-HCl, 0.6 % [w/v] SDS, pH 6.8
Laufpuffer:	20 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % [w/v] SDS, pH 8.3
Ammoniumpersulfat:	10 % in ELIX Wasser
4 × SDS Probenpuffer:	– nicht reduzierend :
	0.25 mM Tris-HCl, 40 % [v/v] Glycerol, 8 % [w/v] SDS, 0.04 % [w/v] Bromphenolblau, pH 6.8
	– reduzierend :
	4 × nicht reduzierender Probenpuffer, 8 % [v/v] β- Mercaptoethanol

Diese Methode ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse jedoch unabhängig von ihrer Ladung und Form. Natriumdodecylsulfat denaturiert dabei das Protein und erzeugt in Abhängigkeit der Zahl der Aminosäurereste eine Netto-Negativladung, welche die größenabhängige Wanderung des Proteins Richtung Anode hervorruft. Hierfür wurde als Laufkammer das horizontale Elektrophoresesystem von C.B.S. (80 × 85 × 0.75 mm) verwendet. Die Untersuchung von Dianthin nach der Expression und Aufreinigung erfolgte in einem 12%igen Gel. Im Fall der Konjugate wurde ein zweistufiges Gel verwendet, wobei die untere Schicht aus einem 12%igen und die obere aus einem 7.5%igen Trenngel bestand. Dies gewährleistete die gleichzeitige Detektion von Dianthin und der Konjugate mit einem deutlichen Unterschied in der molekularen Masse.

Die Proteinproben wurden mit nicht reduzierendem oder reduzierendem 4 × Probenpuffer denaturiert (5 min, 96 °C, zentrifugiert) und 15–25 µL der Probe auf das Sammelgel aufgetragen. Die Separierung erfolgte bei 200 V, 40 mA (1 Gel) oder 80 mA (2 Gele) für 1–1.5 h, mindestens aber solange bis die Laufmittelfront aus dem Gel ausgetreten war.

Tab. 2.2: Pufferzusammensetzung der Polyacrylamidgele

Lösung	Trenngel		Sammelgel
	12 %	7.5 %	4.5 %
ELIX Wasser	1 488 µL	2 126 µL	720 µL
Trenngelpuffer	1 062 µL	1 062 µL	—
Sammelgelpuffer	—	—	300 µL
30 % Acrylamid	1 700 µL	1 062 µL	180 µL
10 % Ammoniumpersulfat	30 µL	30 µL	10 µL
TEMED	3 µL	3 µL	3 µL

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese entweder mit Coomassie Brilliantblau zur Detektion der Proteinbanden eingefärbt oder aber zur weiteren Analyse für einen Westernblot verwendet.

2.3.6 Coomassie-Färbung

Färbelösung: 0.1 % [w/v] Coomassie Brilliantblau R-250, 40 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure; gefilterte Lösung

Entfärber: 20 % [v/v] Ethanol, 10 % [v/v] Essigsäure

Coomassie Brilliantblau R-250 färbt unspezifisch basische sowie aromatische Aminosäuren und ermöglicht so die visuelle Detektion von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Dafür wurden die Gele 1–16 h in Färbelösung unter Agitation (Wippschüttler Rocky) angefärbt und zunächst einmalig mit Leitungswasser sowie nachfolgend mehrmals mit Entfärber gewaschen bis nur noch Proteinbanden detektierbar waren. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei zwischen zwei Cellophanfolien eingespannt und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.3.7 Westernblot

Blot-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % [v/v] Ethanol

Blockpuffer: 5 % Magermilch in PBS

PBSB_{0.2}: PBS with 0.2 % [w/v] Brij 58, pH 7.4

Ponceau Rot: 0.1 % [w/v] Ponceau S, 5 % [v/v] Essigsäure

Lösung A: 100 mM Tris-HCl, 14.11 mM Luminol, pH 8.6

Lösung B: 6 mM *p*-Coumarinsäure in DMSO
30 % [v/v] Wasserstoffperoxid

Dieses Verfahren ermöglicht die Immundetektion von Proteinen über das Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip. Nach Größenauftrennung der Proteine (SDS-PAGE) wurden diese im Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Amersham™ Protran® Membran) übertragen. Die zuvor im Blotpuffer equilibrierte Membran sowie Whatman Filterpapiere und Schwammtücher dienten zum Aufbau des Blot-Sandwichs nach folgendem Schema:

⊖ Schwammtuch Filterpapier Gel Nitrocellulosemembran Filterpapier Schwammtuch ⊕

Der Proteintransfer hin zur Anode (⊕) erfolgte für 58 min bei 50 V und wurde im Anschluss durch Anfärbung mit Ponceau Rot überprüft. Hierfür wurde die Membran für 5 min unter Agitation zunächst in der Färbelösung inkubiert, gefolgt von mehrmaligem Waschen mit Leitungswasser. Sodann erfolgte nach vollständiger Ponceau-Rot-Entfärbung die Blockierung freier Bindungsstellen der Membran mit 5 mL Blockpuffer sowie nach Waschen mit PBS (2 × 5 mL) die Inkubation mit dem für das Protein geeigneten Antikörper (**Tab. 2.3**) in 5 mL

PBSB_{0.2} (Wippschüttler Rocky). Folgend wurde mit 5 mL PBSB_{0.2} (3 × 5 min) gewaschen, überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt und die Membran mit Chemolumineszenzlösung (1 000 µL Lösung A, 100 µL Lösung B, 1 µL Lösung C) für 2 min inkubiert. Die visuelle Detektion erfolgte in der Dunkelkammer auf passend zugeschnittenem Röntgenfilm in Belichtungskassetten, wobei verschiedene Belichtungszeiten beginnend mit 10 sec gewählt wurden. Je nach Signalintensität wurden nachfolgende Belichtungszeiten auf 30 sec, 1–10 min und 1–2 h erhöht.

In dieser Arbeit wurde mit einem HRP markierten primären Antikörper gearbeitet, um Kreuzreaktionen des sekundären Antikörpers mit Panitumumab ausschließen zu können.

Tab. 2.3: Für den Westernblot verwendete Antikörper. (*): *Horse raddish peroxidase* (HRP) markierter Antikörper

Primär-Antikörper	Verdünnung	Inkubation
anti-His IgG(*)	1:2 500	2 h
anti-human IgG-Fcγ(*)	1:50 000	1 h, 4 °C

2.3.8 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse zum Pufferaustausch wurde für alle Proteine gleichermaßen durchgeführt. Zunächst wurde entsprechend des Volumens sowie Größe des Proteins ein Dialyseschlauch geeigneten Größenausschlusses (3.5 oder 12 kDa MWCO, ZelluTrans) in finalem Puffer für 10–20 min equilibriert und das Protein gegen 1–2 L des finalen Puffers unter ständigem Rühren (16 h, 4 °C) dialysiert. Bei Volumina über 20 mL wurde anschließend nochmals der Puffer ausgetauscht und die Dialyse für mindestens eine weitere Stunde fortgesetzt.

2.3.9 Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Die nach der Aufreinigung sowie Dialyse stark verdünnten Proteine (≤ 0.1 mg/mL) wurden über eine Amicon-Zentrifugen-Filtereinheit (Merck Millipore) des benötigten MWCO (3 / 10 / 30 kDa) bei $4\,000 \times g$ (4–20 °C) aufkonzentriert. Um Präzipitatbildung durch graduelle, lokale Konzentrationssteigerung vorzubeugen, wurde zwischen den Zentrifugationseinheiten die Proteinlösung durch Pipettieren durchmischt. Nach dem Aufkonzentrieren auf das gewünschte Volumen wurde die Proteinlösung steril filtriert (0.22 µm) und bei 4 °C gelagert.

2.3.10 Modifizierung mit Hydrazinnicotinamid (HYNIC)

PBS (HYNIC): 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 150 mM NaCl, pH 7.5

Für die Radionuklidmarkierung von Dianthin und Panitumumab (Pan) mit ^{99m}Tc mussten diese im Vorfeld mit HYNIC modifiziert werden. Dies erfolgte nach Herstellerangaben (*R-PE Antibody Conjugation Kit*, Solulink). Dianthin und Panitumumab wurden mit einem 20-molaren Überschuss an HYNIC (in DMSO) derivatisiert (1.5 h, 20 °C, 800 rpm) und größenauflschlusschromatographisch nach Angaben des Herstellers gereinigt (PD-10 Säule, PBS pH 7.4). Die erfolgreiche Modifizierung wurde nachfolgend in einem Assay mit 2-Sulfobenzaldehyd (2-sBA) verifiziert. Dianthin-HYNIC (D(H)) und Panitumumab-HYNIC (Pan(H)) wurden anschließend für die Herstellung der Konjugate D(H)Pan und DPan(H) verwendet.

2.3.11 Biokonjugation (chemische Kopplung)

PBS-EDTA: 20 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5

PBS (NEM): 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 150 mM NaCl, pH 7.2

In dieser Arbeit wurde für die Kopplung von Dianthin an Panitumumab ein heterobiofunktioneller Linker, *N*-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP), verwendet. Seine Ester-Funktion ermöglicht die Einführung von Pyridyldithion über die primären Amine der Proteine. Pyridyldithion kann wiederum von Sulfhydryl-Gruppen angegriffen werden. **Abb. 2.1** zeigt schematisch die Kopplungsreaktion. Um Quervernetzung durch freie Sulfhydryl-Gruppen in Panitumumab zu unterbinden, wurden diese zunächst mit NEM blockiert. Sodann konnten Panitumumab-NEM (Pan-NEM) wie auch Dianthin mit SPDP modifiziert werden, wobei Dianthin im Anschluss mit Dithiothreitol (DTT) reduziert wurde, um freie Sulfhydrylgruppen zu generieren.

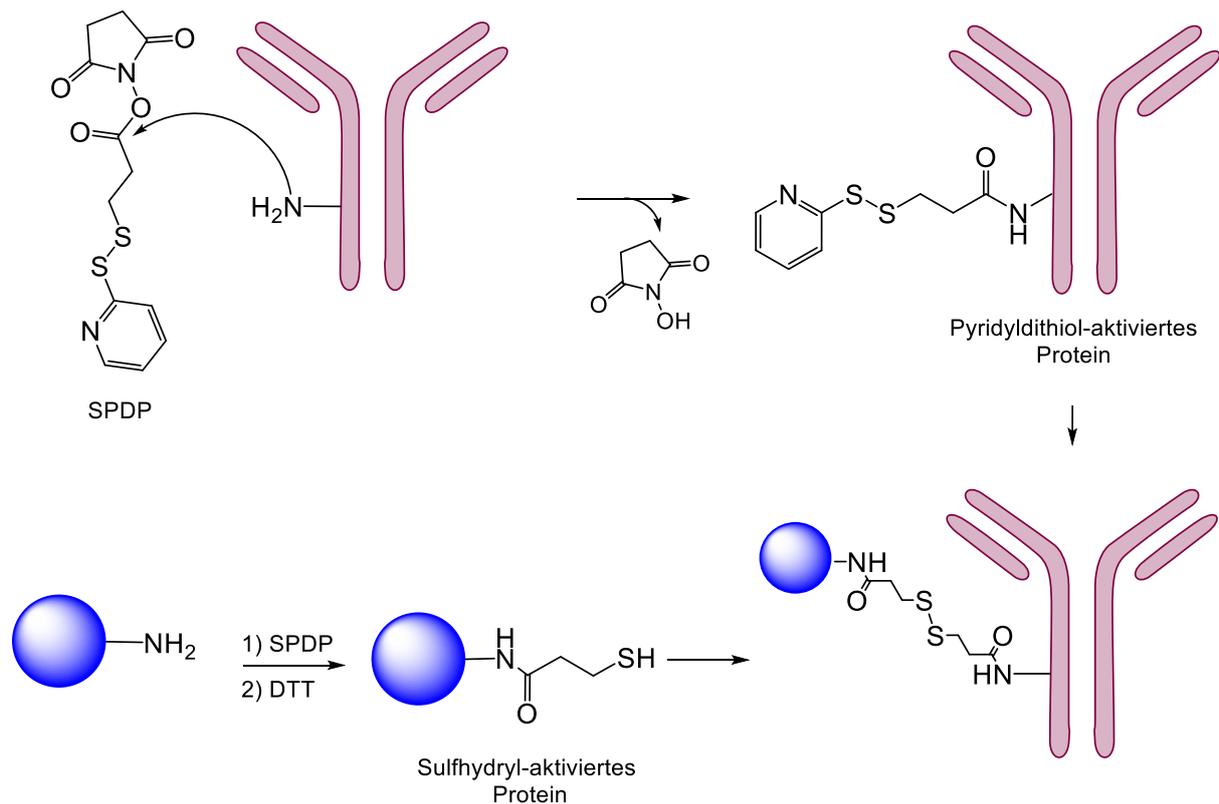


Abb. 2.1: Biokonjugation über SPDP-Linker. Schematische Darstellung der Konjugation von Dianthin (blaue Kugel) an Panitumumab (Antikörper, oben). Im ersten Schritt erfolgt die Modifikation mit SPDP über freie Aminogruppen. Reduktion durch DTT erzeugt eine Sulfhydrylgruppe am Dianthin, welches das Pyridyldithiol aktivierte Panitumumab angreift und so ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Konjugat bildet.

Nach jedem Modifikationsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie (PD-10 Säule) gefolgt von der Aufkonzentrierung auf das Ursprungsvolumen mittels einer geeigneten Amicon-Zentrifugen-Filtereinheit.

Zunächst wurde Panitumumab / Pan(H) (16.7 nmol, 2.433 mg/mL; PBS (NEM) pH 7.2) mit einem 30-molaren Überschuss an frisch hergestellter 100 mM NEM-Lösung (Milli-Q) inkubiert (2 h, 20 °C, 800 rpm) und freies NEM über Größenausschlusschromatographie (PD-10 Säule, PBS-EDTA pH 7.5) nach Angaben des Herstellers entfernt sowie der Puffer ausgetauscht.

Anschließend erfolgte die Modifizierung mit SPDP, indem getrennt voneinander Dianthin / D(H) (0.5 mg/mL, 16.8 nmol, PBS-EDTA pH 7.5) sowie Pan-NEM / Pan(H)-NEM (2.433 mg/mL, 16.8 nmol) mit einem 5-molaren Überschuss an 20 mM SPDP-Lösung (2 mg/320 µL DMSO) inkubiert (1 h, 20 °C, 800 rpm) wurden. Nach der Reduktion von 1 mL Dianthin-SPDP (D-SPDP) / D(H)-SPDP mit 0.5 mL 150 mM DTT (23 mg/mL, PBS-EDTA pH 7.4) für 30 min (20 °C, 800 rpm) zu Dianthin-SH (D-SH / D(H)-SH) wurde dieses äquimolar mit Pan-NEM-SPDP / Pan(H)-NEM-SPDP inkubiert (1 h, 20 °C, 800 rpm). Die Reaktion wurde mit einem 5-molaren Überschuss an L-Cystein gestoppt. Über Protein A-

Affinitätschromatographie sowie IMAC wurde Dianthin-Panitumumab (DPan / D(H)Pan / DPan(H)) von nicht-konjugiertem D-SH / D(H)-SH sowie Pan-NEM-SPDP / Pan(H)-NEM-SPDP abgetrennt.

2.3.12 Radionuklidmarkierung mit ^{99m}Tc

Reaktionslösung A: 7.99 mg Tricin (44.6 μmol) in 0.8 mL “Wasser für Injektionszwecke“,
1 μL 2.0 M HCl, pH 4.5–5

Reaktionslösung B: 9.99 mg SnCl_2 (44.3 μmol) in 0.5 mL 2.0 M HCl

Proteinlösungen: D(H)Pan, DPan(H), DPan, Pan(H)

Die Radionuklidmarkierung erfolgte nach Camacho et al. [158] mit geringfügiger Abwandlung unter Beisein von Dr. Sonal Prasad sowie Mithilfe von Ajay Mohan Mohan (*Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center*). Für die Herstellung der finalen Reaktionslösung wurden 50 μL der Reaktionslösung B zu Reaktionslösung A pipettiert und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 mL gebracht (pH 2.5, final). Hiervon wurden 25 μL mit 20 μL 0.02 M HCl sowie 100 μL Proteinlösung (0.24–0.27 nmol) vorgelegt (pH 5.0) und zu 100–275 MBq Natrium- ^{99m}Tc -Pertechnetat $\text{Na}^+[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ pipettiert. Nach 20-minütiger (20 °C, 800 rpm) Inkubation wurden 10.13 μL (0.23 μmol) EDDA und 2.42 μL (4 nmol) L-Cystein zu der Reaktionslösung gegeben, für weitere 10 min inkubiert sowie anschließend über eine PD-10 Säule nach Angaben des Herstellers gereinigt und aufkonzentriert (~150 μL , Amicon MWCO 10 kDa).

Die Überprüfung der radiochemischen Reinheit erfolgte *via* Dünnschichtchromatographie (DC-Fertigfolien, Laufmittel: Citrat-Dextrose-Lösung) und die Messung der Radionuklidaktivität mittels Aktivimeter ISOMED 2010.

2.4 Methoden zur Proteincharakterisierung

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem auf Kupfer basierendem Bicinchoninsäure-Assay (*PierceTM BCA Protein Assay Kit*) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Hierbei komplexiert das durch Proteine reduzierte Cu^+ mit Bicinchoninsäure zu einem violetten, bei 562 nm detektierbarem Chelatkomplex. Eine serielle Standardreihe (15.13, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000 und 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) von bovinem Serumalbumin und daraus resultierender Standardkurve ermöglicht die Berechnung der Konzentration. Dafür wurden 25 μL der Proteinprobe sowie des Probenpuffers (Blank) mit 200 μL Arbeitsreagenz in eine Mikroplatte (NUNC Immuno

Modules) pipettiert, 30 min bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert und sodann die Absorption (SpectraMax 340P, $\lambda = 562$ nm) gemessen.

2.4.2 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten ϵ von Dianthin

Der molekulare Extinktionskoeffizient ϵ kann über das Lambert-Beersche Gesetz bestimmt werden. Hierfür wurde von sieben Konzentrationen an Dianthin (serielle 1:0.75-Verdünnung aus 0.532 mg/mL) die Absorption bei 280 nm (NanoDrop 1000) bestimmt und diese in Abhängigkeit zur Konzentration graphisch dargestellt. Die Berechnung von ϵ erfolgte über eine lineare Regression (GraphPad Prism8), wobei nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Steigung den Wert für ϵ [$M^{-1}cm^{-1}$] darstellt.

$$\text{Lambert - Beer: } A = \epsilon \cdot d \cdot c = \left[\frac{L}{mol \cdot cm} \cdot cm \cdot \frac{mol}{L} \right] \rightarrow \epsilon = \frac{A}{d \cdot c} = \frac{L}{cm \cdot mol}$$

$$\text{Geradengleichung: } y = m \cdot x \rightarrow m = \epsilon$$

2.4.3 N-Glykosidaseaktivitätstest

Acetatpuffer: 50 mM Natriumacetat, 100 mM KCl, pH 5.0

Mastermix: 1:1 Heringssperma-DNA / Acetatpuffer

Die unspezifische enzymatische Aktivität von Dianthin spaltet Adenin aus Heringssperma-DNA. Basierend darauf wurde ein *Adenine Release Assay* zur N-Glykosidaseaktivitätsmessung [152] entwickelt. Über eine Adenin-Standardreihe (10, 20, 40, 80, 160, 320 pmol) kann mittels linearer Regression freigesetztes Mol Adenin pro Mol Toxin in einer Stunde berechnet werden. Hierfür wurde der Mastermix zunächst für 10 min (50 °C, 800 rpm, Thermoschüttler) inkubiert, danach die Reaktionsansätze nach **Tab. 2.4** hergestellt und für 60 min (50 °C, 800 rpm, Thermoschüttler) inkubiert, sowie anschließend über Größenausschlussfilter zentrifugiert (MWCO 3 000, Nanosep®, 45 min, 4 °C, 5 000 \times g) um freies Adenin vom Reaktionsansatz zu separieren. Die Messung der Absorption des Permeats erfolgte am Spektrophotometer NanoDrop 1000 bei $\lambda = 260$ nm.

Tab. 2.4: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für den Adenin Release Assay.

	Protein	BSA	Blank
DNA Mastermix	20 μ L (100 μ g Heringssperma-DNA)		
Enzym	30 pmol	30 pmol	—
Acetatpuffer	Ad 50 μ L	Ad 50 μ L	30 μ L

Die Berechnung der enzymatischen Aktivität erfolgte über die Standardkurve:

$$\text{Standardkurve: } y(\text{Abs}) = mx + b \rightarrow x \left[\frac{\text{pmol}}{\mu\text{L}} \right] = \frac{\text{Abs}(260\text{nm}) - b}{m}$$

$$\text{enzymatische Aktivität: } \frac{\left(\frac{\text{pmol (Adenin)}}{\text{pmol (Toxin)}} \right)}{h} = \frac{\text{pmol (Adenin)}}{\text{pmol (Toxin)} \times h} = \frac{x \times 50 \mu\text{L}}{30 \text{ pmol}}$$

2.4.4 2-Sulfobenzaldehyd-Assay

Der Nachweis der erfolgreichen HYNIC-Modifikation basiert auf der Reaktion der Hydrazin-Gruppe des HYNIC-Linkers mit der Aldehydgruppe von 2-sBA unter Ausbildung eines Bis-Arylhydrazons, welches photometrisch bei $\lambda = 350 \text{ nm}$ (NanoDrop 1 000) detektiert werden kann (**Abb. 2.2**). Aus einer frisch hergestellten 9.6 mM 2-sBA-Lösung (2 mg/mL in Milli-Q) wurde eine 0.5 mM Arbeitslösung in 100 mM MES-Puffer (pH 5.0) hergestellt und 18 μL mit 20 μL HYNIC-modifiziertem Protein inkubiert (37 °C, 800 rpm) sowie anschließend die Absorption nach 30 min und 2 h gemessen.

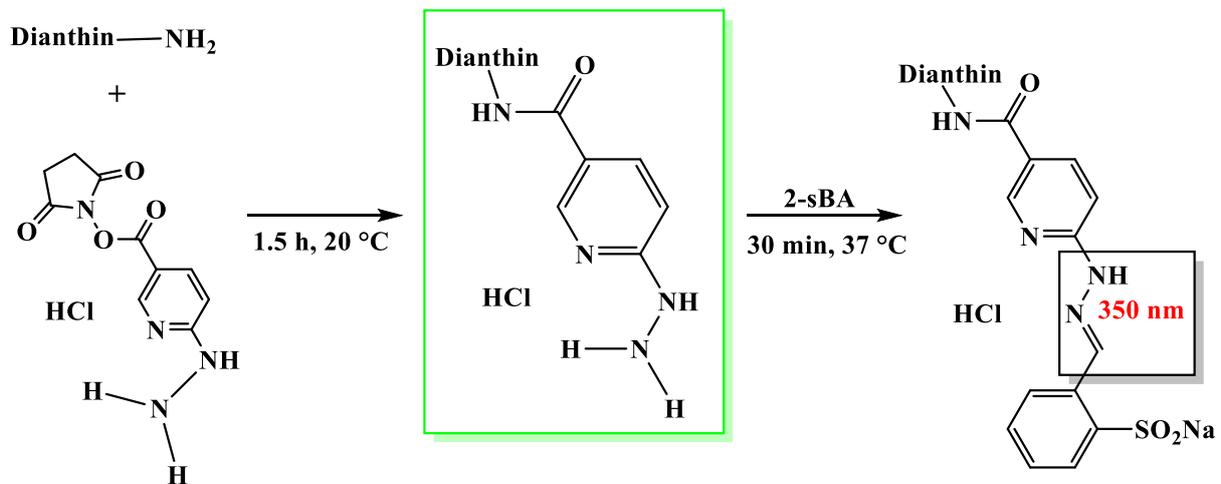


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des 2-sBA-Assays. Die Hydrazingruppe von D(H) und Pan(H) reagiert mit der Aldehydgruppe von 2-sBA unter Ausbildung eines bei 350 nm detektierbaren Bis-Arylhydrazons.

2.4.5 Farbstoffmarkierung mit Cy3

Die erfolgreiche Modifizierung wurde unter Zuhilfenahme einer Cy3-Markierung überprüft, da nach der HYNIC-Modifikation weniger freie Aminogruppen vorhanden sein sollten. Dieser Sachverhalt wurde außerdem als Kontrolle für die anschließende Konjugation genutzt, um den Nachweis noch vorhandener freier Aminogruppen zu erbringen.

Es wurden je 50 μL (bei vorliegender Konzentration 0.037–0.05 mg) Dianthin, D(H), Panitumumab sowie Pan(H) mit 0.2 μL einer 10 mM Lösung an Cy3-NHS-ester inkubiert

(18 h, 20 °C, 800 rpm) und nach erfolgter Aufreinigung (PD-10 Säule) auf das Ursprungsvolumen aufkonzentriert. Die spektrophotometrische Detektion erfolgte bei $\lambda = 550 \text{ nm}$ am NanoDrop 1 000.

2.4.6 Berechnung des Derivatisierungsgrades

Die Anzahl von an Dianthin und Panitumumab gebundenen Molekülen HYNIC und Cy3 wurde über die molekularen Extinktionskoeffizienten sowie die Absorptionsmaxima (280 nm (Protein), 350 nm (HYNIC), 550 nm (Cy3); NanoDrop 1 000) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Die Berechnung erfolgte dabei folgendermaßen:

$$\text{Anzahl HYNIC/Cy3 pro Protein} = \frac{(A_X \times \varepsilon_{280})}{(\varepsilon_X \times A_{280C})}$$

$$A_{280C} = A_{280} - (A_X \times CF_X)$$

$$\varepsilon_D = 20\,823 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}; \varepsilon_{Pan} = 270\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{HYNIC} = 18\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}; \varepsilon_{Cy3} = 150\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$CF_{Cy3} = 0.09; CF_{HYNIC} = \text{unbekannt, wurde gleich Null gesetzt}$$

2.4.7 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR)

PBS-EP: 150 mM NaCl, 8.33 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 1.67 mM KH_2PO_4 , 0.005 % *Surfactant P20*, pH 7.4

Die Bindungsaffinität von DPan, D(H)Pan, DPan(H), Panitumumab und Dianthin an EGFR wurde über Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (BIAcore X100) bestimmt. Auf der carboxymethylierten Dextranoberfläche des CM5 Sensor Chips wurde das rekombinant, humane rhEGFR-Fc Chimera Protein mit einer finalen *resonance unit* RU von 300–500 in PBS-EP immobilisiert. Nach zunächst drei aufeinanderfolgenden Injektionen von 1 M NaCl in 50 mM NaOH (10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 60 s) wurde der Chip mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid / *N*-Hydroxysuccinimid 50:50 aktiviert (10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 420 s) und sodann mit 180 μL rhEGFR-Fc (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden mit Ethanolamin (10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 420 s) abreagiert und der Chip mit PBS-EP equilibriert. Mit der Referenzspur wurde analog, jedoch ohne rhEGFR, verfahren. Das Bindungsverhalten wurde in einem *single cycle kinetic*-Verfahren mit fünf aufsteigenden Konzentrationen des Analyten (DPan, D(H)Pan, DPan(H), Panitumumab, Dianthin) bestimmt, wobei die Assoziation und Dissoziation für 180 s bzw. 5 000 s (30 $\mu\text{L}/\text{min}$) und die Regeneration des Chips mit 10 mM Glycin pH 2.5 (30 s) erfolgte. Die Analyt-Lösung wurde in einer seriellen 1:3-Verdünnung mit PBS-EP aus der höchsten, zu testenden Konzentration von 50 nM hergestellt. Für die Analyse

der Sensogramme („Biacore X100 evaluation software: Langmuir 1:1 binding model; RI constant = 0“) wurde das Referenzsignal vom Bindungssignal subtrahiert.

Die Messung sowie Auswertung wurde von Frau Dr. Nicole Niesler durchgeführt.

2.4.8 Matrix-unterstützte Laser-Desorption / Ionisation (MALDI)

Das flugzeitaufgelöste (*time of flight* TOF) und mit einem Massenspektrometer (MS) gekoppelte MALDI-TOF-MS-Messverfahren dient zur Verifizierung von Ionen nach ihrer Größe. Dabei wird die Matrix-Analyt-Lösung über einen Laser in Gasphase gebracht und der Analyt von den aus der Matrix freiwerdenden Protonen ionisiert. Diese werden im Massenspektrometer beschleunigt und die größenabhängige Molekülflugzeit von einem Detektor analysiert. Die in Milli-Q Wasser entsalzten Konjugate DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurden dafür 1:1 mit der Matrix Super-2,5-DHB auf den Träger aufgetragen (1 µL). Die Messung (*dried droplet method*) erfolgte im *linear positive ion* (LP)-Modus und wurde von Dr. Mazdak Asadian Birjand und Dr. Gregor Nagel durchgeführt.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung adhärenter Tumorzellen

MDA-MB-453: DMEM, 10 % Fetales Kälberserum FCS, 1 % Penicillin-Streptavidin (P / S)

HCT116: McCoy's Medium, 10 % FCS, 1 % P / S

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden unter konstanten Konditionen im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Feuchtigkeit) kultiviert und alle zellbiologischen Arbeiten stets unter sterilen Bedingungen (Laminar air flow Werkbank) durchgeführt.

Die bei -173 °C gelagerten Kryostocks wurden handwarm aufgetaut, in 5 mL Medium überführt und zentrifugiert (5 min, 20 °C, 800 × g). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 mL Medium (20 °C) resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt, in der nach 24 h das Medium zum ersten Mal gewechselt wurde.

Für das Passagieren der humanen kolorektalen Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 wurde verbrauchtes Medium aspiriert, die Zellen mit 5 mL DPBS –/– gewaschen sowie mit 3 mL 0.25 % Trypsin-EDTA (5 min, 37 °C) abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit 3 mL Medium gestoppt, die Zellen durch vorsichtiges resuspendieren vereinzelt und auf eine neue Platte mit einer finalen Konfluenz von 20–40 % passagiert. Die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 wurde analog trypsinisiert, jedoch erfolgte der Waschschrift mit 5 mL DPBS –/– und 1 mL 0.25 % Trypsin-EDTA.

2.5.2 Kryokonservierung humaner Tumorzellen

Die Kryokonservierung der humanen Tumorzellen erfolgte nach der Trypsinierung einer vollständig konfluenten Platte wie folgt: Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 20 °C, 800 × g), das Zellpellet in 10 mL Kryoprotektivum (90 % Voll-Medium, 10 % DMSO) resuspendiert und zu je 1.5 mL in Kryoröhrchen aliquotiert. Das graduelle Einfrieren (Nicoool LM 10) erfolgte zunächst für 30 min auf Stufe 3 gefolgt von 10 min auf Stufe 10. Abschließend wurden die Zellen unverzüglich in flüssigem Stickstofftank bei –173 °C gelagert.

2.5.3 Mykoplasmen-Nachweis

Der Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination erfolgte mit dem *PCR Mycoplasma Test Kit I/C*, welcher auf der Vervielfältigung eines DNA-Fragmentes des *Mycoplasma orale* Gens beruht. Hierfür wurde vor der Trypsinierung 1 mL des Zellüberstandes von HCT116- sowie MDA-MB-453-Zellen verwendet und der Test entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.4 SO1861-Verwendung und -Vorbehandlung

Das hier verwendete Saponin SO1861 wurde aus der getrockneten Wurzel von *Saponaria officinalis* L. von Analyticon Discovery (Lot-Nr.: AD174123e82) isoliert. Saponine neigen bei höheren Konzentrationen zur Ausbildung von Micellen. Da dies zu einem inhomogenen Konzentrationsgemisch führen kann, wurde SO1861 für alle weiteren Versuche wie folgt vorbehandelt. Die SO1861-Lösung wurde zunächst 10–15 min erwärmt (50 °C, 800 rpm) und die Micellen anschließend für 10 s im Ultraschallbad aufgeschlossen. Im Folgenden wurde die Lösung rigoros gevortext und erneut für 2–5 min erwärmt. Nach Zentrifugieren (Tischzentrifuge, 20 s) wurde SO1861 sofort in 37 °C warmen Medium (für die Zellkulturversuche) oder DPBS –/– (für die *in-vivo*-Versuche) verdünnt.

2.5.5 Zytotoxizitäts- und Vitalitätsassay

Die *In-vitro*-Wirkung von DPan, Dianthin und Panitumumab in Kombination mit SO1861 wurde sowohl als Endpunkt- (MTT-Assay) als auch Echtzeit-Messung (IncuCyte® S3) an der Zielzelllinie HCT116 und Kontrollzelllinie MDA-MB-453 durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst gleichermaßen verfahren. Die gewünschte Zellzahl wurde in 100 µL Medium in je eine Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert und darin nach Absetzen der Zellen (15–20 min) in den Inkubator überführt. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 80 µL Medium (± SO1861) sowie nach weiteren 15 min Inkubationszeit die Zugabe von 20 µL

DPBS +/- mit verschiedenen Konzentrationen an zu testendem Protein. Anschließend wurde die Platte entweder weiter im Inkubator gehalten oder aber im IncuCyte-Gerät (im Inkubator: 37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) platziert und (wenn nicht anders angegeben) alle 4 h ein Bild mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

Um die für die Zytotoxizitätstests optimale Zellzahl zu bestimmen wurden 0–20 000 HCT116- bzw. 0–75 000 MDA-MB-453-Zellen in 100 µL Medium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium auf 200 µL aufgefüllt und die Zellviabilität *via* MTT-Assay (für MDA-MB-453 Zellen) oder IncuCyte-Messung (für HCT116 Zellen) ausgewertet.

Weiterhin wurde die Toleranzgrenze der Zellen bezüglich der SO1861-Konzentration (MTT-Assay; 0.04, 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00, 10.00 µg/mL) bestimmt und für nachfolgende Experimente die höchste nicht toxische Konzentration verwendet.

Die Wirksamkeit von DPan (0.03 fM–30 nM), Dianthin (0.003–30 nM) und Panitumumab (0.003–30 nM) wurde in Kombination mit SO1861 als auch ohne getestet und alle Konzentrationen jeweils in einer seriellen Verdünnungsreihe hergestellt. Die Messung erfolgte in 3–4 biologischen sowie 2–3 technischen Replikaten pro Dosis und Zelllinie.

2.5.6 MTT-Assay

Formazan-Solubilizer: 205 mL Isopropanol, 25 mL 10 % SDS, 20 mL 1 M HCl

Das Prinzip des MTT-Assays beruht auf der Umsetzung des gelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid von vitalen Zellen zu dem wasserunlöslichen violetten Farbstoff Formazan (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid), welches photometrisch detektiert werden kann.

Die MTT-Lösung (30 µL, 5 mg/mL in Milli-Q Wasser, steril filtriert) wurde 48 h nach der Zugabe des zu testenden Proteins bzw. SO1861 in jede Vertiefung pipettiert und für 2 h (37 °C) inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und die entstandenen Formazan-Kristalle mit 50 µL Formazan-Solubilizer gelöst und die Absorption in einem Mikroplattenphotometer (SpectraMax 340PC) bei $\lambda = 570$ nm (Referenz: $\lambda = 600$ nm) gemessen.

2.5.7 IncuCyte® S3-Echtzeitmessung

IncuCyte S3 ermöglicht die mikroskopische Echtzeitmessung von Zellen mit verschiedenen Vergrößerungen (4 ×, 10 ×, 20 ×), wobei verschiedene Vorgänge wie Zellproliferation, -migration und -invasion, Apoptose oder 3D-Sphäroide untersucht werden können.

In dieser Arbeit wurde sowohl die Konfluenz von adhärennten humanen Tumorzellen als auch das Verhalten von Tumor-Sphäroiden unter Kombinationsbehandlung untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen IncuCyte S3-Software anhand verschiedener Parameter wie Zellgröße und -beschaffenheit sowie Signalintensität (Fluoreszenz-Messung).

2.5.8 3D-Sphäroid Assay

2D-Assays, in denen Zellen planar auf einer Platte wachsen, sind einfach zu handhaben und geben erste Rückschlüsse über die Effektivität von z. B. Immunotoxinen, stellen jedoch keinen Vergleich zu realen Wachstumsbedingungen eines Tumors dar. Dies kann *in vitro* in sogenannten Sphäroid-Assays ermöglicht werden, in denen Tumorzellen in einer basalmembranähnlichen Matrix (Corning™ Matrigel™) eingebettet und somit das dreidimensionale Wachstum ermöglicht wird.

Hierfür wurden die Vertiefungen einer 96-Well-Zellkulturplatte mit 50 µL Matrigel-Medium-Lösung (1:1) beschichtet und für mindestens 30 min im Inkubator ausgehärtet. Daraufhin wurden 3 000 HCT116-Zellen in 100 µL Medium pro Well ausgesät und für Bildung von Sphäroiden für drei Tage inkubiert (Inkubator). Das überständige Medium wurde entnommen und die Zellen mit 50 µL Matrigel-Medium-Lösung (1:1) beschichtet. Nach Aushärten dieser zweiten Matrigel Schicht (30 min, Inkubator) wurde diese erneut mit jeweils 100 µL Medium bedeckt.

Dabei wurden verschiedene Kombinationen ausgetestet. Zum einen wurde Toxin ± SO1861 (finale Konzentration: 0.3 nM DPan, 1.0 µg/mL SO1861) in die zweite Matrigel-Schicht eingebettet, in das Deck-Medium gegeben oder beide Möglichkeiten kombiniert. Das Zellwachstum wurde sodann am IncuCyte im 3-Stunden Takt für 8 Tage mikroskopisch festgehalten. Die Analyse erfolgte mit der IncuCyte® *Multi Spheroids* Software, wobei Sphäroide mit einem Durchmesser >1 000 µm² (*Background-Cells Sensitivity*: 50) analysiert wurden.

2.5.9 Nachweis der Antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität

Der Wirkmechanismus der Antikörper-Toxin-Konstrukte beruht nicht nur auf dem zielgerichteten Transport des Toxins, sondern ebenso auf der Vermittlung der ADCC. Effektorzellen wie NK-Zellen, Makrophagen oder dendritische Zellen werden dabei von Antikörpern, die an die Zielzelle gebunden haben, aktiviert und attackieren diese.

Für den ADCC-Assay wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wie auch Monozyten extrahiert und deren Aktivierung durch DPan sowie Panitumumab im Zellkulturversuch untersucht. Alle Arbeiten, außer der Blutabnahme, erfolgten unter sterilen Bedingungen an der *Laminar air flow*-Werkbank, alle Inkubationsschritte im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit).

Die PBMCs wurden über einen Dichtegradienten (Ficoll®) aus 60 mL frischem Vollblut (Heparin-Röhrchen) nach Angaben des Herstellers isoliert, jedoch abweichend für insgesamt 1 h zentrifugiert. Nach mehrmaligem Waschen der PBMCs wurden diese in DPBS –/– resuspendiert und enthaltende Monozyten mit dem MACS® Isolierungs-Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl (Trypan-Blau-Färbung, LUNA-FL Dual Fluorescence Cell Counter) sowie der Zusammensetzung aus PBMCs und Monozyten (Cell-Dyn).

Für den ADCC-Assay wurden 6 000 HCT116-Zellen in 100 µL in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und nach 24 h 10 pM DPan, Panitumumab, DPBS (Kontrolle) sowie jeweils 250 nM CytotoxRed (zur Quantifizierung des Zelltodes) zu den Zellen pipettiert (je 6 biologische Replikate) und für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der PBMCs (30 × 6 000) und Monozyten (3.8 × 6 000) zusammen mit 100 ng/mL LPS. Vier Tage lang wurde alle 2 h ein Phasenkontrastbild aufgenommen sowie die Fluoreszenz (Extinktion: 565–605 nm, Emission: 625–705 nm, 400 ms) gemessen (IncuCyte S3).

Die Auswertung erfolgte mit der IncuCyte-Software „Basic Analyzer“ (Top-Hat Korrektur: 144 µm (Radius), 2 RCU (Threshold); Area: < 2 000 µm²; Eccentricity: < 0.85).

2.6 *In-vivo*-Methoden

Die Durchführung der *In-vivo*-Versuche erfolgte im Rahmen des vom „Landesamt für Gesundheit und Soziales“ genehmigten Tierversuchs mit der Kennung G0298/15: „Endosomale Wirkstoff-Freisetzung“. Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen (21–24 °C, 40–60 % Luftfeuchtigkeit) und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus in Plexiglaskäfigen, immundefiziente Mäuse in IVC-Käfigen, mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Alle Versuche wurden frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung gestartet. Parameter, die während der akuten Toxizität- und Therapiestudien elementar für die Befundung der Tiere waren, sind in **Tab. 2.5** beschrieben.

