

Entwicklung und Evaluation rekombinanter Antikörper-Fluorophor-
Konjugate mit Spezifität für Endometriose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Grimm, Armin
aus Heidelberg

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

UKGM Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Ivo Meinhold-Heerlein

Gutachterin: Prof. Dr. Anne Schänzer

Tag der Disputation: 01.06.2026

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Theoretischer Hintergrund.....	1
1.1.1.	Endometriose	1
1.1.1.1.	Definition.....	1
1.1.1.2.	Epidemiologie.....	1
1.1.1.3.	Ätiologie und Pathophysiologie	1
1.1.1.4.	Klinik.....	2
1.1.1.5.	Diagnostik.....	2
1.1.1.6.	Therapie	3
1.1.1.7.	Intraoperative Bildgebung in der Endometriosechirurgie	4
1.1.2.	Molecular Imaging und Image Guided Surgery	4
1.1.3.	Bildgebungssubstanzen – Präparate zur zielgerichteten Detektion und Darstellung von Gewebe	6
1.1.3.1.	Zielstruktur-bindende Komponente: Antikörper und Antikörper-Derivate	7
1.1.3.1.1.	Physiologischer struktureller Aufbau	7
1.1.3.1.2.	Funktion eines Antikörpers	9
1.1.3.1.3.	Herstellung rekombinanter Antikörper	9
1.1.3.1.4.	Antikörper-Derivate: scFv-Fragmente	10
1.1.3.2.	Linker und Konjugationsmethode	12
1.1.3.2.1.	Unspezifische Konjugation an nativ-vorkommende reaktive Gruppen	13
1.1.3.2.2.	Gentechnisches Einfügen nicht-natürlicher Aminosäuren	13
1.1.3.2.3.	Enzymatische Konjugation	14
1.1.3.3.	Wirkstoff: Fluorophore.....	15
1.2.	Zielsetzung des Projekts	17
2.	Material und Methoden	19

2.1.	Material.....	19
2.1.1.	Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.2.	Verwendete Puffer.....	19
2.1.3.	Kits.....	21
2.1.4.	Säulen	21
2.1.5.	Antikörper.....	22
2.1.6.	Geräte.....	23
2.1.7.	Software zur Datenanalyse	24
2.1.8.	Zelllinien.....	24
2.1.9.	Zellkultur	25
2.1.10.	Enzyme	25
2.1.11.	Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP	25
2.1.12.	Verwendete Fluorophore	25
2.2.	Methode.....	25
2.2.1.	Zellkultivierung	26
2.2.2.	Zellen einfrieren	26
2.2.3.	Zellen auftauen	26
2.2.4.	Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP	27
2.2.5.	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinexpression	29
2.2.6.	Proteinpurifikation mittels „Immobilisierter Metallchelataffinitätschromatographie“ (IMAC).....	31
2.2.7.	Konjugation mit BG-modifizierten Fluorophoren.....	32
2.2.8.	Durchflusszytometrie.....	32

2.2.9.	Fluoreszenzmikroskopie	33
3.	Ergebnisse.....	34
3.1.	Entwicklung der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate	34
3.1.1.	Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP	34
3.1.2.	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinexpression	35
3.1.3.	Proteinpurifikation mittels IMAC	37
3.1.4.	Analyse der Antigenbindung durch das Fusionsprotein Farlet-scFv-SNAP	40
3.2.	Evaluation der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zur Detektion endometrioider Antigene.....	41
3.2.1.	Bestimmung des Expressionslevels der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa für die untersuchten Antigene mittels monoklonaler IgG-Antikörper	41
3.2.2.	Vergleich der Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Fluorophor-Antikörper mit der Bindungsfähigkeit monoklonaler IgG-Antikörper an die endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa.....	42
3.2.3.	Untersuchung der Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Antikörper an endometrioide Zellen, die EGFR, CSPG4, α EpCAM oder Farlet exprimieren mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie	44
3.2.4.	Multiplex Imaging der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z und THESC mit den scFv-Antikörperfluorophorkonjugaten 425-scFv-SNAP-BG546 und CSPG4-scFv-SNAP-BG647.....	46
4.	Diskussion	48
4.1.	Entwicklung der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate	48
4.1.1.	Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP	48
4.1.2.	Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinexpression	50

4.1.3.	Proteinpurifikation mittels IMAC	53
4.1.4.	Konjugation mit BG-modifizierten Fluorophoren und Analyse der Antigenbindung.....	56
4.1.5.	Fazit und Ausblick.....	62
4.2.	Evaluation der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zur Detektion endometrioider Antigene.....	65
4.2.1.	Die Wahl des Antikörpers für antikörperbasierte Bildgebungssysteme: IgG-Antikörper oder scFv-Fragmente?	69
4.2.2.	Einordnung der Ergebnisse in den Kontext klinischer Herausforderungen in Diagnostik und Therapie der Endometriose.....	72
4.2.3.	Fazit und Ausblick.....	77
5.	Zusammenfassung/Summary.....	80
5.1.	Zusammenfassung	80
5.2.	Summary.....	81
6.	Literaturverzeichnis.....	82
7.	Publikationsverzeichnis.....	95
8.	Danksagung.....	96

1. Einleitung

1.1. Theoretischer Hintergrund

1.1.1. Endometriose

1.1.1.1. Definition

Endometriose ist eine chronische Erkrankung, die definiert ist als das Auftreten von Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb des Cavum uteri (Zondervan et al. 2020; Ulrich 2020). Histologisch ist dies durch Zellverbände aus endometrioiden Drüsenzellverbänden und Stromazellen gekennzeichnet (Ulrich 2020). Makroskopisch kann sich Endometriose in Form von oberflächlichen peritonealen Läsionen, Zysten in den Ovarien (Endometriome), Endometrioseknoten, die das umliegende Gewebe infiltrieren (tief-infiltrierende Endometriose) und von extrapelvinen Läsionen präsentieren (Zondervan et al. 2020; Ulrich 2020).

1.1.1.2. Epidemiologie

Die genaue Prävalenz der Endometriose kann nur näherungsweise bestimmt werden, da für die definitive Diagnosestellung eine chirurgische Darstellung und Probeentnahme notwendig ist, die nicht bei allen tatsächlich an Endometriose erkrankten Patientinnen erfolgt. Aus diesem Grund muss von einer Dunkelziffer für Endometriose ausgegangen werden (Ulrich 2020; Abbas et al. 2012; Shafrir et al. 2018). Je nach Subpopulation ergeben sich andere Schätzungen für die Prävalenz. Bei Patientinnen, die an Unfruchtbarkeit leiden, beträgt die Prävalenz beispielsweise bis zu 50% (Shafrir et al. 2018). Die standardisierte Prävalenz in Deutschland beträgt 0.8-1% (Abbas et al. 2012; Eisenberg et al. 2018). Diese Angaben unterschätzen aufgrund der unbekannten Dunkelziffer allerdings das Vorliegen von Endometriose (Ulrich 2020). Studien, die diese Einschränkungen in der Bestimmung der tatsächlichen Prävalenz berücksichtigen, nehmen eine Gesamtprävalenz von mindestens 10% an (Shafrir et al. 2018).