2.6.1 Akute Toxizität-Studie an BALB/c

Die Ermittlung der höchsten verträglichen Dosis ohne schwerwiegende Nebeneffekte (NOAEL) von DPan ± SO1861 sowie Panitumumab wurde in der akuten Toxizitätsstudie an nicht tumortragenden BALB/c-Mäusen nach der Richtlinie 425 der „OECD Guidelines for the testing of chemicals“ im Dosisumkehrprinzip durchgeführt. Der Versuch gilt als beendet, wenn konsekutiv dreimal die Höchstdosis appliziert wurde, fünfmaliger Dosenwechsel erfolgte oder die höchst zulässige Tieranzahl von 15 (pro Testsubstanz) erreicht wurde. Die Berechnung der NOAEL erfolgte über die *Maximum Likelihood Method* [159, 160], welche ebenso zur Bestimmung der letalen Dosis angewandt wird (OECD 425). Die regelmäßige Kontrolle der Tiere geschah nach erstmaliger Injektion für 3 h stündlich und weiterführend im 24 h Rhythmus nach den in **Tab. 2.5** beschriebenen Parametern. Ein Versuch galt als beendet, mit gleichzeitiger Tötung des Tieres, wenn mindestens zwei Symptome der Kategorie B oder ein Symptom der Kategorie T erreicht wurde. Die Applikation von DPan (5.79–183 µg) und Panitumumab (183–1 830 µg) erfolgte intravenös (i.v.) in die *Vena caudalis mediana* (V.C.m.) in 100 µL DPBS –/–, die von SO1861 in 100 µL DPBS –/– subkutan (s.c.) in die Nackenfalte. Für den Versuch wurden Tiere im Alter von 8–78 Wochen verwendet. Die Tiere wurden auch bei Abwesenheit von Symptomen, die zur Beendigung des Versuchs geführt hätten, spätestens an Tag 6 nach erstmaliger Injektion euthanasiert und Blut sowie Organe entnommen.

2.6.2 Tumorwachstumsrate

Um ein beschwerdefreies Überleben der Mäuse im Xenograft-Modell während der gesamten Therapiedauer mit 8 Behandlungszyklen (2 Dosen pro Woche) gewährleisten zu können wurde zunächst die Tumorwachstumsrate verschiedener Zellzahlen (**Tab. 2.6**) an weiblichen 12 Wochen alten NMRI nu/nu immundefizienten Mäusen durchgeführt. Eine variierende

Tumorzellzahl (**Tab. 2.6**) an HCT116 wurde in 100 μL DMEM (mit 4.5 g/L D-Glucose, ohne L-Glutamin/Pyruvat) s.c. in die rechte Flanke appliziert. Die Kontrolle der Tiere erfolgte alle 24 h gemäß den in **Tab. 2.5** beschriebenen Parametern, wobei das Tumorgewicht mittels nachfolgender Formel bestimmt wurde:

$$\text{Tumorzellen } mm^3 = \frac{\text{Länge} \times \text{Breite}^2}{2}, \text{ mit } 1 mm^3 = 1 mg$$

Tab. 2.5: Parameter zur Bestimmung von negativen Effekten für die Toxizitäts- und Therapiestudie. A: Geringe Belastung, B: Mittlere Belastung; C: Schwere Belastung, E/D/T: Sofortige Tötung, Body condition BC 1: Maus ist abgemagert (Skelettstruktur extrem ausgeprägt), BC 2: Maus ist unterkonditioniert (Segmentierung der Wirbelsäule erkennbar), AT: Akute Toxizität, DW: Dosis-Wirkung, KG: Körpergewicht, Gew: Gewicht.

	<i>Kategorie</i>	
	AT	DW
Tumorspezifische Symptome subkutaner Tumoren		
Tumurlänge ≤ 10 mm, verschiebbar	–	A
Tumurlänge ≤ 10 mm, nicht verschiebbar	–	B
Aufgetriebener Leib, Ascites	–	B
Tumurlänge > 10 mm und ≤ 15 mm, verschiebbar	–	B
Tumurlänge > 10 mm und ≤ 15 mm, nicht verschiebbar	–	C
Tumurlänge > 15 mm	–	E
Tumorulzeration, Automutilation des Tumors	–	E
Behandlungsspezifische Symptome		
Hautirritationen o. Kratzstellen an Injektionsstelle, Haarverlust ≤ 1 cm ²	A	A
Großflächiger Haarverlust > 1cm ²	T	B
Lokale Entzündung o. Nekrosen an Injektionsstelle	B	B
Leicht flache Atmung	B	B
Torkeln oder Apathie oder deutlich flache Atmung < 48 h nach Behandlung	T	D
Gewicht und Body Condition Scoring		
Gewichtsverlust > 10 % (< 15 % des KG), Gew. zunehmend	A	A
Gewichtsverlust > 10 % (< 15 % des KG), Gew. gleichbleibend oder abnehmend	B	B
Gewichtsverlust > 15 % (< 20 % des KG), Gew. zunehmend	T	B
Gewichtsverlust > 15 % (< 20 % des KG), Gew. zunehmend, BC 2	T	C
Gewichtsverlust > 15 % (< 20 % des KG), Gew. gleichbleibend oder abnehmend	T	C
Gewichtsverlust > 20 % oder BC 1	T	E
Allgemeine Symptome		
Struppiges Fell oder Kratzstellen	A	A
Verlangsamte Reaktion oder Bewegung oder vermiedene Bewegung	A	A
Verminderte Nahrungsaufnahme	A	A
Tier isoliert sich	A	A
Hautfalten bleiben stehen, Dehydratation	B	B
Vorübergehende kauernde oder gekrümmte Haltung oder Zittern	B	B
Eingesunkene, trübe Augen oder Blässe an Augen, Ohren, Haut	T	B
Motorische Auffälligkeiten (Lähmungserscheinungen)	T	B
Oberflächliche Verletzungen	T	C
Wiederholte aber nicht ständig kauernde o. gekrümmte Haltung o. abnormale Körperhaltung	T	D
Automutilation der Gliedmaßen	T	D
Blut an Körperöffnungen oder blutiger Kot	T	D
Systemische Infektionen	T	D
Ständig kauernde oder gekrümmte Haltung oder abnormale Körperhaltung	T	E
Torkeln oder Apathie oder deutlich flache Atmung	T	E
Paralyse	T	E
Rektumprolaps	T	E
Dunkle Verfärbung des Urins	T	E
Moribund	T	E

2.6.3 Dosis-Wirkungsbeziehung im Xenograft-Modell

Die Dosis-Wirkungsbeziehung von DPan wurde an 20–29 Wochen alten immundefizienten, weiblichen NMRI nu/nu Mäusen durchgeführt. Hierfür wurden 2×10^6 HCT116-Zellen in 100 μ L DMEM (mit 4.5 g/L D-Glucose, ohne L-Glutamin/Pyruvat) s.c. in die rechte Flanke der Maus gespritzt. Frau Dr. Nicole Niesler unterstützte bei der Fixierung der Tiere. Basierend auf den Ergebnissen früherer Arbeiten dieser Arbeitsgruppe wurde folgendes Spritzintervall gewählt [161, 162]: Zunächst wurden 50 μ L DPBS +/- SO1861 s.c. in die Nackenfalte gespritzt nach 1 h gefolgt von DPan, Panitumumab oder DPBS (als Negativkontrolle) in 50 μ L DPBS -/- i.v. in die *V.c.m.* **Tab. 2.6** listet die im Studienverlauf verwendeten Dosen, Zellzahlen und Stämme auf.

Die Mäuse wurden pseudo-randomisiert in die Versuchsgruppen eingeteilt mit dem Ziel einer gleichen durchschnittlichen Tumorgroße je Gruppe und einer gleichen Standardabweichung. Bei einer durchschnittlichen Tumorgroße (pro Gruppe) von 3.4 mm wurde die Behandlung gestartet und die Dosis zweimal wöchentlich mit insgesamt 8 Behandlungen injiziert. Die Mäuse wurden 5 Tage nach der letzten Behandlung euthanasiert und Blut, Organe sowie Tumore entnommen.

Tab. 2.6: Verwendete Dosen, Zellzahlen sowie Mausstamm für die akute Toxizität-Studie, Wachstumsrate und Dosis-Wirkungsbeziehung

Studie	Therapie	Zellzahl	Dosis [μg]	SO1861 [μg]	Tumor-modell	Maus [n]
Akute Toxizität	Pan	–	183–1 830	–	Balb/c	5
	DPan	–	57.87–183	–		9
	DPan/SO1861	–	5.79–183	15		9
Tumorwachstumsrate	–	1×10^6	–	–	Balb/c	3
	–	2×10^6	–	–		4
	–	4×10^6	–	–		3
Dosis-Wirkung	PBS/PBS	2×10^6	–	–	Xenograft, NMRI nu/nu	6
	Pan/PBS		2.82	–		8
	DPan/PBS		3.30	–		8
	DPan/SO1861		3.30	15		8

2.6.4 Histopathologische Untersuchung

Die histopathologische Untersuchung der entnommenen Organe und Tumore erfolgte am Berliner Referenzzentrum für Lymphom- und Hämatopathologie unter der Leitung von Herrn Prof. Horst Dürkop.

Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Tumor wurden hierfür von mir in Einbettkassetten überführt und in 10 % neutral gepuffertem Formalin (4 % Formaldehyd) fixiert. Anschließend wurden diese in Paraffin eingebettet, geschnitten und angefärbt (Hämatoxylin-Eosin HE). Der Leberindex als Maß für die Schwere der Schädigung wurde nach Batts und Ludwig [163] bestimmt. Eine milde Schädigung mit Index 1 steht für eine zytoplasmatische Degeneration der Hepatozyten und einer Nekrose von nicht mehr als vier Einzelzellen pro mm^2 , eine mäßige Schädigung mit Index 2 steht für eine hydropische Veränderung von Hepatozyten mit Nekrosen von nicht mehr als 10 Einzelzellen pro mm^2 während schwere Schädigungen von Grad 3 eine Nekrose von mehr als 10 Hepatozyten pro mm^2 bis hin zu einer verlängerten Nekrose anzeigen. Die Bestimmung des Expressionslevels von EGFR sowie des Proliferationsmarkers KI-67 im Innern des Tumors erfolgte mittels immunhistochemischer Anfärbung (anti-EGFR/-Ki-67 IgG, Titer 1:200) nach Angaben des Herstellers.

2.6.5 Bestimmung der Blutparameter

Die leber- sowie nierenspezifischen Parameter Alaninaminotransferase (ALT), Aspartataminotransferase (AST) und Kreatinin wie auch der für Zellschäden repräsentative Wert der Lactatdehydrogenase (LDH) wurden aus Heparin-Plasma der Mäuse bestimmt (Cobas 8000, Labor Berlin). Dafür wurde das den Mäusen entnommene Blut in Heparin beschichtete Küvetten überführt und nach 30 min Inkubation bei 20 °C zentrifugiert ($4\,000 \times g$, 20 °C). Das überstehende Plasma wurde entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen der Probe bei Raumtemperatur wurde diese erneut zentrifugiert ($4\,000 \times g$, 15 min, 20 °C), der Überstand in Mikrogefäße überführt und analysiert, wobei im Falle von für die Messung nicht ausreichend vorhandenem Volumen das Plasma 1:2 oder 1:3 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt wurde.

2.6.6 Biodistribution und Bildgebung über SPECT/CT

Da die Biodistribution des Immunotoxins DPan *in vivo* bisher nicht bekannt ist, wurde diese über Radionuklidmarkierung mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ am *Berlin Experimental Radionuclide Imaging Center* untersucht. Die i.v. Injektion der Radionuklid markierten Proteine sowie die Messung am *Single Photon Emission Computed Tomography/Computer-Tomographiegerät* (SPECT/CT,

nanoSPECT/CTplus, Bioscan/Mediso) wurden von Dr. Nicola Beindorff durchgeführt. Hierfür wurde 22–30 Wochen alten NMRI-nu/nu Mäusen 3×10^6 Zellen in 100 μL DMEM (mit 4.5 g/L D-Glucose, ohne L-Glutamin/Pyruvat) s.c. in die rechte Flanke gespritzt und der Versuch 14 Tage nach der Injektion begonnen. Die Injektion von 100–150 μL $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markierten Protein (**Tab. 2.7**) erfolgte i.v. unter Isofluran-Narkose über einen Schwanzvenenkatheter, welcher vor und nach der Injektion mit 50 μL DPBS gespült wurde. Ein Ganzkörper-CT sowie -SPECT unter Isofluran-Narkose wurde 1, 3 sowie 18 h post Injektion aufgenommen und die Tiere nach der letzten Messung euthanasiert. Daraufhin wurden Tumor, Blut, Herz, Niere, Leber, Milz, Lunge, Dick- und Dünndarm sowie Muskelgewebe entnommen und am γ -Counter (Perkin Elmer, 1480-11 Wizard 3) auf Reststrahlung [counts/min] untersucht.

Tab. 2.7: Dosen und Radioaktivität der im SPECT/CT untersuchten Proteine.

Protein	Dosis [μg]	Ausgangsaktivität [MBq]			Gespritzte Aktivität [MBq]		
D(H)Pan	43.55	255.7	274.5	275.5	12.11	26.33	19.77
DPan(H)	45.67	240.4	275.2	262.5	6.66	15.30	6.06
DPan	49.54	257.9	275.7	274.6	6.80	11.97	5.21
Pan(H)	400		100.18		8.53	7.30	8.78

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse von Dianthin

Die eindeutige Identifizierung der cDNA von Dianthin war Voraussetzung für die Expression von Dianthin. Nach erfolgreicher Plasmidpräparation von pET11d-*His*Dianthin wurde dieses mit den Primern Seq.AT1f/AT1r, welche spezifisch an die die cDNA (Dianthin) umschließende DNA-Abschnitte im Plasmid binden, sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab eine 99.61 %ige Übereinstimmung (**Abb. 3.1**) im Vergleich mit der für Dianthin-30 aus

```
Seq1 1   GCGGCCACAGCATAACATTAATCTCGCAAATCCATCCGCGAGTCAATACTCATCTTTT 60
      |
Seq2 1   GCGGCCACAGCATAACATTAATCTCGCAAATCCATCCGCGAGTCAATACTCATCTTTT 60
Seq1 61   CTGGATCAAATCCGAAACAATGTGAGGGATACCAGCCTCATATACGGTGGGACAGACGT- 119
      |
Seq2 61   CTGGATCAAATCCGAAACAATGTGAGGGATACCAGCCTCATATACGGTGGGACAGACGTA 120
Seq1 120  -CGAAGTGATTGGTGCGCCTTCTACTACTGATAAATTCCTTAGACTTAATTTCCAAGGTC 178
      |
Seq2 121  GCC--GTGATTGGTGCGCCTTCTACTACTGATAAATTCCTTAGACTTAATTTCCAAGGTC 178
Seq1 179   CTCGAGGAACGGTCTCTCTTGGCCTTAGGCGCGAGAACTTATACGTGGTCGCGTATCTTG 238
      |
Seq2 179   CTCGAGGAACGGTCTCTCTTGGCCTTAGGCGCGAGAACTTATACGTGGTCGCGTATCTTG 238
Seq1 239   CAATGGATAACGCAAATGTTAACCGTGCATATTACTTCAAAAACCAAATCACTTCTGCTG 298
      |
Seq2 239   CAATGGATAACGCAAATGTTAACCGTGCATATTACTTCAAAAACCAAATCACTTCTGCTG 298
Seq1 299   AGTTAACCGCCCTTTTCCCCGAGGTTGTGGTTGCAAATCAAAAACAATTAGAGTACGGGG 358
      |
Seq2 299   AGTTAACCGCCCTTTTCCCCGAGGTTGTGGTTGCAAATCAAAAACAATTAGAGTACGGGG 358
Seq1 359   AAGATTACCAGGCGATAGAAAAGAACGCCAAGATAACAACAGGCGATCAAAGTAGAAAGG 418
      |
Seq2 359   AAGATTACCAGGCGATAGAAAAGAACGCCAAGATAACAACAGGCGATCAAAGTAGAAAGG 418
Seq1 419   AACTCGGTTTGGGGATCAATCTACTTATAACGATGATTGATGGAGTGAATAAGAAGGTAC 478
      |
Seq2 419   AACTCGGTTTGGGGATCAATCTACTTATAACGATGATTGATGGAGTGAATAAGAAGGTAC 478
Seq1 479   GTGTAGTCAAAGACGAGGCAAGGTTTTTGTTAATCGCAATTCAAATGACGGCTGAGGCCG 538
      |
Seq2 479   GTGTAGTCAAAGACGAGGCAAGGTTTTTGTTAATCGCAATTCAAATGACGGCTGAGGCCG 538
Seq1 539   CGCGATTTAGGTACATACAGAACTTGGTTACCAAGAACTTCCCAAACAAGTTCGACTCAG 598
      |
Seq2 539   CGCGATTTAGGTACATACAGAACTTGGTTACCAAGAACTTCCCAAACAAGTTCGACTCAG 598
Seq1 599   AAAATAAGGTTATTCAATTTCAAGTTAGTTGGAGTAAGATTTCTACGGCAATATTTGGGG 658
      |
Seq2 599   AAAATAAGGTTATTCAATTTCAAGTTAGTTGGAGTAAGATTTCTACGGCAATATTTGGGG 658
Seq1 659   ATTGCAAAAACGGCGTGTTTAATAAAGATTATGATTTCCGGGTTTGGGAAAGTGAGGCAGG 718
      |
Seq2 659   ATTGCAAAAACGGCGTGTTTAATAAAGATTATGATTTCCGGGTTTGGGAAAGTGAGGCAGG 718
Seq1 719   CAAAAGACCTTCAAATGGGGCTCCTTAAGTATTTAGGTAGACCGAAG 765
      |
Seq2 719   CAAAAGACCTTCAAATGGGGCTCCTTAAGTATTTAGGTAGACCGAAG 765
```

Abb. 3.1: cDNA-Sequenz von Dianthin. Die nach der Midipräparation vervielfältigte, mit dem Vorwärts- und Rückwärtsprimer Seq.ATf1 / Seq.ATr1 sequenzierte Dianthin-cDNA (Seq2, grüne Schrift) ergab nach Vergleich mit dem in der Datenbank *Basic Local Alignment Search Tool BLAST* hinterlegtem Gen für *D. Caryophyllus dia 30* (Sequenz-ID: 59260.1; in der Abbildung Seq1) eine 99.61 %ige Übereinstimmung (*Query*: 14529), die Nukleinbasen ohne Übereinstimmung sind mit rot gekennzeichnet.

D. Caryophyllus publizierten cDNA. Die festgestellte Abweichung ist bereits bekannt, wobei es sich hierbei um einen Austausch von GAA (Glutaminsäure E) zu GCC (Alanin A) handelt [164, 165]. Basierend auf der eindeutigen Identifizierung konnte das präparierte Plasmid für die Herstellung des Proteins Dianthin in dem Expressionsstamm *E. coli* NiCo21(DE3) genutzt werden.

3.2 Expression und Reinigung von Dianthin

Neben Dianthin werden von dem Bakterium *E. coli* auch bakterielle Proteine exprimiert. Da Dianthin einen His-Tag (Sequenz mit sechs Histidinen) besitzt, kann eine Reinigung der Proteinlösung *via* IMAC erfolgen (2.3.2) [166]. Der Bakterienstamm *E. coli* NiCo21(DE3) erlaubt zudem einen weiteren Reinigungsschritt über Chitin-Affinitätschromatographie. Hierbei wurden die nativen Gene der Proteine ArnA (82 kDa), SlyD (35 kDa) und Can (32 kDa) durch künstliche, zusätzlich die Chitin bindende Domäne als Fusionsanteil tragende Gene ersetzt [167]. **Abb. 3.2** zeigt die zweistufige affinitätschromatographische Aufreinigung von Dianthin über **A**) IMAC und **B**) Chitin in einem SDS-PAGE Gel (12 %) unter reduzierenden Bedingungen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie Brilliantblau-Färbung. Ein Großteil der bakteriellen Proteine wurde im ersten Schritt (**A**) entfernt und zeigt sich im Säulendurchlauf (FT) sowie der Waschfraktion 1 (W1). Dianthin (roter Kasten, ~30 kDa) und noch verbliebene bakterielle Proteine mit einer Histidin reichen Sequenz (SlyD, AmA, Can) wurden mit 125 und 500 mM Imidazol (E1, E2) eluiert, wobei Dianthin auch im Durchlauf und den Waschfraktionen W1–5 zu erkennen war. Für die anschließende Chitin-Affinitätschromatographie (**B**) wurden die Fraktionen E1/1–2 und E2/1 vereint und gegen

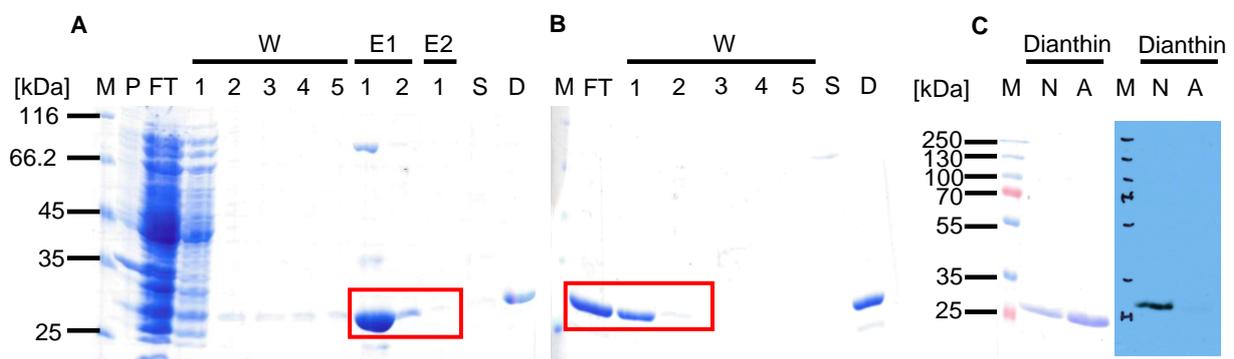


Abb. 3.2: IMAC (A) und Chitin-Affinitätschromatographie (B) von Dianthin. Detektion der Proteinbanden von Dianthin (D, ~ 30 kDa, roter Kasten) nach Aufreinigung über IMAC (A) und Chitin-Affinitätschromatographie (B) sowie finales Dianthin (C, ~ 0.5 mg/mL) unter reduzierenden Bedingungen im Coomassie gefärbten 12 % Polyacrylamid-Gel (A, B, C) sowie Westernblot (C, anti-His^(*)). Abkürzungen: M, *unstained Protein MW Marker* für Coomassie Brilliantblau-Färbung (Thermo Scientific), *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); P, Zellpellet nach Zellyse; FT, Durchlauf; W, Waschfraktionen (20 mM Imidazol); E, Elutionsfraktionen (E1/2, 125/250 mM Imidazol); S, Säulenmaterial; N, Neu; A, Alt; (*), HRP-konjugierter Antikörper.

CBD-Puffer dialysiert. Dianthin wurde erfolgreich als saubere Proteinlösung im Durchlauf (FT) und den Waschfraktionen W1–2 (roter Kasten) eluiert, dabei verblieben bakterielle Proteine auf der Chitin-Säule (S).

Die erfolgreiche Expression mit anschließender Reinigung von Dianthin wurde final in einem Polyacrylamid-Gel mittels Coomassie Brilliantblau-Färbung und Westernblot mit einem direkt HRP markierten His-Antikörper verifiziert (**Abb. 3.2 C**, ~30 kDa). Dianthin konnte nachfolgend charakterisiert und für weiterführende Versuche modifiziert werden.

3.3 Molekularer Extinktionskoeffizient von Dianthin

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein bestimmen maßgeblich das Absorptionsverhalten eines Proteins in Lösung, folglich ist der molare Extinktionskoeffizient ϵ für jedes Protein spezifisch und von dessen Aminosäurezusammensetzung abhängig. Die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ von Dianthin erfolgte wie in **2.4.2** beschrieben. Die Auftragung der Absorption in Abhängigkeit von der Konzentration (mol/L) ermöglichte die Erstellung einer linearen Regression, wobei der Wert der Steigung den Wert für ϵ darstellt. Wie in **Abb. 3.3** zu sehen wurde für Dianthin ein ϵ mit $20\,823\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt.

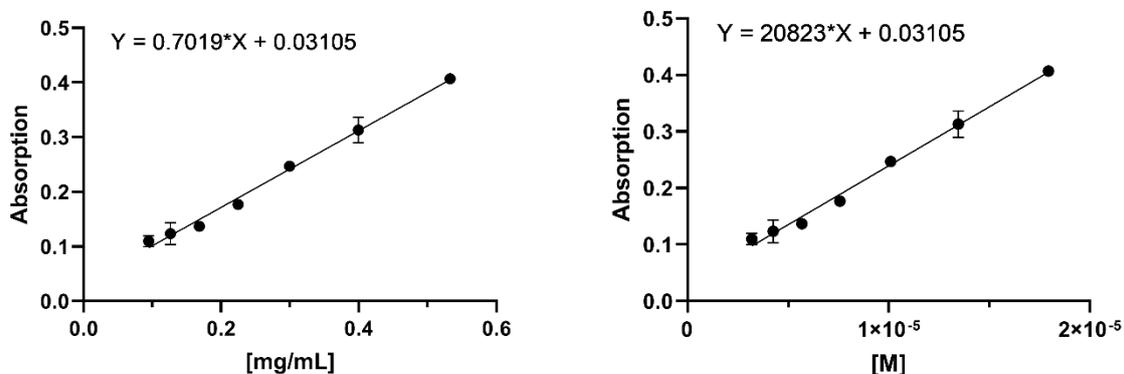


Abb. 3.3: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) von Dianthin. Gemessen wurde die Absorption in Triplikaten ($\lambda = 280\text{ nm}$, NanoDrop® 1000) in Abhängigkeit von der Dianthinkonzentration (in mg/mL sowie $M = \text{mol/L}$). Die Steigung der Geraden (lineare Regression, GraphPad Prism8) stellt $\epsilon = 20\,823\text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dar.

Grund für den Versuch war, Modifizierungen von Dianthin mit Molekülen wie Farbstoffen oder Linkern quantifizieren zu können. Bei Kenntnis von ϵ und der gemessenen Absorption kann so der Modifizierungsgrad, also das Verhältnis vom modifizierenden Molekül (Farbstoff, Linker etc.) zum modifizierten Molekül (Dianthin), über die Formel in **2.4.6** bestimmt werden.

3.4 Modifizierung mit HYNIC und Cy3

Die freien Aminogruppen der Lysine von Dianthin und Panitumumab sind für die Modifikationen in Vorbereitung für die Kopplungsreaktionen besonders essenziell. Dies gilt für die Herstellung des eigentlichen Konjugates als auch für die Radionuklid markierten Konjugate, wobei die Modifikation mit HYNIC eine Grundvoraussetzung für die Radionuklidmarkierung mit ^{99m}Tc für folgende *In-vivo*-Versuche ist. Um sicherzustellen, dass nach der Derivatisierung mit HYNIC noch freie Aminogruppen für die Reaktion des SPDP-Linkers für die Kopplungsreaktion zur Verfügung standen, wurde Dianthin und Panitumumab sowie die HYNIC-Analogen D(H) und Pan(H) mit dem Amin reaktiven Farbstoff Cy3 markiert (**Abb. 3.4 A**). Die Messung der Absorption bei 550 nm ergab, dass durch die HYNIC-Modifizierung zwar weniger, aber noch freie Aminogruppen (rosa Balken) vorhanden waren. So nahm das Verhältnis von Cy3 / Dianthin um 0.68 (75 %) und Cy3 / Pan um 0.69 (41 %) ab. Der Nachweis der erfolgreichen HYNIC-Modifizierung erfolgte im 2-sBA-Assay, in welchem das an das Protein gebundene Hydrazin mit 2-sBA ein spektrophotometrisch bei 350 nm detektierbares Bis-Arylhydrazon ausbildet (**Abb. 2.2**). Das Verhältnis von HYNIC / Dianthin und HYNIC / Panitumumab war 2.56 bzw. 8.3, dabei erhielt man für die Kontrollen (nicht HYNIC modifizierte Proteine mit 2-sBA) ein Hintergrundsignal von 0.37

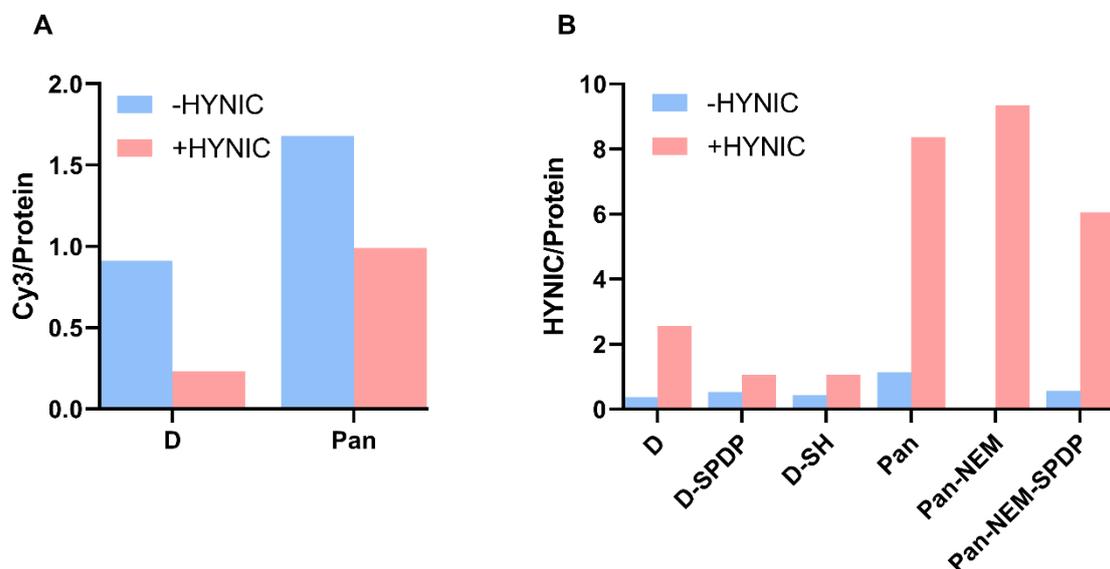


Abb. 3.4: Derivatisierungsgrad von HYNIC und Cy3 modifiziertem Protein. Berechnung von HYNIC und Cy3 pro Protein erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Formel in Abschnitt 2.4.6). Verglichen wurden Dianthin (D), Panitumumab (Pan), Maleimid geschütztes Panitumumab (Pan-NEM), Pyridylthiol-aktivierte Proteine (D-/Pan-NEM-SPDP) und Sulfhydryl-aktiviertes Dianthin (D-SH) mit dem jeweiligen HYNIC derivatisiertem Analogon (B) sowie Dianthin mit D-Cy3 und Panitumumab mit Pan-Cy3 (A). Erfolgreiche Modifizierung mit HYNIC wurde im 2-sBA-Assay spektrophotometrisch bei 350 nm nachgewiesen; Cy3 modifiziertes Protein besaß eine Absorption bei 550 nm (NanoDrop 1 000).

bzw. 1.13. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass im Laufe der Kopplungsreaktion die HYNIC-Funktion in D(H)-SPDP, D(H)-SH und Pan(H)-NEM, Pan(H)-NEM-SPDP weiterhin zugänglich war (**Abb. 3.4 B**, Vergleich blauer mit rosa Balken).

3.5 Biokonjugation zur Erzeugung von DPan, D(H)Pan, DPan(H)

Die Konjugation von Dianthin an Panitumumab wurde über den bifunktionellen Linker SPDP ermöglicht. Um eine Kreuzreaktionen von Panitumumab mit sich selbst zu unterbinden wurden zunächst dessen freie Sulfhydrylgruppen mit NEM (Pan-NEM) blockiert, anschließend erfolgte die Modifizierung mit SPDP (Pan-NEM-SPDP). Das mit SPDP derivatisierte Dianthin (D-SPDP) konnte nach Reduktion mit DTT zu D-SH nukleophil Pan-NEM-SPDP angreifen, woraufhin Dianthin und Panitumumab über eine Disulfidbrücke verknüpft werden konnten (DPan). Mit den HYNIC modifizierten Proteinen D(H) und Pan(H) wurde analog verfahren (D(H)Pan, DPan(H)). Die Reaktionszeit der Kopplung von Dianthin und Panitumumab (DPan) wurde ausführlich in der Masterarbeit von Lea Sophie Günther [168] analysiert, nicht aber für D(H)Pan und DPan(H). Um eine abweichende Reaktionskinetik ausschließen zu können, wurde diese im direkten Vergleich zu DPan untersucht. **Abb. 3.5** zeigt den Fortschritt der Kopplungsreaktion von DPan, D(H)Pan und DPan(H) nach 1.5 h, 18 h (**A, C, D**) und 2 Tagen (**B**). Die Detektion der Proteinbanden erfolgte im Polyacrylamidgel (7.5/12 %) über Coomassie Brilliantblau-Färbung sowie mittels Westernblot mit einem direkt HRP markierten Antikörper. Hier erfolgte die Detektion von Dianthin (**Abb. 3.5 C**) über einen His-Antikörper und die von Panitumumab über einen Human-Antikörper (**Abb. 3.5 D**), wobei DPan über beide Antikörper detektiert werden konnte. Nach 18 h war anteilmäßig mehr Konjugat sichtbar als nach 1.5 h (roter Kasten), vor allem im Bereich höherer Konjugate. Hingegen war nach zwei Tagen deutlich weniger Konjugat aber dafür neue Fragmentierungsbanden bei ~50 kDa und <25 kDa erkennbar (**Abb. 3.5 B**). Die Bandenintensität nahm dabei von DPan über DPan(H) zu D(H)Pan ab. Als Kontrollen dienten Dianthin, D-SH (**A**), D(H)-SH (**B**), Panitumumab, Pan-NEM-SPDP (**A**), Pan(H)-NEM-SPDP (**B**).

Um Proteinpräzipitation zu vermeiden aber dennoch genügend Konjugat pro Kopplung gewinnen zu können wurde für D(H)Pan und DPan(H) die Reaktionszeit auf 2 h gesetzt, die für DPan verblieb bei 1 h [168].

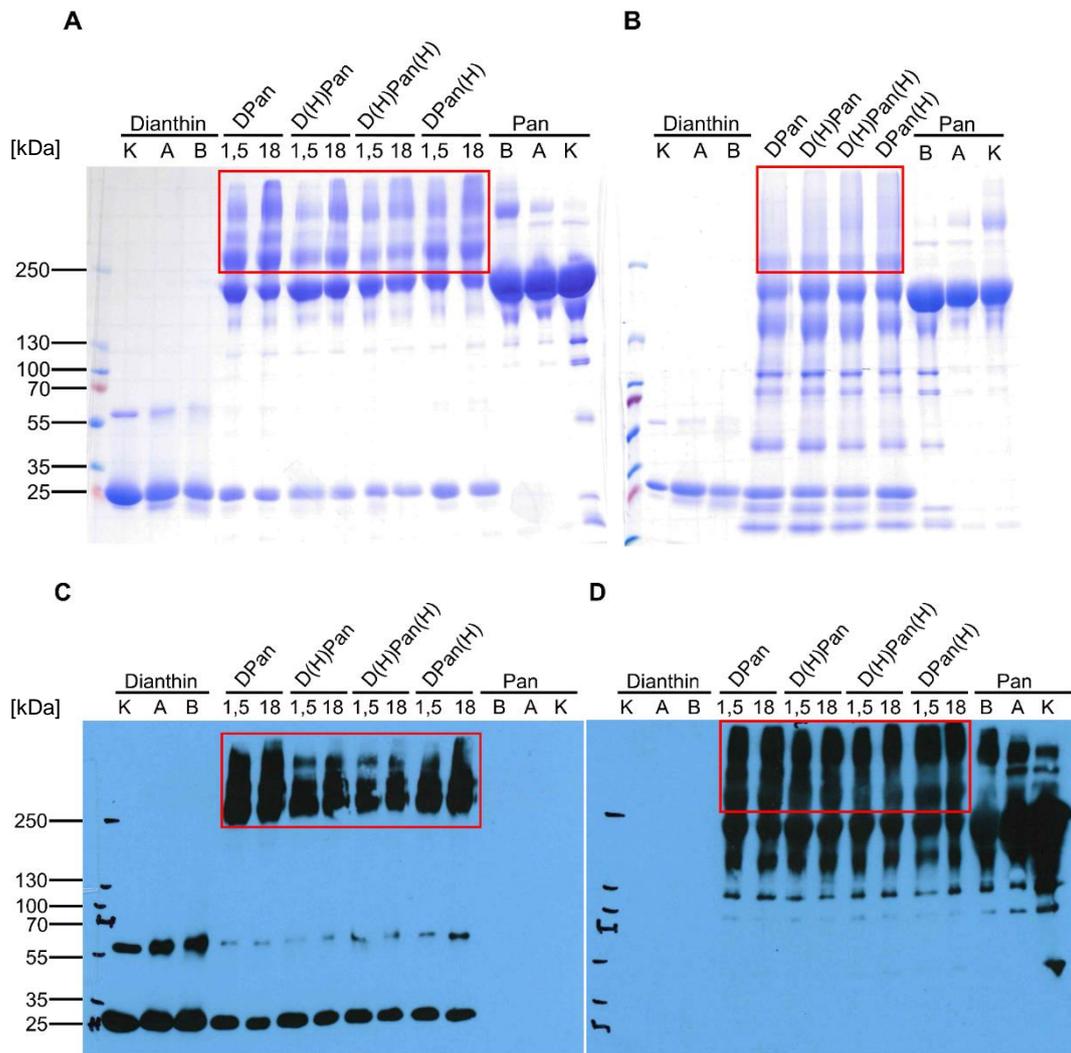


Abb. 3.5: Inkubationszeiten der Reaktionsgemische DPan, D(H)Pan, D(H)Pan(H), DPan(H). Dianthin, D(H), Panitumumab, Pan(H) sowie die Konjugate (rote Box) nach verschiedenen Reaktionszeiten (1.5, 18 h (A), 2 d (B), 20 °C, 800 rpm) wurden in einem zweiphasigen [7.5/12%] SDS-PAGE Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen analysiert und *via* Coomassie Brilliantblau-Färbung (A, B) und Westernblot (C: anti-His*, D: anti-Human*) visualisiert. Dianthin (~ 30 kDa) und Panitumumab (~ 150 kDa) wurden als Kontrollen mitgeführt. Marker: *PageRuler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific. Abkürzungen: A, Sulfhydryl-aktiviertes Protein D-SH sowie Pyridylthiol-aktiviertes Protein Pan-NEM-SPDP; B, HYNIC modifiziertes Protein (D(H)-SH, Pan(H)-NEM-SPDP); *, HRP-konjugierter Antikörper.

Die Reinigung der Konjugate DPan, D(H)Pan und DPan(H) von nicht reagiertem Dianthin, D(H), Panitumumab und Pan(H) erfolgte in einem Zweistufen-System. Zuerst wurde mittels Protein A-Affinitätschromatographie (wie in 2.3.4 beschrieben) Dianthin, welches keine Affinität zu Protein A besitzt, entfernt. Panitumumab konnte *via* IMAC entfernt werden, da dieses im Gegensatz zu Dianthin keinen His-Tag besitzt und somit keine Affinität zum Säulenmaterial aufweist. **Abb. 3.6** zeigt das Ergebnis der Aufreinigung von DPan, D(H)Pan und DPan(H) über Protein A-Affinitätschromatographie (A: SDS-PAGE, Coomassie Brilliantblau Färbung) und IMAC (B: Westernblot, anti-Human(*)). Bezüglich des Reinigungsschritt über Protein A befand sich nicht reagiertes Dianthin im Durchlauf (FT) sowie

den Waschfraktionen W1–3. Die gleichen Fraktionen enthielten zusätzlich geringe Anteile an Antikörper und Konjugat. Die das Konjugat (roter Kasten) enthaltenen Elutionsfraktionen E1–3 wurden gepoolt und mittels IMAC weiter gereinigt. Hier eluierten die Konjugate ab einer Imidazolkonzentration von 31 mM, hauptsächlich ab der dritten Fraktion 31 / 3. In den Fraktionen, die mit 250 und 500 mM Imidazol eluiert wurden, war anteilmäßig wesentlich weniger Konjugat sichtbar, da bereits mit 62 nM der Hauptteil an Konjugat eluiert wurde. Im Durchlauf und den Waschfraktionen W1–5 konnten sowohl freie Antikörper (~200 kDa) als auch nicht an die Ni-NTA gebundenes Konjugat (>250 kDa) mit absteigender Intensität nachgewiesen werden.

Ferner wurde für Dianthin wie auch Panitumumab untersucht, ob die Modifizierungsschritte mit HYNIC, NEM, SPDP und die anschließende DTT-Reduktion einen Einfluss auf das Laufverhalten des Proteins hatte. **Abb. 3.7** zeigt die Analyse der Kopplungszwischenstufen *via* SDS-PAGE (**A**: 7.5 / 12 %) und Westernblot (**B**: anti-His(*) und **C**: -Human(*)). Für Dianthin waren weder im Gel noch im Westernblot Unterschiede in Abhängigkeit der Modifikationen sichtbar (Vergleich Dianthin—D-SPDP—D-SH—D(H)—D(H)-SPDP—D(H)SH). Die Bande bei ~60 kDa stellt lediglich das Dianthin-Dimer dar. Im Fall von Panitumumab führte die Modifikation mit HYNIC (Pan(H)) und NEM (Pan-NEM) zu einem leicht veränderten Laufverhalten im Gel, das sich als eine schmierige Proteinbande manifestierte. Darüber hinaus wurde bei 100–130 kDa eine deutliche Proteinbande detektiert. Ein Vergleich der Konjugate DPan—D(H)Pan—DPan(H) (Marker >250 kDa) miteinander zeigte hier keine nennenswerten Unterschiede.

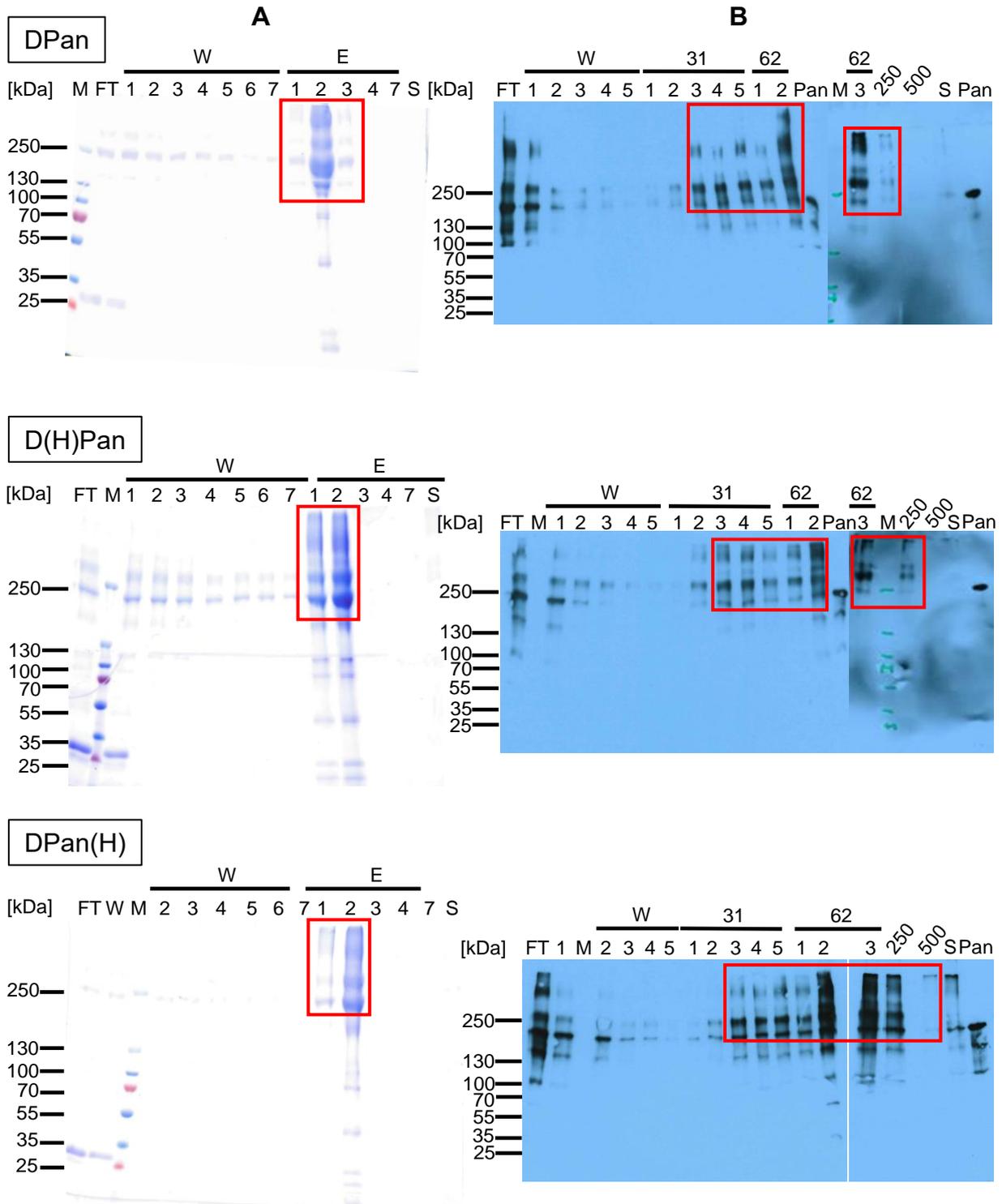


Abb. 3.6: Ergebnis der Protein A-Affinitätschromatographie und darauffolgender IMAC-Reinigung der Konjugate. DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurden von freiem Dianthin (~ 30 kDa) *via* Protein A-Affinitätschromatographie (Coomassie Brilliantblau-Färbung) und von Panitumumab (~ 150 kDa) mittels IMAC (Westernblot, anti-Human^(*)) abgetrennt. SDS-PAGE wie in **Abb. 3.5** beschrieben. Die Konjugate (>250 kDa, rote Box) wurden jeweils mit 100 mM Glycin pH 2.9 (Protein A) bzw. einem steigenden Imidazolgradienten 31–500 mM (IMAC) eluiert. Abkürzungen: FT, Durchlauf; W, Waschfraktionen; E, Elutionsfraktionen; M, *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific); (*), HRP-konjugierter Antikörper; Pan, Panitumumab; S, Säulenmaterial.

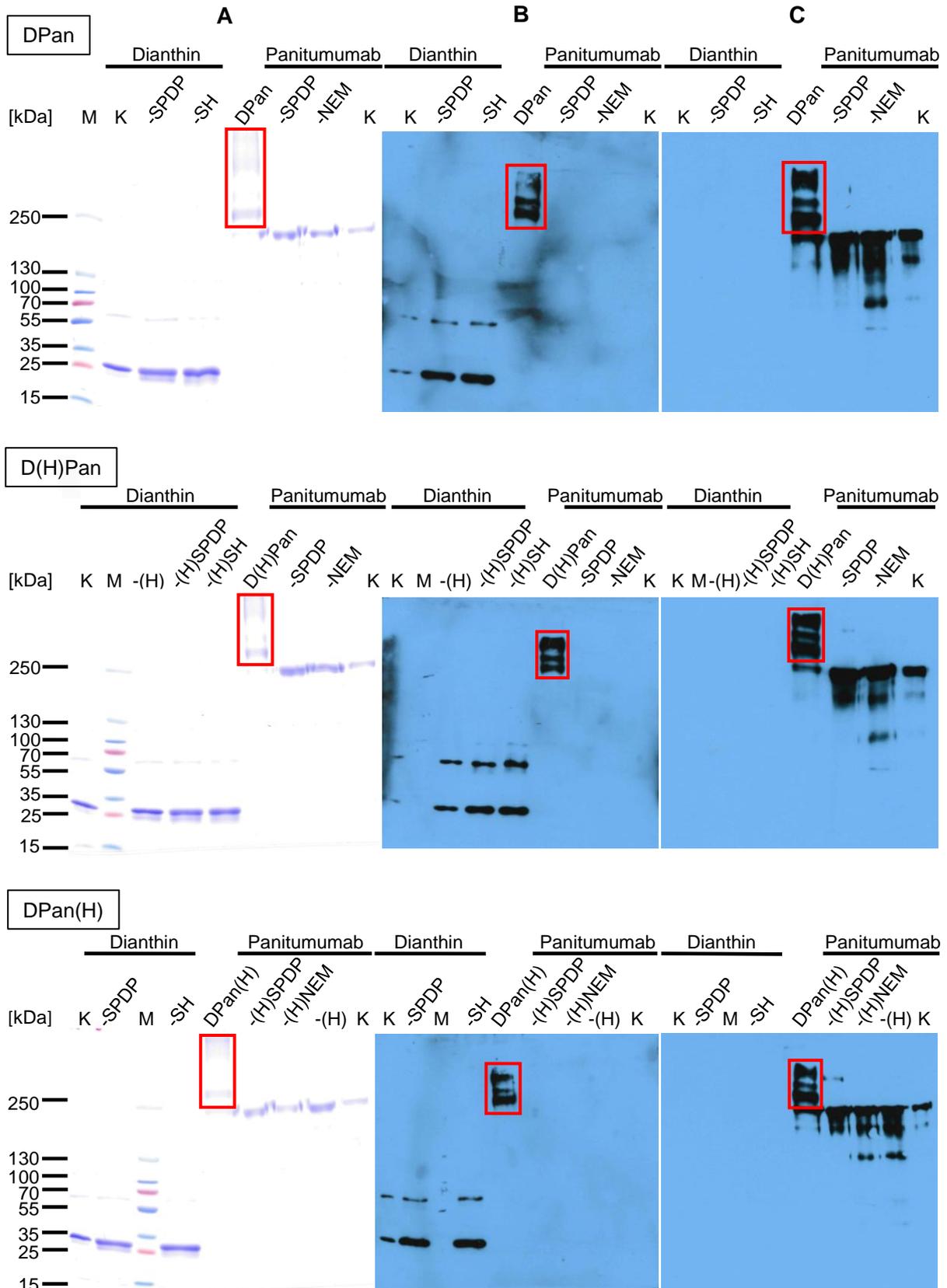


Abb. 3.7: Einzelne Reaktionsschritte der Konjugation. Dargestellt sind die Analysen (wie in Abb. 3.5) mittels SDS-PAGE (A) und Westernblot (B, anti-His*; C, anti-Human*) der HYNIC modifizierten (H), Pyridylthiol/Sylfhydryl aktivierten (-SPDP/-SH), Maleimid geschützten (-NEM) Proteine und gereinigte Konjugate (>250 kDa, rote Box) DPan, D(H)Pan, DPan(H). Abkürzungen: M, *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific).

Die finale Analyse der Konjugate DPan, D(H)Pan und DPan(H) mittels SDS-PAGE (A) und Westernblot (B) His(*) und C) Human(*)), zu sehen in **Abb. 3.8**, bestätigte die erfolgreiche Trennung von nicht gebundenem Dianthin aus den Konjugationslösungen. Freies Panitumumab mit ~150 kDa wurde lediglich in Spuren (Marker bei 250 kDa) detektiert. Pro Kopplung wurden für alle Konjugate jeweils 200–250 µg gereinigtes Immunotoxin erhalten.

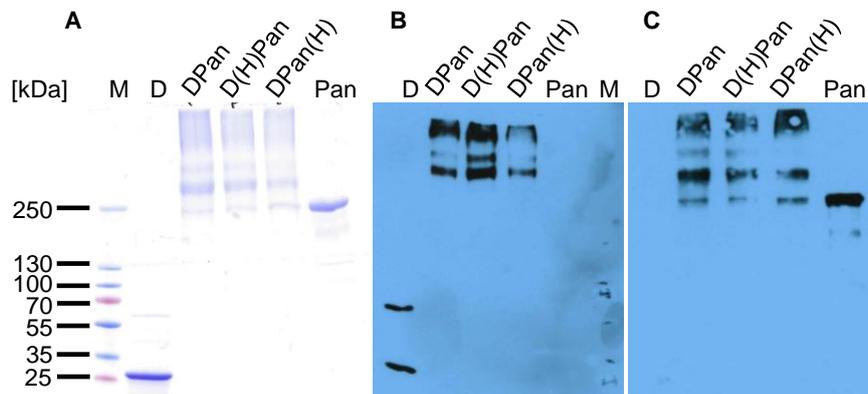


Abb. 3.8: Finale Analyse von DPan, D(H)Pan, DPan(H). Die erfolgreiche Konjugation und Aufreinigung von DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurde mittels SDS-Page [7.5/12 %] analysiert und mit Coomassie Brilliantblau-Färbung (A) sowie Westernblot detektiert. Dianthin (D, ~ 30 kDa) sowie Konjugat wurden mit His(*) (B) und Panitumumab (~ 150 kDa) sowie Konjugat mit Human(*) (C) detektiert. Dianthin sowie Panitumumab dienen als Kontrollen.

In Vorbereitung auf die Zellkultur- und *In-vivo-Versuche* wurden die Konjugate im nächsten Schritt bezüglich ihrer molekularen Masse, enzymatischen Aktivität und ihres Bindungsverhaltens an das Zielmolekül EGFR untersucht.

3.6 Charakterisierung von DPan, D(H)Pan und DPan(H)

3.6.1 Molekulare Masse der Immunotoxine

Ein wesentliches Charakteristikum von ADCs ist deren Verhältnis von Wirkstoff zu Antikörper (DAR). So hängen Pharmakokinetik, Wirksamkeit und Toxizität effektiv mit diesem zusammen. Die molekulare Masse von DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurde mittels MALDI-TOF-MS über die *Dried Droplet*-Methode analysiert. Zusätzlich kann hier eine Abschätzung des DARs erfolgen. **Abb. 3.9** zeigt exemplarisch das Spektrum einer Kopplung von DPan (A), D(H)Pan (B) und DPan(H) (C), in welchem die Intensität in Abhängigkeit von Masse zur Ladung (m/z) dargestellt ist. Je nach Kopplung variierte die molekulare Masse der Konjugate (roter Pfeil) zwischen 179 201–181 633 (DPan), 179 515–181 810 (D(H)Pan) und 180 962–181 089 g/mol (DPan(H)), was einem DAR von ~1 entspricht. Besonders muss hier betont werden, dass der theoretische Wert für DAR pro Kopplung kaum schwankte. Wie bereits zuvor

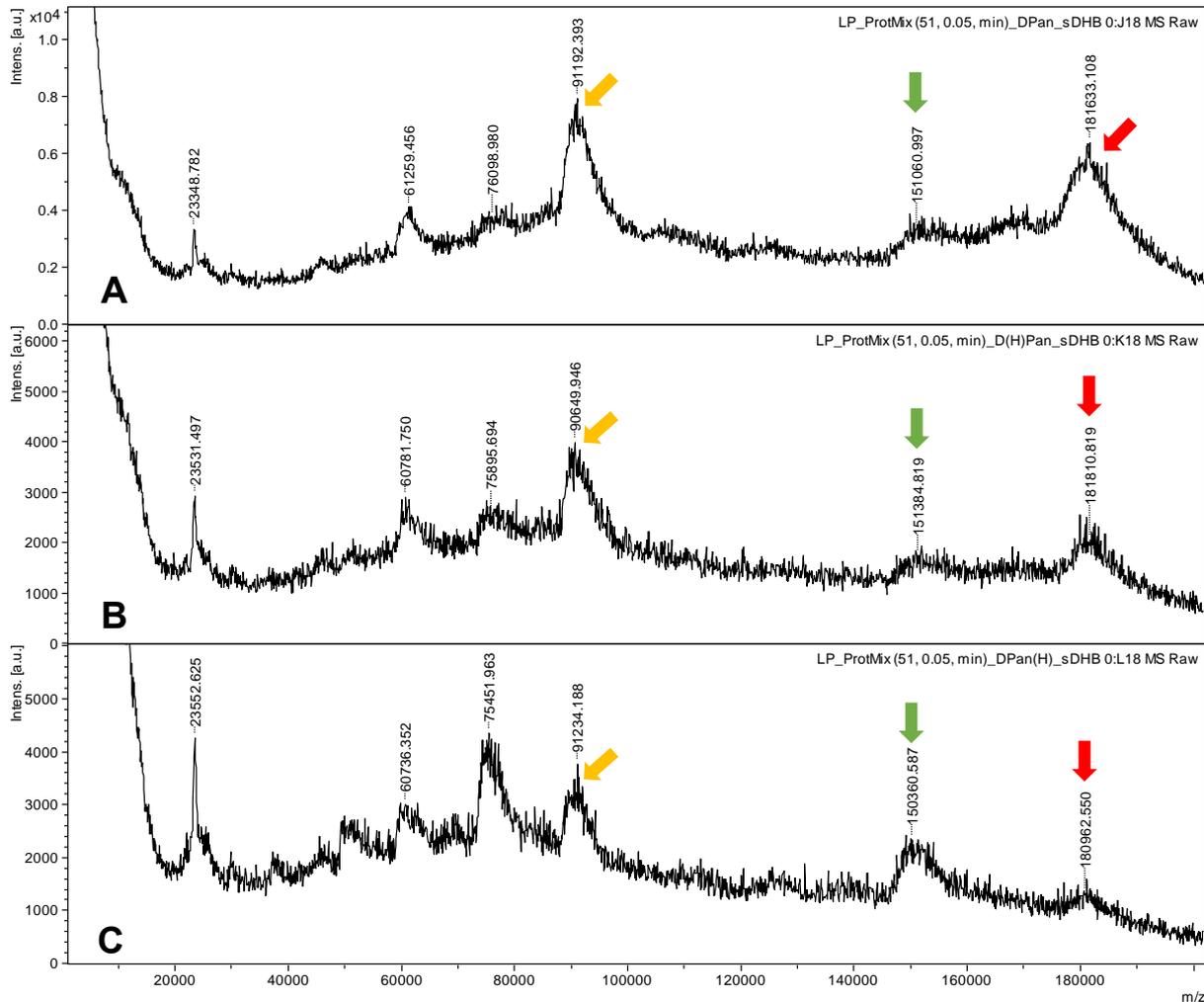


Abb. 3.9: Bestimmung der molekularen Masse via MALDI-TOF-MS. Die in Milli-Q Wasser entsalzten Konjugate DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurden 1:1 mit der Matrix Super-2,5-DHB auf den Träger aufgetragen (1 μ L). Die Messung (*Dried-Droplet-Methode*) erfolgte im *linear positive ion* (LP)-Modus. Das Spektrum ist exemplarisch für eine Kopplungsreaktion. Die Massen für DPan, D(H)Pan, DPan(H) (roter Pfeil) variierten je nach Kopplung zwischen 179 201–181 633, 179 515–181 810, 180 962–181 089 g/mol. Weiterhin gezeigt ist freies Pan (grüner Pfeil) und zweifach geladenes Konjugat (gelber Pfeil).

beschrieben (3.5) wurde auch hier freies Panitumumab bei 150 360–151 384 g/mol (grüner Pfeil) detektiert. Ferner konnte den Massen bei 91 192 (DPan), 90 649 (D(H)Pan) und 91 234 g/mol (DPan(H)) das jeweils zweifach geladene Konjugat zugeordnet werden.

3.6.2 Enzymatische Aktivität

Für die spätere Testung der Eingangshypothese in Zellkultur und *In-vivo*-Versuchen musste zunächst die enzymatische Funktion von Dianthin innerhalb der verschiedenen Kopplungsprodukte nachgewiesen werden. Die enzymatische Aktivität der Konjugate erfolgte dabei mittels eines Testverfahrens, das die Freisetzung von Adenin misst. Entscheidend war, ob nach der Kopplung an Panitumumab die enzymatische Funktion von Dianthin weiterhin vorhanden oder gegebenenfalls durch die Kopplung beeinträchtigt war. Für DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurde eine Aktivität von 153.5, 158.6 und 141.0 pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h bestimmt

(**Tab. 3.1**). Im Vergleich zu Dianthin mit 316.2 pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h bedeutet dies eine ungefähre Aktivitätshalbierung auf 48.5, 50.1 und 44.6 %. Ebenso wurde untersucht, ob die Modifikation von Dianthin mit HYNIC einen Aktivitätsverlust bedeutete. D(H) besaß eine Aktivität von 273.1 pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h und war somit um 13.6 % vermindert verglichen zu unmodifiziertem Dianthin. Panitumumab und BSA als Negativkontrollen führten zu einem Hintergrundsignal von 1.3 und 9.4 pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h (0.4 und 3.0 %).

Tab. 3.1: Enzymatische Aktivität der Konjugate. Die *N*-Glykosidaseaktivität von DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurde in einem *Adenine Release Assay* durch Messung des von Dianthin aus Heringssperma-DNA abgespaltenen Adenins bestimmt. Positivkontrolle: Dianthin (100 %); Negativkontrolle: Panitumumab und bovines Serumalbumin BSA.

Protein	[pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h]	[%]
Dianthin	316.2	100.0
D(H)	273.1	86.4
DPan	153.5	48.5
D(H)Pan	158.6	50.1
DPan(H)	141.0	44.6
Pan	1.3	0.4
BSA	9.4	3.0

3.6.3 Bindungsaffinität zu EGFR

Wie erläutert muss die enzymatische Aktivität von Dianthin im Konjugat erhalten bleiben. Für Panitumumab ist es dagegen von elementarer Bedeutung, weiterhin die Fähigkeit zu besitzen, an den Oberflächenrezeptor EGFR binden zu können. Mithilfe der Oberflächenresonanzspektroskopie wurde die Bindungsaffinität von Panitumumab, DPan, D(H)Pan, DPan(H) und Dianthin an ein rekombinant hergestelltes, humanes EGFR-Fc Chimera Protein bestimmt. **Abb. 3.10** zeigt die Sensogramme als Änderung der RU in Abhängigkeit von der Zeit. Plateausprünge in der Kurve stellen die Stufenweise Anpassung der Analytenkonzentration dar. Jeder Analyt wurde zweimal in direkt aufeinanderfolgenden Messungen analysiert, separiert von je einem Regenerations- und Waschlauflauf (PBS-EP) (durchgezogene Linie). Die Anpassungskurve (Fit) der beiden Messungen ist als gestrichelte Linie markiert und der K_D als Mittelwert der Einzelwerte (Fit 1 und Fit 2) angegeben. Für Panitumumab wurde eine Dissoziationskonstante K_D von 3.32×10^{-10} M bestimmt, welche sich im Rahmen der in

der Literatur angegebenen Werte von $0.5\text{--}3.4 \times 10^{-10} \text{ M}$ [169-171] befand. Für DPan, D(H)Pan und DPan(H) wurde ein K_D von 1.5, 2.9 bzw. $2.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ bestimmt.

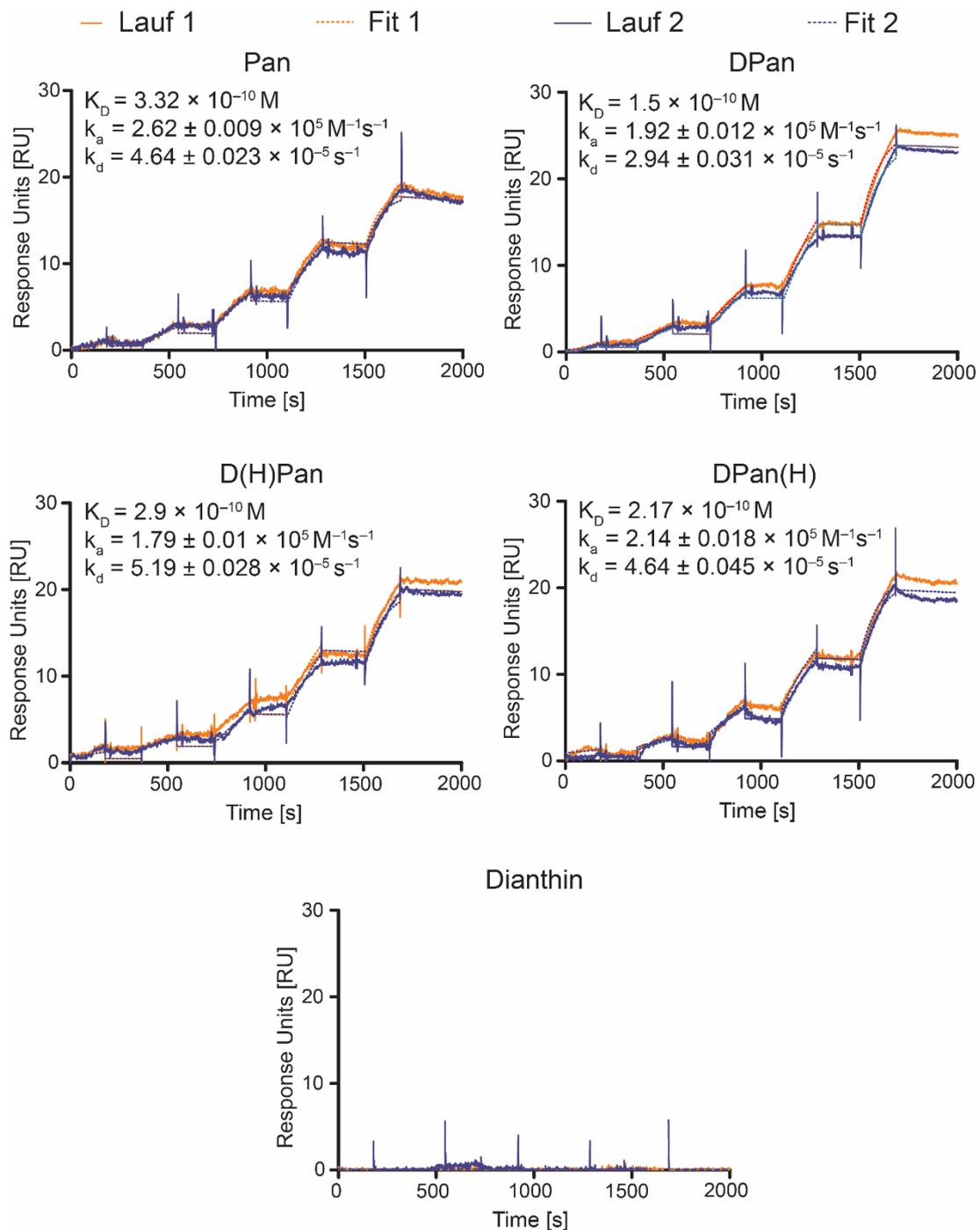


Abb. 3.10: Bindungsaffinität von Panitumumab, DPan, D(H)Pan, DPan(H) zu EGFR. Das rekombinante, humane EGFR-Fc Chimera Protein wurde mit einer RU von 300–500 auf einen CM5-Chip (GE Healthcare) immobilisiert und die Bindungsaffinität von Dianthin, Panitumumab, DPan, D(H)Pan, DPan(H) in einem *single cycle kinetic*-Verfahren nach Langmuir, Bindungsverhalten 1:1, bestimmt. Die Messung erfolgte als Duplikat mit einer höchsten Proteinkonzentration von 50 nM. Die K_D -Werte (Dissoziationskonstanten) von Panitumumab, DPan, D(H)Pan und DPan(H) waren annähernd gleich und lagen im Bereich von $1.5\text{--}3.32 \times 10^{-10} \text{ M}$. Für Dianthin konnte keine Kinetik bestimmt werden, da es erwartungsgemäß nicht an EGFR bindet.

Die Konjugation mit Dianthin führte somit zu keinem Affinitätsverlust, auch beeinflusste die Modifikation mit HYNIC das Bindungsverhalten nicht. Ebenfalls wurde untersucht, ob Dianthin allein eine Bindungsaffinität zu EGFR aufweist. Dafür wurden keinerlei Anhaltspunkte gefunden und eine Bestimmung der Dissoziationskonstante konnte entsprechend nicht erfolgen.

Somit konnte gezeigt werden, dass gereinigtes DPan mit einer DAR von ~1 sowohl enzymatisch aktiv ist als auch spezifisch an den Oberflächenrezeptor EGFR bindet. Basierend auf der positiven Charakterisierung konnte nun mit ersten Wirksamkeits-Untersuchungen *in vitro* begonnen werden.

3.7 *In-vitro*-Versuche

Nachdem das Immunotoxin DPan erfolgreich hergestellt und auf dessen enzymatische Aktivität sowie Bindungsaffinität untersucht wurde, war im Folgenden von großem Interesse, ob diese Funktionen auf Zellkulturversuche adaptiert werden können. Da Panitumumab mit einer hohen Bindungsaffinität an den Oberflächenrezeptor EGFR bindet [169], sollte die *In-vitro*-Wirksamkeit von DPan an EGFR überexprimierenden Zellen untersucht werden. Hierfür wurde als Zielzelllinie HCT116 ausgesucht. Als Kontroll- und Nichtzielzelllinie diente MDA-MB-453, welche nur in äußerst geringen Mengen EGFR exprimiert [172]. Wie eingangs erwähnt (1.6) bedingt die endosomale / lysosomale Degradierung von ADCs und Wirkstoffen im Allgemeinen einen großen Wirksamkeitsverlust. Aufgrund dessen wurde hier der Effekt des Saponins SO1861 als EEE untersucht. Zunächst wurde eine Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen ausgeschlossen, da diese das Zellwachstum negativ beeinflussen können und somit zu einer Ergebnisverfälschung führen würden. Der PCR-basierte Test beruht auf der Vervielfältigung des *Mycoplasma orale* Gens aus dem Zellüberstand der zu untersuchenden Zelllinie. **Abb. 3.11** zeigt das Agarosegel mit den aufgetragenen PCR-Reaktionsansätzen. Die

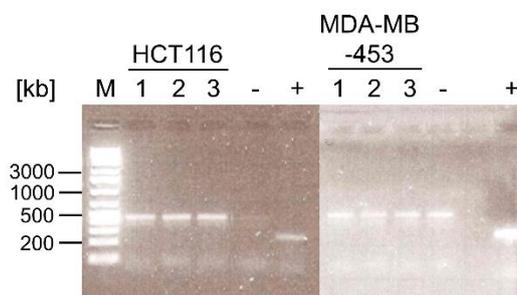


Abb. 3.11: Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination von HCT116- und MDA-MB-453-Zellen. Standard-Agarosegel (1.5 %) mit angefärbten DNA-Banden. Positivkontrolle (+) zeigt eine Bande bei ~250 kb, welche weder bei der Negativprobe (-) noch bei den HCT116- und MDA-MB-453-Proben 1–3 detektiert wurde. M, Marker GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Positivkontrolle zeigt eine DNA-Bande bei ~250 kb, diese wurde weder in den getesteten HCT116- noch in den MDA-MB-453-Zellansätzen detektiert. Als Negativkontrolle fungierte das jeweilige Medium der Zellen.

Sodann konnte wie in 2.5.5 beschrieben mit der Optimierung der Zellzahl für die folgenden Assays begonnen und die Eigentoxizität von SO1861 auf die beiden Zelllinien untersucht werden. Ersteres wurde bereits hinlänglich in der Masterarbeit von Lea Sophie Günther [168] durchgeführt und in dieser Arbeit einmalig für vier biologische Replikate wiederholt. **Abb. 3.12** zeigt die Absorption der MDA-MB-453 Zellen (linkes Diagramm) in Abhängigkeit von der Zellzahl, sowie die Konfluenz der verschiedenen Zellzahlen an HCT116 in Abhängigkeit von der Zeit (rechtes Diagramm). Die MDA-MB-453 Zellen befanden sich bis zur höchsten Zellzahl stets im (logarithmischen) Wachstumsbereich, wobei ab 40 000 Zellen eine Verminderung einzusetzen schien. Bei den HCT116-Zellen wurde mit der niedrigsten Zellzahl nach 150 h sowie mit der höchsten Zellzahl nach ~40 h ein Wachstumsplateau erreicht. Um sicherzustellen, dass das Zellwachstum frühestens am Ende des MTT-Versuchs (Tag 4, 96 h) ein Wachstumsplateau erreicht, sich die Zellen jedoch idealerweise noch in der Wachstumsphase befinden, wurde für weiterführende Versuche mit einer Zellzahl von 30 000 für MDA-MB-453 und 3 000 für HCT116 gearbeitet.

Als EEE soll SO1861 die endosomale Freisetzung des Immunotoxins in das Cytoplasma bewerkstelligen, nicht aber einen eigenen toxischen Effekt auf die Zelle ausüben. Deswegen wurde zunächst die maximale nicht toxische Konzentration von SO1861 in einem MTT-Assay

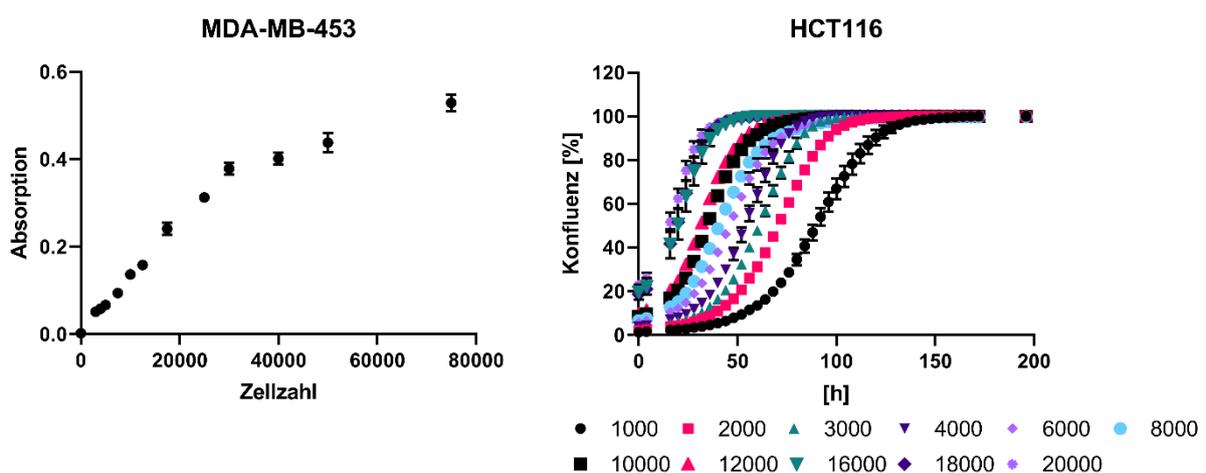


Abb. 3.12: Zellzahloptimierung für Vitalitäts-Assays. Vier biologische Replikate an verschiedenen Zellzahlen von HCT116- (1 000–20 000) und MDA-MB-453-Zellen (3 000–75 000) in je 100 μ L Zellmedium wurden in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und die Proliferation für 170 h am IncuCyte mikroskopisch (10 \times Vergrößerung) detektiert (HCT116-Zellen) oder im MTT-Assay nach 48 h die Absorption bestimmt (MDA-MB-453-Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler.

bestimmt (**Abb. 3.13**). Dargestellt ist die Vitalität [%] in Abhängigkeit von der Konzentration. Im Fall der HCT116-Zellen wurde beginnend bei 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SO1861 ein zytotoxischer Effekt beobachtet, bei den MDA-MB-453-Zellen dagegen erst bei 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Darauf aufbauend wurde für alle nachfolgenden Experimente eine SO1861 Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (gestrichelte Linie in **Abb. 3.13**) festgelegt, welche unterhalb der lytischen Konzentration von SO1861 lag [146, 147].

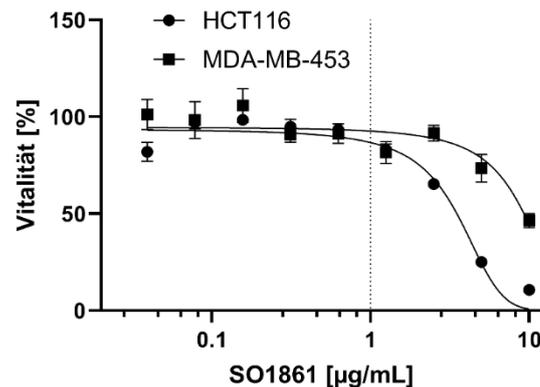


Abb. 3.13: Maximale, nicht toxische Konzentration von SO1861. HCT116- (3 000/Well) und MDA-MB-453-Zellen (30 000/Well) wurden in 100 μL Zellmedium ausgesät (96-Well Zellkulturplatte) und die konzentrationsabhängige Vitalität [%] in einem MTT-Assay bestimmt. SO1861-Konzentrationsbereich: 0.04–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Messungen dreier biologischer Replikate.

3.7.1 Untersuchung der Zytotoxizität von DPan

Die zytotoxische Wirkung des zielgerichteten Immunotoxins DPan sowie dessen Ausgangsproteine Dianthin und Panitumumab wurde an den EGFR überexprimierenden HCT116 Zellen in Kombination mit SO1861 sowie ohne getestet vergleichend an der Nichtzielzelle MDA-MB-453. Der Vergleich diente als Überprüfung der selektiven und Rezeptor spezifischen Wirkung von DPan. **Abb. 3.14** zeigt die Dosis-Wirkungskurve der Messung am IncuCyte sowie des MTT-Assays. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) wurde dabei über einen Vier-Parameter Fit bestimmt ($bottom = 0\%$ und $top = 100\%$, IncuCyte Software) (**Tab. 3.2**).

Die Messung am IncuCyte erlaubt das Beobachten des Zellwachstums in Echtzeit. Aufgrund der einfacheren Darstellung wurde hier die konzentrationsabhängige Konfluenz zu einem festgelegten Zeitpunkt dargestellt (HCT116: Tag 6; MDA-MB-453: Tag 7) und der zeitliche Verlauf nur exemplarisch für DPan \pm SO1861 mit 0.003 nM an HCT116 und MDA-MB-453-Zellen gezeigt (**Abb. 3.14 A und B**). Beginnend mit der Darstellung des zeitlichen Verlaufs wird hier veranschaulicht, dass DPan mit einer Konzentration von 0.003 nM keinen wachstumsverminderten Effekt weder auf die Ziel- noch die Nichtzielzellen hatte und beide

Zelllinien ein Wachstumsplateau nach 96 h (**A**: HCT116) und 130 h (**B**: MDA-MB-453) erreichten. Hingegen führte die Kombination mit SO1861 bei HCT116-Zellen zu einem selektiven Zielzellsterben, wobei die Konfluenz nicht über 10 % anstieg. Die Nichtzielzelllinie blieb unaffektiert und zeigte einen unveränderten Wachstumsverlauf. Bei Betrachtung der dosisabhängigen Wachstumsverläufe der HCT116- und MDA-MB-453-Zellen wurde ohne SO1861 weder für freies Dianthin noch für Panitumumab im untersuchten Konzentrationsbereich von 0.003–30 nM ein zytotoxischer Effekt beobachtet (**Abb. 3.14 C–F**). DPan hingegen führte ab 10 nM zu einem leichten Zellsterben der Zielzellen (**C** und **E**), nicht jedoch der Nichtzielzellen (**D** und **F**). In Kombination mit SO1861 hingegen konnte der zytotoxische Effekt auf die Zielzellen enorm um mehr als das 270 000fache gesteigert und der EC₅₀-Wert von 60.2 nM auf 0.00022 nM reduziert werden. Auf der Nichtzielzelllinie hingegen bewirkte SO1861 eine vergleichsweise geringe Verstärkung von 1 890fach, was in einem EC₅₀-Wert von rund 3 500 nM resultiert. Somit ergab sich durch den Einsatz von SO1861 ein 145facher Spezifitätsgewinn von Ziel- zu Nichtzelllinie (**Tab. 3.2**). Die Kombination Dianthin / SO1861 führte bei beiden Linien zu einem Zellsterben, wobei der Effekt auf die Zielzelle intensiver war, mit einem niedrigeren EC₅₀-Wert von 0.25 nM im Vergleich zu 17 nM für die Nichtzielzelle. Bei Betrachtung der Dosis-Wirkungskurven von mit DPan / SO1861 und Dianthin / SO1861 behandelten MDA-MB-453-Zellen fiel ein simultaner Verlauf auf. Die Konjugation von Dianthin an Panitumumab bewirkte hier keine Zytotoxizitätsverstärkung. Bezüglich Panitumumab konnte mit SO1861 keine Zytotoxizität erreicht werden. Der Vergleich der Dosis-Wirkungskurven verdeutlicht hier eindrucksvoll, dass die Konjugation eine selektive, Rezeptor abhängige Aufnahme von Dianthin bewirkte und so bereits das zytotoxische Potential von Dianthin verbesserte. In Kombination mit dem EEE SO1861 konnte dies wiederum signifikant ($p < 0.05$) verstärkt werden. Zusammenfassend, die Kombinationstherapie mit DPan / SO1861 führte zu einem deutlich verminderten Zellwachstum und war spezifisch für die Zielzelllinie HCT116. Die Kombinationsbehandlung DPan / SO1861 an den HCT116-Zellen unterschied sich dabei signifikant ($p \leq 0.05$) zu Dianthin / SO1861 und Pan / SO1861. Für die Nichtzielzelllinie MDA-MB-453 unterschied sich signifikant ($p < 0.05$) nur die Behandlung mit DPan / SO1861 zu Pan / SO1861. Die hier detektierten zytotoxischen Effekte wurden im Wesentlichen durch eine unspezifische Wirkung von Dianthin mit SO1861 als EEE hervorgerufen. Die als verlässlich einzustufenden für DPan / SO1861(HCT116) und Dianthin / SO1861 (HCT116, MDA-MB-453) berechneten EC₅₀-Werte sind in **Tab. 3.2** dargestellt.