1.1.1.3. Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie der Endometriose ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Obwohl es verschiedene Erklärungsansätze gibt, kann keiner dieser Ansätze die Pathogenese der

Endometriose vollständig erklären (Ebert 2019; Ulrich 2020; Zondervan et al. 2020). Zu diesen Ansätzen gehören beispielsweise die Implantationstheorie, die „Tissue-Injury-and-Repair-Theorie“, die Zölom-Metaplasie-Theorie und eine lymphatische und vaskuläre Metastasierung (Ulrich 2020; Zondervan et al. 2020; Leyendecker et al. 2009; Sampson 1927a; Sampson 1927b; Ebert 2019). Allerdings gibt es einige Arbeiten, die die Hypothese unterstützen, dass die retrograde Menstruation die Hauptpathogeneseform der Endometriose darstellt. So konnten Konrad et al. zeigen, dass Endometriose nur dann entsteht, wenn zumindest rudimentäres Endometriumgewebe vorhanden ist (Konrad et al. 2019). Auf zellulärer Ebene kommt es bei der Endometriose außerdem zu einer im Vergleich zum physiologischen Endometrium veränderten Membranarchitektur. Für die Zelladhäsion wichtige Moleküle wie das Claudin-10 ändern ihre Lokalisation in der Membran. Dies spricht für eine gestörte Zelladhäsion und unterstützt somit die Implantationstheorie (Loeffelmann et al. 2022).

Zudem wird auch ein Einfluss genetischer Faktoren diskutiert (Zondervan et al. 2020; Ulrich 2020).

1.1.1.4. Klinik

Die Symptome der Endometriose weisen eine ausgeprägte Heterogenität auf. Das Kardinalsymptom ist die Dysmenorrhoe, weitere Beschwerden wie azyklische chronische Beckenschmerzen, Dyspareunie, Dyschezie, Dysurie, Infertilität und Fatigue (Zondervan et al. 2020; Becker et al. 2022; Ulrich 2020) können hinzukommen. Endometriose führt nicht nur zu körperlichen Beeinträchtigungen, sondern wirkt sich auch negativ auf das mentale und soziale Wohlbefinden aus (Moradi et al. 2014). Eine pathophysiologische Besonderheit der Endometriose ist, dass der makroskopische Befund und die Symptomschwere divergieren können (Johnson et al. 2017).

1.1.1.5. Diagnostik

Besteht anamnestisch der Verdacht auf Endometriose, sollte eine klinische Untersuchung durchgeführt werden sowie ein transvaginaler Ultraschall oder eine MRT-Untersuchung. Es muss beachtet werden, dass eine Endometriose bei unauffälligen Befunden in körperlicher Untersuchung und Bildgebung nicht ausgeschlossen ist (Becker et al. 2022; Nisenblatt et al.

2016; Ulrich 2020). Vor allem für oberflächliche peritoneale Endometrioseherde weisen bildgebende Verfahren keine ausreichende Sensitivität auf (Becker et al. 2022; Nisenblat et al. 2016; Ulrich 2020). Um die Verdachtsdiagnose „Endometriose“ definitiv zu bestätigen ist eine chirurgische Inspektion des Abdomens und Beckens notwendig. Dies erfolgt in der Regel laparoskopisch (Nisenblat et al. 2016; Kennedy et al. 2005; Becker et al. 2022; Ulrich 2020).

Zwischen dem Auftreten der ersten Symptome und der Diagnose Endometriose liegt eine durchschnittliche Verzögerung von 4,4–8 Jahren (Ghai et al. 2020; Nnoaham et al. 2011; Soliman et al. 2017). Als mögliche Gründe hierfür werden eine Symptomüberlappung mit anderen Krankheitsbildern wie der „akuten oder chronischen Beckenentzündung/Pelvic Inflammatory Disease“ und ein oft blander körperlicher Untersuchungsbefund bei betroffenen Patientinnen genannt (Soliman et al. 2017). Ein weiterer Grund für die Diagnoseverzögerung ist das Fehlen ausreichend sensibler nicht-invasiver diagnostischer Tools wie Biomarker oder bildgebender Verfahren (Zondervan et al. 2020, 2020; Nisenblat et al. 2016; Ulrich 2020). Kürzlich haben Bendifallah et al. eine Speichel-miRNA-Testmethode eingeführt, um Endometriose nicht-invasiv zu diagnostizieren. Trotz einiger Einschränkungen der Studie, wie zum Beispiel einer kleinen Stichprobengröße und der Verwendung einer internen Querschnittvalidierung, zeigt diese Studie ein vielversprechendes Instrument zur Verbesserung der Diagnose von Endometriose (Bendifallah et al. 2022).

1.1.1.6. Therapie

Die Therapie der Endometriose kann konservativ-medikamentös oder operativ erfolgen. Zudem gibt es weitere supportive Therapieansätze (Ulrich 2020; Becker et al. 2022). Therapieziel ist unter anderem die Symptomkontrolle und eine möglichst lange Beschwerdefreiheit (Ulrich 2020; Becker et al. 2022). Die hormonell-medikamentöse Therapie entfaltet ihre Wirkung über eine Reduktion des Östrogenspiegels und besteht in erster Linie in der Gabe gestagenhaltiger Präparate, supportiv kann eine medikamentöse Analgesie erfolgen (Ulrich 2020; Becker et al. 2022).

Die Laparoskopie ist das Verfahren der Wahl in der operativen Therapie der Endometriose (Ulrich 2020; Abbott et al. 2004; Deguara et al. 2012; Garry 2004; Abbott et al. 2004).

Das Ziel der Endometriosechirurgie ist ein möglichst hohes Resektionsausmaß zu erreichen. Ein hohes Resektionsausmaß korreliert mit einer postoperativen Reduktion von

endometriose-assoziierten Schmerzen und einer geringeren Anzahl an Krankheitsrezidiven und notwendigen Folgeoperationen. Zudem steigt die Rate an spontanen Schwangerschaften (Kaiser et al. 2009; Duepree et al. 2002; Hart et al. 2008). In mehr als 50% der Patientinnen kommt es im Intervall allerdings zu einem Beschwerderezidiv mit der Notwendigkeit weiterer Operationen (Cheong et al. 2008).

Ein weiterer operativer Ansatz zur Symptomkontrolle ist die sakrale Neuromodulation. Dies beruht auf einer Schmerzreduktion über Stimulation sakraler Nerven mittels einer in Nähe der entsprechenden Nerven implantierten Elektrode (Kolodziej et al. 2020; Zegrea et al. 2023).

1.1.1.7. Intraoperative Bildgebung in der Endometriosechirurgie

Ein Ansatz für die intraoperative Bildgebung von Endometrioseläsionen beruht auf der Verwendung von Nahinfrarot-Indocyaningrün (NIR-ICG). NIR-ICG ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der Plasmaproteine im vaskulären System bindet und so eine Darstellung der Gewebepfusion ermöglicht (Raffone et al. 2022). NIR-ICG kann die intraoperative Detektionsrate von Endometrioseläsionen verbessern, indem im Weißlicht sichtbare Herde bestätigt werden und okkulte Herde sichtbar gemacht werden können (Cosentino et al. 2018). Vor allem die Kombination von Weißlicht und NIR-ICG-Bildgebung kann den positiven prädiktiven Wert in der intraoperativen Diagnostik erhöhen (Al-Taher et al. 2021). Einschränkung muss erwähnt werden, dass mithilfe von NIR-ICG nicht alle Endometrioseläsionen detektiert werden können (Cosentino et al. 2018).

1.1.2. Molecular Imaging und Image Guided Surgery

Das „Molecular Imaging“ und die „Image Guided Surgery“ beruhen auf der bildgebenden Darstellung gewebespezifischer funktioneller Charakteristika mithilfe von zielgerichteten Bildgebungssubstanzen (Zhang et al. 2017; Dammes und Peer 2020). Dazu werden signalabgebende Substanzen entwickelt, die mit Biomarkern wie Oberflächenmolekülen interagieren, die spezifisch für das gesuchte Gewebe sind. Solche Substanzen bestehen aus einem zielstruktur-bindenden Anteil, der spezifisch und sensitiv mit dem Biomarker interagiert, und einem signalabgebendem Anteil, der ein Signal abgibt, das von bildgebenden Systemen detektiert werden kann (Dammes und Peer 2020; Zhang et al. 2017; Weissleder et

al. 2000). Für den zielstruktur-bindenden Anteil werden aufgrund ihrer hohen Antigenspezifität und -affinität am häufigsten Antikörper und Antikörper-Derivate verwendet. Die Auswahl des signalabgebenden Moleküls hängt von dem verwendeten Detektionsverfahren ab, es können beispielsweise Fluorophore und MRT-Kontrastmittel verwendet werden (Dammes und Peer 2020; Zhang et al. 2017; Weissleder et al. 2000). Diese Verfahren stellen also nicht nur anatomische, sondern auch funktionelle Unterschiede verschiedener Gewebe dar (Dammes und Peer 2020). Funktionelle Veränderungen können auch dann detektierbar sein, wenn keine makroskopische anatomische Veränderung erkennbar ist (Dammes und Peer 2020; Weissleder et al. 2000).

Beispiele hierfür sind ein von Duranti et al. entwickeltes Antikörper-Fluorophor-Konjugat (AFK) und ein von Johansen et al. entwickeltes zielgerichtetes MRT-Kontrastmittel.

Duranti et al. haben ein „single chain variable fragment“ (scFv)-Antikörperfragment gegen den hERG1-Ionenkanal entwickelt und dessen Funktion Tumorgewebe zu detektieren im Mausmodell eines pankreatischen duktales Adenokarzinoms untersucht. Der scFv-Antikörper wurde mit einem Fluorophor konjugiert und nach intravenöser Verabreichung des scFv-Fluorophor-Konjugats konnte sowohl der Primärtumor als auch Metastasen schnell und spezifisch mittels Nahinfrarotbildgebung dargestellt werden (Duranti et al. 2018). Johansen et al. konnten im Gliom-Mausmodell bei der Anwendung eines zielgerichteten MRT-Kontrastmittels gegen eine Tyrosinphosphatase im Vergleich zu einem unspezifischen Kontrastmittel eine verbesserte Detektion und länger anhaltende Anreicherung des Kontrastmittels im Tumorgewebe darstellen (Johansen et al. 2017).

Das am weitesten verbreitete Verfahren zur intraoperativen Bildgebung ist die „Fluorescence Guided Surgery“ (FGS) (Vahrmeijer et al. 2013; Zhang et al. 2017). Potenzielle Vorteile der FGS sind ein vollständigeres Resektionsausmaß, die Reduktion von Reoperationen, die Schonung wichtiger Strukturen wie Nerven, eine bessere intraoperative Entscheidungsfindung, eine kürzere Operationsdauer und damit einhergehend eine kürzere Anästhesiedauer. Insgesamt könnte dies zu einem besseren postoperativen Outcome mit weniger operationsbezogenen Komorbiditäten führen (Zhang et al. 2017).

Ein Beispiel ist die intraoperative Bildgebung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich mit dem anti-EGFR-AFK Cetuximab-IRDye800. Das AFK wurde intravenös verabreicht und das Fluoreszenzsignal mit einem Weitfeld-

Nahinfrarotfluoreszenzbildgebungssystem erfasst und dargestellt. Das Fluoreszenzsignal zeigte einen deutlichen Kontrast zwischen pathologischem und gesundem Gewebe. Postoperativ wurden die Resektate histologisch aufbereitet und mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und Fluoreszenzdarstellung untersucht. Das Fluoreszenzsignal zeigte eine Korrelation mit dem histologisch identifizierten Tumorgewebe- und -rand (Rosenthal et al. 2015).

Ein weiteres Anwendungsbeispiel wird von Van Dam et al. angeführt. Die Autoren verwendeten ein gegen den Folat-Rezeptor-Alpha ($FR\alpha$) gerichtetes Folat-Fluorophor-Konjugat (Folat-Fluorescein-Isothiocyanate [FITC]) zur intraoperativen Fluoreszenzdarstellung des metastasierten Ovarialkarzinoms. Das Fluorophorkonjugat wurde intravenös verabreicht und mit einem multispektralen intraoperativen Fluoreszenz-Bildgebungssystem in Echtzeit dargestellt. Das Fluorophorkonjugat stellte spezifisch $FR\alpha$ -positive Ovarialkarzinome dar, $FR\alpha$ -negative Ovarialkarzinome und gesundes Gewebe zeigten kein Fluoreszenzsignal. Die ex-vivo-Identifikation von Tumorherden war mittels der Fluoreszenzdarstellung signifikant höher als mit bloßem Auge. Postoperativ erfolgte eine histopathologische Aufarbeitung der Resektate mit HE-Färbung, $FR\alpha$ -Immunhistochemie und FITC-Fluoreszenzmikroskopie. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen der In-vivo-Fluoreszenz und den histopathologischen Ergebnissen (van Dam et al. 2011).

1.1.3. Bildgebungssubstanzen – Präparate zur zielgerichteten Detektion und Darstellung von Gewebe

Eine Bildgebungssubstanz, die gezielt an Gewebe binden und es sichtbar machen soll, muss aus mindestens drei Komponenten bestehen. Diese sind eine zielstruktur-bindende Komponente (am häufigsten werden Antikörper und ihre Derivate verwendet), eine signalabgebende Komponente (allgemein: Wirkstoff) und ein Verbindungsstück (im Folgenden als Linker bezeichnet), der diese beiden Komponenten miteinander verbindet (Weissleder et al. 2000; Kobayashi et al. 2016). Diese Bildgebungssubstanzen sollen möglichst ausschließlich am Zielgewebe ihre Wirkung entfalten und so unerwünschte unspezifische Wirkungen minimieren (Weissleder et al. 2000; Kobayashi et al. 2016).