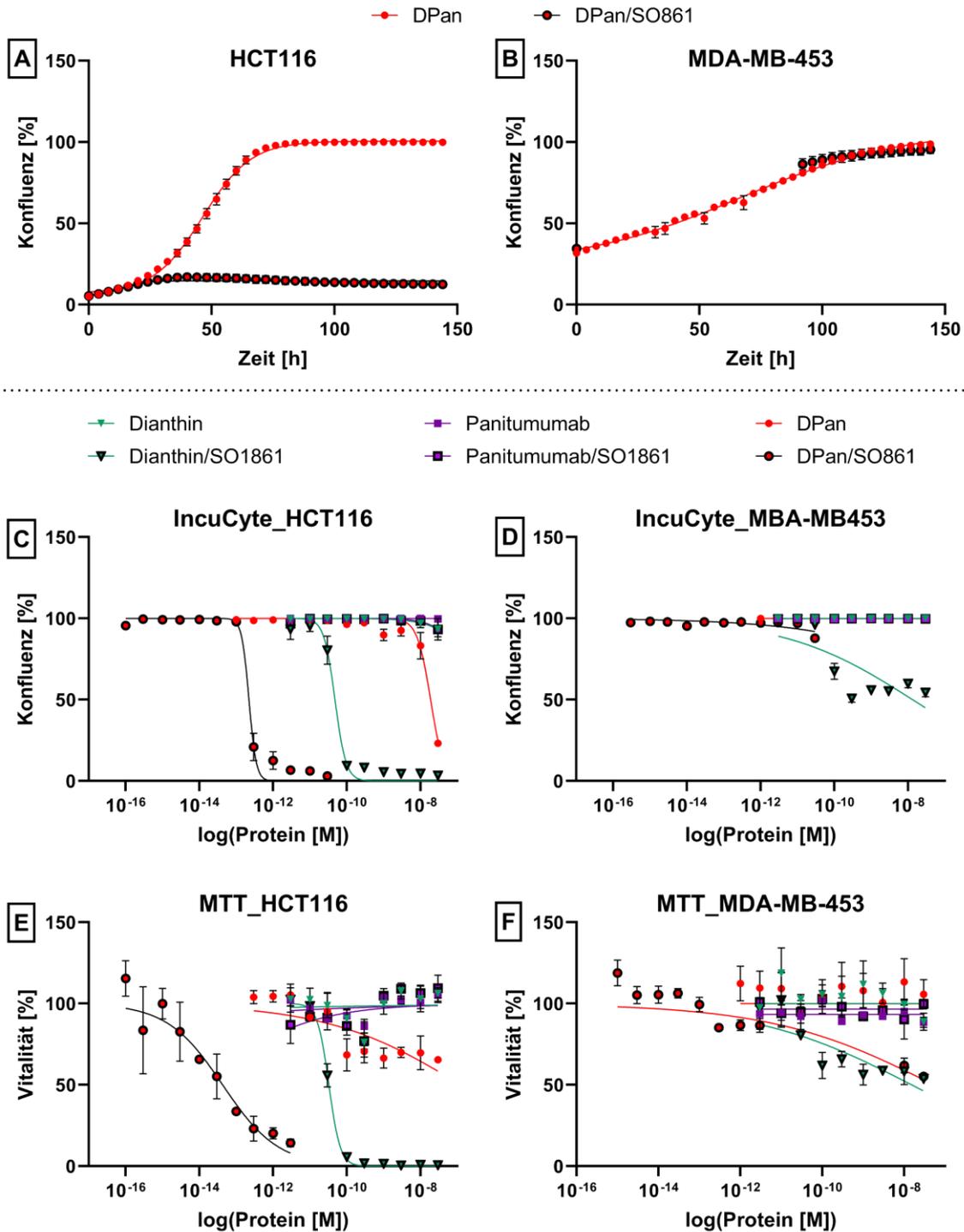


Abb. 3.14 Zytotoxizität von DPan an Ziel- und Nichtzielzellen. Dargestellt sind die Dosis-Wirkungskurven verschiedener Konzentrationen von Dianthin, Panitumumab (beide 3 pM–30 nM) und DPan (0.3 fM–30 nM) ± SO1861 (1 µg/mL) an HCT116 (Ziel)- und MDA-MB-453 (Nichtziel)-Zellen. HCT116- und MDA-MB-453-Zellen (3 000, 30 000/Well) wurden in 100 µL ausgesät (96-Well Zellkulturplatte) und nach Zugabe von Protein sowie SO1861 im IncuCyte-Gerät platziert und alle 4 h vier Bilder/Well aufgenommen (10 × Vergrößerung) oder ein MTT-Assay durchgeführt. Die zeitabhängige Konfluenz ist exemplarisch für beide Zellen unter Behandlung mit DPan (A–B, 0.003 nM) dargestellt. Verbliebene Diagramme (C–F) zeigen die konzentrationsabhängige Konfluenz an Tag 6 (HCT116) bzw. 7 (MDA-MB-453). HCT116_IncuCyte: drei unabhängige Experimente biologischer Triplikate; MDA-MB-453_IncuCyte: ein Experiment mit biologischen Triplikaten; HCT116/MDA-MB-453_MTT: zwei unabhängige Experimente mit biologischen Triplikaten.

Tab. 3.2: Verstärkungsfaktor (VF) und Spezifitätsgewinn (SG) der Kombinationsbehandlung mit SO1861. Die EC₅₀-Werte mit zugehörigem Bestimmtheitsmaß R² wurden über einen Vier-Parameter-Fit per InCuCyte-Software (*bottom* = 0 %, *top* = 100 %) oder mit GraphPad Prism8 (MTT-Assay, *bottom* = 0 %, *top* = 100 %) bestimmt. Das Verhältnis der EC₅₀-Werte in Anwesenheit von SO1861 (1 µg/mL) und Abwesenheit ergeben VF, wobei SG aus dem Verhältnis von VF_Z (Zielzelle, HCT116^a) zu VF_N (Nichtzielzelle, MDA-MB-453^b) berechnet wurde. Der Signifikanzwert p wurde aus den Mittelwerten (technischer oder biologischer Replikate) der EC₅₀-Werte über den Mann-Whitney-Test (GraphPad Prism8) erstellt. Signifikant (p ≤ 0.05) unterschieden sich DPan zu DPan/SO1861 sowie Dianthin zu D/SO1861 der per InCuCyte erstellten EC₅₀-Werte. Zellabhängige Vergleiche ergaben einen signifikanten (p ≤ 0.05) Unterschied von DPan/SO1861 zu D/SO1861 (HCT-Zellen) und DPan/SO1861 zu Pan/SO1861 (HCT116- und MDA-MB-453-Zellen). Die Behandlung von Ziel- sowie Nichtzielzelle mit DPan/SO1861 unterschied sich signifikant (p ≤ 0.05). R² ist als Mittelwert mit Standardfehler SEM gezeigt. —: konnte nicht bestimmt werden.

Behandlung	HCT116		VF _Z	MDA-MB-453		VF _N	SG
	EC ₅₀ [nM] R ² (±SEM)			EC ₅₀ [nM] R ² (±SEM)			
SO1861	–	+		–	+		
Dianthin-I	1000102 0.45 (0.23)	0.2527 0.98 (0.00)	3957664	3000000 0.00	17 0.62 (0.06)	177866	22
D-MTT	47570 0.06 (0.04)	0,3106 0.65 (0.24)	153170	— —	20 0.62 (0.04)	—	—
Pan-I	1000085 0.39 (0.16)	2000010 0.32 (0.26)	1	3000000 0.00	3000000 0.00	1	1
Pan-MTT	— —	— —	—	1216000 0.30 (0.00)	334900 0.09 (0.01)	4	—
DPan-I	60.2 0.84 (0.09)	0.00022 0.97 (0.01)	273636	3000000 0.17 (0.10)	1587 0.47 (0.02)	1890	145
DPan-MTT	66 0.58 (0.00)	0.00006 0.83 (0.04)	11000000	— —	188 0.19 (0.23)	—	—

^a InCuCyte: Drei unabhängige Experimente von biologischen Triplikaten; MTT: Zwei unabhängige Experimente mit biologischen Triplikaten.

^b InCuCyte: Drei biologische Replikate; MTT: Zwei unabhängige Experimente mit biologischen Triplikaten.

Die für die *In-vivo*-Versuche erforderliche *In-vitro*-Aktivität des Immunotoxins DPan konnte erfolgreich untersucht werden und zeigte eine hohe zellspezifische Zytotoxizität. Weiterführend wurde untersucht, ob dieser Effekt auch bei Sphäroiden eintritt, welche nochmals näher an *In-vivo*-Wachstumsbedingungen anknüpfen.

3.7.2 HCT116-Sphäroide unter Kombinationsbehandlung mit DPan / SO1861

Um den realen Wachstumsbedingungen eines Tumors nahe zu kommen, wurden HCT116-Zellen in eine Basalmembran ähnliche Matrix eingebettet und so das dreidimensionale Wachstum ermöglicht. Getestet wurde die Kombination von 0.3 nM DPan, welches in vorherigen Versuchen bei dieser Konzentration keinen zytotoxischen Effekt zeigte (3.7.1), in Kombination mit 1.0 µg/mL SO1861 sowie ohne als auch eine unbehandelte Kontrolle. **Abb. 3.15 A** zeigt exemplarisch eins von vier aufgenommen Bildern pro Well am Tag des Behandlungsstarts (0 d) und –endes (8 d). Sehr deutlich ist hier der Wachstumsunterschied zwischen Kombinationsbehandlung, Kontrolle und Einzelbehandlung zu sehen. Mit der

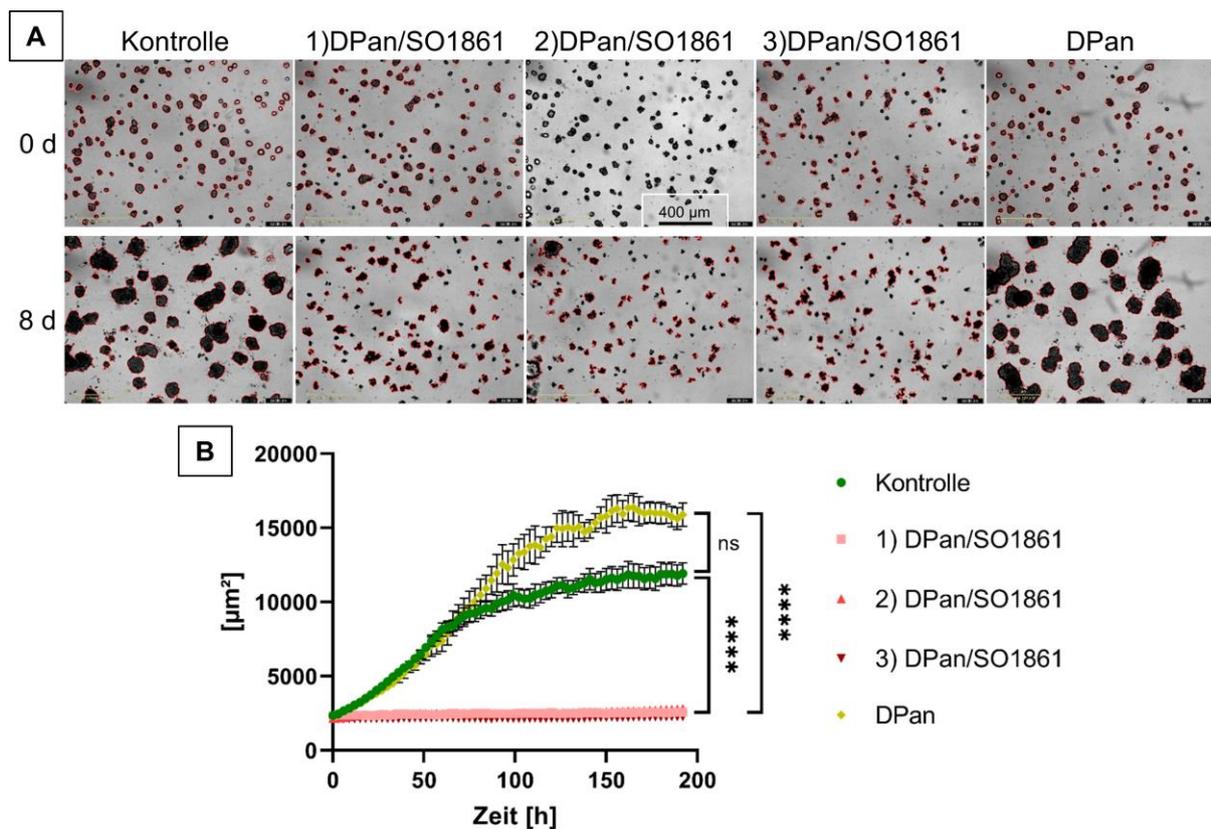


Abb. 3.15: Sphäroidwachstum von HCT116-Zellen unter Kombinationstherapie. Abgebildet ist exemplarisch eines von vier Phasenkontrastbildern (A) pro Well (10 × Vergrößerung) an Tag 0 (Behandlungsstart) und Tag 8 nach Behandlung von zwischen Matrigel eingebetteten HCT116-Zellen (3 000 Zellen/Well) mit DPan (0.3 nM) und SO1861 (1.0 µg/mL) in der zweiten Matrigel-Schicht (1), im Deckmedium (2) oder als Kombination in beidem (3). Das rechte Bild zeigt eine Behandlung mit DPan ohne SO1861, wobei die Kontrolle unbehandelte Sphäroide bei gleichen Konditionen zeigt. Im Diagramm (B) ist das zeitabhängige Sphäroidwachstum [µm²] (Mittelwerte mit Standardfehler) dargestellt.

Kombinationsbehandlung DPan / SO1861 wurde das Zellwachstum deutlich eingeschränkt. Dabei machte es keinen Unterschied ob sich DPan / SO1861 in der zweiten Matrigel-Schicht (1), im Deckmedium (2) oder aber in beidem (3) befand. Die Sphäroide unter Kontrollbedingungen bzw. nur DPan-Behandlung zeigten ein stetiges Wachstum und unterschieden sich kaum. Das Verhalten wird durch die Darstellung des zeitaufgelösten Sphäroidwachstums [μm^2] in **Abb. 3.15 B** bestätigt. Dieser Versuch verdeutlicht nochmals die Effektivität der Kombinationsbehandlung des Immunotoxins DPan mit SO1861, welches nicht nur in planaren Zellkulturexperimenten die gewünschte zytotoxische Wirkung zeigt, sondern auch in dreidimensionalen Zell-Assays unter realitätsnäheren Wachstumsbedingungen.

3.7.3 Antikörper abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC)

Wie in der Einleitung beschrieben (**1.3**) übernehmen Antikörper als Bestandteil eines Immunotoxins insbesondere zwei wesentliche Hauptfunktionen, zum einen den zielgerichteten Transport des Toxins und zum anderen die Aktivierung des Immunsystems. Besonders wichtig ist, dass diese Funktionen nach chemischer Kopplung beider Komponenten erhalten bleiben. Wie bereits erfolgreich bewiesen, war die Bindungsaffinität zu EGFR unvermindert (**3.6.3**) und ein deutlich zytotoxisches Potential nachweisbar (**3.7.1**). Panitumumab als IgG2 Antikörper vermag keine oder nur sehr stark abgeschwächte ADCC über NK-Zellen zu vermitteln, zeigt jedoch vermehrte ADCC über Monozyten und neutrophile Granulozyten [173]. Daher war es ein Teilziel dieser Arbeit zu zeigen, ob das ADC DPan ähnlich zu Panitumumab eine ADCC auslösen kann, oder ob die Fähigkeit des Antikörpers aufgrund der Kopplung an Dianthin verloren geht. Hierbei wurde die ADCC mit aus Vollblut gewonnenen PMBC und Monozyten untersucht. Da Monozyten an sich erstmal keine direkte Funktion ausüben, wurden diese mit einer nichttoxischen Konzentration an LPS (100 ng/mL) zu proinflammatorischen Monozyten stimuliert [174, 175]. **Abb. 3.16** zeigt die Behandlung von HCT116-Zellen mit unterschiedlichen Kombinationen einer nichttoxischen Konzentration von DPan (10 pM) und Panitumumab (10 pM) zusammen mit PBMCs oder Monozyten. Die Mikroskopie-Bilder (**Abb. 3.16 A**) zeigten deutlich, dass sowohl Panitumumab (rechts) als auch DPan (Mitte) eine ADCC in PBMC (oben) und Monozyten (unten) auslösten und zu einem stark verminderten Zellwachstum führten. Kontrollen, welche mit den Effektorzellen, jedoch ohne Antikörper bzw. Konjugat behandelt wurden, zeigten dagegen kein vermindertes Wachstum. Lediglich ein leicht morphologischer Effekt in der Kombination Monozyten / LPS war anhand der Zellform abzulesen. Der Effekt durch PBMC fiel dabei etwas stärker aus. Neben der qualitativen Beurteilung über Phasenkontrastbilder wurde das Zellsterben zusätzlich fluorometrisch mit

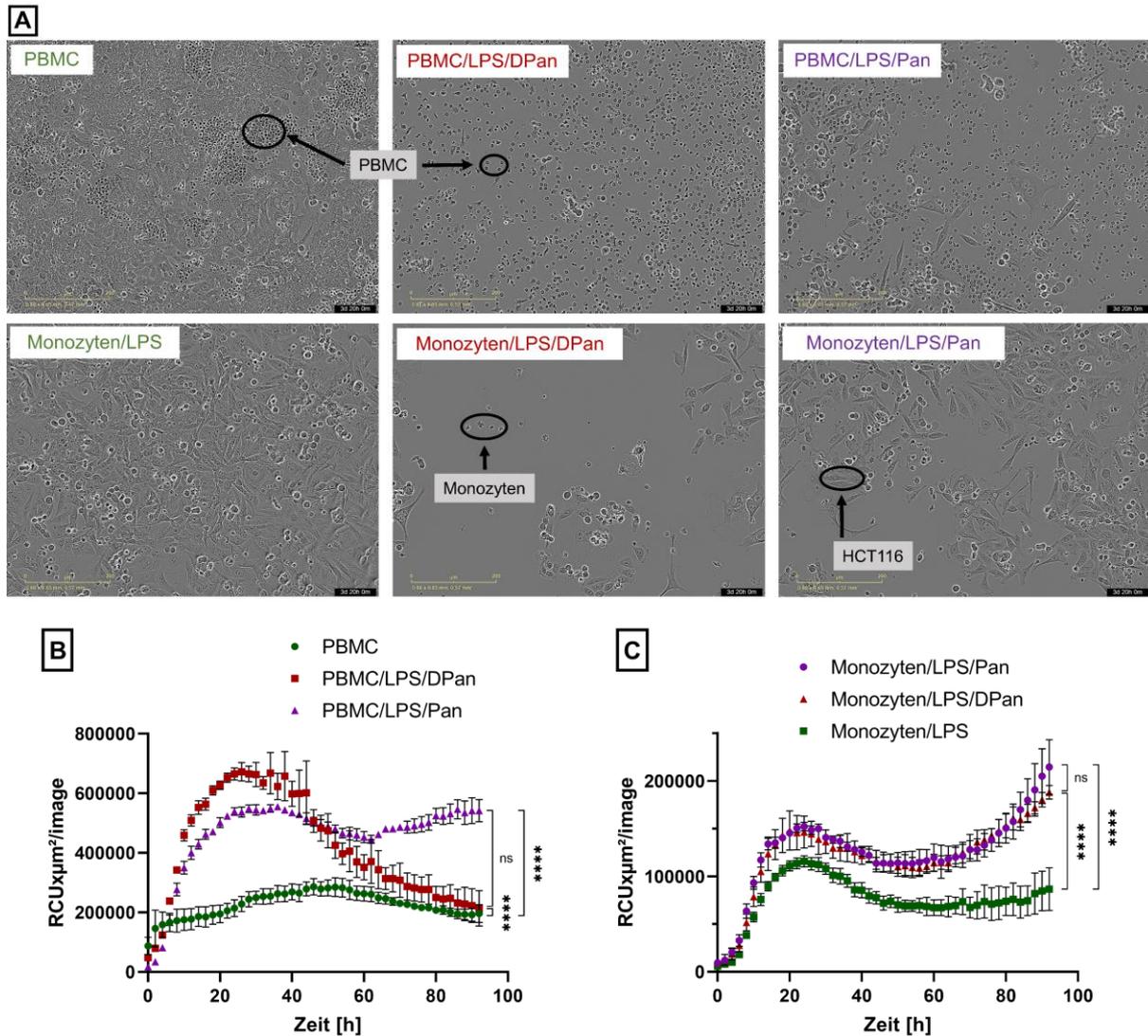


Abb. 3.16: Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität von DPan und Panitumumab. Aus Vollblut gewonnene PBMCs und Monozyten (mit 100 ng/mL LPS) wurden zu HCT116-Zellen im Verhältnis 30:1 bzw. 3.8:1 gegeben, welche zuvor mit DPan (10 pM) oder Panitumumab (10 pM) und CytotoxRed (250 nm) inkubiert wurden. Alle 2 h erfolgte die Aufnahme eines Phasenkontrastbildes (**A**, 10 \times Vergrößerung) sowie der Fluoreszenz (**B** und **C**, 612 nm) am IncuCyte. Gezeigt ist exemplarisch für jede Gruppe ein Bild an Tag 3. Die Diagramme (**B** und **C**) zeigen den zeitlichen Verlauf des Fluoreszenzsignals (*Total Red Object Integrated Intensity* RCU $\times\mu\text{m}^2$ /Image), welches proportional dem Zelltod ist. Als Kontrolle wurden HCT116-Zellen mit PBMCs bzw. Monozyten / LPS behandelt. Das Signifikanzniveau p wurde über den Kruskal-Wallis-Test (*one-tailed*) bestimmt (GraphPad Prism). Hier unterscheidet sich der Effekt von DPan und Panitumumab signifikant ($p < 0.0001$, ****) zur Kontrolle, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit DPan und Panitumumab besteht.

Cytotox Red quantifiziert (**Abb. 3.16 B** und **C**). Dieser hoch sensitive Cyanin-Farbstoff, welcher in Zellen mit gestörter Plasmamembranintegrität eintreten kann, bindet an DNA was eine 100–1 000fache Fluoreszenzverstärkung bewirkt. Sowohl PBMC / Pan und PBMC / DPan führten zu einem signifikanten (**B**, $p < 0.0001$, ****) Signalanstieg der Fluoreszenz (RCU $\times\mu\text{m}^2$ /image) im Vergleich zur Kontrolle. Dabei unterschied sich das Signal von DPan zu Panitumumab nicht signifikant. Die Signalunterschiede von Monozyten / DPan und Monozyten / Panitumumab zur Kontrolle Monozyten / LPS war deutlich geringer aber dennoch

statistisch signifikant (C, $p < 0.0001$, ****). Das Signal der Kontrolle / Monozyten erscheint hoch, ist im Vergleich zur Kontrolle / PBMC aber gering. Dass das Signal insgesamt bei der Monozyten-Gruppe niedriger ausfällt vermag auch hier an der deutlich geringeren Anzahl an Monozyten im Vergleich zu PBMCs liegen. Somit wurde das Immunotoxin DPan erfolgreich bezüglich seiner enzymatischen Aktivität sowie Bindungsaffinität zum Zielrezeptor evaluiert und intensiv in Kombination mit SO1861 bezüglich seiner Zytotoxizität *in vitro* untersucht. Das hervorragende zytotoxische Potential von DPan sollte nun auch *in vivo* im Xenograft-Modell nachgewiesen werden.

3.8 *In-vivo*-Studien

3.8.1 Akute Toxizität

Die akute Toxizität von DPan in Kombination mit SO1861 sowie ohne als auch von Panitumumab wurde an immunkompetenten BALB/c-Mäusen nach der OECD-Richtlinie 425 durchgeführt und die NOAEL entsprechend der Richtlinie berechnet. Dies war maßgeblich für alle weiteren Tierversuche, um in einem nichttoxischen Dosisbereich arbeiten zu können.

Für DPan betrug die aus den experimentellen Daten rechnerisch ermittelte NOAEL 117 µg; diese war in Kombination mit SO1861 und einem Wert von 126 µg nicht wesentlich verändert. Panitumumab hingegen wurde bis zur höchst festgelegten Dosis von 1 830 µg sehr gut vertragen, sodass hier eine NOAEL nicht erreicht wurde. Die höchste Dosis mit 183 µg von DPan als auch DPan / SO1861 führte zu einem starken Gewichtsverlust (**Abb. 3.17**), struppigen Fell sowie einer verlangsamten Bewegung. Teilweise nahmen die Tiere zusätzlich eine gekrümmte Haltung ein, die Augen wirkten fahl und eingefallen. Die Gabe von 57.87 µg DPan ± SO1861 bewirkte zwar ebenfalls einen Gewichtsverlust, jedoch ohne weiterreichende Symptome was damit nach den vorgeschriebenen Parametern (**Tab. 2.5**) nicht als schwerwiegend einzustufen war. Ferner war bei manchen mit DPan behandelten Mäusen (57.87 und 183 µg) ein vermehrter Tränenfluss der Augen, ähnlich einer Entzündung, zu bemerken.

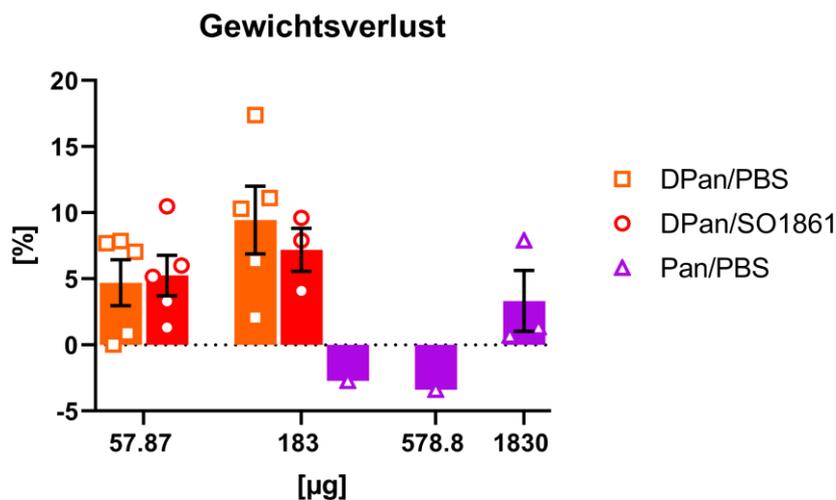


Abb. 3.17: Prozentualer Gewichtsverlust am Finaltag der akuten Toxizitätsstudie. Dargestellt ist der Gewichtsverlust [%] von behandelten Tieren, die an Tag 1 und 4 DPan ± SO1861 beziehungsweise Panitumumab erhielten. Die Gabe von DPan ± SO1861 mit 183 µg erfolgte aufgrund zu hoher Toxizität hier nur einmalig. Gezeigt sind die Einzelwerte mit Mittelwert und Standardfehler, wobei jeder Einzelwert gleichbedeutend mit einer Maus ist.

Medikamente werden in Säugetieren in Abhängigkeit ihres Ursprungs und der Größe hauptsächlich über die Niere ausgeschieden oder die Leber abgebaut und ausgeschieden. Von Interesse war also hier, ob DPan konzentrationsabhängig einen Einfluss auf die leberspezifischen Parameter ALT und AST sowie den Nierenparameter Kreatinin ausübt. Ebenso wurde das LDH-Level bestimmt, dessen Nachweis im Blutplasma oder –serum auf eine Zellschädigung hinweist. **Abb. 3.18** zeigt den dosisabhängigen Vergleich mit Gruppenzugehörigkeit. Da die Kreatininwerte aller Tiere ≤ 0.17 mg/dL betragen und im beziehungsweise unterhalb des Referenzbereiches (Tierlieferant: 0.52 ± 0.06 mg/dL [176]) lagen, wurden diese nicht graphisch dargestellt. Die Behandlung mit Panitumumab zeigte für alle Dosen (183–1 830 μ g) den geringsten Wert (LDH: 170–144 U/L, ALT: 16–10 U/L; AST: 68–74 U/L) und war jeweils konform mit dem vom Tierlieferant bekannten Daten (ALT: 74 ± 52 UI/L; AST: 233 ± 124 UI/L; LDH unbekannt [176]). Vergleiche von Blutparametern, welche in unterschiedlichen Laboren und Geräten bestimmt wurden, können zwar quantitativ nicht miteinander verglichen werden, ein Plausibilitätsvergleich darf allerdings gezogen werden. Bei der Behandlung mit DPan und DPan / SO1861 kam es zu einer breiten Streuung der Messwerte, weswegen hier jeweils der Median dargestellt wurde. Eine Verfälschung der Messwerte kann vor allem durch Hämolyse bei der Blutentnahme und Folgebehandlung des Blutes hervorgerufen werden, was teils zu erhöhten Werten führt und die breite Streuung erklären könnte. Dennoch ist hier ein dosisabhängiger Trend zu sehen, wobei alle Werte für LDH, ALT sowie AST im Vergleich zu denen von Panitumumab deutlich erhöht waren, mit

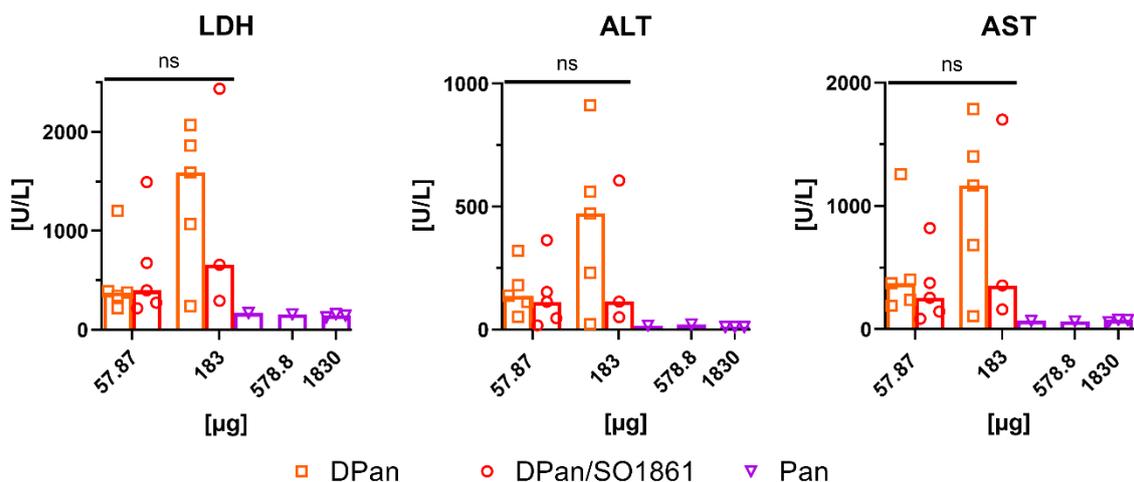


Abb. 3.18: Blutparameter in der Studie zur akuten Toxizität. Aus Heparinplasma wurde für jede Maus der Gruppen Panitumumab, DPan, DPan/SO1861 ($n = 5, 9, 9$) die Kreatinin-, LDH-, ALT- und AST-Werte bestimmt (Cobas 8000, Labor Berlin) und als *scatter dot plot* mit Median dargestellt. Kreatinin war für alle Tiere < 0.17 mg/dL. Es konnten keine statistischen Signifikanzen ermittelt werden. (Mann-Whitney Test, *one-tailed*, GraphPad Prism8).

höchstem Median für DPan bei einer Dosis von 183 μg (LDH: 1 591 U/L; ALT: 472 U/L; AST: 1 168 U/L). Die Mediane von DPan und DPan / SO1861 bei einer Dosis von 57.87 μg (LDH: 378–399 U/L; ALT: 138–113 U/L; AST: 372–255 U/L) unterschieden sich kaum. Ein nichtgepaarter und nichtparametrischer Vergleich (Mann-Whitney Test, *one-tailed*, GraphPad Prism8) der dosisabhängigen sowie gruppeninternen Parameter zeigte keinen signifikanten Unterschied. Ein Vergleich mit Panitumumab konnte aufgrund der geringen Datenmenge nicht durchgeführt werden. Wie bereits erwähnt ist dennoch ein deutlicher Unterschied im Diagramm zu sehen. Neben der Bestimmung der Blutparameter wurde ebenfalls das Gewebe der entsprechenden Organe auf pathologische Veränderungen untersucht und über HE-Färbung (**Abb. 3.19**) nach Batts und Ludwig ausgewertet (**2.6.4**). Dabei korrelierten die gemessenen erhöhten Werte der Blutparameter, verursacht durch die Behandlung mit DPan und DPan / SO1861, mit der histopathologischen Auswertung (**Tab. 3.3**). Die Organe Niere, Milz, und Herz zeigten auch bei der höchsten Dosis keine Veränderungen. Die erkennbaren Schäden der Lunge waren nachweislich postmortaler Natur (vermutlich als Folge der Inhalation des

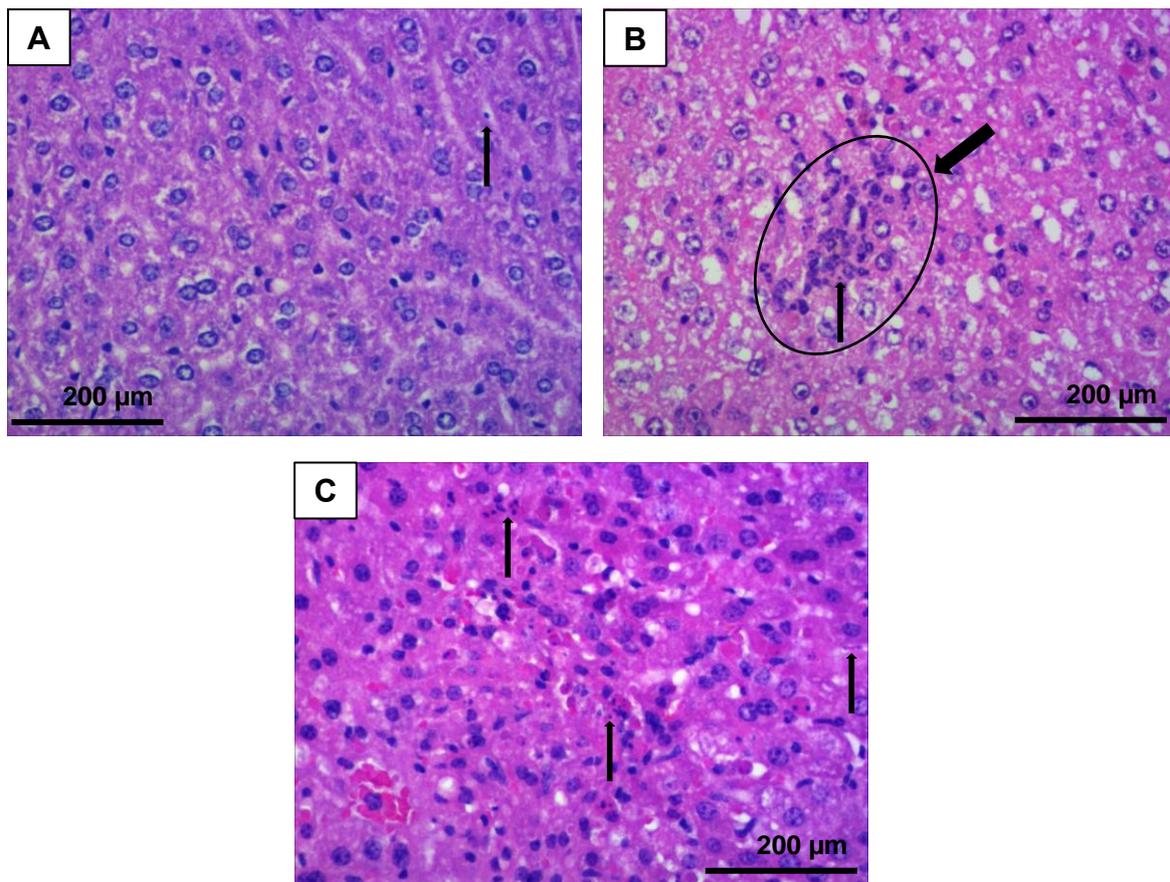


Abb. 3.19 Histopathologische Auswertung der Leber in der Studie zur akuten Toxizität. Dargestellt sind mit HE angefärbte Leberschnitte von behandelten Tieren, welche 1 830 μg Panitumumab (**A**), 57.87 μg DPan (**B**) und 183 μg DPan / SO1861(**C**) injiziert bekamen. Einzelzellnekrosen sind beispielhaft mit schmalen Pfeil gekennzeichnet. Der mit breitem Pfeil markierte, schwarz umrandete Bereich zeigt ein granulozytäres Infiltrat.

Betäubungsmittels) und wurden nicht in Bezug zu der Behandlung gesetzt. Mäßige bis schwere Leberschäden (**Abb. 3.19**) wurden nach der Behandlung mit DPan und DPan / SO1861 festgestellt, vor allem nach Gabe der Höchstdosis von 183 µg (**Abb. 3.19 C**). Bei einer Dosis von 57.87 µg war ein Leberindex von 1 und 2 (**Abb. 3.19 B**) bestimmbar mit vereinzelt granulozytären Infiltrat. Panitumumab führte auch bei der höchsten Dosis von 1 830 µg lediglich zu einem milden Schaden (**Abb. 3.24 A**).

Tab. 3.3: Histopathologische Auswertung der Organe nach HE-Färbung. Leberindex: 1 milde, 2 mäßige, 3 schwere Schädigung [163]; Milz: R rote Pulpa dominant, aktiviert; W weiße Pulpa dominant, aktiviert; —: Kein Material zur Verfügung.

	Leber Index	Niere	Milz	Lunge	Herz	Dosis [µg]
Pan/PBS	1	regelhaft	R	Postmortaler Schaden	regelhaft	183
	1		—	regelhaft	regelhaft	578.7
	1		W	Postmortaler Schaden	—	1830
	1		R	regelhaft	regelhaft	1830
	1		W	Postmortaler Schaden	regelhaft	1830
DPan/PBS	2	regelhaft	R	regelhaft	regelhaft	57.87
	2		R	regelhaft	regelhaft	183
	1		R	regelhaft	regelhaft	57.87
	1		R	regelhaft	—	57.87
	1		R	Postmortaler Schaden	regelhaft	183
	2		W	regelhaft	regelhaft	57.87
	2		R	regelhaft	regelhaft	57.87
	2		R	regelhaft	regelhaft	183
	2		W	Postmortaler Schaden	regelhaft	183
	2		R	regelhaft	regelhaft	183
DPan/SO1861	1	regelhaft	R	regelhaft	regelhaft	5.79
	1		R	regelhaft	regelhaft	57.87
	1		R	regelhaft	—	18.30
	1		R	regelhaft	regelhaft	57.87
	2		R	Postmortaler Schaden	regelhaft	183
	2		W	regelhaft	regelhaft	57.87
	3		R	regelhaft	regelhaft	183
	3		R	Postmortaler Schaden	regelhaft	57.87
	1		R	regelhaft	regelhaft	183
	2		R	Postmortaler Schaden	regelhaft	57.87

3.8.2 Tumorwachstumsrate

Zur Bestimmung der für die Therapiedauer optimalen HCT116 Zellzahl zur Induktion eines experimentellen Tumorwachstums wurden immunsuppressiven NMRI nu/nu Mäusen ($n = 3, 4, 3$) $1, 2$ und 4×10^6 Zellen s.c. in die rechte Flanke gespritzt. Das Tumorwachstum wurde für 61 Tage beobachtet und die Mäuse nach den in **Tab. 2.5** beschriebenen Parameter untersucht. **Abb. 3.20** zeigt das zeitliche Tumorwachstum dargestellt als Tumorgewicht. Die höchste Zellzahl führte schneller zu einem messbaren Tumorwachstum, allerdings mussten die Tiere entsprechend früher euthanasiert werden. Tumoren der Gruppe 1×10^6 und 2×10^6 zeigten anfangs ein ähnliches Wachstum, wobei die Kurve mit der niedrigsten Zellzahl im zeitlichen Verlauf flacher anstieg.

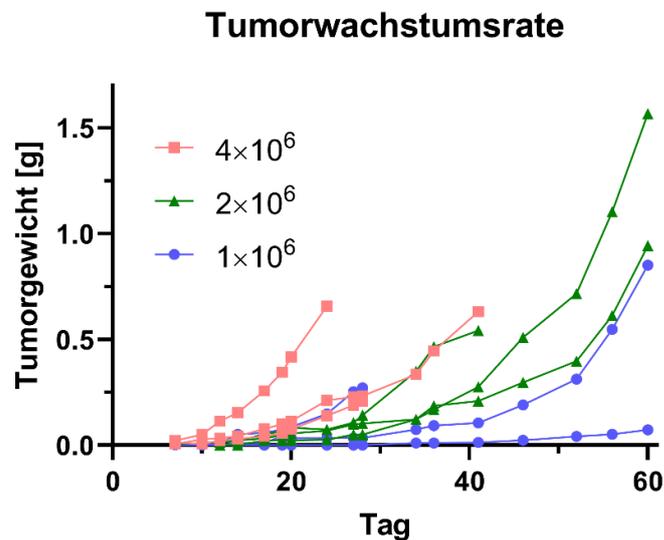


Abb. 3.20: Tumorwachstumsrate in Abhängigkeit von der Zellkonzentration. Verschiedene Konzentrationen ($1 / 2 / 4 \times 10^6$ Zellen/100 μ L) an HCT116-Zellen wurden s.c. in die Flanke immundefizienter NMRI nu/nu-Mäusen gespritzt und das Tumorwachstum für 61 Tage beobachtet. Tiere mit der höchsten Zellzahl mussten aufgrund der Abbruchkriterien früher aus dem Versuch genommen werden.

Da die avisierte Therapie mit acht Dosen vier Wochen dauert galt es zu gewährleisten, dass Tiere aufgrund der Tumorgröße oder des dadurch eingeschränkten Wohlbefindens nicht vorzeitig aus dem Versuch genommen werden müssen. Weiterhin musste aber auch das Wachstum eines deutlich messbaren Tumors gewährleistet sein. Aufgrund dessen wurde für die Therapie eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen gewählt.

3.8.3 Dosis-Wirkungsbeziehung der Kombinationstherapie DPan/SO1861

Der antitumorale Effekt von DPan in Kombination mit SO1861 sowie DPan und Panitumumab als Vergleichstherapie wurde an tumortragenden NMRI nu/nu Mäusen untersucht. Dafür wurde SO1861 (15 µg) in 50 µL DPBS –/– s.c. in die Nackenfalte und 1 h später Konjugat (3.3 µg) oder Panitumumab (2.82 µg) i.v. in die Schwanzvene gespritzt. Die für die Therapie benutzte Dosis von DPan und Panitumumab lag dabei weit unterhalb der zuvor in der Studie zur akuten Toxizität bestimmten NOAEL und die Tiere zeigten keine Symptome aufgrund der Behandlung. Lediglich eine leichte Verhärtung sowie blau-weißliche Verfärbung im Bereich der SO1861-Injektionsstelle war bei fünf Tieren zu beobachten, welche im Verlauf der Therapie und vor jeder erneuten Applikation wieder abnahm. Bei einer mit DPan behandelten Maus kam es zu einer blauen Verfärbung um den Tumor (siehe **Abb. 3.21**).