Allgemein muss bei der Konjugation von Wirkstoffen an Antikörper beachtet werden, dass die strukturelle Integrität des Antikörpers und seine Fähigkeit Antigene zu binden erhalten bleiben muss, gleiches gilt für die Funktion des Wirkstoffs (Ducry und Stump 2010).

Je nach verwendeter Konjugationsmethode können homogenere oder heterogenere Produkte entstehen. Im Vergleich zu heterogenen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (AWK) zeigen homogene AWK eine höhere therapeutische Effektivität und Stabilität sowie weniger Nebenwirkungen (Panowski et al. 2014; Chouman et al.). Außerdem verbessert die Verwendung seitenspezifischer Konjugationsmethoden den therapeutischen Index der AWK (Junutula et al. 2008b). Aus diesen Überlegungen ergibt sich, dass für die Herstellung von AFK bevorzugt solche Methoden eingesetzt werden sollten, die möglichst homogene Produkte erzeugen. Eine weitere wichtige Eigenschaft der AWK ist das Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis (WAV). Ein zu niedriges WAV kann zu einer geringen Wirkung des Konjugats führen, während bei einem zu hohen WAV die Pharmakokinetik negativ beeinflusst werden kann, indem zum Beispiel die Hydrophobie erhöht wird (Jabbour et al. 2021).

1.1.3.1. Zielstruktur-bindende Komponente: Antikörper und Antikörper-Derivate

Durch ihre hohe Spezifität und Affinität gegen ihre Antigene sind Antikörper die idealen Substanzen für zielgerichtete Bildgebungsansätze (Dübel et al. 2019; Hwang und Foote 2005). Der verwendete Antikörper sollte eine hohe Spezifität und Affinität für das Zielantigen aufweisen. Es sollten weder Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen noch eine unspezifische Antigenbindung auftreten. Dies muss gegeben sein, damit das AWK selektiv am Zielgewebe wirken kann und unerwünschte Effekte durch eine unspezifische Antigenbindung minimiert werden (Dübel et al. 2019; Hwang und Foote 2005). Der verwendete Antikörper muss zudem hinsichtlich seiner Immunogenität untersucht werden. Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass humane oder humanisierte Antikörper eine geringere Immunogenität aufweisen als chimäre oder murine Antikörper (Dübel et al. 2019; Hwang und Foote 2005; Jabbour et al. 2021).

1.1.3.1.1. Physiologischer struktureller Aufbau

Antikörper werden von den B-Zellen gebildet und sind damit Teil des adaptiven Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es Antigene spezifisch und mit hoher Affinität zu erkennen und zu binden. Es gibt insgesamt fünf Antikörper-Isotypen (Immunglobulin (IgG), IgA, IgM, IgE, IgD), die verschiedene Aufgaben in der Immunabwehr wahrnehmen (Schroeder und Cavacini 2010).

Antikörper sind globuläre Proteine, die aus verschiedenen Immunglobulindomänen bestehen. Jede Domäne wird zudem über eine interne Disulfidbrücke stabilisiert (Dübel et al. 2019; Chothia et al. 1985).

Das IgG entspricht dem strukturellen Prototyp aller Antikörper, sein Aufbau ist in Abbildung 1 dargestellt. Es besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die leichten Ketten bestehen aus zwei Immunglobulindomänen; „variable light domain“ (VL) und „constant light domain“ (CL), während die schweren Ketten vier Domänen enthalten; „variable heavy domain“ (VH) und drei „constant heavy domains“ (CH1, CH2, CH3) (Chiu et al. 2019). Die beiden schweren Ketten des Antikörpers sind an der Scharnierregion (englisch: „hinge-region“) über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (Dübel et al. 2019).

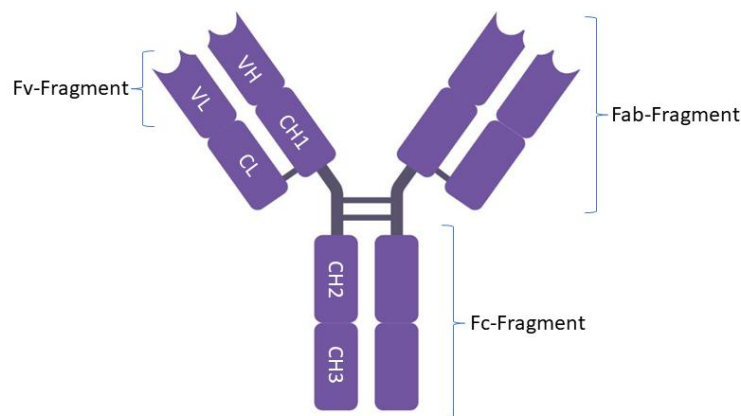


Abbildung 1: Aufbau IgG; VL: variable Domäne der leichten Kette; CL: konstante Domäne der leichten Kette; VH: variable Domäne der schweren Kette; CH1: konstante Domäne 1 der schweren Kette, CH2: konstante Domäne 2 der schweren Kette, CH3: konstante Domäne 3 der schweren Kette. Hergestellt mit BioRender.com

Das IgG kann in zwei unterschiedliche funktionelle Bereiche eingeteilt werden: Den Fc-Teil (fragment crystallizable/constant) und zwei „fragment antigen binding“ (Fab)-Teile. Fc- und Fab-Fragmente sind über die Scharnierregion zwischen CH1- und CH2-Domäne miteinander verbunden (Amzel und Poljak 1979; Dübel et al. 2019). Das Fab-Fragment wird von der leichten Kette und der VH- und CH1-Domäne der schweren Kette gebildet. Die Verbindung der leichten und schweren Kette im Fab-Fragment erfolgt über eine Disulfidbrücke zwischen der CH1-Domäne und der CL-Domäne. Das N-terminale Ende des Fab-Fragments wird auch als Fragment-variable-(Fv)–Fragment bezeichnet und enthält die

für die Antigenbindung relevanten Domänen (Mestecky 1972). Die Peptidsequenz der konstanten Domänen ist hochkonserviert. Die variablen Domänen der schweren und leichten Kette weisen Sequenzabschnitte auf, die eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidsequenzen enthalten können. Diese Abschnitte werden deshalb auch als hypervariable Regionen bezeichnet. Je drei hypervariable Regionen der leichten und schweren Kette bilden das antigenbindende Paratop aus und stellen die „complementary-determining-regions“ (CDR) dar. Die Struktur der CDR wird mithilfe der anderen Anteile der variablen Domäne stabilisiert (Dübel et al. 2019). Das Fc-Fragment wird ausschließlich von den beiden schweren Ketten des Antikörpers gebildet und besteht aus zwei Immunglobulindomänen (CH2 und CH3) (Schroeder und Cavacini 2010).

1.1.3.1.2. Funktion eines Antikörpers

Das Fab-Fragment bindet über die CDR der Fv-Region das Epitop des Antigens. Das Fc-Fragment vermittelt die Effektorfunktion und bindet an den Fc-Rezeptor von Zellen der Immunabwehr: den Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, B-Zellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten. Die Effektorfunktion hängt dabei von der Zelle ab, an deren Fc-Rezeptor der Antikörper bindet und reicht von einer verbesserten Opsonisierung bis zur Vermittlung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (Chiu et al. 2019). Antikörper weisen durch ihre Größe und Struktur eine hohe Halbwertszeit auf (Fu et al. 2018). Ein weiterer Faktor, der zu der langen Halbwertszeit der Antikörper führt, ist die Interaktion des Fc-Fragments mit dem neonatalen FcRn-Rezeptor, dieser schützt IgG-Moleküle vor dem Abbau (Rath et al. 2015).

1.1.3.1.3. Herstellung rekombinanter Antikörper

Um die antigenbindenden Eigenschaften von Antikörpern therapeutisch und diagnostisch zu nutzen, existieren verschiedene Verfahren. Ursprünglich wurde das Immunsystem von Mäusen mit den Antigenen in Kontakt gebracht und so eine Immunantwort ausgelöst. Die antikörper-produzierenden murinen B-Zellen wurden aus der Milz isoliert und durch Fusion mit Myelomzellen immortalisiert. Ein wichtiger Nachteil dieser murinen Antikörper ist ihre Immunogenität, die im menschlichen Körper zur Ausbildung von humanen anti-Maus-Antikörpern führt. Dadurch sind ihre Einsatzmöglichkeiten begrenzt. Um dies zu umgehen, wurden chimäre und humanisierte Antikörper entwickelt, bei denen nur die variablen Regionen oder die CDR murinen Ursprungs sind (Dübel et al. 2019; Kobayashi et al. 2016).

Über die Verwendung von Phage-Display Bibliotheken und die Entwicklung humanisierter Mäuse können auch vollständig humane Antikörper hergestellt werden (Dübel et al. 2019; Kobayashi et al. 2016). Diese Ansätze ermöglichen die Herstellung von Antikörpern und ihren Derivaten gegen nahezu jedes Zielmolekül (Dübel et al. 2019).

1.1.3.1.4. Antikörper-Derivate: scFv-Fragmente

Neben den IgG-Antikörpern wurden mittels enzymatischer und gentechnologischer Methoden Antikörperderivate hergestellt, die sich in Größe und Funktion von diesen unterscheiden (Dübel et al. 2019).

Im vorliegenden Projekt werden scFv-Antikörper verwendet, daher wird diese Antikörper-Klasse im Folgenden näher besprochen.

Die scFv-Antikörper sind gentechnologisch hergestellte Antikörperderivate. Abbildung 2 zeigt schematisch die Struktur eines scFv-Antikörpers. Sie bestehen aus dem variablen Anteil der leichten Kette und dem variablen Anteil der schweren Kette, die über einen Peptidlinker miteinander verknüpft sind.

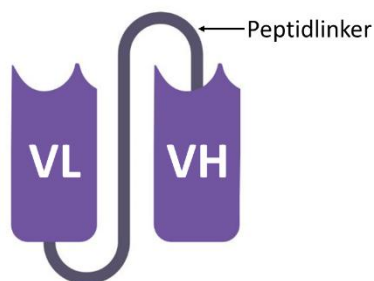


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines scFv-Antikörpers; VL: variable Domäne der leichten Kette; VH: variable Domäne der schweren Kette. Hergestellt mit BioRender.com

Der Peptidlinker verbindet das C-terminale Ende des VL-Anteils mit dem N-terminalen Ende des VH-Anteils, durch diese kovalente Bindung wird das posttranslationale Zusammenlagern der beiden Domänen erleichtert und die Antigenaffinität positiv beeinflusst (Bird et al. 1988; Muñoz-López et al. 2022; Huston et al. 1988). Die scFv-Antikörper haben eine Größe von 26 kDa, sie werden renal eliminiert und haben durch ihre

geringe Größe eine schnelle „Clearance-Rate“ (Kobayashi et al. 2016; Kaur et al. 2012). Sie verfügen über eine durchschnittliche Lebensdauer im Blut von 0.5-2 Stunden (Knowles und Wu 2012).

Es gibt verschiedene Systeme, die zur Herstellung von scFv-Fragmenten genutzt werden können, zu diesen gehören die Hybridom-Technik, Phage-Display, Ribosomendisplay und die sequentielle Klonierung (Muñoz-López et al. 2022). Für die Expression des Proteins können verschiedene Expressionssysteme verwendet werden, zum Beispiel bakterielle, Hefe- und Säugetierexpressionssysteme (Brondyk 2009).

Das diagnostische Potential von scFv-Fragmenten und scFv-Konjugaten wurde in zahlreichen Studien erprobt. Lu et al. haben einen EGFR-spezifischen scFv-Antikörper mit Fe₃O₄/Au-Nanopartikeln konjugiert, um eine EGFR-spezifische MRT-Bildgebungssubstanz zu entwickeln. Diese konnte im Mausmodell EGFR⁺ „Non-Small-Cell-Lung-Cancer“ (NSCLC)-Xenografts per MRT spezifisch erkennen (Lu et al. 2021). Kessler et al. demonstrieren die spezifische Bindungsfähigkeit und Internalisierung rekombinanter scFv-Fusionsproteine gegen das Prostata-Stammzell-Antigen (PSCA) *in vitro* mit PSCA⁺-HEK-PSCA-Zellen und *ex vivo* an primären Prostatakarzinom-Gewebeproben (Kessler et al. 2017).

Khantasup et al. haben einen anti-αEpCAM-scFv-Antikörper mit Gadolinium konjugiert, dieses Konjugat zeigte *in vitro* eine gute Bindungsfähigkeit an eine αEpCAM⁺ Zelllinie und eine Verstärkung des Magnetresonanz-(MR)-Signals bei der MR-Untersuchung dieser Zelllinie (Khantasup et al. 2018). Ein von Yakushiji et al. entwickelter ⁸⁹Zirkonium-konjugierter anti-Mesothelin-scFv ermöglichte die deutliche Darstellung von murinen Mesothelin⁺-Tumoren im PET-CT (Yakushiji et al. 2019). Neben diesen diagnostischen Anwendungsmöglichkeiten gibt es bereits einige scFv-basierte Strategien zur Therapie von Malignomen, die zurzeit in klinischen Studien erprobt werden (Muñoz-López et al. 2022). Zu diesen gehört die Therapie von B-Zell-Malignomen mit CAR-T-Zellen, die einen scFv-Antikörper auf ihrer Oberfläche exprimieren, der gegen den B-Zellmarker CD19 gerichtet ist (Hong et al. 2020; Neelapu et al. 2017). Eine weitere scFv-basierte Medikamentenklasse sind die Bispezifischen-T-Zell-Engager (BiTE), die aus zwei verschiedenen scFv-Fragmenten bestehen, die über einen flexiblen Linker miteinander verknüpft sind. Ein scFv-Fragment ist dabei gegen den T-Zellmarker CD3 gerichtet und das andere gegen ein

tumorspezifisches Antigen (Huehls et al. 2015). Blinatumomab ist beispielsweise ein BiTE, der zur Therapie der B-ALL erprobt wird und gegen CD3 und den B-Zellmarker CD19 gerichtet ist (Klinger et al. 2012).