Abb. 3.21: Verfärbung um den Tumorbereich einer mit DPan behandelten Maus. Das Bild zeigt eine i.v. mit 3.3 µg DPan behandelte Maus mit einer deutlichen blaugrünen Verfärbung des Tumorareals ab der siebten Dosis.

Abb. 3.22 zeigt das Tumorgewicht während der 38 Tage andauernden Therapie, mit Therapiestart an Tag 9 bei einem durchschnittlichen Tumordurchmesser von 3.4 mm, da hier der Tumor gut tastbar war. Keine der drei Behandlungsformen führte eine Tumorregression herbei. Panitumumab / PBS schränkte das Tumorwachstum am meisten ein, gefolgt von der Kombinationstherapie DPan / SO1861 und DPan / PBS. Verglichen mit der Kontrollgruppe PBS / PBS war das Wachstum von allen Therapiegruppen signifikant vermindert, ebenso verlangsamte SO1861 das Tumorwachstum zusätzlich signifikant.

Untersuchungen der Blutparameter Kreatinin, LDH und ALT zeigten keine signifikante Variabilität zwischen den Gruppen (**Abb. 3.23**). Lediglich für AST war ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen DPan / SO1861 zu DPan und DPan zu Panitumumab kalkulierbar, in der graphischen Abbildung jedoch wenig bemerkbar.

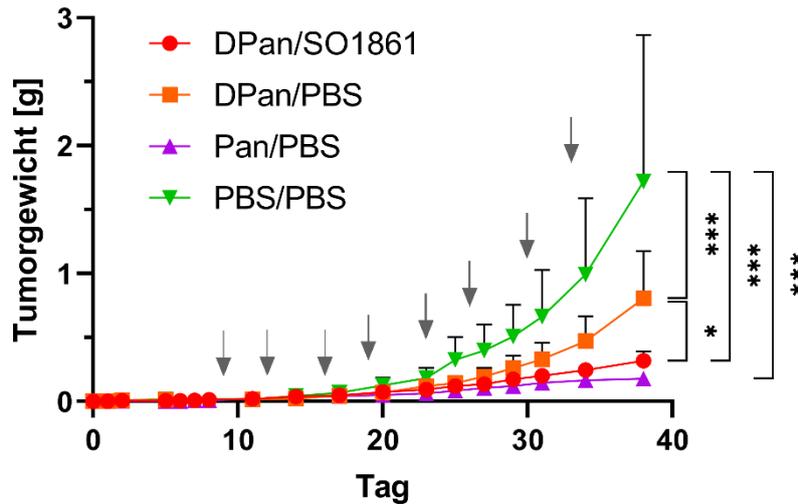


Abb. 3.22: Dosis-Wirkungsbeziehung der Kombinationstherapie. Dargestellt ist die Therapie abhängige Tumorstadiumsrate der mit DPan (3.3 µg) ± SO1861 (15 µg) behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren behandelt mit Panitumumab (2.82 µg) oder PBS. Therapiert wurde mit 8 Dosen (zwei/Woche) als i.v. Injektion in die Schwanzvene (DPan, Pan, PBS) und subkutane Bolusapplikation in die Nackenfalte (SO1861, PBS). Das Tumorgewicht wurde nach der Formel in 2.6.2 berechnet. Messpunkte von aus dem Versuch ausgeschiedenen Tieren wurden extrapoliert (nichtlineare Regression-Exponential growth equation, GraphPad Prism8) und mit in die Erstellung des Mittelwertes mit Standardfehler einbezogen. Der Vergleich aller Behandlungen zur Kontrollgruppe PBS/PBS ergab einen statistisch signifikanten Unterschied (***, p < 0.0002; *, p < 0.05, Wilcoxon Test, one-tailed, GraphPad Prism). Die Tumorstadiumsrate wurde am stärksten von Pan/PBS > DPan/SO1861 > DPan/PBS > PBS/PBS beeinflusst.

Die Werte für ALT und AST lagen zudem im vom Tierlieferanten bestimmten Parameterbereich (ALT: 60 ± 11 U/L; AST: 161 ± 60; Kreatinin: 0.63 ± 0.05 mg/dL) [176] und wiesen keinerlei Erhöhung auf. Histologische Untersuchungen führten zu keinem pathologischen Befund. Auch Niere und Herz entsprachen der Regel. Die Leber war in den Gruppen PBS / PBS, Pan / PBS und DPan / SO1861 nur bei einer von sechs bzw. acht Mäusen als mäßig geschädigt zu klassifizieren (Tab. 3.4). Dabei war die weiße Pulpa der Milz vermehrt

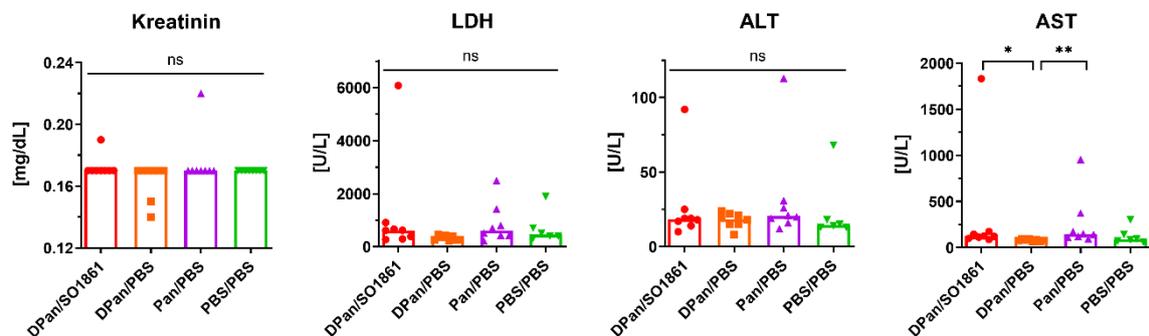


Abb. 3.23: Blutparameter der Dosis-Wirkungsbeziehung. Darstellung wie in Abb. 3.18, der Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte über den nicht gepaarten und nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test (one-tailed, GraphPad Prism) basierend auf den Mittelwerten. Statistisch signifikant unterschieden sich nur die Gruppen DPan/SO1861 vs DPan/PBS (*, p < 0.05) und DPan/PBS vs Pan/PBS (**, p < 0.002) des Parameters AST.

in den Gruppen PBS / PBS und DPan / PBS dominant aktiviert, außerdem teilweise in den Gruppen Pan / PBS und DPan / SO1861. Die Tumoren wurden nach HE-Färbung auf deren nekrotischen Anteil untersucht. So korreliert ein hoher nekrotischer Anteil mit einem therapeutischen Effekt. Die histologische Untersuchung ergab dabei einen erhöhten Anteil in den Therapiegruppen DPan / SO1861, DPan / PBS und Pan / PBS im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS / PBS (**Tab. 3.4**). Dabei waren jeweils zwei Tumore der Gruppen DPan / PBS und Pan / PBS nur noch als narbige Fibrose ohne mikroskopisch detektierbare

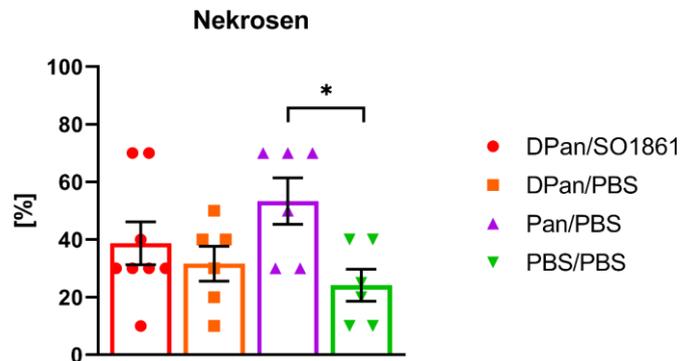


Abb. 3.24: Nekrosen der Tumoren. Prozentualer Anteil an Nekrosen im Tumor nach HE-Färbung. Ein signifikant höherer Anteil an Nekrosen war in der Gruppe Pan/PBS im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. DPan/SO1861 und DPan/PBS führten ebenfalls zu einem höheren Nekroseanteil, jedoch ohne nachweisbare Signifikanz. Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte über den Mann-Whitney Test (*, $p < 0.05$, *one-tailed*, GraphPad Prism).

Tumorzellen erkennbar. Ebenfalls wurden Tumore mit hohem und niedrigem nekrotischen Anteil auf deren Ki-67- (Proliferationsmarker) und EGFR-Expressionslevel untersucht (**Tab. 3.4** und **Abb. 3.25**). Ki-67 ist bei Krebserkrankungen vermehrt nachzuweisen und dient als wichtiges Maß zur Prognoseeinschätzung. So war hier von Interesse, ob die Behandlung mit DPan und Panitumumab einen Einfluss auf das Expressionslevel hatte. Dabei wurde bei allen Tumoren ein für solide Tumore hoher Ki-67-Wert ($> 50\%$) festgestellt.

Tab. 3.4 Histologische Auswertung der Organe und Tumore jeder Maus/Gruppe. Die Anfärbung erfolgte mit HE sowie immunhistochemisch mit anti-EGF und anti-Ki-67-IgG. Leberindex: 1 milde, 2 mäßige, 3 schwere Schädigung [163]; Milz: R rote Pulpa dominant, aktiviert; W weiße Pulpa dominant, aktiviert. Niere, Lunge und Herz waren bei allen Tieren regelhaft. **X**: narbige Fibrose, keine Tumorzellen nachweisbar. Die immunhistochemische Anfärbung mit anti-EGF und anti-Ki-67-IgG erfolgte bei Tumoren mit einem sehr hohen oder niedrigen nekrotischen Anteil als auch bei sehr großen oder kleinen Tumordurchmessern. —: keine Daten erhoben.

	Leber Index	Milz	Tumordurchmesser [mm]	Nekrosen [%]	Ki-67/WF [%]	EGFR [%]
PBS/PBS	2	R	12	25	—	—
	1	W	12	40	—	—
	1	W	13	30	60	90
	1	W	11	40	60	80
	1	R	9	10	50	50
	—	—	4	10	—	—
Pan/PBS	1	R	15	50	70	50
	1	W	9	30	70	90
	1	R	10	70	—	—
	1	R	7	70	—	—
	1	R	X	—	—	—
	2	W	7	30	—	—
	1	R	X	—	—	—
	1	R	5	70	80	70
DPan/PBS	1	W	X	—	—	—
	1	W	7	10	60	90
	1	W	8	40	60	60
	1	W	14	50	50	40
	1	R	7	30	—	—
	1	R	X	—	—	—
	1	W	9	30	—	—
	1	W	15	20	70	80
DPan/SO1861	1	W	13	40	—	—
	1	R	20	70	70	70
	2	W	9	30	—	—
	1	R	12	30	60	70
	1	R	8	30	—	—
	1	R	8	30	—	—
	1	R	4	70	80	40
	1	R	13	10	70	90

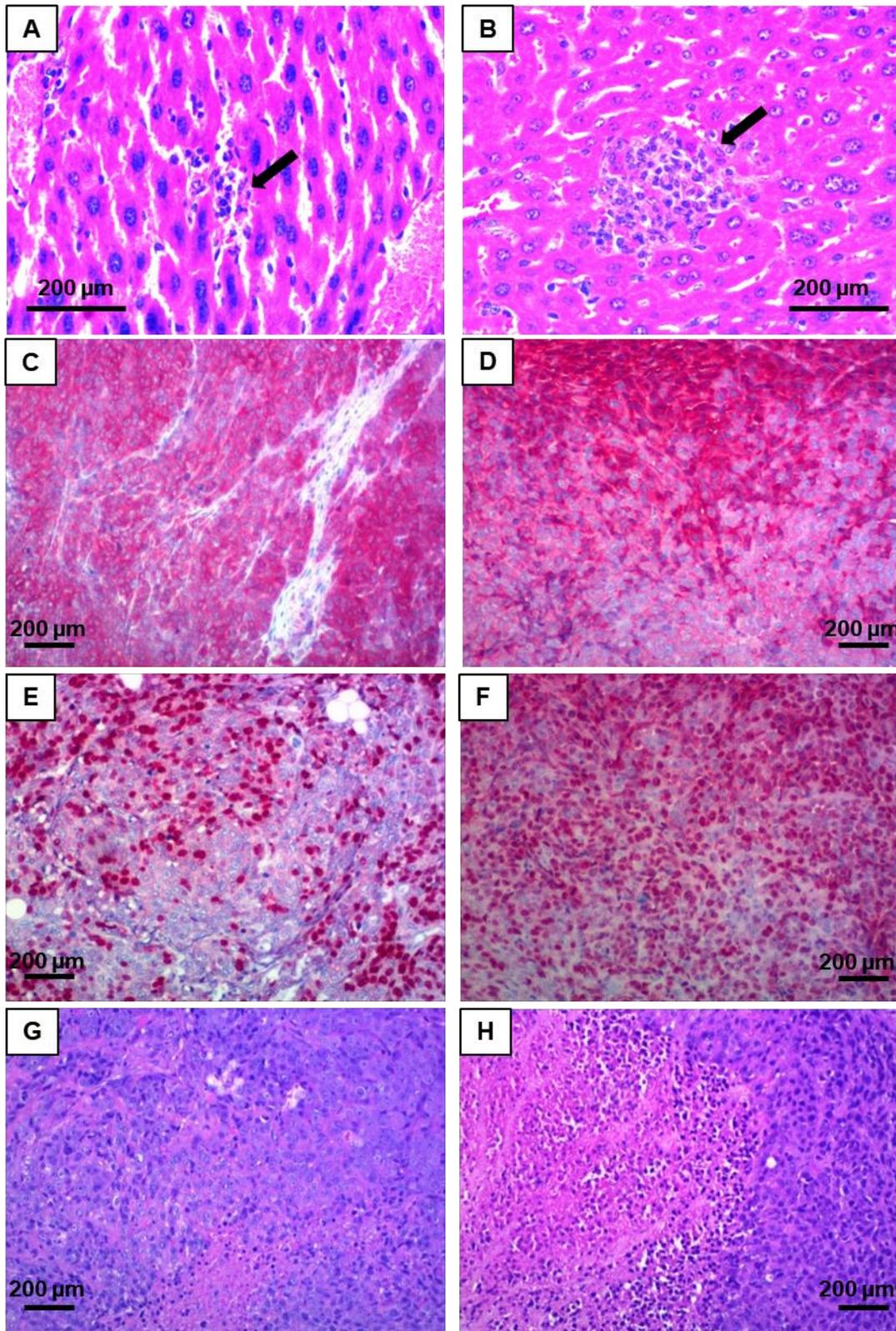


Abb. 3.25 HE- (A/B) sowie immunhistochemische (C—H) Färbung der Leber und Tumoren in der Studie zur Dosis-Wirkungsbeziehung. Exemplarisch ist ein Ausschnitt der Leber (20 × Vergrößerung) mit Index von 1 (A) und 2 (B) gezeigt. Schwarze Pfeile kennzeichnen ein granulozytäres Infiltrat mit einzelnen nekrotischen Hepatozyten. (C) zeigt ein hohes Expressionslevel von EGFR (90 %), (D) ein niedriges mit 40 %. (E) und (F) zeigen ein niedriges und hohes Expressionslevel von Ki-67 mit 50 bzw. 80 %. Der nekrotische Anteil ist in (G) und (H) mit 10 und 70 % gezeigt. Eine intensive rot-violett Färbung (C—H, 10 × Vergrößerung) korreliert mit einem hohen Anteil an Nekrosen, Ki-67 und EGFR. (B/D/F/H) stammt von einem mit DPan / PBS behandelten Tier, (A/C/E/G) von einem Tier der Kontrollgruppe PBS / PBS.

Das niedrigste EGFR-Expressionslevel hingegen mit 40 % wurde in den Therapiegruppen DPan / SO1861 und DPan / PBS detektiert. Wie in **Abb. 3.26** zu sehen, war ein reziproker Zusammenhang zwischen Tumornekrose und EGFR-Level vor allem bei den mit DPan therapierten Gruppen zu erkennen. So wiesen Tumore mit dem höchsten nekrotischen Anteil die geringste EGFR-Expression auf. Ebenso war ein proportionaler Aufwärtstrend von Ki-67 zu Nekrosen zu beobachten. Darüber hinaus zeigte der Vergleich zwischen Tumordurchmesser, Nekrosen, Ki-67- und EGFR-Expression keine weiteren Korrelationen.

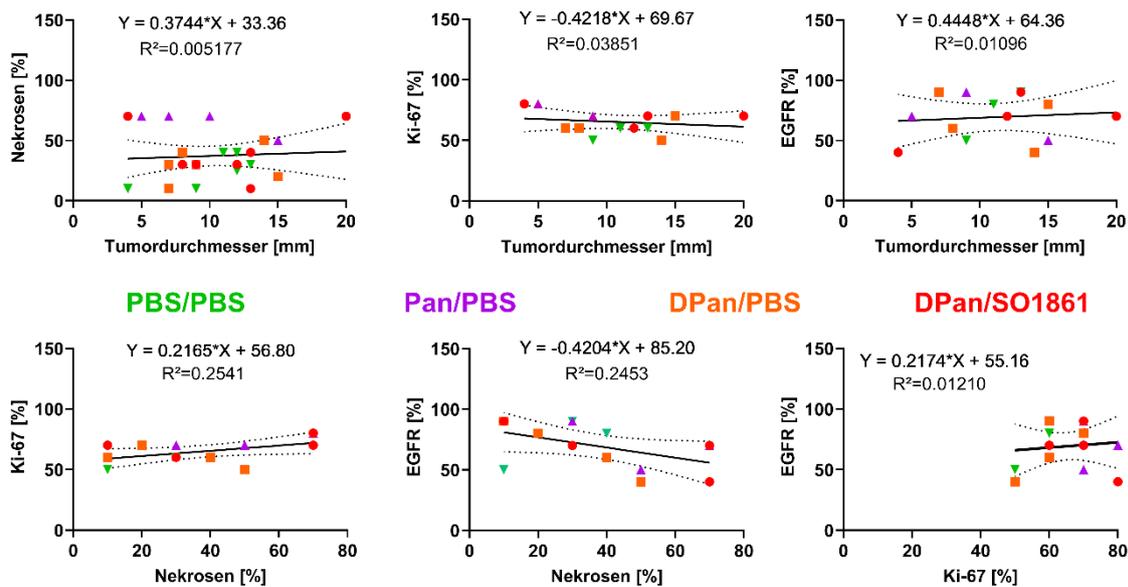


Abb. 3.26: Vergleich histopathologisch ermittelter Parameter der Dosis-Wirkungsbeziehung. Der prozentuale Anteil von Ki-67 (Proliferationsmarker), EGFR und Nekrosen der Tumoren wurde über HE- sowie immunhistochemischer Färbung (anti-EGFR und anti-Ki-67 Antikörper) visuell bestimmt. Dargestellt sind die Vergleiche von Tumordurchmesser, EGFR [%], Ki-67 [%] und Nekrosen [%] aller Behandlungsgruppen zueinander, basierend auf der Annahme einer möglichen Korrelation. Aufgrund der verschiedenen Behandlungen könnten die Zusammenhänge beeinflusst worden sein und zu einem Mischergebnis führen. Einen Trend des umgekehrt proportionalen Zusammenhangs wurde bei EGFR vs. Nekrosen sichtbar. Die gestrichelten Linien zeigen das Konfidenzintervall mit 95 % an.

Entgegen der Erwartung wurde mit der Kombinationstherapie DPan / SO1861 aber auch mit dem therapeutischen Antikörper Panitumumab keine Tumorregression erreicht. Zwar wurde das Tumorwachstum im Vergleich zu der Kontrollgruppe verlangsamt, war aber auch hier nicht so effizient wie die Behandlung mit Panitumumab. In früheren Arbeiten wurde Dianthin als chimäres Toxin D-EGF, welches ebenfalls EGFR-exprimierende Zellen adressiert, in Kombination mit SO18161 an tumortragenden Mäusen untersucht und konnte erfolgreich die Tumorreduktion bewerkstelligen. Der Gedanke lag also nahe, die zielrichtende Funktion EGF gegen einen Antikörper auszutauschen [177, 178]. Jedoch erfolgte in dieser Arbeit die Gabe des ITs i.v. im Gegensatz zu der damaligen Injektion des chimären Toxins in Tumornähe. Dies könnte basierend auf einer veränderten Pharmakokinetik den abweichenden Behandlungserfolg

erklären. Die Kinetik der SO1861-Behandlung wurde bereits eingehend studiert und ergab eine maximale Konzentration im Tumor 1 h post Injektion [161]. Käme es nun zu einem wesentlich zeitverzögerten Eintreffen von SO1861 und IT im Tumor, wäre die Effektivität deutlich herabgesetzt. Basierend darauf wurde zur besseren Einschätzung der Verteilung des ITs im Körper und Tumor dieses radionuklidmarkiert an tumortragenden Mäusen im SPECT/CT untersucht.

3.8.4 Biodistribution von ^{99m}Tc markiertem DPan

Die Markierung von DPan mit ^{99m}Tc erfolgte über den HYNIC-Linker, wofür vor der Konjugation entweder Dianthin oder Panitumumab mit diesem derivatisiert wurde. Dies hatte zum Zweck, eine mögliche Abspaltung von Dianthin aus dem Konjugat im Blutkreislauf nachverfolgen zu können. In diesem Fall würde Dianthin nicht mehr zielgerichtet transportiert, sondern nur unspezifisch vom Tumor aufgenommen werden. D(H)Pan, DPan(H) und Pan(H) wurden mit einer radiochemischen Reinheit von 63, 77 und 93 % markiert. Da DPan, welches ursprünglich als Negativkontrolle für die Radionuklidmarkierung diente, ebenfalls eine unspezifische Bindung mit ^{99m}Tc einging, wurde auch dieses *in vivo* mit einer radiochemischen Reinheit von 56 % untersucht. Die Applikation der Radionuklid markierten Proteine erfolgte i.v. in die Schwanzvene gefolgt von einem Ganzkörper-SPECT/CT 1, 3 und 18 post Injektion. Die Bildgebung wurde für jedes Protein an drei Tieren unabhängig voneinander bestimmt. **Abb. 3.27** zeigt in der coronalen, sagittalen und transversalen Ansicht die Verteilung von DPan(H) nach 1, 3 und 18 h. Der Tumor (roter Pfeil) konnte erfolgreich im SPECT/CT dargestellt werden. Dabei schien das Signal nach 3 h die höchste Intensität zu besitzen. Eine Strahlung mit der insgesamt höchsten Intensität ging vermehrt aus der Leber und Milz aus, welche von 1 h nach 3 h zu- und nach 18 h wieder abnahm.

Im Vergleich zu DPan(H) ging von D(H)Pan im Tumor ein deutlich schwächeres Signal aus und ist hier für den 3 h Scan gezeigt (**Abb. 3.28**). Auch hier war die höchste Intensität in den Organen Leber und Milz zu detektieren. Pan(H) war etwas weniger in den Organen zu detektieren und die höchste Intensität im Tumor sah man auch hier nach 3 h. Von DPan ohne HYNIC-Linker ging im Tumor kaum eine Strahlung aus und die Ergebnisse sind deshalb hier nicht gezeigt. Die Darstellung eines Signals wäre nicht deutlich von den Umgebungssignalen zu trennen gewesen. Die Bildgebung im SPECT/CT zieht den zeitlichen Zerfall von ^{99m}Tc nicht mit in Betracht. Um eine detaillierte Aussage über die Verteilung der Proteine im Körper treffen zu können, wurden von den *Volumes Of Interests (VOI)* eine *Hottest-voxel-Analyse*

durchgeführt. Dies ermöglichte die Ermittlung der zerfallskorrigierten gespritzten Aktivität [%] pro mL zu jedem Zeitpunkt (**Abb. 3.29** und **Tab. 3.5**).

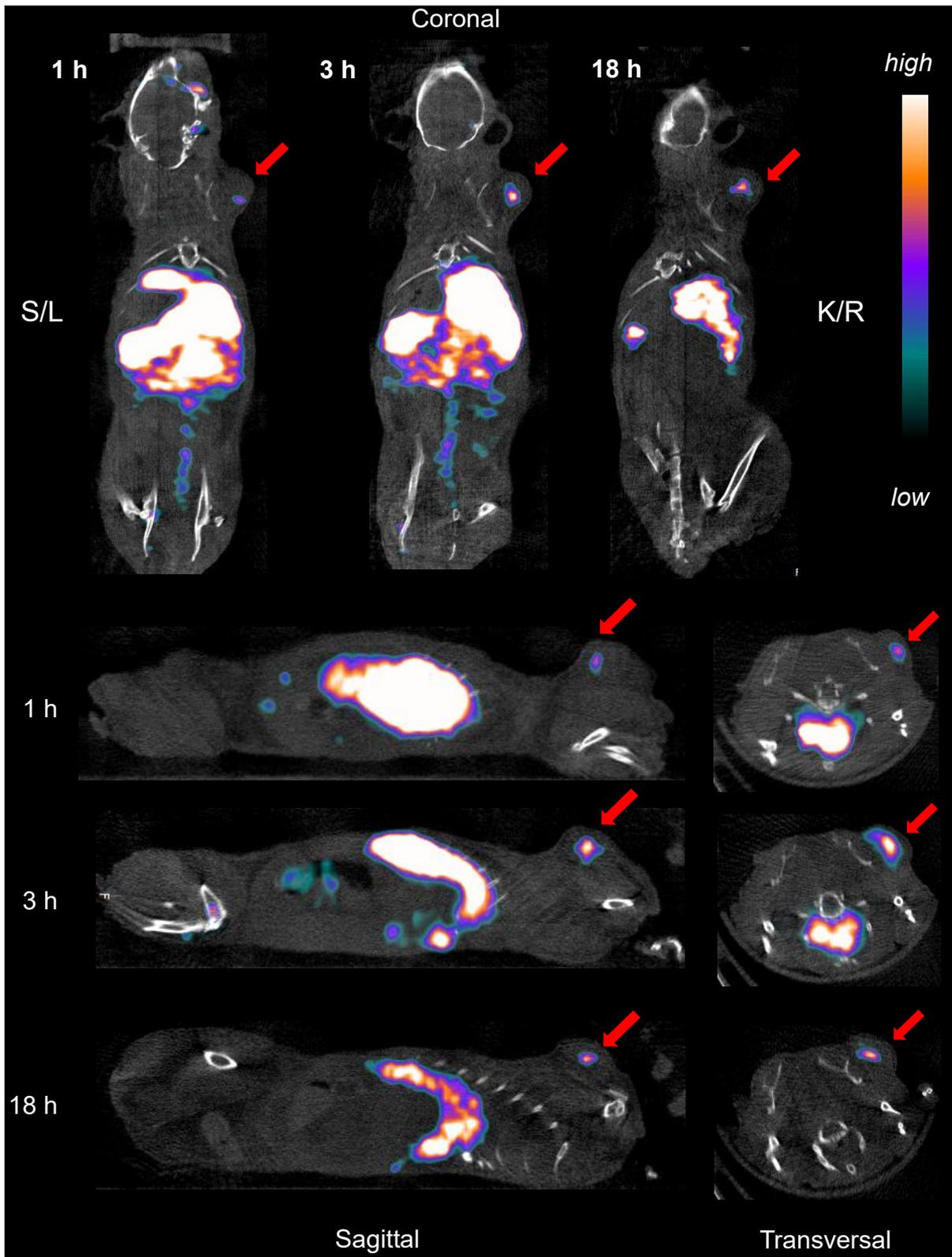


Abb. 3.27: Bildgebung von ^{99m}Tc -markiertem DPan(H) im SPECT/CT. Coronale, sagittale und transversale Ansicht einer von drei Mäusen, welcher DPan(H) mit einer Aktivität von 15.30 MBq i.v. in die Schwanzvene injiziert und nach 1, 3, 18 h ein SPECT/CT (überlagerte Darstellung) aufgenommen wurde. Tumore sind jeweils mit rotem Pfeil gekennzeichnet, der 3 h-Scan zeigt das intensivste Signal im Tumorbereich. L: Links; R: Rechts; K: Kopf; S: Schwanz. Signalintensität: hell = stark (high), dunkel = schwach (low).

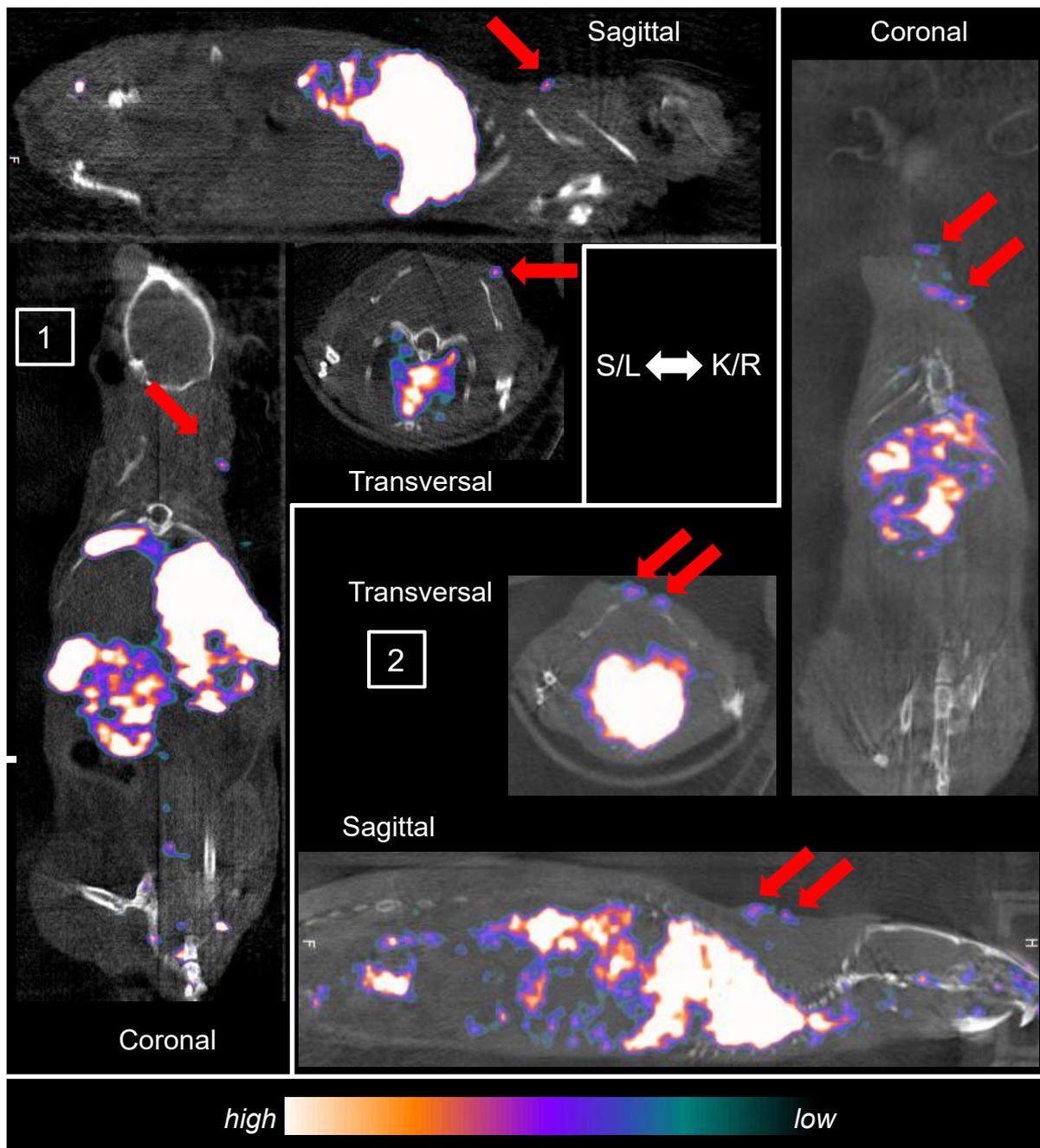


Abb. 3.28 Bildgebung von ^{99m}Tc -markiertem D(H)Pan (1) und Pan(H) (2). Coronale, sagittale und transversale Ansicht 3 h nach i.v. Injektion von 26.33 MBq D(H)Pan (1) bzw. 7.30 MBq Pan(H). Tumore sind jeweils mit rotem Pfeil gekennzeichnet. Abkürzungen wie in **Abb. 3.27**.

Deutlich zu erkennen ist hier, dass für alle Proteine die Tumoraufnahme nach 18 h am höchsten war, mit dem intensivsten radioaktiven Signal für Pan(H). Dieses befand sich zum Großteil im Herzen gefolgt von Leber und Milz, wobei die Radioaktivität in allen Organen mit der Zeit abnahm. DPan(H) war großteils in der Leber und Milz zu detektieren, wobei die Radioaktivität zeitlich nur wenig schwankte. Das niedrigere Signal im Herzen nahm hingegen zeitlich ab. D(H)Pan akkumulierte stark in der Leber mit gleichbleibendem Signal. Wesentlich geringer war dessen Aufnahme in der Milz und im Herzen, wobei die Intensität nur bei letzterem

abnahm. DPan war mit der höchsten Radioaktivität in der Leber (gleichbleibend), gefolgt von Milz (zunehmend) und Herz (abnehmend) zu finden. Die im Herzen gemessene Radioaktivität stellt hier vor allem den Blut-Pool dar.

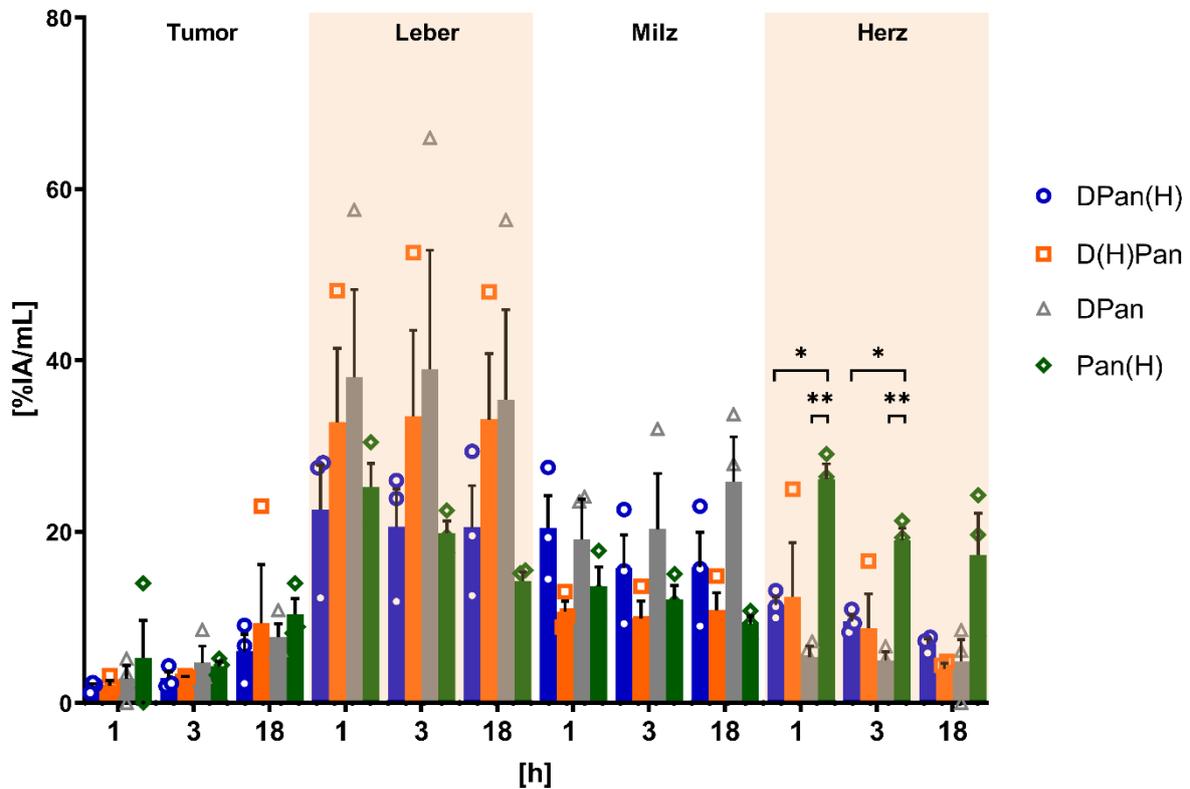


Abb. 3.29: Aktivitätsverlauf von DPan(H), D(H)Pan, DPan und Pan(H) im SPECT/CT. Dargestellt ist die prozentuale gespritzte Aktivität (*Injected Activity* IA) pro Volumen (%IA/mL) in Tumor, Leber, Milz und Herz nach 1, 3 und 18 h. Berechnet wurde diese unter Berücksichtigung des radiochemischen Zerfalls von ^{99m}Tc mittels der *Hottest-voxel*-Analyse, wobei die VOI über die Software π -mod manuell erstellt wurde. Die höchste Radioaktivität wurde in Leber, Milz und Herz (repräsentiert den Blut-Pool) gemessen, die Intensität des Signals nahm im Tumor im zeitlichen Verlauf zu und war bei 18 h an stärksten. Signifikanzen wurden über den *2way Anova* nach Tukey bestimmt (**, $p < 0.002$; *, $p < 0.05$, GraphPad Prism).

Tab. 3.5: Radioaktivitäten [%IA/mL] der ^{99m}Tc markierten Proteine DPan(H), D(H)Pan, DPan und Pan(H) nach *Hottest-voxel*-Analyse der VOIs.

	Tumor			Leber			Milz			Herz		
Zeit [h]	1	3	18	1	3	18	1	3	18	1	3	18
DPan(H)	1.91 ± 0.36	2.88 ± 0.74	6.02 ± 1.99	22.6 ± 5.17	20.59 ± 4.40	20.48 ± 4.89	20.43 ± 3.80	15.77 ± 3.85	15.89 ± 4.05	11.45 ± 0.92	9.51 ± 0.78	6.93 ± 0.56
D(H)Pan	2.06 ± 0.58	2.91 ± 0.19	9.31 ± 6.85	32.78 ± 8.63	33.5 ± 10.02	33.12 ± 7.67	10.67 ± 1.22	9.9 ± 2.01	10.84 ± 2.03	12.39 ± 6.34	8.75 ± 3.99	3.99 ± 0.65
DPan	2.86 ± 1.52	4.7 ± 1.93	7.68 ± 1.58	38.03 ± 10.23	38.98 ± 13.90	35.42 ± 10.51	19.08 ± 4.73	20.3 ± 6.50	25.85 ± 5.23	5.34 ± 1.32	4.94 ± 1.03	4.87 ± 2.53
Pan(H)	5.28 ± 4.38	4.3 ± 0.56	10.35 ± 1.83	25.21 ± 2.76	19.83 ± 1.44	14.27 ± 1.05	13.65 ± 2.23	12.11 ± 1.62	9.19 ± 0.95	26.12 ± 1.80	18.98 ± 1.43	17.25 ± 4.89

Da die Berechnung der Intensität von der markierten VOI abhängt und diese teilweise schwer exakt von der Umgebung abzugrenzen war, wurde die Radioaktivität der Organe und Tumore nach 18 h am γ -Counter gemessen (Abb. 3.30 und Tab. 3.6). Dieses Gerät ist wesentlich sensitiver und wird zur eigentlichen Bestimmung der Biodistribution verwendet. Auch hier war Pan(H) von allen Proteinen am stärksten im Tumor zu finden, gefolgt von DPan(H), D(H)Pan und DPan, wobei es keinen signifikanten Unterschied von D(H)Pan zu DPan gab. Das gleiche Schema spiegelte die Verteilung im Blut wieder. Pan(H) war auch hier vorwiegend im Blut nachweisbar, wobei DPan(H), D(H)Pan und DPan vermehrt in Leber und Milz akkumulierten. Die Radioaktivität für DPan war in der Leber und Milz im Vergleich zu den anderen Proteinen am höchsten. D(H)Pan zeigte im Gruppenvergleich in der Niere die höchste Radioaktivität. Im Dünn- und Dickdarm war diese für die Proteine gering, mit dem höchsten Wert für Pan(H). Die Messung des Muskels erfolgte gemäß der Annahme, dass hier eine besonders niedrige bis keine Aktivität zu vermuten war. Eine hohe Aktivität hätte hier für eine besonders unspezifische Aufnahme des radiomarkierten Proteins gesprochen. Wie erwartet waren die messbaren

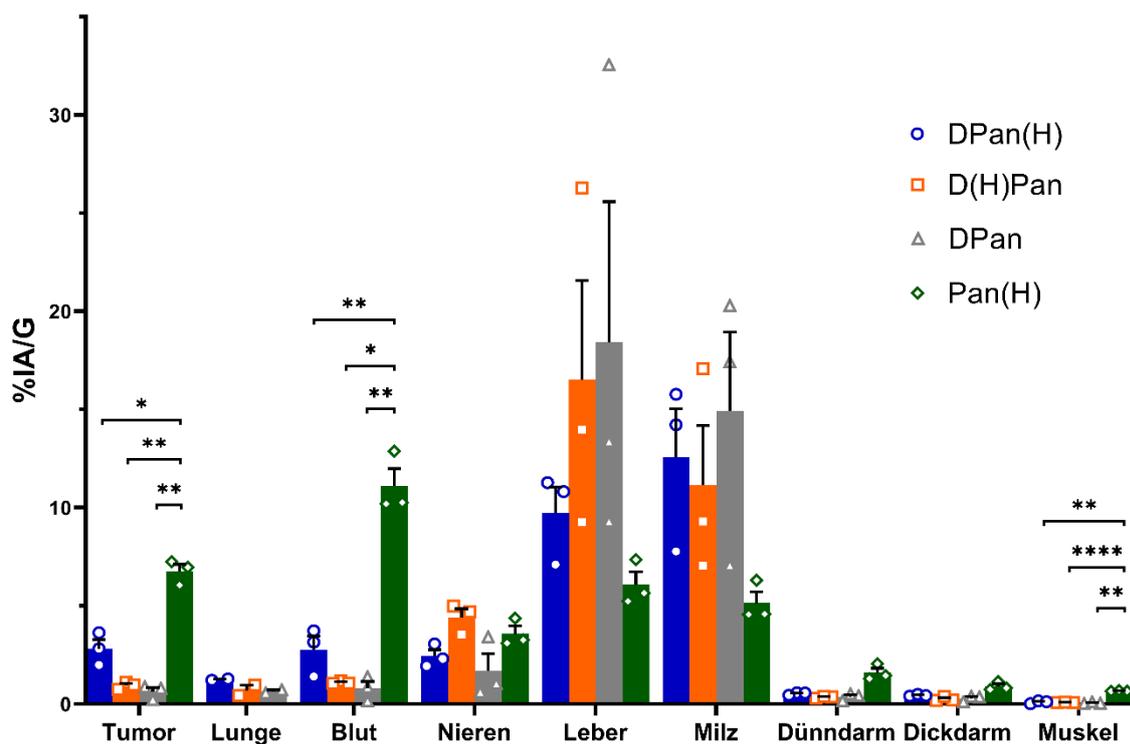


Abb. 3.30: Biodistribution von DPan(H), D(H)Pan, DPan und Pan(H). Nach dem 18 h Scan wurde die Radioaktivität von Organen und Tumoren im γ -Counter gemessen und als zerfallskorrigierte gespritzte Aktivität IA [%] pro g dargestellt. Im Tumor und Blut zeigte Pan(H) die höchste Radioaktivität gefolgt von DPan(H), D(H)Pan und DPan. Die von den Proteinen ausgehende Radioaktivität in Leber und Milz zeigte einen genau umgekehrten Intensitätenverlauf. Das Signifikanzniveau würde über die *2way Anova* Analyse nach Tukey's (****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.002$; *, $p < 0.05$, Graph Pad Prism) bestimmt

Radioaktivitäten niedrig, wobei auch hier die höchste Aktivität von Pan(H) ausging, welches sich damit signifikant von D(H)Pan, DPan(H) und DPan unterschied.