1.1.3.2. Linker und Konjugationsmethode

Der Linker verbindet die zielstruktur-bindende- und die signalabgebende-Komponente miteinander. Linker haben einen wichtigen Einfluss auf die Effektivität, Sicherheit und Pharmakokinetik der AWK (Jabbour et al. 2021; Mansour et al. 2017). Sind beispielsweise sowohl der Linker als auch der Wirkstoff hydrophob, kann dies zur Aggregation und hepatischen Elimination des Konjugats führen und potentiell hepatotoxische Effekte aufweisen (Sun et al. 2017; Satomaa et al. 2018). Der Linker sollte im Blutplasma außerdem eine hohe Stabilität aufweisen, damit es während der Blutzirkulation nicht zur ungewollten systemischen Freisetzung des Wirkstoffs kommt (Ducry und Stump 2010).

Es gibt zwei Hauptarten von Linkern: spaltbare und nicht-spaltbare Linker. Spaltbare Linker sind so konzipiert, dass der Wirkstoff im Zielgewebe vom Antikörper abgespalten wird. Die Spaltung kann chemisch oder enzymatisch erfolgen, allen Methoden ist gemein, dass die für die Spaltung optimalen Bedingungen erst im intrazellulären Raum erfüllt werden (Ducry und Stump 2010). Die chemische Spaltung kann durch den niedrigeren intrazellulären pH-Wert bewirkt werden. Um diesen Effekt zu erreichen, können Hydrazon-Linker verwendet werden, wie es beispielsweise bei dem FDA-zugelassenen AWK gegen die refraktäre AML Gemtuzumab-Ozogamicin der Fall ist (Ducry und Stump 2010; Hamann et al. 2002). Eine weitere Form chemisch spaltbarer Linker sind Disulfidbrücken, die durch intrazelluläres Glutathion gespalten werden können (Ducry und Stump 2010). Um eine enzymatische Spaltung mittels lysosomaler Proteasen zu nutzen, können Peptidlinker verwendet werden. Es können beispielsweise Valin-Citrullin-Peptide und Phenylalanin-Lysin-Peptide genutzt werden (Ducry und Stump 2010). Bei nicht-spaltbaren Linkern wie Thioether-Bindungen erfolgt die Freisetzung des Wirkstoffs erst nach vollständiger lysosomaler Degradation des AWK. Dies führt dazu, dass am Wirkstoff der Linker und Antikörperreste verbleiben, dadurch könne die chemischen Eigenschaften des Wirkstoffs verändert werden (Ducry und Stump 2010). Nicht-spaltbare Linker weisen eine höhere Serumstabilität auf (Polson et al. 2009). Der größte Vorteil spaltbarer Linker ist, dass sie eine vollständige Abspaltung des Wirkstoffs vom Antikörper ermöglichen. Der größte

Vorteil nicht-spaltbarer Linker ist, dass durch die höhere Serumstabilität die therapeutische Breite vergrößert wird (Polson et al. 2009; Ducry und Stump 2010).

Es werden verschiedene Möglichkeiten unterschieden, den Linker mit dem Antikörper zu verknüpfen. Bei der Auswahl der Konjugationsmethode muss berücksichtigt werden, dass die Funktion des Antikörpers durch die Konjugation nicht beeinträchtigt wird, wie viele Wirkstoffe mit der ausgewählten Methode an den Antikörper gebunden werden und wie homogen das entstehende Produkt ist (Ducry und Stump 2010; Hamblett et al. 2004; Jabbour et al. 2021; Junutula et al. 2008b; McDonagh et al. 2006; Chouman et al.; Panowski et al. 2014).

1.1.3.2.1. Unspezifische Konjugation an nativ-vorkommende reaktive Gruppen

Reaktive Gruppen von Aminosäuren wie Lysin und Cystein können als Konjugationsort verwendet werden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die native Struktur des Antikörpers dazu nicht verändert werden muss. Allerdings führt diese Methode zu heterogenen Produktgemischen, da nicht kontrolliert werden kann, welche Lysin- oder Cysteinreste des Antikörpers zur Konjugation verwendet werden. Dies führt zur Entstehung eines Produktgemisches mit verschiedenen Konjugationsorten und unterschiedlichen WAV, die zu einer unterschiedlichen Stabilität, Funktion und Pharmakokinetik führen können (McCombs und Owen 2015; Tsuchikama und An 2018). Basierend auf diesem Konzept wurden daher weitere Methoden entwickelt, mit dem Ziel eine höhere Homogenität zu erreichen. Dazu gehören beispielsweise die THIOMAB-Technologie und das Cystein-Rebridging (Junutula et al. 2008a; Junutula et al. 2008b; Behrens et al. 2015).

1.1.3.2.2. Gentechnisches Einfügen nicht-natürlicher Aminosäuren

Um spezifische und lokalisierte Konjugationsstellen bereit zu stellen, können nicht-natürliche Aminosäuren mit spezifischen reaktiven Gruppen in die Antikörper inkorporiert werden (Tsuchikama und An 2018; McCombs und Owen 2015). Ein Beispiel ist die Aminosäure p-azidomethyl-L-phenylalanin, die über eine Azidogruppe mit Alkin-Linkern reagieren kann (Zimmerman et al. 2014). Vorteil dieser Methode ist ihre Spezifität mit der Möglichkeit homogene Produkte mit kontrollierten WAV zu generieren. Limitierende Faktoren sind der technisch aufwendige Herstellungsprozess und die mögliche

Immunogenität der eingefügten Aminosäuren (Tsuchikama und An 2018; McCombs und Owen 2015).