Tab. 3.6: Biodistribution von DPan, D(H)Pan, DPan(H) und Pan(H). Zerfallskorrigierte Radioaktivität [%IA/G] von ^{99m}Tc nach 18 h post Injektion in den Tumoren und Organen. Die Messung erfolgte am γ -Counter.

	DPan(H)	D(H)Pan	DPan	Pan(H)
Tumor	2.82 ± 0.47	0.95 ± 0.10	0.63 ± 0.20	6.75 ± 0.36
Lunge	1.25 ± 0.03	0.70 ± 0.26	0.64 ± 0.08	–
Blut	2.76 ± 0.70	1.10 ± 0.05	0.79 ± 0.36	11.11 ± 0.88
Nieren	2.44 ± 0.33	4.41 ± 0.44	1.70 ± 0.87	3.58 ± 0.40
Leber	9.74 ± 1.32	16.51 ± 5.07	18.42 ± 7.17	6.08 ± 0.64
Milz	12.59 ± 2.45	11.14 ± 3.04	14.93 ± 4.02	5.14 ± 0.58
Dünndarm	0.53 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.11	1.59 ± 0.23
Dickdarm	0.44 ± 0.03	0.26 ± 0.06	0.28 ± 0.09	0.90 ± 0.12
Muskel	0.10 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.66 ± 0.01

Der Vergleich der gemessenen und errechneten Radioaktivitäten über den γ -Counter und das SPECT/CT zeigt tendenziell Ähnlichkeiten, mit Blick auf die Tumorverteilung besteht jedoch eine Diskrepanz und kann zu Fehleinschätzungen der eigentlichen Verteilung des Antikörpers, des Konjugates sowie der HYNIC modifizierten Konjugate führen. Zusammen betrachtet kann gesagt werden, dass DPan als auch Panitumumab nach 18 h für den betrachteten Zeitraum das höchste radioaktive Signal im Tumor besaßen, wobei von Panitumumab das höchste ausging.

4 Diskussion

4.1 Aufbau des Antikörper-Toxin-Konjugates DPan

Dianthin als Typ I RIP ist aufgrund seiner *N*-Glykosidaseaktivität, welche ein besonders hohes zytotoxisches Potential darstellt, prädestiniert für den Aufbau von zielgerichteten Toxinen, im Speziellen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten. Es zeichnet sich bezüglich Lagerzeit und Temperatureinfluss durch eine hohe Stabilität aus. So wurde über Zirkulardichroismus-Spektroskopie gezeigt, dass es erst ab 60 °C zu einer irreversiblen Strukturveränderung einhergehend mit der Denaturierung des Proteins kommt [123]. Ebenso kann Dianthin mit einer besonders hohen Reinheit und Ausbeute (**Abb. 3.2**), welche in dieser Arbeit bis zu 13 mg pro 2 L Expressionsansatz war, in einem einfachen Expressionssystem hergestellt werden [179]. Zusätzlich gilt Dianthin im Gegensatz zu Saporin, welches bereits Gegenstand aktueller Forschung in der Herstellung von ADCs ist [180], als weniger immunogen [125]. Da Dianthin über keine zellbindende Domäne verfügt besitzt es eine unspezifisch wirkende Toxizität. Über die Konjugation oder Fusionierung an diverse zielgerichtete Funktionalitäten wie Antikörper kann aber eine (beliebige) zielgerichtete Zellaufnahme und Wirkung erzeugt werden, was im Gegensatz mit Typ II RIPs nicht möglich ist.

Panitumumab, als vollständig humanisierter IgG2-Antikörper, besitzt aufgrund seiner Herkunft im Vergleich zu chimären Antikörpern wie Cetuximab und Trastuzumab ein besonders vermindertes immunogenes Potential [181] und wird *in vivo* bis hin zu hohen Dosen besonders gut vertragen (**3.8.1**) [182]. Mit EGFR als Antigen, welches in einer Vielzahl von Krebsarten überexprimiert ist, stellt Panitumumab als zielbindende Funktion einen guten Partner für den Aufbau von ADCs dar.

Die Herstellung der Konjugate erfolgte in dieser Arbeit über einen spaltbaren SPDP-Linker, welcher Dianthin über eine Disulfidbrücke an Panitumumab bindet (**2.3.11**). SPDP ist bereits etabliert und stellt eine einfache Kopplungsmethode mit geringem Arbeitsaufwand dar. Ein besonderer Vorteil dieses Linkers ist, dass die Abspaltung des Toxins vom Antikörper erst im Cytosol durch Glutathion, welches im in solchem in weitaus höheren Mengen vorhanden ist als im Blutplasma (1–10 mM vs. 2–20 µM [71]), geschieht und neben einer notwendigen Plasmastabilität die freientfaltete Wirkung des Toxins gewährleistet. Ferner ist Glutathion im Zytosol von Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen wesentlich erhöht [183], ebenso wie Proteindisulfidisomerasen, welche ebenfalls eine Abspaltung bewirken können [184]. Die Modifizierung der Proteine mit SPDP erfolgt über die freien Aminogruppen der Lysine (**Abb. 1.3**). Dies vereinfacht die Kopplungsreaktion, da diese Gruppen vermehrt in Proteinen zu finden

sind. Gleichzeitig birgt dies jedoch den Nachteil einer nicht selektiven Konjugation, da hier keine Steuerung für eine zielgerichtete Auswahl der Lysine im Protein möglich ist und somit heterogene und quervernetzte Produkte entstehen. Um trotzdem möglichst einheitliche und reproduzierbare Kopplungsprodukte erhalten zu können, wurde in der von mir betreuten Masterarbeit von Lea Sophie Günther [168] das Kopplungsprotokoll zugunsten einer geringen Präzipitation der Konjugate und gleichbleibender DAR optimiert. Die Modifizierung freier Thiolgruppen des Antikörpers mit NEM unterdrücken zusätzlich eine inter- und intramolekulare Kreuzreaktion, da Thiole die über Lysine eingeführte SPDP-Funktion angreifen und Disulfidbrücken zwischen Antikörper-Molekülen ausbilden können. So konnte nach einer zweistufigen Aufreinigung Konjugat mit einer durchschnittlichen molekularen Masse von 181 kDa mit einer DAR von ~ 1:1 erhalten werden, welches zudem bei einer 4 °C-Lagerung mit einer Konzentration unter 0.5 mg/mL kaum Präzipitation über einen Verlauf von mehreren Monaten und somit eine sehr gute Stabilität zeigte. Jedoch war es nicht möglich, freies Panitumumab über IMAC vollständig von dem Konjugat zu trennen (**Abb. 3.6**), was bereits in sehr frühen Arbeiten für die Reinigung von Immunotoxinen *via* IMAC beschrieben wurde [185]. Eine Begründung hierfür könnte sein, dass Panitumumab ebenfalls Histidin reiche Domänen enthält, welche eine ausreichende Affinität zu Ni-NTA besitzen, um bei höheren Konzentrationen in substanzieller Menge daran zu binden. Eine alternative Methode zur Abtrennung der Konjugate von freiem Dianthin und Panitumumab stellt die Kationenaustauschchromatographie dar. Hierbei erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt, indem sie abhängig von der durch den pH-Wert des Laufpuffers erzeugten Ladung mit der negativ geladenen stationären Phase interagieren. Der pI-Wert gibt an, bei welchem pH-Wert das Protein nach außen hin neutral wirkt. So hat laut theoretischer Berechnung (ExPASy ProtParam tool) Dianthin einen pI-Wert von 9.48, Panitumumab von 6.73 und DPan (DAR 1:1) von 7.96. In dem pH-Bereich 6.73–7.96 sollte DPan, wie auch Dianthin, theoretisch positiv geladen sein und an die stationäre Phase der Säule binden wohingegen Panitumumab keine Bindung zeigen und im Durchlauf auswaschbar sein sollte (Dianthin sei hier zu vernachlässigen, da dieses vorher über Protein A-Affinitätschromatographie entfernt wurde). Da der theoretische pH-Bereich aber gering ist ($\Delta p = 1.23$) könnte man eine nicht 100 %ige Trennung von DPan und Panitumumab erwarten. So waren erste Versuche, dieses Trennverfahren zu etablieren, erfolglos und führten zu keiner Trennung von DPan und Panitumumab. Eine Optimierung bezüglich geeigneter Puffer und Systembedingungen erfordern im Vergleich zu der bisher durchgeführten Affinitätschromatographie einen wesentlich höheren Zeitaufwand und können eine ideale

Trennung von Konjugat und Antikörper nicht garantieren. Diesbezüglich veröffentlichte Boylan *et al.* 2013, dass die elektrostatischen Eigenschaften sowohl vom DAR der ADCs abhängen als auch von der Kopplungsposition im Antikörper [186].

Die einfach zu handhabende Kopplung über einen spaltbaren SPDP-Linker generiert somit nicht nur heterogene Konjugate, in welchen Dianthin über unterschiedliche Amine (**Abb. 1.3**) an den Antikörper gebunden ist, sondern außerdem unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Ladung, Stabilität und Pharmakokinetik. Eine Möglichkeit das Problem der Heterogenität zu umgehen bietet das neue Konzept der Affinitätspeptid-vermittelten regiodivergenten Funktionalisierung (AJICAP) von nativen Antikörpern nach Yamada *et al.* [187]. Über ein T7-Phage Display System wurde hier eine Peptidsequenz bestehend aus 17 Aminosäuren identifiziert, welche eine selektive Affinität zu dem Fc-Teil des IgG1-Antikörpers besitzt. Basierend auf dem Abstand des Affinitätspeptids zu dem nächstgelegenen Lysin des Antikörpers in der schweren Kette wurde ein Linker mit eben diesem Abstand designt, welcher eine aminreaktive NHS-Funktion besitzt. Die Peptidsequenz mit hoher Fc-Affinität und spezifischer Linkerlänge ermöglicht somit die räumliche Nähe und einhergehend regiodivergente Reaktion des Lysins mit dem NHS-Ester des Linkers. Nachfolgend konnte unter milden Reaktionsbedingungen mit TCEP das Peptid abgespalten werden und ermöglichte der so generierten Thiolgruppe an spezifischer Position des Antikörpers die Modifikation mit SMCC derivatisiertem MMAE. Dabei war diese Methode nicht nur auf Antikörper des Typs IgG1 beschränkt, sondern funktionierte auch für die Subtypen IgG2, zu welchem Panitumumab gehört, und IgG4. Ferner konnten Matsuda *et al.* diese Methode für die Herstellung von Trastuzumab-AJICAPTM-MMAE im Gramm-Maßstab benutzen und unterstreicht deren Effektivität nicht nur im Labormaßstab, sondern auch mit Hinblick auf die pharmazeutische Industrie [188]. Eine weitere Möglichkeit der ortsspezifischen Funktionalisierung wurde zur Generierung sogenannter ThiomabTM-ADCs benutzt [189-191]. Junutula *et al.* führten 2008 über Genmodifikation erstmals Cystein-Reste selektiv in der leichten und schweren Kette des Fc-Teils von Trastuzumab ein, wobei die schwere Kette zu 100 % mit Biotin über einen Maleimid-Linker modifiziert werden konnte, die der leichten Kette nur zu 25–50 %. Dieses Konzept wurde erfolgreich für die Generierung eines anti-Mucin ThiomabTM-ADCs angewandt, in welchem MMAE über einen proteaselabilen Linker an die Cysteine in Position HC-A114C (Kabat Nummerierung) angebracht war. Die einheitliche Stöchiometrie des ThiomabTM-ADCs führte im Vergleich zu einem analogen ADC zu einem verbesserten therapeutischen Index *in vivo*.

Weiterhin können durch partielle Reduktion mit DTT oder TCEP intermolekulare Disulfidbrücken zu Cysteinen reduziert und hier spezifisch modifiziert werden [192]. Zwar kommt es auch hier zu einer geringen Heterogenität [77], welche im Vergleich zu der Modifizierung über die Lysine dennoch wesentlich geringer ist. Adcetris® (Brentuximab Vedotin), ein mit MMAE modifizierter anti-CD 30 Antikörper, fand so 2011 seine erfolgreiche Zulassung zur Behandlung des Hodgkin-Lymphoms.

Glykosylierte Antikörper können ebenfalls über deren Zuckerseitenkette, welche sich an Position N297 der C_H2-Domäne des Fc-Teils befinden, ortsspezifisch modifiziert werden. Bereits seit 1975 werden Diole der Glykane mit Periodat zu Aldehyden oxidiert, welche anschließend die Reaktion mit einem Hydrazid modifiziertem Protein oder anderem Molekül erlauben [193-195]. Allerdings muss hier insbesondere die *In-vivo*-Stabilität der Hydranonbindung untersucht werden, welche leicht hydrolysiert werden kann, sodass gegebenenfalls eine Reduzierung mit Cyanoborhydrid ratsam ist. Li *et al.* [196] beschrieben die Einführung einer Azid modifizierten Sialinsäure über das Enzym Sialyltransferase ST6Gal1. Die 1,3-dipolare Cycloaddition (Klick-Reaktion) des Azid modifizierten anti-CD22-Antikörpers mit dem Alkin modifizierten Doxorubicin ermöglichte die Generierung eines homogenen ADCs. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass keine genetische Modifizierung notwendig und dieses System somit einfach zu handhaben ist. Bioorthogonale Funktionalisierungen mit sogenannten Klickfunktionen wie Aziden oder Alkinen lassen sich mittels nicht natürlicher Aminosäuren in Proteine einführen. Dies geschieht mit einem tRNA / Aminoacyl-tRNA Synthetase Paares für die entsprechende Aminosäure über das Amber- / Opal- / Ochre-Stopp Codon [197, 198]. Für den spezifischen Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure in einen Antikörper, welches zuvor einer genetischen Modifizierung bedarf, kann dies sehr kompliziert werden. Wesentlich einfacher kann dies im Fall von Dianthin bewerkstelligt werden. So besitzt Dianthin vier Methionine, von welchen drei über zielgerichtete Mutagenese entfernt und somit der ortsspezifische / selektive Einbau der analogen Aminosäure Azidohomoalanin (Klick-Funktion) ermöglicht werden kann. In unserer Arbeitsgruppe konnte dies bereits erfolgreich durchgeführt werden (Daten nicht veröffentlicht). Sato *et al.* inkorporierten ortsspezifisch in einem zellfreien Expressionssystem p-Azidomethyl-L-Phenylalanin in Trastuzumab und generierten in einer Klick-Reaktion mit DBCO-modifiziertem MMAF ein hochspezifisches ADC, welches *in vitro* ein hohes zytotoxisches Potential zeigte [199]. Der Vorteil eines solchen Expressionssystems ist die Möglichkeit, auch für z. B. Bakterien toxische Proteine zu exprimieren. Nachteilig jedoch sind die hohen Kosten dieses Expressionssystems als auch die Produktion im industriellen Maßstab [200]. Der Aufbau

des Systems im Mikrotiter-Ansatz erlaubt hingegen das simultane Austesten verschiedener Reaktionsparameter. Die Einführung von Selenocystein in einen Antikörper hingegen erwies sich als besonders einfach, da hauptsächlich C-terminale Cystein codierende Positionen zur Inkorporation beitragen und keine vorherige genetische Modifikation nötig war [201]. Der niedrige pKa-Wert von 5.5 ermöglichte dabei einen selektiven nukleophilen Angriff von Selenocystein an Maleimid-Linker unter leicht sauren Bedingungen ohne Konkurrenzreaktionen von Lysin oder Cysteinen, welche unter diesen Bedingungen nicht reaktiv sind [202, 203].

Die ortsspezifische Modifikation eines Antikörpers mithilfe der mikrobiellen Transglutaminase stellt eine weitere Möglichkeit zur Generierung homogener ADCs dar. Hierbei wird enzymatisch ein primäres Amin beinhaltenes Molekül an Glutamin, welches an Position Q295 des Fc-Teils befindlich ist, unter Ausbildung einer Amidbindung gekoppelt. Dies ermöglicht entweder den direkten Einbau der toxischen Fracht oder beispielsweise den Einbau einer Azid-Klickfunktion, welche mit Alkin modifizierten Molekülen reagieren kann. So generierten Dennler *et al.* 2014 Trastuzumab-MMAE mit einem definierten DAR von 2 und hervorragender *In-vitro*-Toxizität [204]. Jisoo *et al.* hingegen erzeugten 2018 in einer *Peptide-Directed Photocross-linking* (PEDIP) Reaktion über ein Fc-bindendes Peptid sowie einer photoreaktiven nichtproteinogenen Aminosäure Trastuzumab-PE24, dessen zytotoxisches Potential ebenfalls positiv *in vitro* evaluiert wurde [205]. Trotzdem diese Methoden und Linker ein selektiveres ADC generieren können, wurde in dieser Arbeit die Konjugation über die Lysine und den SPDP-Linker vollzogen, da so erzeugtes und sehr stabiles DPan in früheren Arbeiten eine hervorragende Zytotoxizität bewies [123] und mit einer erheblichen Zeitersparnis verbunden war. Da genetisch modifiziertes Klick-Dianthin aber bereits in unserer Arbeitsgruppe vorhanden ist, wären fortführende Arbeiten an diesem zur Erzeugung eines Klick-ADCs unter Gewährleistung der Homogenität von besonderem Interesse. Ebenso existiert bereits ein genetisch modifiziertes Dianthin, welches an einer definierten Position ein Cystein (Cys-Dianthin) trägt und bereits für den Aufbau eines ADCs verwendet wird. Interessant wäre hier deren Vergleich zu dem in dieser Arbeit hergestelltem DPan bezüglich A) der Expressionsausbeute des Dianthins, B) der Kopplungsausbeute des homogenen ADCs und C) deren enzymatischer Aktivität sowie Zytotoxizität. Bezüglich A) konnte bereits gezeigt werden, dass diese für Klick-Dianthin als auch Cys-Dianthin erheblich reduziert war (Daten nicht veröffentlicht).

4.2 Charakterisierung von DPan

Die Plasmastabilität und korrelierende unspezifische Zytotoxizität von Mylotarg® zeigt, wie wichtig neben der Plasmastabilität ein genau definiertes DAR besonders mit Blick auf *In-vivo*-Versuche sowie die Anwendung im Menschen ist [88, 89, 91] um ungewollte toxische Nebeneffekte zu kontrollieren. Je höher das DAR desto toxischer auch das ADC, ebenso aber unter Umständen auch dessen therapeutische Effizienz. Das DAR wurde in der hier vorliegenden Arbeit über MALDI-TOF-MS bestimmt. Dabei konnte erfolgreich gezeigt werden, dass aufgrund der gewählten Reaktionsbedingungen DPan eine durchschnittliche molekulare Masse von ~181 kDa besaß, welches einem DAR von ~1:1 entspricht (**Abb. 3.9**). Zwar waren im Polyacrylamidgel und Westernblot drei dominante Konjugatbanden zu sehen (oberhalb 250 kDa, **Abb. 3.8**), welche vermutlich ein DAR von 1:1, 2:1 und 3:1 darstellen, aber das mehrmalige Wiederholen der Konjugation zeigte ein gleichbleibendes DAR und bestätigt die Effizienz der Reaktionsbedingungen als auch des SPDP-Linkers. Von Interesse wäre hier, an welche Lysine SPDP sowohl in Dianthin als auch Panitumumab bindet. Dieses kann untersucht werden, indem die SPDP modifizierten Proteine nach einer SDS-PAGE einem Trypsin-in-Gel-Verdau unterzogen werden. Trypsin spaltet selektiv nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und auch modifiziertem Cystein und generiert so Peptidsequenzen, welche via MALDI-TOF-MS analysiert werden können [206]. Der Vergleich zu den nicht modifizierten Proteinen ermöglicht es, die in der Kopplungsreaktion involvierten Lysine zu identifizieren. Neben der Einheitlichkeit des ADCs ist es ebenso besonders wichtig, dass die toxische Funktion des Dianthins auch nach Kopplung des Antikörpers gewährleistet ist. Nicht konjugiertes Dianthin besaß eine enzymatische Aktivität mit $312.2 \text{ pmol}_{\text{Adenin}}/\text{pmol}_{\text{Protein}}/\text{h}$, wohingegen das von DPan annähernd um die Hälfte auf $153.3 \text{ pmol}_{\text{Adenin}}/\text{pmol}_{\text{Protein}}/\text{h}$ reduziert war, wobei eine zusätzliche Modifizierung mit HYNIC kaum einen Einfluss ausübte. Hierbei ist zu vermuten, dass an Dianthin gekoppeltes Panitumumab mit einer Größe von 144.3 kDa ein sterisches Hindernis bedeutet und aufgrund der strukturellen Veränderung Dianthin seine enzymatische Aktivität nicht vollständig entfalten kann. Wie in **Abb. 1.3** zu sehen befinden sich Lysine in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums und so wäre es nicht verwunderlich, wenn eine Konjugation über diese zu einer Abschirmung des katalytischen Zentrums führen könnte. Ebenso ist bekannt, dass bereits geringfügige strukturelle Veränderungen in der Proteinsequenz und somit der Proteinkonformation, was nach einer derartigen Modifikation wahrscheinlich erscheint, zu wesentlich veränderten Eigenschaften führen können [207]. Gilabert-Oriol *et al.* fanden 2013 in Arbeiten mit Dianthin-EGF und dem Analogon Saporin-EGF heraus, dass nur äußerst geringe strukturelle Veränderungen in der Peptidsequenz zu einem

Expressionsunterschied führten, wobei Dianthin-EGF mit einer doppelt so hohen Ausbeute exprimiert werden konnte [124]. Weiterhin war die enzymatische Aktivität von Dianthin-EGF zu Dianthin vermindert und der Vergleich von letzterem mit Saporin zeigte dies ebenso. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass die im katalytischen Zentrum liegenden Aminosäuren Tyr73, Tyr121, Glu177 sowie Arg180 bei Dianthin zu einer unterschiedlichen Konformation als bei Saporin führen. Weiterhin gibt es maßgebliche Unterschiede bezüglich des Oberflächenpotentials. Dianthin zeigt in der katalytischen Tasche eine negatives, in ihrer Umgebung aber ein positives Potential, wohingegen Saporin negativ in der Umgebung des katalytischen Zentrums ist. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass der Oxacarbenium-ähnliche Übergangszustand, welcher durch Protonierung des N3-Atoms durch Arg180 entsteht, infolge des negativen Potentials von Saporin besser stabilisiert wird und somit zu einer verbesserten katalytischen Aktivität von Saporin im Vergleich zu Dianthin führt [127, 208, 209]. In der 2000 veröffentlichten Arbeit von Barbieri *et al.* führte die Konjugation von sowohl Dianthin als auch Saporin an den Ber-H2 anti-CD30 IgG1-Antikörper ebenfalls zu einer Halbierung der enzymatischen Aktivität [210]. Um zu überprüfen, ob die enzymatische Aktivität von Dianthin durch Abspaltung von Panitumumab reversibel wiederhergestellt werden kann, könnte das Konjugat mit DTT behandelt und das so freie Dianthin erneut auf dessen *N*-Glykosidaseaktivität untersucht werden [210].

Panitumumab als vollständig humanisierter IgG2-Antikörper adressiert EGFR und wird zur Behandlung des metastasierenden kolorektalen Karzinoms (RAS-Wildtyp) sowohl in Form der Monotherapie als auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum FOLFOX oder FOLFIRI eingesetzt [173]. Nach Bindung an die extrazelluläre Domäne III des EGF-Rezeptors kommt es über Rezeptor vermittelte Endozytose zur Internalisierung des Antikörper-Rezeptor-Komplexes gefolgt von dem Recycling zur Zelloberfläche oder der Degradierung in Lysosomen. Die Hauptaufgabe von Panitumumab als Funktion in einem Immunotoxin aber ist der zielgerichtete Transport des Toxins hin zum Wirkort, der Tumorzelle.

Nachdem bereits die enzymatische Aktivität der Konjugate erfolgreich nachgewiesen werden konnte, war für meine Arbeit maßgeblich entscheidend, ob die Affinität von Panitumumab zum EGFR trotz Konjugation des Antikörpers an Dianthin weiterhin von Bestand war. Aufgrund der durchgeführten Kopplungsmethoden, nämlich über nichtspezifische Lysine, war es durchaus vorstellbar, dass Dianthin an den antigenbindenden Fab-Bereich koppelt und somit die Bindung des Antikörpers an den Oberflächenrezeptor unterbindet. Über Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie wurde hier erstmals die Bindungsaffinität von DPan, D(H)Pan, DPan(H) und Dianthin an das rekombinant, humane EGFR-Fc Chimera

Protein untersucht und mit dem Bindungsverhalten von Panitumumab verglichen (3.6.3). Hierbei war deutlich zu erkennen, dass die Bindungsaffinität weder von DPan, noch der HYNIC-modifizierten Konjugate D(H)Pan und DPan(H), an EGFR vermindert war und im Bereich von $K_D = 1.5\text{--}3.3 \times 10^{-10}$ M lag (Abb. 3.10). Dies deckte sich hervorragend mit den in der Literatur für Panitumumab genannten Werten von $0.5\text{--}3.4 \times 10^{-10}$ M [169-171] und unterstützte die These, DPan als erfolgreiches Immunotoxin etablieren zu wollen.

Konträr hierzu publizierte Zhou *et al.* 2012, dass Affinitäten unterhalb $K_D = 10\text{--}100 \times 10^{-10}$ M nicht zu einer verbesserten quantitativen Tumorakkumulation führen und sogar die Effektivität des Tumor-Targetings verschlechtern könnte [211]. Begründet sei dies mit einer vermehrten Zellaufnahme sowie Degradierung bei zu hoher Bindungsaffinität. Weiterhin, nach Rudnick *et al.* [212], verschob sich die Distribution des Antikörpers mit steigender Antigen-Affinität hin zu einer perivaskulären Verteilung sowie einem erhöhten Katabolismus sowie Antikörper-Degradierung, welches zu einem Herabsetzen der Tumorpenetration führte, einhergehend mit einem verschlechterten therapeutischen Nutzen. Basierend hierauf sollte vor Kreierung eines Antikörpers oder Antikörper-Konstruktes zwingend darauf geachtet werden und mit in das Design einfließen, für welche spezifische Anwendung, perivaskuläre Verteilung oder gründliche Tumorpenetration, dieser benutzt werden soll. Für das in dieser Arbeit verwendete ADC DPan war vor allem die erfolgreiche Tumoraufnahme und -penetration entscheidend, da Dianthin seine Wirkung im Zytosol entfaltet.

4.3 Bewertung des zytotoxischen Potentials von DPan in Kombination mit SO1861

Die über Panitumumab vermittelte Antigenspezifität ermöglicht den zielgerichteten Transport von Dianthin zum Wirkort in der Tumorzelle, wobei die Zellaufnahme über Rezeptor vermittelte Endozytose erfolgt [70]. Wirksamkeit limitierende Faktoren sind hier – wie generell bei Immunkonjugaten mit zytosolisch wirkenden Effektorsubstanzen – der endosomale und lysosomale Abbau sowie das Recycling zurück zur Zelloberfläche. Um der lysosomalen Degradierung entgegen zu wirken sind verschiedene Methoden bekannt, wie eingangs beschrieben (1.6). In dieser Arbeit wurde der EE mit dem triterpenoiden Saponin SO1861 ermöglicht. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppen Fuchs und Melzig wurde beschrieben, dass die durch das Saponin ausgelöste Freilassung in das Zytosol zum einen pH-Wert abhängig ist und erst im Zuge der natürlichen endosomalen / lysosomalen Reifung ermöglicht wird, und zum anderen von der Proteinsequenz des Toxins abhängt [152, 213]. Die Überlegung war daher, ob die kombinatorische Wirkung von Dianthin und SO1861 durch die Kopplung an eine zielgerichtete Funktion (Panitumumab) als eine Art Plattformtechnologie fungieren kann, in

welcher lediglich die zielgerichtete Funktion ausgetauscht wird. Die Konjugation von Dianthin an Panitumumab resultierte in einer deutlichen Verschiebung der Dosis-Wirkungskurven hin zu niedrigeren Konzentrationen, welche wesentlich durch die Kombination mit SO1861 verstärkt werden konnte (**Abb. 3.14**) sowie im Vergleich mit der Nichtzielzelle zu einem enormen 145-fachen Spezifitätsgewinn führte (**Tab. 3.2**). Dabei zeigte Panitumumab im getesteten Konzentrationsbereich keine Zytotoxizität und verdeutlichte somit, dass die toxische Funktionalität über Dianthin / SO1861 vermittelt wird. Zur besseren Abschätzung der Toxizität wurde die Konzentration berechnet, bei welcher das Zellwachstum um 50 % vermindert war (**Tab. 3.2**). Die Berechnung der EC_{50} -Werte erfolgte über einen Vier-Parameter-Fit, bei welchem die obere und untere Grenze auf 100 % beziehungsweise 0 % gesetzt wurde. Die obere Grenze mit 100 % konnte basierend der Annahme gewählt werden, dass bei zunehmender und unendlicher Verdünnung des Toxins sich die Vitalität der Zellen denen der unbehandelten Kontrolle annähert. Die untere Grenze mit 0 % wurde basierend auf früheren Versuchen angenommen, da ein vollständiges Zellsterben bei der Behandlung mit Dianthin, DPan und Panitumumab bei der Zielzelle HCT116 zu erwarten war, wenn auch teilweise erst bei höheren Konzentrationen [123, 171, 214]. Bezüglich der Nichtzielzelle MDA-MB-453 wurde auch hier die untere Grenze auf 0 % gesetzt, gemäß der Annahme, dass Dianthin unspezifisch über Pinozytose von der Zelle aufgenommen und dessen zytotoxischer Effekt zellunspezifisch von SO1861 verstärkt wird, sodass auch dort bei entsprechend hoher Konzentration vollständiges Zellsterben erfolgt [155]. Dies gilt übertragend für DPan, wobei hier fast ausschließlich das zytotoxische Potential von Dianthin zum Tragen kommt. Der von Panitumumab ausgelöste Effekt sollte hingegen gering sein, da EGFR nur in äußerst geringen Mengen von den MDA-MB-453-Zellen exprimiert wird [172] und somit Panitumumab konzentrationsabhängig und vermehrt unspezifisch über Pinozytose von der Zelle aufgenommen werden sollte.

Vergleichend zeigten die per MTT-Assay oder IncuCyte-Messung erhaltenen Dosis-Wirkungskurven von Dianthin, Panitumumab und DPan \pm SO1861 tendenziell einen ähnlichen sigmoidalen Verlauf, wobei die Berechnung der EC_{50} -Werte deutliche Unterschiede ergab. Im Fall von Panitumumab, welches weder auf Ziel- noch auf Nichtzielzelle sowie in Kombination mit SO1861 Zytotoxizität zeigte, sind alle berechneten EC_{50} -Werte, gerade mit Blick auf das schlechte Bestimmtheitsmaß R^2 , nicht realistisch und streng mathematischer Natur. Je näher R^2 am Wert 1 liegt, desto besser ist die Güte der Regression und somit auch der Messwerte. Die für Dianthin berechneten Werte beider Messverfahren (MTT und IncuCyte) decken sich für die Kombination mit SO1861 gut, wobei für die Werte ohne SO1861 analoges zu Panitumumab gilt. Erstaunlicherweise kam es zu einem beträchtlichen Unterschied in den Messverfahren bei

der Berechnung der EC₅₀-Werte für DPan um eine Zehnerpotenz bei beiden Zelllinien. Eine mögliche Erklärung hierfür kann sein, dass nur minimal veränderte Messwerte bei einem schlechten R² einen großen Einfluss auf den Verlauf der Regressionskurve haben können und folglich auch auf davon berechnete Werte. Bei genauer Betrachtung der MDA-MB-453-Kurvenverläufe (beider Messverfahren) für Dianthin in Kombination mit SO1861 fällt auf, dass ab einer Konzentration von 0.1 nM ein Plateau ähnlicher Kurvenverlauf zu erkennen ist (**Abb. 3.14**). Ein solcher Verlauf kann häufig bei zu Resistenz ausbildenden Zellen beobachtet werden, jedoch gilt MDA-MB-453 nicht als solche [215]. Aber angenommen man würde hier eine Resistenz berücksichtigen, dann dürfte die untere Grenze nicht auf 0 % gesetzt werden, da kein 100 %iges Zellsterben zu erwarten ist. Dies würde wiederum zu einem veränderten und im vorliegenden Fall wesentlich niedrigeren EC₅₀-Wert führen, welcher nur die Konzentration angibt, bei der das Wachstum von nicht resistenten Zellen um 50 % vermindert ist. Ein direkter Vergleich mit der Dianthin behandelten Zielzelllinie wäre daher womöglich nicht aussagekräftig. Dass der unspezifische toxische Effekt von Dianthin / SO1861 auf die Zielzelle intensiver war als für die Nichtzielzelle kann durch das unterschiedliche Proliferationsverhalten der Zelllinien erklärt werden. So haben HCT116-Zellen eine Verdopplungsrate von 25–40 h [216], wohingegen diese für MDA-MB-453-Zellen bei 50–60 h liegt [217]. Bei einer höheren Proliferationsrate könnte auch von einer vermehrten Pinozytose sowie erhöhter Proteinsynthese ausgegangen werden, was aufgrund des Wirkungsmechanismus von Dianthin mit einer höheren Zytotoxizität korreliert [218].

Was hier jedoch sehr deutlich gezeigt werden konnte ist, dass DPan Antigen spezifisch internalisiert wird und in Kombination mit SO1861 als EEE mit Hinblick auf die folgenden *In-vivo*-Versuche ein außerordentlich zytotoxisches Potential beweist.

4.4 DPan vermittelte Rekrutierung von Effektorzellen der Immunantwort

Der Einsatz von Antikörpern als Krebstherapeutikum dient nicht nur der Blockierung der Oberflächenrezeptoren sowie Inhibierung von Signalkaskaden, sondern auch in der Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems, um so einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt hervorzurufen (**1.3**). Die ADCC wird dabei hauptsächlich durch Aktivierung von NK-Zellen, aber auch Monozyten / Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Granulozyten ausgelöst, indem für jede Zellart ein spezifischer Fc γ -Rezeptor den Fc-Teil des Antikörpers adressiert. Dabei bindet Panitumumab als IgG2-Antikörper vorwiegend an Fc γ RIIa, welcher sich im hohen Maß auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen befindet [219-221]. Fc γ RIII, vorwiegend auf NK-Zellen befindlich, bindet an IgG1-Antikörper wie

Cetuximab oder Zalutumumab [211]. Monozyten und Makrophagen sind die Hauptbestandteile des angeborenen Immunsystems und eliminieren Pathogene über Phagozytose sowie Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und spielen eine Rolle in der Vermittlung der T-Zell-Immunantwort [222]. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen kann über verschiedene Wege erfolgen, wobei hier durch Stimulation mit LPS Makrophagen des proinflammatorischen Phenotyps M1 generiert wurden. Diese sind befähigt, proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 oder IL-12 zu produzieren [222, 223]. Die von Panitumumab ausgelöste ADCC, gerade im Vergleich zu dem IgG1-Antikörper Cetuximab, gilt als vermindert [220] und somit war für diese Arbeit entscheidend, ob die Konjugation von Dianthin an Panitumumab nicht zusätzlich das Potential der ADCC hinabsetzt. Dies konnte nicht bestätigt werden. So wurde hier erstmals gezeigt, dass das Immunotoxin DPan in einer nichttoxischen Konzentration effektiv das Zellsterben durch Rekrutierung von Monozyten ermöglichte, vergleichbar zu dem durch Panitumumab hervorgerufenen Effekt (**Abb. 3.16**). Eine Monozytenbindung wurde somit nicht beeinflusst, was in einem verminderten zytotoxischen Effekt resultiert hätte. Vielmehr noch wurde die ADCC von DPan und Panitumumab unter Verwendung aller mononukleären Zellen PBMC (Lymphozyten wie NK-, B- und T-Zellen als auch Monozyten) erheblich verstärkt. Da Panitumumab wie bereits erwähnt nicht oder nur kaum zur Aktivierung von NK-Zellen beiträgt [219], kann hier davon ausgegangen werden, dass über Panitumumab aktivierte Monozyten / Makrophagen durch Ausschüttung von IL-12 und IL-18 aber auch direkten Zellkontakt NK-Zellen aktivieren und diese wiederum zytotoxisches / antitumorales $\text{IFN-}\gamma$ sekretieren, welches im weiteren Verlauf zur Aktivierung von Makrophagen beiträgt [224-226]. So konnte für Cetuximab beschrieben werden, dass eine Aktivierung der NK-Zellen zur Rekrutierung von dendritischen und T-Zellen führt und somit einen ADCC verstärkenden Effekt hervorruft [227]. Dieser Mechanismus ist auch für Panitumumab denkbar. Was hier nicht untersucht wurde ist, ob Dianthin oder auch SO1861 für sich genommen einen Effekt auf die Effektorzellen haben. Dies sollte fortführend untersucht werden, um einen Effekt dieser auf die ADCC ausschließen zu können.

Die mittels LPS induzierte Reifung von Monozyten zu Makrophagen hingegen führte ohne Antikörper zu keinem Zellsterben was nochmals verdeutlicht, dass die antitumorale Wirkung der Monozyten / Makrophagen Panitumumab vermittelt und somit spezifisch ist. Zwar war der über Monozyten im Vergleich zu PBMC getriggerte Effekt deutlich vermindert, sichtbar durch ein wesentlich geringeres Fluoreszenzsignal in **Abb. 3.16**, jedoch war das Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle für die Monozyten 3.8:1 und somit wesentlich geringer als das der

PBMCs (30:1). Zudem fehlt hier der von Monozyten / Makrophagen in NK-Zellen ausgelöste zusätzliche zytotoxische Effekt. Eine antitumorale Wirkung wird hier hauptsächlich durch Ausschüttung von proteolytischem Granzym B erreicht [228]. Schneider-Merck *et al.* verwendeten zur Untersuchung der über Panitumumab ausgelösten ADCC ein Monozyten-zu-Zielzellverhältnis von 40:1 [219]. Eine Generierung von Monozyten in der für dieses Verhältnis erforderlichen Menge konnte in dieser Arbeit nicht ermöglicht werden. Trotzdem wird verdeutlicht, dass Panitumumab ein erhebliches Potential als IgG2-Antikörper in der Krebstherapie besitzt, auch wenn Cetuximab als überlegen bezüglich seiner direkten Rekrutierung von NK-Zellen gilt. Zusätzlich kann Panitumumab zur Behandlung von Patienten mit einer Einzelpunktmutation in der Ektodomäne von EGFR, welche somit eine Resistenz gegenüber Cetuximab ausbilden, erfolgreich angewandt werden [170]. Ein weiterer Vorteil von Panitumumab ist, dass er als vollständig humaner Antikörper ein geringeres immunogenes Potential besitzt als der chimäre Antikörper Cetuximab. Jedoch bleibt Panitumumab aufgrund seines IgG2-Isotyps dadurch im Kontrast die Fähigkeit verwehrt das Komplementsystem zu aktivieren [229].