1.1.3.2.3. Enzymatische Konjugation

Enzymatische Methoden bedienen sich der katalytischen und substratspezifischen Eigenschaften von Enzymen, um seitenspezifische Konjugationen mit einem kontrollierten WAV zu erreichen. Die Enzyme erkennen spezifische gentechnisch eingefügte oder native Aminosäuresequenzen und binden modifizierte Substrate an diese (McCombs und Owen 2015; Tsuchikama und An 2018). Ein Beispiel hierfür sind die Sortasen. Hierbei handelt es sich um Cystein-Transpeptidasen, die ursprünglich an der Zellwand gram-positiver Bakterien lokalisiert sind und Proteine an die bakterielle Zelloberfläche binden (Spirig et al. 2011). Diese Proteine können wichtige Funktionen als Virulenzfaktoren einnehmen und beispielsweise die Immunantwort des Wirtsorganismus hemmen. Zudem sind die Sortasen an der Ausbildung der bakteriellen Pili beteiligt, die die bakterielle Adhäsion vermitteln. Die Sortasen werden in Untergruppen von A bis F eingeteilt (Spirig et al. 2011). Die Sortase A erkennt die Sequenz LPXTG (wobei X für eine beliebige Aminosäure steht) und konjugiert an diese Stelle, nach Spaltung der Threonin-Glycin-Bindung, Moleküle, die mit einem Oligo-Glycin-Rest modifiziert sind. Zur Herstellung eines AWK muss der Antikörper entweder am C-terminalen Ende mit der LPXTG-Sequenz oder am N-terminalen Ende mit einem Oligo-Glycin-Rest modifiziert sein. Die Konjugation erfolgt anschließend mit einem komplementär modifizierten Wirkstoff unter Katalyse durch die Sortase A (Popp et al. 2009). Eine Abwandlung dieses Ansatzes ist die gentechnische Fusion des Antikörpers mit einem enzymatisch aktiven Peptid-Tag. Bei der SNAP-tag-Methode wird ein Derivat des humanen DNA-Reperaturenzym O(6)-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) verwendet. Dieses als SNAP-tag bezeichnete Enzym bindet spezifisch und kovalent mit O(6)-Benzylguanin modifizierte Moleküle, indem es die Benzylgruppe unter Freisetzung eines freien Guanins an das aktive Zentrum bindet (Kampmeier et al. 2009). Der SNAP-tag wurde so modifiziert, dass er im Vergleich zur AGT eine höhere Affinität zu O(6)-Benzylguanin aufweist und eine niedrigere Affinität zu DNA. Aufgrund des humanen Ursprungs kann von einer niedrigen Immunogenität ausgegangen werden (Hussain et al. 2013). Der SNAP-tag wird gentechnisch mit dem N- oder C-terminalen Ende des Antikörpers fusioniert. Für scFv-Fragmente wird in der Regel das C-terminale Ende gewählt (Kampmeier et al. 2009). Mit dem SNAP-tag modifizierte Antikörper werden in demselben

Ausmaß exprimiert wie korrespondierende native Antikörper (Kampmeier et al. 2009). Durch die Fusion des Antikörpers mit dem SNAP-tag werden weder die Funktion des Antikörpers noch die Funktion des SNAP-tag beeinträchtigt. Kampmeier et al. beschreiben eine Reaktionseffizienz von 90-100 % bei Inkubation des SNAP-tag-Fusionsproteins mit einem BG-modifizierten Substrat über Nacht und eine Effizienz von 60-70 % nach Inkubation für eine Stunde. Die Konjugation erfolgt demnach sowohl schnell als auch effektiv (Kampmeier et al. 2009). Der SNAP-tag wirkt zudem als „Spacer“ zwischen dem Antikörper und dem Wirkstoff und reduziert so die Wahrscheinlichkeit, dass sich diese beiden Komponenten negativ in ihrer Funktionalität beeinflussen (Hussain et al. 2013). Die Konjugation erfolgt aufgrund der Substratspezifität mit einem definierten WAV von 1:1 (Kampmeier et al. 2009). Das Funktionsprinzip des SNAP-tag ist in Abbildung 3 gezeigt.

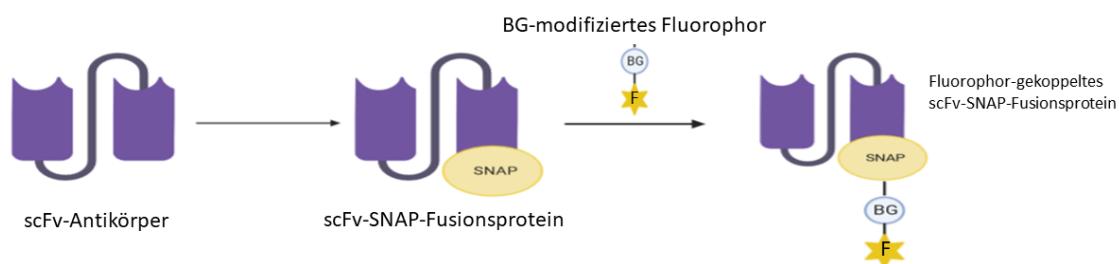


Abbildung 3: Schema zur Modifizierung der scFv-Antikörper mit dem SNAP-tag und der SNAP-tag-vermittelten Konjugation mit einem BG-modifizierten Fluorophor; BG: Benzylguanin; F: Fluorophor. Hergestellt mit BioRender.com

1.1.3.3. Wirkstoff: Fluorophore

Für bildgebende Ansätze können je nach verwendetem Bildgebungsverfahren verschiedene Bildgebungsagenzien verwendet werden. Es bietet sich an für einen „Proof-of-Principle“ die Konjugation mit einem Fluorophor durchzuführen, da hiermit sowohl *in vitro* (Durchflusszytometrie, Fluoreszenzmikroskopie), *ex vivo* (Immunfluoreszenz von Patientenproben) und *in vivo* (präklinisch: Fluoreszenzbildgebung im Mausmodell, klinisch: „Fluorescence Guided Surgery“) Studien durchgeführt werden können (Kessler et al. 2017; Kampmeier et al. 2010; van Dam et al. 2011; Zhang et al. 2017; Raffone et al. 2022; Rosenthal et al. 2015; Schouw et al. 2021; Sato et al. 2014). Man kann prinzipiell zwischen konstitutiv aktiven Substanzen und aktivierbaren Proben, die erst bei Interaktion mit der Zielstruktur ein Signal abgeben, unterscheiden. Der Vorteil solcher aktivierbarer Proben ist,

dass sie erst im Zielgewebe aktiv werden und so unspezifische Background-Signale minimiert werden können (Weissleder et al. 2000; van Oosten et al. 2011).