Von Interesse wäre hier, ob Patienten unter Behandlung mit Panitumumab durch eine leichte Administration von LPS daraus einen zusätzlichen, antitumoralen Nutzen schöpfen könnten, ohne aber ihr Immunsystem zu sehr zu belasten.

Tumorassoziierte Makrophagen des Typs 2 hingegen wirken sich nachteilig auf einen Behandlungserfolg aus, da sie durch Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF, EGF und TGF- β aktiv das Tumorwachstum unterstützen. Gleichzeitig produzieren sie immunsuppressive Moleküle und unterstützen so regulatorische T-Zellen [230]. Diesbezüglich beschreiben Li *et al.* in ihrer 2017 publizierten Arbeit, dass tumorassoziierte Makrophagen *in vitro* die antitumorale Wirkung unterstützen können [231], wobei *In-vivo*-Arbeiten diesbezüglich noch ausstehen.

4.5 Untersuchung der *In-vivo*-Wirksamkeit und Biodistribution von DPan im Xenograft-Modell

Bisher existieren nur acht zugelassenen ADCs (**Tab. 1.1**) und über 60 befinden sich in klinischen Phasen [71]. Weiterführende Untersuchungen dieser potenziellen Krebstherapeutika sind von großem Interesse, da viele Krebsarten spezifische Antigene wie den Oberflächenrezeptor EGFR in erhöhtem Maße präsentieren, welche von einer Vielzahl von Antikörpern adressiert werden können. Wie bereits in vielen Arbeiten publiziert besitzen Antikörper eine besonders hohe *In-vivo*-Toleranz [232, 233] und so konnte auch in dieser Arbeit

keine NOAEL, also die maximale Dosis bei der keine adversen Effekte auftreten, für Panitumumab ermittelt werden (**3.8.1**). Die in der Klinik eingesetzte Dosis von Panitumumab beträgt 6 mg/kg Körpergewicht und für eine 30 g schwere Maus würde dies eine Dosis von 180 µg bedeuten. Die NOAEL für DPan ± SO1861 liegt mit 117–126 µg unterhalb der beim Menschen eingesetzten körperrgewichtabhängigen Dosis und die für die Dosis-Wirkungsbeziehung verwendeten Dosen von 2.82 µg (Panitumumab) und 3.30 µg (DPan) lagen somit weit unterhalb der NOAEL (in der Maus bestimmt), aber auch der therapeutischen Dosis (eingesetzt im Menschen). Vergleichend mussten Glatt *et al.* eine Dosis von 10100 mg/kg an Panitumumab und des ADCs Panitumumab-Docetaxel (~200 µg pro Injektion und Maus) im Xenograft-Modell anwenden, um eine Tumorregression zu erhalten [171]. Somit waren zwar die in dieser Arbeit eingesetzten Dosen besonders sicher und zeigten keine pathologischen Veränderungen der Leber oder Niere, welche aktiv am Metabolismus und Exkretion von Wirkstoffen beteiligt sind, noch Zellschäden an (**Tab. 3.4** und **Abb. 3.25**). Jedoch konnte auch keine Tumorregression, wohl aber ein verlangsamtes Tumorwachstum erreicht werden (**Abb. 3.22**). Besonders interessant war hierbei, dass DPan sowohl in Kombination mit SO1861 als auch ohne nicht zu einem ähnlich verlangsamten Tumorwachstum führte wie Panitumumab. Ziel dieser Arbeit war es, durch Erzeugung eines ADCs aus Panitumumab und Dianthin eine deutlich verbesserte antitumorale Wirkung zu erzielen, welche durch den EEE SO1861 nochmals um ein wesentliches hätte verstärkt werden sollen. Worin liegen hier also die Gründe für einen nicht vergleichbaren therapeutischen Nutzen? Eine Möglichkeit könnte die durch Dianthinkonjugation veränderte Bindungsaffinität von Panitumumab an EGFR sein. Jedoch konnte im *In-vitro*-Versuch ganz klar gezeigt werden, dass diese im Vergleich zu Panitumumab unverändert war (**Abb. 3.10**). Unter *In-vivo*-Bedingungen könnte diese nochmals verändert sein, eine komplett gegenläufige Bindungsaffinität ist jedoch unwahrscheinlich. Ein weiterer Faktor könnte die durch den Antikörper ausgelöste ADCC sein, welche für Panitumumab zwar gering ausfällt aber dennoch einen positiven Effekt auf die therapeutische Wirkung haben kann. Overdijk *et al.* konnten zeigen, dass humane IgG2-Antikörper an den murinen FcγRIIb und FcγRIII Rezeptor binden und so durch Rekrutierung von murinen NK-Zellen ADCC auslösen [234]. Der hier verwendete Mausstamm ist zwar B-Zell repressiviert, gleichzeitig aber im Besitz von T- sowie NK-Zellen und Makrophagen. Demzufolge sollte auch hier eine ADCC möglich sein. Passend dazu wurde im *In-vitro*-Experiment zuvor ebenfalls ganz deutlich gezeigt, dass DPan ebenso wie Panitumumab in der Lage ist, eine ADCC auszulösen und so einem effektiven Zellsterben beizutragen (**Abb. 3.16**).

In früheren Arbeiten dieser Gruppe wurde für das chimäre Toxin Dianthin-EGF in Kombination mit SO1861 ein hervorragender antitumoraler Effekt mit fast vollständiger Tumorregression erreicht [177, 178]. Der durch SO1861 vermittelte Verstärkereffekt ließ dabei vermuten, dass die toxische Einheit Dianthin / SO1861 auch auf weitere Moleküle, wie Antikörper, übertragen werden kann, um so A) einen besseren therapeutischen Erfolg zu erreichen und B) eine Plattform-Technologie zu errichten, in welcher lediglich die Transportfunktion ausgetauscht werden muss und somit eine Vielzahl von Krankheiten zu adressieren (und nicht nur Tumore). Aufbauend auf den vorangegangenen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit eine zu Dianthin-EGF äquimolare Dosis verwendet und die Applikationsart, nämlich erst die s.c. Applikation von SO1861 und nach einstündiger Inkubation die Injektion von DPan, übertragen. Die Injektion von DPan erfolgte hier jedoch im Gegensatz zu den vorherigen Arbeiten i.v. in die Schwanzvene. Eine s.c. Applikation in Tumornähe sowie intraperitoneale Injektion sind mit Hinblick auf die Anwendung im Menschen nicht praktikabel und realitätsfern. Somit ergeben sich hieraus genau zwei sehr wesentliche Unterschiede, die zu einem veränderten Behandlungserfolg führen können. Zum einen ist DPan als ADC mit einer molekularen Masse von ~181 kDa wesentlich größer als Dianthin-EGF mit 36 kDa, zum anderen erfolgte dessen Injektion i.v. Diese Parameter indes resultieren in einer stark abweichenden Pharmakokinetik und sollten erklären, wieso die Kombinationstherapie DPan / SO1861 nicht den gleichen Erfolg erzielte wie D-EGF / SO1861 [178]. Bachran *et al.* konnten zeigen, dass die für den Behandlungserfolg entscheidende Konzentration von Saponin im Tumor nach 60 min post Injektion am höchsten war [161] und die Kombination von 0.35 µg chimärem Toxin in Kombination mit 15 µg Saponin einen hohen therapeutischen Effekt ausübte [162]. So war hier zu vermuten, dass aufgrund der Konjugatgröße und Applikationsart eine Gewährleistung des gleichzeitigen Vorhandenseins von DPan und SO1861 im Tumor nicht mehr gegeben war. Pharmakokinetische Untersuchungen von ^{99m}Tc markierten DPan und Panitumumab zeigten deutlich, dass die Aufnahme in den Tumor nach 18 h post Injektion am höchsten war und unterstreichen somit die These, dass SO1861 und DPan nur vermindert zum gleichen Zeitpunkt im Tumor vorliegen (**Abb. 3.29**). Die zeitlich veränderte Aufnahme in den Tumor erklärt allerdings nicht, wieso DPan nicht den gleichen Effekt zeigte wie Panitumumab. Ein möglicher Grund hierfür vermag die durch Konjugation an Dianthin hervorgerufene und zu Panitumumab veränderte Biodistribution sein. Die Daten der am γ -Counter durchgeführten Biodistributionsstudie zeigten deutlich, dass Panitumumab nicht nur zu einem wesentlich höheren Anteil im Tumor akkumulierte, sondern auch im Blutkreislauf (**Abb. 3.30**) Radionuklidmarkiertes DPan hingegen war anteilmäßig weniger im Blut vorhanden, dafür aber

verstärkt in Leber und Milz (**Tab. 3.6**). Die Biodistribution hängt dabei stark von der Ladung, Form, Hydrophobität und Größe der Moleküle ab. Wenn der pI des Proteins um nur eine Einheit verändert wird, kann dies bereits zu einer abweichenden Gewebeaufnahme und Kinetik führen. Dabei resultiert die Zunahme der Netto-Positivladung in einer verbesserten Gewebeaufnahme und *blood clearance* und umgekehrt verringert eine Netto-Negativladung die Gewebeaufnahme und führt zu einer längeren Blutzirkulation [235]. Panitumumab mit einem pI von 6.8 [236] müsste dem zufolge unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) leicht negativ geladen sein. Das erklärt auch, wieso die Radioaktivität für Panitumumab im Blut wesentlich höher war und für die Konjugate geringer. Umgekehrt erklärt diese Tatsache auch, wieso DPan vermehrt in der Leber und Milz zu finden waren, da sie mit einem pI um die 7.96 neutral bis leicht positiv geladen sein sollten und somit besser an Zellmembranen, welche eine negative Ladung haben, binden. Vor allem darf hier nicht vergessen werden, dass sowohl Linker, SPDP wie HYNIC, als auch Dianthin einen wesentlichen Einfluss auf die Ladung und Faltung der Konjugate hat, welche bis dato noch nicht untersucht wurde. Es ist bekannt, dass monoklonale Antikörper vermehrt in Herz, Lunge, Leber, Milz und Niere akkumulieren [237], vor allem induziert durch eine sehr gute Durchblutung derselbigen. Weiterhin wird angenommen, dass Antikörper vermehrt in diskontinuierlichen Kapillarendothelien, so wie sie in der Leber und Milz zu finden sind, akkumulieren [238]. Bereits in frühen Arbeiten von Stirpe und Blakey konnte gezeigt werden, dass Saporin tragende Immunotoxine vermehrt in der Leber verbleiben, wobei Saporin zudem eine hohe hepatische Toxizität zeigte [239, 240]. Aufgrund der Homologie von Saporin und Dianthin kann eine ähnliche Biodistribution erwartet werden. Wawrzynczak *et al.* verglichen Immunotoxine, welche unterschiedliche Ribosomen inaktivierende Proteine trugen, miteinander und fanden heraus, dass die Blutzirkulation des ITs abhängig von dem Toxin war [241]. Dabei erfolgte die Konjugation des RIPs an den Antikörper über einen Disulfidlinker und lässt darauf schließen, dass eine längere Zirkulation im Blutkreislauf mit der vom Toxin abhängigen sterischen Abschirmung der Disulfidbrücke zusammenhängt und eine Konkurrenzreaktion mit frei zirkulierendem Glutathion vermindert ist [241].

Weiterhin ist unklar, ob die Funktionen der Milz, nämlich die Blutzellmauserung (rote Pulpa) sowie immunologische Überwachung (weiße Pulpa) des Blutes, in direktem Zusammenhang mit der hohen DPan-Akkumulation stehen. So war die weiße Pulpa der Milz vermehrt in den Gruppen PBS / PBS und DPan / PBS dominant aktiviert und nur teilweise in den Gruppen Pan / PBS und DPan / SO1861. Da es sich hier um immundefiziente Mäuse handelt, welche keine T-Zellen aber B-Zellen besitzen, kann hier davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung der weißen Pulpa nicht mit der Behandlung im kausalen Zusammenhang steht.

Vielmehr ist davon auszugehen, dass die Injektion von körperfremden Substanzen per se eine Immunantwort, wenn auch eine geringe, hervorruft, die wiederum vermehrt über die B-Zellen erfolgen muss.

Die verschlechterte Tumorpenetration von DPan im Vergleich zu Panitumumab kann wie folgt erklärt werden. Blutgefäße des Tumors gelten zwar als besonders durchlässig und sollten somit insbesondere größeren Molekülen einen Durchtritt erlauben, jedoch führen solch schlecht geformte Gefäße auch zu einer Verdichtung der extrazellulären Matrix und erhöhen so den interstitiellen Flüssigkeitsdruck innerhalb der Tumore. Dieser wiederum wirkt dem Konvektionsfluss entgegen und hindert somit größere Moleküle stärker an der Tumorpenetration [242]. Wittrup *et al.* veröffentlichten diesbezüglich 2012 einen mathematischen Zusammenhang bezüglich der Tumoraufnahme von zielgerichteten Therapeutika in Abhängigkeit von ihrer Bindungsaffinität und molekularen Größe [243, 244]. So berechneten sie für Konstrukte mit einer molekularen Masse von 10–100 kDa eine besonders schlechte Tumoraufnahme. Ein ebenfalls zu betrachtender Faktor ist die Bindungsaffinität an den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn), welcher in der Leber exprimiert wird [245]. Dieser ist hauptverantwortlich für das Recycling von IgG-Antikörpern aus den Endosomen hin zur Zelloberfläche. Dabei tragen hämatopoetische Zellen wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen, welche maßgeblich FcRn exprimieren, signifikant zu einer verlängerten Halbwertszeit der IgG-Antikörper bei [246]. Die Bindung von IgG an FcRn, welche über Endozytose von der Zelle aufgenommen werden, ist abhängig vom pH-Wert, und unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) erfolgt keine Bindung. Erst unter leicht sauren Bedingungen, wie im Zuge der endosomalen / lysosomalen Reifung (6.0–6.5), entgeht der Antikörper durch Bindung an FcRn dessen lysosomaler Degradierung und wird nach Rücktransport zur Zelloberfläche der extrazellulären Flüssigkeit zugeführt [247-249]. Panitumumab besitzt aufgrund seines humanen IgG-Gerüsts eine hohe Affinität zu FcRn resultierend in einer *In-vivo*-Halbwertszeit von durchschnittlich 7.5 Tagen, Cetuximab als chimärer IgG-Antikörper hingegen nur eine HWZ von 4.19 Tagen [173]. Eine zu Panitumumab verschlechterte Affinität von DPan zu FcRn würde in einer vermehrten lysosomalen Degradierung und folglich in einer verminderten Blutzirkulation resultieren. So konnte gezeigt werden, dass eine verminderte FcRn-Bindungsaffinität von IgG modifizierten Varianten zu einer erhöhten Leberakkumulierung führte [250, 251]. Ob dieser Sachverhalt wiederum den therapeutischen Erfolg schmälert sei jedoch dahingestellt, denn für die Wirkung von DPan essenziell ist die Freisetzung von Dianthin in das Zytosol.

Die Kopplung von Dianthin an Panitumumab erfolgte über einen SPDP-Linker unter Ausbildung einer Disulfidbrücke und sollte nach erfolgreicher Internalisierung von DPan die Abspaltung von Dianthin im Zytosol gewährleisten. Jedoch ist bekannt, dass solche Disulfidbrücken auch schon im Blutplasma durch Glutathion, Cystein und auch Serumalbumin gespalten werden können [252]. Dabei stellen IgGs und Serumalbumin mit 80–90 % den höchsten Anteil der Proteine im Plasma dar. Um genau dies für DPan beurteilen zu können wurde eine spezifische Radionuklidmarkierung mit ^{99m}Tc über Dianthin (D(H)Pan) und Panitumumab (DPan(H)) vorgenommen (**3.8.4**). Eine für D(H)Pan im Vergleich zu DPan(H) als auch Pan(H) erhöhte Radioaktivität in der Niere bestätigte die Vermutung, dass die Abspaltung von Dianthin bereits im Blutplasma erfolgte, wenn auch zu einem geringen Teil (**Abb. 3.30**). Dies stimmt wiederum mit der für Saporin erstellten Biodistribution überein und erscheint sehr plausibel mit Bezug auf die Homologie beider 30 kDa großen Proteine [239]. Die für DPan(H) und Pan(H) gemessene Radioaktivität in der Niere kann auf eine proteolytische Degradierung des Antikörpers zurück zu führen sein, woraufhin die leichte wie vermutlich auch schwere Kette mit ~25 und ~55 kDa ebenfalls renal ausgeschieden werden [158]. Ursprünglich diente HYNIC freies DPan als Negativkontrolle für die Radionuklidmarkierung mit ^{99m}Tc . Jedoch konnte hier eine unspezifische Bindung von ^{99m}Tc festgestellt werden was uns zu der Annahme führte, die Biodistribution von DPan auch ohne einen speziellen Bindungspartner für ^{99m}Tc untersuchen zu können. Reduziertes ^{99m}Tc kann mit Elektronendonoren wie Carbonyl-, Hydroxyl-, Amin- und Sulfhydrylgruppen Chelate ausbilden und würde hier eine unspezifische Bindung erklären, da diese vor allem in Proteinen zu einer Vielzahl vorhanden sind. Ferner kann ein $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ -Komplex über Histidine chelatisiert werden, welche vor allem in Dianthin aufgrund des His-Tags vorhanden sind [253]. Ein solcher Komplex entsteht jedoch durch Reduzierung von Natriumpertechnetat mit Natriumborhydrid und steht damit im Gegensatz zu der in dieser Arbeit *via* Zinnchlorid vermittelten Reduktion.

Um einer vorzeitigen Spaltung der Disulfidbrücke entgegen zu wirken führten Sadowsky *et al.* sterisch abschirmende Methylgruppen in direkter Nähe der Disulfidbrücke ein [254]. Dabei hängt die Effizienz der Abschirmung sowie Gewährleistung der Plasmastabilität stark von der Auswahl der sterischen Gruppe ab und kann *in vivo* auch zu einer verschlechterten Effizienz des ADCs führen [83, 255, 256]. Ebenso spielt die Länge des Linkers eine wesentliche Rolle [101]. Alternativ kann ein nichtspaltbarer Linker wie SMCC verwendet werden, wobei erst im Lysosom durch Proteasen wie Cathepsin B das ADC gespalten wird. Das 2013 von der FDA zugelassene ADC Trastuzumab-Emtansin (Kadcyla®) zur Behandlung des metastasierenden

Brustkarzinoms wurde über solch einen Linker hergestellt. Jedoch gewährt auch dieser Linker keine vollständige Plasmastabilität. Ein häufig beschriebenes Problem stellt hier eine Retro-Michael Reaktion sowie konkurrierende Thiol-Austauschreaktion mit dem im Blut im hohen Maß vorhandenem Serumalbumin (bis zu 40 mg/mL) dar.[257, 258]. So wurden verschiedene Ansätze gewählt, um dieses Problem zu umgehen. Tumey *et al.* stabilisierten durch Hydrolyse, welche die Ringöffnung des Succinimid-Rings bewirkte, das ADC und erzielten so eine verbesserte Stabilität und Wirksamkeit [259]. Kasper *et al.* synthetisierten Ethinylphosphonamide und benutzten diese zur Generierung von Hydrolyse unempfindlichen Trastuzumab-Emtansin. Auch hier wurde die Stabilität enorm verbessert und erzeugte einen sehr guten therapeutischen Effekt *in vivo* [260, 261].

IgG-Antikörper zeichnen sich durch eine hohe Bindungsaffinität und -spezifität sowie Plasmastabilität [56] aus und können ebenfalls zusätzliche zytotoxische Mechanismen wie die ADCC oder CDC auslösen [57, 60]. Aufgrund ihrer relativ guten Verträglichkeit können besonders hohe Dosen eingesetzt werden, um eine gute Wirkung zu erreichen [181, 182]. Wenn jedoch der Antikörper zusätzlich mit einem Toxin modifiziert wird, welches besonders toxisch jedoch unspezifisch wirkt, überträgt sich dessen zytotoxisches Potential und verhindert eine hohe Dosierung. Ebenfalls resultiert dies häufig in einer verminderten Tumorpenetration und einer hohen systemischen Akkumulierung sowie langsamen *blood clearance* [71, 262]. Es stellt sich somit die Frage, ob IgGs tatsächlich in der Tumorthherapie, besonders aber im Aufbau von ADCs als geeignet angesehen werden können. Wie bereits erörtert besitzen sie neben dem zielgerichteten Transport des Toxins zum Wirkort den Vorteil der Auslösung von immunologischen Prozessen wie ADCC und CDC. Doch ist die Auslösung der ADCC als vermindert und nicht als eigentlicher toxischer Mechanismus anzusehen [263]. Womöglich stellen kleinere Moleküle, welche ebenfalls befähigt sind, das Antigen anzusteuern und die toxische Fracht dorthin zu schleusen, eine bessere Option dar und könnten Problematiken wie die größenabhängige, schlechte Tumorpenetration umgehen [264].

In den letzten Jahren wurde deswegen der Fokus auf die Entwicklung eben solcher Moleküle gelegt, wobei sich diese in zwei Kategorien einteilen lassen. Zum einen in die der Antikörperfragmente und zum anderen in synthetisch produzierte Moleküle. Zu ersteren gehören ScFv-Fragmente, Diabodies, *Small Immunoproteins*, Fab-Fragmente und Einzel-domänenantikörper. ScFv-Fragmente, bestehend aus der leichten und schweren Kette der variablen Antikörperregion und einer Größe von ~30 kDa, gelten als besonders erfolgsversprechend und wurden bereits erfolgreich als Transportmittel für verschiedene Wirkstoffe untersucht [265]. So wurde 2018 Moxetumumab Pasudotox (Lumoxiti™), ein mit

Pseudomonas Exotoxin PE38 fusioniertes anti-CD22-ScFv-Fragment, erfolgreich zur Behandlung der Haarzellenleukämie zugelassen [265]. Ein anti-CD-30-Diabody-MMAE führte im Vergleich zu seinem IgG1-Analogon zu einer besseren Akkumulation von MMAE im Tumor, aber auch in den Organen wie Leber und Niere [266]. Affibodies, DARPins (*designed ankyrin repeat proteins*), Centyrine und Knottin sind wesentlich kleinere (7–18 kDa), synthetisch hergestellte Moleküle, die durch Protein-Engineering an Zielmoleküle binden. Der Vorteil hierbei ist, neben der geringen Größe, die einfache Herstellung und Variabilität bezüglich des Zielmoleküls. Sokolova *et al.* konnten *in vitro* und *in vivo* erfolgreich die antitumorale Wirkung eines mit *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A fusioniertem anti-HER2-DARPins nachweisen [267].

So ist die letzten Endes die Auswahl eines geeigneten Toxintransporters sowie Linkers keinesfalls trivial und Faktoren wie die Pharmakokinetik, *In-vivo*-Stabilität und -Verträglichkeit sowie Tumorpenetration müssen genauestens untersucht und angepasst werden.

Zusammenfassend, in dieser Arbeit konnte ein in Kombination mit dem EEE SO1861 äußerst toxisches ADC, DPan, hergestellt werden, welches selektiv Tumorzellen mit EGFR-Überexpression adressiert. Die intensive Charakterisierung des Konjugates DPan zeigte, dass die Konjugation mit der konstanten Generierung eines DARs von ~1 reproduzierbar war und außerdem nicht zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität von Dianthin innerhalb des Konjugates führte. Ebenso wurde die Bindungsaffinität von Panitumumab zu EGFR durch die Konjugation nicht beeinflusst und war annähernd gleich zu nicht konjugiertem Panitumumab. Gerade im Vergleich zum Ausgangsantikörper Panitumumab bestach DPan *in vitro* vor allem in Kombination mit SO1861 mit einer besonders hohen antitumoralen Effizienz. Diese konnte ebenso in 3D-Versuchen an Sphäroiden nachgewiesen werden. Vielmehr noch war Panitumumab trotz Kopplung an Dianthin weiterhin in der Lage, eine ADCC auszulösen und somit einen zusätzlichen antitumoralen Effekt auszuüben. Erstmals wurde hier die NOAEL von DPan an nichttumortragenden Mäusen bestimmt und es war möglich, *in vivo* an tumortragenden Mäusen den antitumoralen Effekt von DPan in Kombination mit SO1861 zu verbessern.

4.6 Ausblick

Basierend auf den in dieser Arbeit erhaltenen grundlegenden Erkenntnisse sollte in zukünftigen Arbeiten versucht werden, die antitumorale *In-Vivo*-Wirkung von DPan zu verbessern. Dies kann entweder durch einen abweichenden Aufbau des ADCs geschehen, indem verschiedene Linker oder aber auch Antikörperfragmente eingesetzt werden oder aber durch eine Dosisanpassung, da die hier eingesetzte Dosis weit unterhalb der NOAEL lag. Ebenso sollte

die Untersuchung der Plasmastabilität *ex vivo* durchgeführt werden um darauf reagierend eine gegebenenfalls notwendige Stabilitätsanpassung des Konjugates vornehmen zu können. Aufgrund der hohen Akkumulierung von DPan in Leber und Milz sollte versucht werden, Einfluss auf die Biodistribution zu nehmen, um eine bessere Plasmapräsenz und vor allem Tumorpenetration zu erreichen. Ferner wurde nicht untersucht, wie i.v. gespritztes Dianthin ± SO1861 und Panitumumab / SO1861 wirkt. Dies sollte ebenso untersucht werden. Da die Größe des ADCs mitunter verantwortlich für die schlechte Tumorpenetration ist, könnte versucht werden, den Dianthin / SO1861-Plattformcharakter auf kleinere Konstrukte zu übertragen. Die Kombinationstherapie DPan / SO1861 könnte im Patienten aufgrund der voneinander getrennten Biodistribution der beiden Komponenten schwer steuerbar sein. Demzufolge wäre es hier erstrebenswert, ein Einkomponentensystem aufzubauen, in welchem das ADC DPan und der EEE SO1861 fusioniert vorliegen und somit eine gemeinsame und besser steuerbare Biodistribution besitzen.

5 Zusammenfassung

Die stets ansteigende Zahl an Krebserkrankungen mit einhergehendem tödlichem Verlauf erfordert die stetige Weiter- und Neuentwicklung von entsprechenden Therapien, welche Tumorspezifisch agieren müssen. Vor allem schwerwiegende Nebeneffekte, die häufig bei den gängigen Radio- und Chemotherapien auftreten, gilt es zu minimieren. Der Aufbau von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADC) vereint hier das zielgerichtete Wirken durch den Antikörper mit der Toxizität der Wirkstoffkomponente und so sind bereits acht dieser ADCs durch die *Food and Drug Administration* zugelassen worden. In dieser Arbeit wurde deswegen ein ADC aus Panitumumab, einem vollständig humanen IgG2-Antikörper mit geringem immunogenem Potential, und Dianthin, einem hoch toxischen pflanzlichen und enzymatisch wirkenden Protein, reproduzierbar mit einem Wirkstoff-zu-Antikörper-Verhältnis (DAR) von ~ 1 und einer molekularen Masse von ~ 180 kDa erzeugt. Dabei wurde die Bindungsaffinität von Dianthin-Panitumumab (DPan) zum Zielrezeptor EGFR, welcher vorwiegend von Krebszellen in einem Übermaß exprimiert wird, unvermindert gegenüber Panitumumab mit einem K_D -Wert von 1.5×10^{-10} M bestimmt. Die enzymatische Aktivität von DPan im Vergleich zu Dianthin war aufgrund der Kopplung um ~ 50 % von 312.2 auf 153.3 pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h vermindert, jedoch bewies das ADC DPan *in vitro* ein enormes selektives und zielzellspezifisch zytotoxisches Potential, wobei in Kombination mit dem glykosylierten Triterpenoid SO1861 als *Endosomal Escape Enhancer* eine bemerkenswerte mittlere Effektivität von 0.00022 / 0.00006 nM (IncuCyte-Echtzeitmessung / MTT-Assay) erreicht wurde. Das zytotoxische Potential der Kombinationsbehandlung konnte weiterführend in einem 3D-Sphäroid-Versuch unter realitätsnahen Tumorbedingungen nachgewiesen werden. Ebenso konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass DPan weiterhin und vergleichbar zu Panitumumab in der Lage ist, die Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) über PBMCs und Monozyten auszulösen, um somit einen additiven antitumoralen Effekt zu erzeugen. Das *in vitro* hervorragend zytotoxisch wirkende ADC DPan zeigte dagegen *in vivo* an tumortragenden Mäusen eine im Vergleich zu Panitumumab leicht verminderte antitumorale Wirkung, wobei in Kombination mit SO1861 die Wirkung signifikant gesteigert wurde. Die eingesetzte Dosis mit 3.3 μ g lag dabei weit unter der höchst verträglichen Dosis ohne schwerwiegende Nebeneffekte mit 126 μ g, sodass hier in zukünftigen Untersuchungen durchaus eine Dosiserhöhung möglich ist, da hier auch mit einer äquimolaren Dosis an Panitumumab keine Tumorregression bewirkt wurde. Untersuchungen der Biodistribution von Radionuklid (^{99m}Tc) markierten DPan und Panitumumab zeigten indes eine unterschiedliche

Kinetik. Beide Proteine zeigten bezüglich der Konzentration im Tumor erst am Ende des untersuchten Zeitraums von 18 h die höchste Konzentration, wobei Panitumumab dominierend im Tumor akkumulierte. Die allgemeine Biodistribution im Körper betrachtend zeigte Panitumumab eine vermehrte Plasmapräsenz im Blut-Pool, wohingegen DPan stark in der Leber und Milz akkumulierte. Ferner konnte gezeigt werden, dass Dianthin bereits im Blutplasma geringfügig aus dem ADC abgespalten wird, vermutlich weil hier ein spaltbarer SPDP-Linker verwendet wurde. Da DPan in Kombination mit SO1861 aber *in vitro* ein hervorragendes antitumorales Potential zeigte, welches *in vivo* nicht gänzlich zum Tragen kam, sollte trotzdem in zukünftigen Arbeiten an der Optimierung der *In-vivo*-Effizienz von DPan gearbeitet werden. So könnten andere Linker verwendet werden, welche eine bessere Plasmastabilität gewährleisten. Da die Tumorpenetration maßgeblich durch die Größe des Konjugates als auch dessen physikalischen Eigenschaften beeinflusst wird und somit unterschiedlich zu Panitumumab war, bestünde die Möglichkeit im Aufbau kleinerer Konjugate, die ebenfalls zielzellspezifisch agieren und Dianthin zum Wirkort transportieren. So muss hier in Betracht gezogen werden, ob antikörperspezifische Eigenschaften wie die Vermittlung der ADCC weniger wichtig sind als die erfolgreiche und größenabhängige Tumorpenetration.

In dieser Arbeit wurde sehr gut verdeutlicht, dass der Sprung von einer äußerst erfolgreichen *In-vitro*-Anwendung eines ADCs hin zu einem erfolgreich *in vivo* wirkenden Wirkstoff nicht trivial ist und dass Faktoren wie die richtige Wahl des Linkers, die Gewährleistung der Plasmastabilität aber auch der guten Tumorpenetration sowie Effektorfunktionen wie die Vermittlung der ADCC signifikant für den Behandlungserfolg sind.

6 Conclusion

The constantly increasing number of cancers with a fatal outcome requires the constant further and new development of appropriate therapies, which must act in a tumour-specific manner. Above all, serious side effects, which frequently occur with the usual radio and chemotherapies, must be minimized. The development of antibody-drug conjugates (ADCs) combines the targeted action of the antibody with the toxicity of the drug component, and eight of these ADCs have already been approved by the Food and Drug Administration. In this work, an ADC was therefore generated from Panitumumab, a fully human IgG2 antibody with low immunogenic potential, and Dianthin, a highly toxic plant and enzymatically active protein, reproducibly with a drug to antibody ratio (DAR) of ~1 and a molecular mass of ~180 kDa. The binding affinity of Dianthin-Panitumumab (DPan) to the target receptor EGFR, which is predominantly expressed in excess by cancer cells, was determined undiminished compared to Panitumumab with a K_D value of 1.5×10^{-10} M. The enzymatic activity of DPan compared to Dianthin was reduced by ~50 % from 312.2 to 153.3 pmol_{Adenin}/pmol_{Protein}/h due to coupling. But still the ADC DPan demonstrated an enormous selective and target cell specific cytotoxic potential *in vitro*. In combination with the glycosylated triterpenoid SO1861 as endosomal escape enhancer a remarkable mean effectiveness of 0.00022 / 0.00006 nM (IncuCyte real-time measurement / MTT assay) was achieved. The cytotoxic potential of the combination treatment was further demonstrated in a 3D-spheroid experiment under realistic tumor conditions. In this work it could also be shown for the first time that DPan is still able to induce antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) via PBMCs and monocytes in a manner comparable to Panitumumab, thus producing an additive anti-tumour effect. In contrast, the ADC DPan, which has an excellent cytotoxic effect *in vitro*, showed a slightly reduced antitumor effect *in vivo* in tumor-bearing mice compared to Panitumumab, whereas in combination with SO1861 the effect was significantly increased. The applied dose of 3.3 µg was far below the highest tolerated dose without serious side effects of 126 µg, so that a dose increase is possible in future studies, since even an equimolar dose of Panitumumab did not cause tumour regression. Investigations of the biodistribution of radionuclide (^{99m}Tc) labelled DPan and Panitumumab showed different kinetics. Both proteins showed the highest concentration in the tumor only at the end of the investigated period of 18 h, with Panitumumab accumulating predominantly in the tumor. Regarding the general biodistribution in the body, Panitumumab showed an increased plasma presence in the blood pool, whereas DPan accumulated strongly in the liver and spleen. Furthermore, it could be shown that Dianthin is already slightly cleaved from ADC

in the blood plasma, presumably because a cleavable SPDP linker was used here. However, since DPan in combination with SO1861 showed an excellent antitumour potential *in vitro*, which did not fully materialize *in vivo*, future work should nevertheless focus on optimizing the *in vivo* efficiency of DPan. Thus, other linkers could be used which provide better plasma stability. The tumor penetration is significantly influenced by the size of the conjugate as well as its physical properties and was therefore different from Panitumumab. To transport Dianthin to the site of action it is possible to construct smaller conjugates that also act target cell specifically. Thus, it must be considered here whether antibody-specific properties such as the mediation of ADCC are less important than successful and size-dependent tumor penetration. However, what was very well illustrated in this work is that the leap from an extremely successful *in vitro* application of an ADC to a successful *in vivo* agent is not trivial and that factors such as the correct choice of the linker, the guarantee of plasma stability but also of good tumor penetration as well as effector functions such as the mediation of ADCC are significant for the success of treatment.

7 Literaturverzeichnis

1. WHO (2018). "Global health estimates 2016: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016." from https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/.
2. Wild CP, W.E., Stewart BW (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. W.E. Wild CP, Stewart BW. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. **4**: 34-44.
3. Bray, F., et al. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin* **68**(6): 394-424.
4. Pflaum, T., et al. (2016). "Carcinogenic compounds in alcoholic beverages: an update." *Arch Toxicol* **90**(10): 2349-2367.
5. Nishigori, C. (2006). "Cellular aspects of photocarcinogenesis." *Photochem Photobiol Sci* **5**(2): 208-214.
6. Tierney, P., et al. (2015). "Predicted increased risk of squamous cell carcinoma induction associated with sunbed exposure habits." *Br J Dermatol* **173**(1): 201-208.
7. IARC (2016). "Outdoor air pollution. ." *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **109**: 1-448.
8. Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2012). "Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens." *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* **100**(Pt B): 1-441.
9. Hanahan, D. and R.A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
10. Lane, D.P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." *Nature* **358**(6381): 15-16.
11. Luo, Q., et al. (2017). "Dynamics of p53: A Master Decider of Cell Fate." *Genes (Basel)* **8**(2).
12. Kanapathipillai, M. (2018). "Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer." *Cancers (Basel)* **10**(6).
13. Lasagna-Reeves, C.A., et al. (2013). "Dual role of p53 amyloid formation in cancer; loss of function and gain of toxicity." *Biochem Biophys Res Commun* **430**(3): 963-968.
14. Whelan, J.T., et al. (2012). "Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway." *J Cell Physiol* **227**(3): 1235-1241.
15. Massague, J. (2012). "TGFbeta signalling in context." *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**(10): 616-630.
16. Zhang, Y., P.B. Alexander, and X.F. Wang (2017). "TGF-beta Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**(4).

17. Nieto, M.A., et al. (2016). "Emt: 2016." *Cell* **166**(1): 21-45.
18. Colak, S. and P. Ten Dijke (2017). "Targeting TGF-beta Signaling in Cancer." *Trends Cancer* **3**(1): 56-71.
19. Hua, W., et al. (2020). "TGFbeta-induced metabolic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition in cancer." *Cell Mol Life Sci* **77**(11): 2103-2123.
20. Chen, W. and P. Ten Dijke (2016). "Immunoregulation by members of the TGFbeta superfamily." *Nat Rev Immunol* **16**(12): 723-740.
21. Wang, M., et al. (2017). "Role of tumor microenvironment in tumorigenesis." *J Cancer* **8**(5): 761-773.
22. Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." *Lancet* **357**(9270): 1777-1789.
23. Ohue, Y. and H. Nishikawa (2019). "Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target?" *Cancer Sci* **110**(7): 2080-2089.
24. Najafi, M., et al. (2019). "Macrophage polarity in cancer: A review." *J Cell Biochem* **120**(3): 2756-2765.
25. Wu, Y., et al. (2019). "PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition." *Front Immunol* **10**: 2022.
26. Urruticoechea, A., et al. (2010). "Recent advances in cancer therapy: an overview." *Curr Pharm Des* **16**(1): 3-10.
27. Katharina, P. (2011). "Tumor cell seeding during surgery-possible contribution to metastasis formations." *Cancers (Basel)* **3**(2): 2540-2553.
28. Steeg, P.S. (2006). "Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges." *Nat Med* **12**(8): 895-904.
29. Baskar, R., et al. (2014). "Biological response of cancer cells to radiation treatment." *Front Mol Biosci* **1**: 24.
30. Holley, A.K., et al. (2014). "Redox-modulated phenomena and radiation therapy: the central role of superoxide dismutases." *Antioxid Redox Signal* **20**(10): 1567-1589.
31. Lomax, M.E., L.K. Folkes, and P. O'Neill (2013). "Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **25**(10): 578-585.
32. Vakifahmetoglu, H., M. Olsson, and B. Zhivotovsky (2008). "Death through a tragedy: mitotic catastrophe." *Cell Death Differ* **15**(7): 1153-1162.
33. Kuwahara, Y., et al. (2014). "Targeting of tumor endothelial cells combining 2 Gy/day of X-ray with Everolimus is the effective modality for overcoming clinically relevant radioresistant tumors." *Cancer Med* **3**(2): 310-321.

34. Cuneo, K.C., et al. (2015). "EGFR targeted therapies and radiation: Optimizing efficacy by appropriate drug scheduling and patient selection." *Pharmacol Ther* **154**: 67-77.
35. Liccardi, G., J.A. Hartley, and D. Hochhauser (2011). "EGFR nuclear translocation modulates DNA repair following cisplatin and ionizing radiation treatment." *Cancer Res* **71**(3): 1103-1114.
36. Dittmann, K., et al. (2005). "Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase." *J Biol Chem* **280**(35): 31182-31189.
37. Yacoub, A., et al. (2003). "Epidermal Growth Factor and Ionizing Radiation Up-regulate the DNA Repair Genes *XRCC1* and *ERCC1* in DU145 and LNCaP Prostate Carcinoma through MAPK Signaling." *Radiation Research* **159**(4): 439-452, 414.
38. Emadi, A., R.J. Jones, and R.A. Brodsky (2009). "Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary." *Nat Rev Clin Oncol* **6**(11): 638-647.
39. Dasari, S. and P.B. Tchounwou (2014). "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action." *Eur J Pharmacol* **740**: 364-378.
40. Carvalho, C., et al. (2009). "Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect." *Curr Med Chem* **16**(25): 3267-3285.
41. Yu, Z., et al. (2016). "Targeted Delivery of Bleomycin: A Comprehensive Anticancer Review." *Curr Cancer Drug Targets* **16**(6): 509-521.
42. Bagnyukova, T.V., et al. (2010). "Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents?" *Cancer Biol Ther* **10**(9): 839-853.
43. Aidan, J.C., N.R. Priddee, and J.J. McAleer (2013). "Chemotherapy causes cancer! A case report of therapy related acute myeloid leukaemia in early stage breast cancer." *Ulster Med J* **82**(2): 97-99.
44. Morrow, G.R., et al. (2002). "Fatigue associated with cancer and its treatment." *Support Care Cancer* **10**(5): 389-398.
45. Dabholkar, M., et al. (1994). "Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy." *J Clin Invest* **94**(2): 703-708.
46. Du, P., et al. (2016). "High ERCC1 expression is associated with platinum-resistance, but not survival in patients with epithelial ovarian cancer." *Oncol Lett* **12**(2): 857-862.
47. McKeage, K. (2015). "Alectinib: a review of its use in advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer." *Drugs* **75**(1): 75-82.
48. Ke, E.E. and Y.L. Wu (2016). "Afatinib in the first-line treatment of epidermal-growth-factor-receptor mutation-positive non-small cell lung cancer: a review of the clinical evidence." *Ther Adv Respir Dis* **10**(3): 256-264.

49. Ciuleanu, T.E., et al. (2017). "Randomised Phase 2 study of maintenance linsitinib (OSI-906) in combination with erlotinib compared with placebo plus erlotinib after platinum-based chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer." *Br J Cancer* **117**(6): 757-766.
50. Voigtlaender, M., T. Schneider-Merck, and M. Trepel (2018). "Lapatinib." *Recent Results Cancer Res* **211**: 19-44.
51. Ettrich, T.J. and T. Seufferlein (2018). "Regorafenib." *Recent Results Cancer Res* **211**: 45-56.
52. Imai, K. and A. Takaoka (2006). "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 714-727.
53. Hu, Z., et al. (2015). "Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: focus on the cancer hallmark of tumor angiogenesis." *Carcinogenesis* **36 Suppl 1**(Suppl 1): S184-202.
54. Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." *Nature* **256**(5517): 495-497.
55. Weiner, G.J. (2015). "Building better monoclonal antibody-based therapeutics." *Nat Rev Cancer* **15**(6): 361-370.
56. Suzuki, M., C. Kato, and A. Kato (2015). "Therapeutic antibodies: their mechanisms of action and the pathological findings they induce in toxicity studies." *J Toxicol Pathol* **28**(3): 133-139.
57. Loisel, S., et al. (2007). "Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment." *Crit Rev Oncol Hematol* **62**(1): 34-42.
58. Ravetch, J.V. and S. Bolland (2001). "IgG Fc receptors." *Annu Rev Immunol* **19**: 275-290.
59. Walsh, E.R. and S. Bolland (2014). B Cells. Antibody Fc. M.E. Ackerman and F. Nimmerjahn. Boston, Academic Press: 115-129.
60. Nezlin, R. and V. Ghetie (2004). Interactions of Immunoglobulins Outside the Antigen-Combining Site. Advances in Immunology, Academic Press. **82**: 155-215.
61. Attarwala, H. (2010). "Role of antibodies in cancer targeting." *J Nat Sci Biol Med* **1**(1): 53-56.
62. Bortolotti, M., et al. (2016). "High in Vitro Anti-Tumor Efficacy of Dimeric Rituximab/Saporin-S6 Immunotoxin." *Toxins (Basel)* **8**(6).
63. Kreutzfeldt, J., et al. (2020). "The trastuzumab era: current and upcoming targeted HER2+ breast cancer therapies." *Am J Cancer Res* **10**(4): 1045-1067.
64. Li, M. and D.L. Kroetz (2018). "Bevacizumab-induced hypertension: Clinical presentation and molecular understanding." *Pharmacol Ther* **182**: 152-160.

65. Kim, G.P. and A. Grothey (2008). "Targeting colorectal cancer with human anti-EGFR monoclonal antibodies: focus on panitumumab." *Biologics* **2**(2): 223-228.
66. Li, X., et al. (2020). "Colorectal carcinomas with mucinous differentiation are associated with high frequent mutation of KRAS or BRAF mutations, irrespective of quantity of mucinous component." *BMC Cancer* **20**(1): 400.
67. Golay, J. and M. Introna (2012). "Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays." *Arch Biochem Biophys* **526**(2): 146-153.
68. Ahmad, T., et al. (2004). "The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." *J Biol Chem* **279**(3): 1713-1719.
69. Frankel, A.E., R.J. Kreitman, and E.A. Sausville (2000). "Targeted toxins." *Clin Cancer Res* **6**(2): 326-334.
70. Chalouni, C. and S. Doll (2018). "Fate of Antibody-Drug Conjugates in Cancer Cells." *J Exp Clin Cancer Res* **37**(1): 20.
71. Liu, H., et al. (2020). "Metabolism of bioconjugate therapeutics: why, when, and how?" *Drug Metab Rev* **52**(1): 66-124.
72. Bardia, A., et al. (2019). "Sacituzumab Govitecan-hziy in Refractory Metastatic Triple-Negative Breast Cancer." *N Engl J Med* **380**(8): 741-751.
73. (2017–2030). Antibody drug conjugates market. R.A.P. Ltd.
74. Anighoro, A., J. Bajorath, and G. Rastelli (2014). "Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery." *J Med Chem* **57**(19): 7874-7887.
75. Li, F. and R.I. Mahato (2017). "Bioconjugate Therapeutics: Current Progress and Future Perspective." *Mol Pharm* **14**(5): 1321-1324.
76. Jackson, D. and D. Stover (2015). "Using the Lessons Learned From the Clinic to Improve the Preclinical Development of Antibody Drug Conjugates." *Pharm Res* **32**(11): 3458-3469.
77. McDonagh, C.F., et al. (2006). "Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment." *Protein Eng Des Sel* **19**(7): 299-307.
78. Hamblett, K.J., et al. (2004). "Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate." *Clin Cancer Res* **10**(20): 7063-7070.
79. Ducry, L. and B. Stump (2010). "Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies." *Bioconjug Chem* **21**(1): 5-13.
80. van Der Velden, V.H., et al. (2001). "Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells." *Blood* **97**(10): 3197-3204.

81. Trail, P.A., et al. (1993). "Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates." *Science* **261**(5118): 212-215.
82. Erickson, H.K., et al. (2006). "Antibody-maytansinoid conjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing." *Cancer Res* **66**(8): 4426-4433.
83. Erickson, H.K., et al. (2010). "Tumor delivery and in vivo processing of disulfide-linked and thioether-linked antibody-maytansinoid conjugates." *Bioconjug Chem* **21**(1): 84-92.
84. Koblinski, J.E., M. Ahram, and B.F. Sloane (2000). "Unraveling the role of proteases in cancer." *Clin Chim Acta* **291**(2): 113-135.
85. Law, B. and C.H. Tung (2009). "Proteolysis: a biological process adapted in drug delivery, therapy, and imaging." *Bioconjug Chem* **20**(9): 1683-1695.
86. Toki, B.E., et al. (2002). "Protease-mediated fragmentation of p-amidobenzyl ethers: a new strategy for the activation of anticancer prodrugs." *J Org Chem* **67**(6): 1866-1872.
87. Sanderson, R.J., et al. (2005). "In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate." *Clin Cancer Res* **11**(2 Pt 1): 843-852.
88. Bross, P.F., et al. (2001). "Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia." *Clin Cancer Res* **7**(6): 1490-1496.
89. Labrijn, A.F., et al. (2009). "Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo." *Nat Biotechnol* **27**(8): 767-771.
90. Beck, A., et al. (2010). "The next generation of antibody-drug conjugates comes of age." *Discov Med* **10**(53): 329-339.
91. Godwin, C.D., R.P. Gale, and R.B. Walter (2017). "Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia." *Leukemia* **31**(9): 1855-1868.
92. Burris, H.A., 3rd, et al. (2011). "Trastuzumab emtansine (T-DM1): a novel agent for targeting HER2+ breast cancer." *Clin Breast Cancer* **11**(5): 275-282.
93. Oroudjev, E., et al. (2010). "Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability." *Mol Cancer Ther* **9**(10): 2700-2713.
94. Goldenberg, D.M., et al. (2015). "Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC)." *Oncotarget* **6**(26): 22496-22512.
95. Shen, B.Q., et al. (2012). "Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates." *Nat Biotechnol* **30**(2): 184-189.
96. Beck, A., et al. (2017). "Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates." *Nat Rev Drug Discov* **16**(5): 315-337.
97. Oganessian, V., et al. (2018). "Structural insights into the mechanism of action of a biparatopic anti-HER2 antibody." *J Biol Chem* **293**(22): 8439-8448.

98. Stein, E.M., et al. (2018). "A phase 1 trial of vadastuximab talirine as monotherapy in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia." *Blood* **131**(4): 387-396.
99. Beck, A. and J.M. Reichert (2014). "Antibody-drug conjugates: present and future." *MAbs* **6**(1): 15-17.
100. Ritchie, M., L. Tchistiakova, and N. Scott (2013). "Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates." *MAbs* **5**(1): 13-21.
101. Pillow, T.H., et al. (2017). "Decoupling stability and release in disulfide bonds with antibody-small molecule conjugates." *Chem Sci* **8**(1): 366-370.
102. Le Roy, C. and J.L. Wrana (2005). "Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2): 112-126.
103. Lin, J.Y., et al. (1970). "Abrin and ricin: new anti-tumour substances." *Nature* **227**(5255): 292-293.
104. Lin, J.Y., et al. (1970). "Effect of crystalline abrin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumors." *Cancer Res* **30**(9): 2431-2433.
105. Lin, J.Y., et al. (1971). "Effect of crystalline ricin on the biosynthesis of protein, RNA, and DNA in experimental tumor cells." *Cancer Res* **31**(7): 921-924.
106. Olsnes, S. and A. Pihl (1973). "Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis." *Biochemistry* **12**(16): 3121-3126.
107. Olsnes, S. and A. Pihl (1972). "Ricin - a potent inhibitor of protein synthesis." *FEBS Lett* **20**(3): 327-329.
108. Endo, Y. and I.G. Wool (1982). "The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid." *J Biol Chem* **257**(15): 9054-9060.
109. Endo, Y. and K. Tsurugi (1987). "RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes." *J Biol Chem* **262**(17): 8128-8130.
110. Stirpe, F., et al. (1976). "Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro." *Biochem J* **156**(1): 1-6.
111. Barbieri, L., et al. (1997). "Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A)." *Nucleic Acids Res* **25**(3): 518-522.
112. Obrig, T.G., J.D. Irvin, and B. Hardesty (1973). "The effect of an antiviral peptide on the ribosomal reactions of the peptide elongation enzymes, EF-I and EF-II." *Arch Biochem Biophys* **155**(2): 278-289.

113. Stirpe, F., et al. (1981). "Dianthins, ribosome-damaging proteins with anti-viral properties from *Dianthus caryophyllus* L. (carnation)." *Biochem J* **195**(2): 399-405.
114. Hertler, A.A., L.E. Spitler, and A.E. Frankel (1987). "Humoral immune response to a ricin A chain immunotoxin in patients with metastatic melanoma." *Cancer Drug Deliv* **4**(4): 245-253.
115. Thorpe, P.E., et al. (1981). "Cytotoxicity acquired by conjugation of an anti-Thy1.1 monoclonal antibody and the ribosome-inactivating protein, gelonin." *Eur J Biochem* **116**(3): 447-454.
116. Ramakrishnan, S. and L.L. Houston (1984). "Comparison of the selective cytotoxic effects of immunotoxins containing ricin A chain or pokeweed antiviral protein and anti-Thy 1.1 monoclonal antibodies." *Cancer Res* **44**(1): 201-208.
117. Lambert, J.M., et al. (1985). "Purified immunotoxins that are reactive with human lymphoid cells. Monoclonal antibodies conjugated to the ribosome-inactivating proteins gelonin and the pokeweed antiviral proteins." *J Biol Chem* **260**(22): 12035-12041.
118. Blythman, H.E., et al. (1981). "Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumour cells." *Nature* **290**(5802): 145-146.
119. Polito, L., et al. (2011). "Immunotoxins and other conjugates containing saporin-s6 for cancer therapy." *Toxins (Basel)* **3**(6): 697-720.
120. Polito, L., et al. (2013). "Saporin-S6: a useful tool in cancer therapy." *Toxins (Basel)* **5**(10): 1698-1722.
121. Manosroi, J., et al. (1992). "Thermo-stability and antitumor activity on colon cancer cell lines of monoclonal anti-CEA antibody-saporin immunotoxin." *J Korean Med Sci* **7**(2): 128-135.
122. Santanche, S., A. Bellelli, and M. Brunori (1997). "The unusual stability of saporin, a candidate for the synthesis of immunotoxins." *Biochem Biophys Res Commun* **234**(1): 129-132.
123. Gilabert-Oriol, R., et al. (2015). "Combinatorial approach to increase efficacy of Cetuximab, Panitumumab and Trastuzumab by dianthin conjugation and co-application of SO1861." *Biochem Pharmacol* **97**(3): 247-255.
124. Gilabert-Oriol, R., et al. (2013). "Small structural differences of targeted anti-tumor toxins result in strong variation of protein expression." *Protein Expr Purif* **91**(1): 54-60.
125. Strocchi, P., L. Barbieri, and F. Stirpe (1992). "Immunological properties of ribosome-inactivating proteins and a saporin immunotoxin." *J Immunol Methods* **155**(1): 57-63.
126. Falasca, A., et al. (1982). "Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Momordica charantia* inhibitor, and dianthins." *Biochem J* **207**(3): 505-509.
127. Fermani, S., et al. (2005). "The 1.4 anstroms structure of dianthin 30 indicates a role of surface potential at the active site of type 1 ribosome inactivating proteins." *J Struct Biol* **149**(2): 204-212.

128. Weng, A., et al. (2009). "Enhancement of saporin cytotoxicity by Gypsophila saponins-more than stimulation of endocytosis." *Chem Biol Interact* **181**(3): 424-429.
129. Vago, R., et al. (2005). "Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells." *FEBS J* **272**(19): 4983-4995.
130. Fuchs, H., A. Weng, and R. Gilabert-Oriol (2016). "Augmenting the Efficacy of Immunotoxins and Other Targeted Protein Toxins by Endosomal Escape Enhancers." *Toxins (Basel)* **8**(7).
131. Nishikawa, M. and L. Huang (2001). "Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer." *Hum Gene Ther* **12**(8): 861-870.
132. Tokatlian, T. and T. Segura (2010). "siRNA applications in nanomedicine." *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2**(3): 305-315.
133. Li, M., et al. (2015). "Discovery and characterization of a peptide that enhances endosomal escape of delivered proteins in vitro and in vivo." *J Am Chem Soc* **137**(44): 14084-14093.
134. Frankel, A.D. and C.O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* **55**(6): 1189-1193.
135. Shin, M.C., et al. (2014). "Combination of antibody targeting and PTD-mediated intracellular toxin delivery for colorectal cancer therapy." *J Control Release* **194**: 197-210.
136. Shin, M.C., et al. (2015). "Recombinant TAT-gelatin fusion toxin: synthesis and characterization of heparin/protamine-regulated cell transduction." *J Biomed Mater Res A* **103**(1): 409-419.
137. Adigbli, D.K. and A.J. MacRobert (2012). "Photochemical internalisation: the journey from basic scientific concept to the threshold of clinical application." *Curr Opin Pharmacol* **12**(4): 434-438.
138. Yip, W.L., et al. (2007). "Targeted delivery and enhanced cytotoxicity of cetuximab-saporin by photochemical internalization in EGFR-positive cancer cells." *Mol Pharm* **4**(2): 241-251.
139. Selbo, P.K., et al. (2009). "Multi-modality therapeutics with potent anti-tumor effects: photochemical internalization enhances delivery of the fusion toxin scFvMEL/rGel." *PLoS One* **4**(8): e6691.
140. Chollet, P., et al. (2002). "Side-effects of a systemic injection of linear polyethylenimine-DNA complexes." *J Gene Med* **4**(1): 84-91.
141. Zhang, X., et al. (2003). "The in vivo use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct." *J Gene Med* **5**(3): 209-218.
142. Fuchs, H., et al. (2017). "Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies." *Biomedicines* **5**(2).

143. Findlay, J.A. (1996). "Chemistry & Pharmacology of Natural Products: Saponins K. Hostettmann and A. Marston. Cambridge University Press, New York, NY. 1995. xii + 548 pp. 15 × 22.5 cm. ISBN 0-521-32970-1. \$120.00." *Journal of Natural Products* **59**(1): 96-96.
144. Vincken, J.P., et al. (2007). "Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom." *Phytochemistry* **68**(3): 275-297.
145. Bottger, S., et al. (2013). "Structure-activity relationships of saponins enhancing the cytotoxicity of ribosome-inactivating proteins type I (RIP-I)." *Toxicol* **73**: 144-150.
146. Bottger, S., K. Hofmann, and M.F. Melzig (2012). "Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: a correlation?" *Bioorg Med Chem* **20**(9): 2822-2828.
147. Baumann, E., et al. (2000). "Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure." *Acta Histochem* **102**(1): 21-35.
148. Augustin, J.M., et al. (2011). "Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins." *Phytochemistry* **72**(6): 435-457.
149. Wang, T., et al. (2009). "Effects of escin on acute inflammation and the immune system in mice." *Pharmacol Rep* **61**(4): 697-704.
150. Sirtori, C.R. (2001). "Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile." *Pharmacol Res* **44**(3): 183-193.
151. Heisler, I., et al. (2005). "Combined application of saponin and chimeric toxins drastically enhances the targeted cytotoxicity on tumor cells." *J Control Release* **106**(1-2): 123-137.
152. Weng, A., et al. (2012). "The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins." *Mol Oncol* **6**(3): 323-332.
153. Thakur, M., et al. (2013). "Macromolecular interactions of triterpenoids and targeted toxins: role of saponins charge." *Int J Biol Macromol* **61**: 285-294.
154. Bachran, D., et al. (2011). "The endocytic uptake pathways of targeted toxins are influenced by synergistically acting Gypsophila saponins." *Mol Pharm* **8**(6): 2262-2272.
155. Gilabert-Oriol, R., et al. (2016). "Saponins from *Saponaria officinalis* L. Augment the Efficacy of a Rituximab-Immunotoxin." *Planta Med* **82**(18): 1525-1531.
156. Moniuszko-Szajwaj, B., et al. (2013). "New triterpenoid saponins from the roots of *Saponaria officinalis*." *Nat Prod Commun* **8**(12): 1687-1690.
157. Parkinson-Lawrence, E.J., et al. (2005). "Immunochemical analysis of CD107a (LAMP-1)." *Cell Immunol* **236**(1-2): 161-166.
158. Camacho, X., et al. (2014). "^{99m}Tc-Labeled Bevacizumab via HYNIC for Imaging of Melanoma." *Journal of Analytical Oncology* **3**(1): 53-64.

159. SAS (1990). SAS/STAT® User's Guide. Version 6. Fourth Ed. or later. Cary, NC, USA.
160. BMDP Statistics Software, I. (1990). BMDP Statistical Software Manual. W.J.Dixon, Chief Ed. 1990 rev. or later. University of California Press, Berkeley, CA, USA.
161. Bachran, C., et al. (2010). "The distribution of saponins in vivo affects their synergy with chimeric toxins against tumours expressing human epidermal growth factor receptors in mice." *Br J Pharmacol* **159**(2): 345-352.
162. Bachran, C., et al. (2009). "Inhibition of tumor growth by targeted toxins in mice is dramatically improved by saponinum album in a synergistic way." *J Immunother* **32**(7): 713-725.
163. Batts, K.P. and J. Ludwig (1995). "Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting." *Am J Surg Pathol* **19**(12): 1409-1417.
164. Legname, G., et al. (1991). "Nucleotide sequence of cDNA coding for dianthin 30, a ribosome inactivating protein from *Dianthus caryophyllus*." *Biochim Biophys Acta* **1090**(1): 119-122.
165. UniProtKB. "P24476 (RIP0_DIACA)." from <https://www.uniprot.org/uniprot/P24476>.
166. C., S.J. (2016) Purifying Recombinant His-Tagged Proteins. **36**,
167. BioLabs, N.E. "Produkt information: NiCo21(DE3) Competent E. coli." from <https://international.neb.com/products/c2529-nico21de3-competent-e-coli#Product%20Information>.
168. Günther, L.S. (2018). "Development of a targeted dianthin by chemical conjugation to Panitumumab and *in vitro* studies on colon carcinoma cells." *Master Thesis (unpublished)*. Universität Potsdam, Potsdam, Deutschland.
169. Yang, X.D., et al. (1999). "Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy." *Cancer Res* **59**(6): 1236-1243.
170. Sickmier, E.A., et al. (2016). "The Panitumumab EGFR Complex Reveals a Binding Mechanism That Overcomes Cetuximab Induced Resistance." *PLoS One* **11**(9): e0163366.
171. Glatt, D.M., et al. (2018). "Synthesis and Characterization of Cetuximab-Docetaxel and Panitumumab-Docetaxel Antibody-Drug Conjugates for EGFR-Overexpressing Cancer Therapy." *Mol Pharm* **15**(11): 5089-5102.
172. Stanley, A., et al. (2017). "Synergistic effects of various Her inhibitors in combination with IGF-1R, C-MET and Src targeting agents in breast cancer cell lines." *Scientific Reports* **7**(1): 3964.
173. Garcia-Foncillas, J., et al. (2019). "Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors." *Front Oncol* **9**: 849.
174. Belge, K.U., et al. (2002). "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." *J Immunol* **168**(7): 3536-3542.

175. Horelt, A., et al. (2002). "The CD14+CD16+ monocytes in erysipelas are expanded and show reduced cytokine production." *Eur J Immunol* **32**(5): 1319-1327.
176. from https://www.janvier-labs.com/en/fiche_produit/nmri-nu_mouse/.
177. Bhargava, C., et al. (2017). "Targeted dianthin is a powerful toxin to treat pancreatic carcinoma when applied in combination with the glycosylated triterpene SO1861." *Mol Oncol* **11**(11): 1527-1543.
178. von Mallinckrodt, B., et al. (2014). "Dianthin-EGF is an effective tumor targeted toxin in combination with saponins in a xenograft model for colon carcinoma." *Future Oncol* **10**(14): 2161-2175.
179. Legname, G., et al. (1995). "Heterologous expression, purification, activity and conformational studies of different forms of dianthin 30." *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* **1**(2): 61-68.
180. Komatsu, N., et al. (2020). "Saponin Facilitates Anti-Robo1 Immunotoxin Cytotoxic Effects on Maxillary Sinus Squamous Cell Carcinoma." *J Oncol* **2020**: 9593516.
181. Weeraratne, D., et al. (2011). "Immunogenicity of panitumumab in combination chemotherapy clinical trials." *BMC Clin Pharmacol* **11**: 17.
182. Weiner, L.M., et al. (2005). "Updated results from a dose and schedule study of Panitumumab (ABX-EGF) monotherapy, in patients with advanced solid malignancies." *Journal of Clinical Oncology* **23**(16): 206s-206s.
183. Traverso, N., et al. (2013). "Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance." *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 972913.
184. Lee, E. and D.H. Lee (2017). "Emerging roles of protein disulfide isomerase in cancer." *BMB Rep* **50**(8): 401-410.
185. Dhanabal, M., D.K. Fryxell, and S. Ramakrishnan (1995). "A novel method to purify immunotoxins from free antibodies using modified recombinant toxins." *J Immunol Methods* **182**(2): 165-175.
186. Boylan, N.J., et al. (2013). "Conjugation site heterogeneity causes variable electrostatic properties in Fc conjugates." *Bioconjug Chem* **24**(6): 1008-1016.
187. Yamada, K., et al. (2019). "AJICAP: Affinity Peptide Mediated Regiodivergent Functionalization of Native Antibodies." *Angew Chem Int Ed Engl* **58**(17): 5592-5597.
188. Matsuda, Y., et al. (2019). "Gram-Scale Antibody-Drug Conjugate Synthesis by Site-Specific Chemical Conjugation: AJICAP First Generation." *Organic Process Research & Development* **23**(12): 2647-2654.
189. Junutula, J.R., et al. (2008). "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index." *Nat Biotechnol* **26**(8): 925-932.
190. Junutula, J.R., et al. (2008). "Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs." *J Immunol Methods* **332**(1-2): 41-52.

191. Pahl, A., C. Lutz, and T. Hechler (2018). "Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates." *Drug Discov Today Technol* **30**: 85-89.
192. Sun, M.M., et al. (2005). "Reduction-alkylation strategies for the modification of specific monoclonal antibody disulfides." *Bioconjug Chem* **16**(5): 1282-1290.
193. Nakane, P.K. (1975). "Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method." *Ann N Y Acad Sci* **254**(1): 203-211.
194. Wolfe, C.A. and D.S. Hage (1995). "Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate." *Anal Biochem* **231**(1): 123-130.
195. Zuberbuhler, K., et al. (2012). "Fucose-specific conjugation of hydrazide derivatives to a vascular-targeting monoclonal antibody in IgG format." *Chem Commun (Camb)* **48**(56): 7100-7102.
196. Li, X., T. Fang, and G.J. Boons (2014). "Preparation of well-defined antibody-drug conjugates through glycan remodeling and strain-promoted azide-alkyne cycloadditions." *Angew Chem Int Ed Engl* **53**(28): 7179-7182.
197. Liu, C.C. and P.G. Schultz (2010). "Adding new chemistries to the genetic code." *Annu Rev Biochem* **79**(1): 413-444.
198. Sochaj, A.M., K.W. Swiderska, and J. Otlewski (2015). "Current methods for the synthesis of homogeneous antibody-drug conjugates." *Biotechnol Adv* **33**(6 Pt 1): 775-784.
199. Zimmerman, E.S., et al. (2014). "Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system." *Bioconjug Chem* **25**(2): 351-361.
200. Smolskaya, S., Y.A. Logashina, and Y.A. Andreev (2020). "Escherichia coli Extract-Based Cell-Free Expression System as an Alternative for Difficult-to-Obtain Protein Biosynthesis." *Int J Mol Sci* **21**(3): 928.
201. Kryukov, G.V., et al. (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." *Science* **300**(5624): 1439-1443.
202. Johansson, L., et al. (2004). "Exploiting the 21st amino acid-purifying and labeling proteins by selenolate targeting." *Nat Methods* **1**(1): 61-66.
203. Hofer, T., et al. (2008). "An engineered selenocysteine defines a unique class of antibody derivatives." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(34): 12451-12456.
204. Dennler, P., et al. (2014). "Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates." *Bioconjug Chem* **25**(3): 569-578.
205. Park, J., et al. (2018). "Peptide-Directed Photo-Cross-Linking for Site-Specific Conjugation of IgG." *Bioconjug Chem* **29**(10): 3240-3244.
206. Webster, J. and D. Oxley (2012). "Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry." *Methods Mol Biol* **800**: 227-240.

207. Sadowski, M.I. and D.T. Jones (2009). "The sequence-structure relationship and protein function prediction." *Curr Opin Struct Biol* **19**(3): 357-362.
208. Trautner, A. (2014). "Klonierung und Expression von Dianthin zur zielgerichteten Tumorthherapie: Kopplung an Antikörper und *in vitro*-Testung." *Diplomarbeit (unveröffentlicht)*. Technische Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
209. Fermani, S., et al. (2009). "Structure/function studies on two type 1 ribosome inactivating proteins: Bouganin and lychnin." *J Struct Biol* **168**(2): 278-287.
210. Barbieri, L., et al. (2000). "Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of immunotoxins containing ribosome-inactivating proteins." *J Drug Target* **8**(5): 281-288.
211. Zhou, Y., et al. (2012). "Impact of intrinsic affinity on functional binding and biological activity of EGFR antibodies." *Mol Cancer Ther* **11**(7): 1467-1476.
212. Rudnick, S.I., et al. (2011). "Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors." *Cancer Res* **71**(6): 2250-2259.
213. Weng, A., et al. (2012). "Saponins modulate the intracellular trafficking of protein toxins." *J Control Release* **164**(1): 74-86.
214. Kasper, S., et al. (2013). "Oncogenic RAS simultaneously protects against anti-EGFR antibody-dependent cellular cytotoxicity and EGFR signaling blockade." *Oncogene* **32**(23): 2873-2881.
215. Chen, X., T.K. Yeung, and Z. Wang (2000). "Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3." *Biochem Biophys Res Commun* **277**(3): 757-763.
216. DSMZ. "HCT116." from <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-581>.
217. DSMZ. "MDA-MB-453." from <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-65>.
218. White-Gilbertson, S., D.T. Kurtz, and C. Voelkel-Johnson (2009). "The role of protein synthesis in cell cycling and cancer." *Mol Oncol* **3**(5-6): 402-408.
219. Schneider-Merck, T., et al. (2010). "Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage." *J Immunol* **184**(1): 512-520.
220. Trivedi, S., et al. (2016). "Anti-EGFR Targeted Monoclonal Antibody Isotype Influences Antitumor Cellular Immunity in Head and Neck Cancer Patients." *Clin Cancer Res* **22**(21): 5229-5237.
221. Shim, H. (2011). "One target, different effects: a comparison of distinct therapeutic antibodies against the same targets." *Exp Mol Med* **43**(10): 539-549.

222. Serbina, N.V., et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* **26**: 421-452.
223. Ivanova, E.A. and A.N. Orekhov (2016). "Monocyte Activation in Immunopathology: Cellular Test for Development of Diagnostics and Therapy." *J Immunol Res* **2016**: 4789279.
224. Michel, T., F. Hentges, and J. Zimmer (2012). "Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells." *Front Immunol* **3**(403): 403.
225. Bhatnagar, N., et al. (2014). "FcγRIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and FcγRII (CD32)." *Eur J Immunol* **44**(11): 3368-3379.
226. Soderquest, K., et al. (2011). "Monocytes control natural killer cell differentiation to effector phenotypes." *Blood* **117**(17): 4511-4518.
227. Srivastava, R.M., et al. (2013). "Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients." *Clin Cancer Res* **19**(7): 1858-1872.
228. Elavazhagan, S., et al. (2015). "Granzyme B expression is enhanced in human monocytes by TLR8 agonists and contributes to antibody-dependent cellular cytotoxicity." *J Immunol* **194**(6): 2786-2795.
229. Holubec, L., et al. (2016). "The Role of Cetuximab in the Induction of Anticancer Immune Response in Colorectal Cancer Treatment." *Anticancer Res* **36**(9): 4421-4426.
230. Anfray, C., et al. (2019). "Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses." *Cells* **9**(1).
231. Li, F., et al. (2017). "Tumor-Associated Macrophages Can Contribute to Antitumor Activity through FcγR-Mediated Processing of Antibody-Drug Conjugates." *Mol Cancer Ther* **16**(7): 1347-1354.
232. Clark, M. (2000). "Antibody humanization: a case of the 'Emperor's new clothes'?" *Immunol Today* **21**(8): 397-402.
233. Hwang, W.Y. and J. Foote (2005). "Immunogenicity of engineered antibodies." *Methods* **36**(1): 3-10.
234. Overdijk, M.B., et al. (2012). "Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells." *J Immunol* **189**(7): 3430-3438.
235. Boswell, C.A., et al. (2010). "Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics." *Bioconjug Chem* **21**(12): 2153-2163.
236. Goyon, A., et al. (2017). "Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1065-1066**: 119-128.
237. Shah, D.K. and A.M. Betts (2013). "Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human." *MAbs* **5**(2): 297-305.

238. Glassman, P.M., L. Abuqayyas, and J.P. Balthasar (2015). "Assessments of antibody biodistribution." *J Clin Pharmacol* **55 Suppl 3**: S29-38.
239. Stirpe, F., et al. (1987). "Hepatotoxicity of immunotoxins made with saporin, a ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis*." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **53**(5): 259-271.
240. Blakey, D.C., et al. (1988). "Comparison of the pharmacokinetics and hepatotoxic effects of saporin and ricin A-chain immunotoxins on murine liver parenchymal cells." *Cancer Res* **48**(24 Pt 1): 7072-7078.
241. Wawrzynczak, E.J., et al. (1990). "Pharmacokinetics in the rat of a panel of immunotoxins made with abrin A chain, ricin A chain, gelonin, and momordin." *Cancer Res* **50**(23): 7519-7526.
242. Jain, R.K. and L.T. Baxter (1988). "Mechanisms of heterogeneous distribution of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors: significance of elevated interstitial pressure." *Cancer Res* **48**(24 Pt 1): 7022-7032.
243. Wittrup, K.D., et al. (2012). "Practical theoretic guidance for the design of tumor-targeting agents." *Methods Enzymol* **503**: 255-268.
244. Graff, C.P. and K.D. Wittrup (2003). "Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: importance of dosage for penetration, and affinity for retention." *Cancer Res* **63**(6): 1288-1296.
245. Akilesh, S., et al. (2007). "Neonatal FcR expression in bone marrow-derived cells functions to protect serum IgG from catabolism." *J Immunol* **179**(7): 4580-4588.
246. Qiao, S.W., et al. (2008). "Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(27): 9337-9342.
247. Datta-Mannan, A., et al. (2007). "Humanized IgG1 variants with differential binding properties to the neonatal Fc receptor: relationship to pharmacokinetics in mice and primates." *Drug Metab Dispos* **35**(1): 86-94.
248. Datta-Mannan, A., et al. (2007). "Monoclonal antibody clearance. Impact of modulating the interaction of IgG with the neonatal Fc receptor." *J Biol Chem* **282**(3): 1709-1717.
249. Deng, R., et al. (2010). "Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- α antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys." *Drug Metab Dispos* **38**(4): 600-605.
250. Kenanova, V., et al. (2007). "Radioiodinated versus radiometal-labeled anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments: optimal pharmacokinetics for therapy." *Cancer Res* **67**(2): 718-726.
251. Olafsen, T., et al. (2005). "Optimizing radiolabeled engineered anti-p185HER2 antibody fragments for in vivo imaging." *Cancer Res* **65**(13): 5907-5916.
252. McCombs, J.R. and S.C. Owen (2015). "Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry." *AAPS J* **17**(2): 339-351.

253. Costa, B., D. Ilem-Ozdemir, and R. Santos-Oliveira (2019). "Technetium-99m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: old chemistry for new products." *Journal of Coordination Chemistry* **72**(11): 1759-1784.
254. Sadowsky, J.D., et al. (2017). "Development of Efficient Chemistry to Generate Site-Specific Disulfide-Linked Protein- and Peptide-Payload Conjugates: Application to THIOMAB Antibody-Drug Conjugates." *Bioconjug Chem* **28**(8): 2086-2098.
255. Kellogg, B.A., et al. (2011). "Disulfide-linked antibody-maytansinoid conjugates: optimization of in vivo activity by varying the steric hindrance at carbon atoms adjacent to the disulfide linkage." *Bioconjug Chem* **22**(4): 717-727.
256. Zhang, D., et al. (2016). "Linker Immobilization Determines Cell Killing Activity of Disulfide-Linked Pyrrolobenzodiazepine Antibody-Drug Conjugates." *ACS Med Chem Lett* **7**(11): 988-993.
257. Kim, J., et al. (2006). "Albumin turnover: FcRn-mediated recycling saves as much albumin from degradation as the liver produces." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(2): G352-360.
258. Peters, T., Jr. (1985). "Serum albumin." *Adv Protein Chem* **37**: 161-245.
259. Tumey, L.N., et al. (2014). "Mild method for succinimide hydrolysis on ADCs: impact on ADC potency, stability, exposure, and efficacy." *Bioconjug Chem* **25**(10): 1871-1880.
260. Kasper, M.A., et al. (2019). "Ethylnylphosphoramidates for the Rapid and Cysteine-Selective Generation of Efficacious Antibody-Drug Conjugates." *Angew Chem Int Ed Engl* **58**(34): 11631-11636.
261. Kasper, M.A., et al. (2020). "N-Hydroxysuccinimide-Modified Ethylnylphosphoramidates Enable the Synthesis of Configurationally Defined Protein Conjugates." *Chembiochem* **21**(1-2): 113-119.
262. Cilliers, C., et al. (2018). "Improved Tumor Penetration and Single-Cell Targeting of Antibody-Drug Conjugates Increases Anticancer Efficacy and Host Survival." *Cancer Res* **78**(3): 758-768.
263. Richards, D.A. (2018). "Exploring alternative antibody scaffolds: Antibody fragments and antibody mimics for targeted drug delivery." *Drug Discov Today Technol* **30**: 35-46.
264. Zhuang, C., et al. (2019). "Small molecule-drug conjugates: A novel strategy for cancer-targeted treatment." *Eur J Med Chem* **163**: 883-895.
265. Safdari, Y., et al. (2016). "Use of single chain antibody derivatives for targeted drug delivery." *Mol Med* **22**: 258-270.
266. Kim, K.M., et al. (2008). "Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity." *Mol Cancer Ther* **7**(8): 2486-2497.

267. Sokolova, E., et al. (2016). "Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect in vitro and a potent antitumor activity in vivo." *J Control Release* **233**: 48-56.

8 Publikationen

Poster

Trautner A, Günther L. S., Niesler N, Fuchs H. „Enhancing immunotoxins' cytotoxicity“. CESAR-Jahrestagung. March 16th – 17th, 2018. Berlin, Germany.

Niesler N, Arndt J, Weise C, Rentzsch M, Kurtze B, **Trautner A**, Fuchs H. „The chicken anemia virus protein apoptin in targeted therapy: weapon of tumor mass destruction or lame duck?“. CESAR-Jahrestagung. March 16th–17th, 2018. Berlin, Germany.

Niesler N, Arndt J, Silberreis K, **Trautner A**, Panjideh H and Fuchs H. „The apoptosis inducing viral protein apoptin as promising and efficient candidate for tumor targeted therapy? “ MDC-FMP-BIH-Charit'e Postdoc Day. May 5th, 2017. Berlin, Germany.

Trautner A, Knepper I, Niesler N, Panjideh H, Fuchs H. „A novel tool to generate highly defined immunotoxins: clickable dianthin“. 15th International Congress on Targeted Anticancer Therapies. March 6th – 8th, 2017. Paris, France.

Niesler N, Kurtze B, **Trautner A**, Panjideh H and Fuchs H. „Click-apoptin as novel strategy to generate homogeneous tumor targeted weapons“. 15th International Congress on Targeted Anticancer Therapies. March 6th–8th, 2017. Paris, France.

Panjideh H, **Trautner A**, Gilabert-Oriol R, Weng A, Bhargava C, Niesler N, Fuchs H. „Improvement in efficacy of Cetuximab, Panitumumab, Trastuzumab and Rituximab by dianthin conjugation and co-application of SO1861“. 32th Deutscher Krebskongress. February 21th–24th, 2016. Berlin, Germany.

Publikationen

Fuchs H, Niesler N, **Trautner A**, Sama S, Jerz G, Panjideh H, Weng A (2017). „Glycosylated triterpenoids as endosomal escape enhancers in targeted tumor therapies“. *Biomedicines*. 5(2):E14

Gilabert-Oriol R, Weng A, **Trautner A**, Weise C, Schmid D, Bhargava C, Niesler N, Wookey PJ, Fuchs H, Thakur M (2015). "Combinatorial approach to increase efficacy of Cetuximab, Panitumumab and Trastuzumab by dianthin conjugation and co-application of SO1861". *Biochem Pharmacol*. 97(3):247 – 55 2013

Enthaler S, **Trautner A** (2013). „Iron-catalyzed Ring-closing Depolymerisation of Poly(tetrahydrofuran)“. *ChemSusChem*. 6(8):1334 – 1336

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Hendrik Fuchs für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe promovieren zu dürfen. Vielen lieben Dank für die konstruktiven Gespräche, die mir eingeräumten Freiheiten sowie die Möglichkeit, jederzeit Gedankengänge und Problematiken besprechen zu können.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias F. Melzig für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters bedanken.

Herrn Prof. Dr. Horst Dürkop möchte ich recht herzlich für die histopathologische Befundung und seine überaus hilfreichen Erklärungen danken.

Ein ganz großer Dank gilt Dr. Jens Dervedde, der mir nicht nur fachlich stets unterstützend zur Seite stand, sondern auch immer für einen persönlichen Schnack zu haben war.

Von ganz großem Herzen möchte ich meiner liebsten Nicole danken, die wirklich immer für mich da war. Danke auch an Xiangli, Martha, Kim und Isabell, ihr seid nicht nur Arbeitskolleginnen, sondern auch sehr gute Freunde geworden. Vor allem möchte ich Nicole und Isabell für die Korrektur meiner Arbeit danken, ohne euch wäre das nichts geworden.

Meinen lieben Arbeitskolleginnen Doris, Brigitte und Luise möchte ich für die Unterstützung und Erklärungen danken und dass man wirklich wegen jeder Kleinigkeit euch um Hilfe bitten konnte.

Meine lieben Füchse, ich werde euch vermissen. Marianne, Mazdak, Gregor, Melanie, Ajmal, Finn, Lena, Shikka, Alessio, Tuyen, Maria, Burak, Jannis und Qi sowie die ehemaligen Lea, Matthias, Roger, Benedikta, Cheenu und Mayank: Vielen Dank für die wirklich schöne Zeit, das viele Lachen miteinander und die gegenseitige Unterstützung.

Der wohl größte Dank gilt meiner Familie. Vielen Dank Mama und Papa für eure stetige Unterstützung in jeglicher Hinsicht und das Gewähren der Entfaltung meines freien Geistes, ohne mich je einschränken zu wollen. Vielen Dank Katharina und Jan Peter für eure Unterstützung in jeder Lebenslage. Ohne meine Familie wäre ich nicht dieselbe!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Kindergarten-, Abitur- und Studienfreunden Ann, Flo, Faust, Jessica, Caro, Paddy, Hilde, Maria, Nicole, Steff und Steffi bedanken, die nie den Glauben an mich verloren haben!

DANKE!

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit Titel „Mechanismen der zielgerichteten antitumoralen Wirksamkeit von Dianthin-Panitumumab-Konjugaten in Kombination mit dem glykosylierten Triterpenoid SO1861“ selbstständig und eigenhändig sowie ohne unerlaubte fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Alexandra Trautner