Um zu ermöglichen, dass eine Konjugation mit einem Antikörper realisierbar ist, muss eine passende Konjugationdomäne entweder gegeben sein oder das Fluorophor entsprechend modifiziert werden können, ohne dass dessen Funktion durch die Modifikation beeinträchtigt wird. Für den Gebrauch mit dem SNAP-tag müssen die Fluorophore mit einer O(6)-Benzylguanin-Gruppe modifiziert sein (Kampmeier et al. 2009). Da mit der Verwendung von NIR-ICG bereits klinische Erfahrung gesammelt wurde, bietet es sich an Fluorophore auszuwählen, die ein ähnliches Exzitations- und Emissionsspektrum wie NIR-ICG aufweisen, um auf die bereits bestehende Infrastruktur zugreifen zu können (Rosenthal et al. 2015). Eine Auswahl solcher Fluorophore ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Fluorophore im NIR-Bereich

Fluorophor	Anwendungsbeispiel	BG-Modifikation
IRDye800(IRDye® 800 2022)	Cetuximab-IRDye800-Konjugat zur Detektion von Plattenepithelkarzinomen (Rosenthal et al. 2015)	Vorhanden (Gong et al. 2011)
NIR-ICG	NIR-ICG-Bildgebung in der Endometriosechirurgie (Raffone et al. 2022) Detektion Kolorektaler Lebermetastasen (van der Vorst et al. 2013)	Vorhanden (ICG-SNAP 2022)
Alexa647(Alexa Fluor 647 dye Thermo Fisher Scientific - DE 2022)	Anti-Tissue-Factor-scFv-Alexa647 (Sato et al. 2014)	Vorhanden (New England Biolabs 2022)
5-Aminolävulinsäure (fluoreszierender	Glioblastom-Chirurgie (Leroy et al. 2015)	Nein

1.2. Zielsetzung des Projekts

Mit einer Prävalenz von 10 % gehört die Endometriose zu den häufigsten gutartigen gynäkologischen Krankheitsbildern (Ulrich 2020). Die Diagnostik und Therapie der Endometriose stellt die Medizin aber immer noch vor Herausforderungen (Ulrich 2020; Zondervan et al. 2020). Bildgebende Verfahren, die in der Diagnostik der Endometriose Anwendung finden sind zwar für manche Entitäten der Endometriose wie Endometriome und die tief-infiltrierende Endometriose des Darms hilfreiche und aussagekräftige Tools, andere Manifestationsformen wie die peritoneale Endometriose können bisher aber ausschließlich mittels einer diagnostischen Laparoskopie identifiziert werden (Ulrich 2020; Becker et al. 2022). Zudem weisen auch die etablierten bildgebenden Verfahren eine verbesserungswürdige Sensitivität auf, für die Adenomyose beträgt diese beispielsweise 77 % (Champaneria et al. 2010). Es fehlt dementsprechend immer noch an ausreichend sensitiven diagnostischen Tools. Dies resultiert zum einen in einer Dunkelziffer an nicht diagnostizierten Endometriosepatientinnen und zum anderen in einer Verzögerung zwischen dem ersten Auftreten von Symptomen und der Diagnose „Endometriose“. In Deutschland liegt diese Diagnoseverzögerung im Mittel bei 10,4 Jahren (Ulrich 2020; Abbas et al. 2012; Shafrir et al. 2018; Hudelist et al. 2012). Auch die diagnostische Laparoskopie – als aktueller Goldstandard zur Diagnosestellung der Endometriose weist entscheidende Einschränkungen auf (Ulrich 2020; Becker et al. 2022; Nisenblat et al. 2016; Kennedy et al. 2005). Hier sind vor allem die Abhängigkeit der Identifizierung suspekter Läsionen von der Erfahrung des Operateurs zu nennen und dass nicht alle Endometrioseherde mit dem bloßen Auge erkannt werden können (Nisenblat et al. 2016). Auch der Einsatz von Nahinfrarot-Indocyaningrün (NIR-ICG) als intraoperatives fluoreszierendes Kontrastmittel zur Optimierung der Detektion von Endometrioseläsionen kann diese Limitationen aufgrund der fehlenden Sensitivität für endometrioides Gewebe nicht zu genüge beheben. Dies hat nicht nur Auswirkungen auf die Diagnostik, sondern auch auf den therapeutischen Erfolg, da die Endometrioseherde nicht vollständig entfernt werden können und ein geringeres Resektionsausmaß mit einer

schlechteren Symptomkontrolle und mehr Reoperationen assoziiert ist (Kaiser et al. 2009; Duepre et al. 2002; Hart et al. 2008; Vignali et al. 2005). Ein Verfahren, das die intraoperative Detektion von Endometrioseläsionen objektiviert und von der individuellen Erfahrung unabhängiger macht und zudem sensitiv und spezifisch endometrioides Gewebe darstellt, wäre ein sinnvoller Schritt zur Verbesserung dieser Einschränkungen. Ein Ansatz, um diese Herausforderungen anzugehen ist die Entwicklung zielgerichteter AFK. Solche Konjugate können in zielgerichteten Verfahren wie dem „Molecular Imaging“ und der „Image Guided Surgery“ Verwendung finden und so zu einer Verbesserung der Diagnostik und Therapie der Endometriose führen (Weissleder et al. 2000; Zhang et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung und Anwendung von endometriosespezifischen AFK untersucht. Dazu wurden scFv-Antikörper gentechnisch mit dem SNAP-tag fusioniert und über diesen die Konjugation mit einem Fluorophor vermittelt (Kampmeier et al. 2009; Hussain et al. 2019a). Anschließend wurde die Fähigkeit der scFv-SNAP-Fusionsproteine untersucht endometrioiden Zelllinien in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren. Abschließend wurde analysiert, ob die verwendeten scFv-SNAP-Fusionsproteine für ein Multiplex-Imaging geeignet sind. Die Arbeit soll damit eine Grundlage für die weitere Entwicklung eines endometriosespezifischen antikörperbasierten Kontrastmittels legen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von Carl Roth, Greiner, Sigma, Corning, Eppendorf, Novolab und Sarstedt bezogen, sofern nicht anders angegeben.

2.1.2. Verwendete Puffer

Tabelle 2: Liste verwendeter Puffer

Puffer/Lösung	Bestandteile	Konzentration
4 x Ni-NTA	NaH ₂ PO ₄	200 mM
Bindungspuffer (pH 8,0)	NaCl	1200 mM
	Imidazol	40 mM
1 x Ni-NTA	NaH ₂ PO ₄	50 mM
Bindungspuffer (pH 8,0)	NaCl	300 mM
	Imidazol	10 mM
Ni-NTA Waschpuffer (pH 8,0)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	40 mM
Ni-NTA Elutionspuffer (pH 8,0)	NaH ₂ PO ₄	50 mM
	NaCl	300 mM
	Imidazol	250 mM
Ni-NTA Strippingpuffer (pH 7,4)	NaH ₂ PO ₄	20 mM
	NaCl	500 mM
	EDTA	50 mM
Regenerationspuffer	NiCl ₂	100 mM

5 x Proteinladungspuffer	Bromophenolblau	0,02% (v/v)
	Glycerol	30% (v/v)
	SDS	10% (v/v)
	Tris-HCl	250 mM
10% SDS-PAGE (Trenngel)	Milli-Q-Wasser	40,8% (v/v)
	Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 37,5:1)	32,9% (v/v)
	Tris-HCl (pH 8,8)	373 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	APS	0,032% (w/v)
4% SDS-PAGE (Sammelgel)	Milli-Q-Wasser	60,3% (v/v)
	Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 37,5:1)	12,9% (v/v)
	Tris-HCl (0,5 M; pH 6,8)	125 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	TEMED	0,1% (v/v)
	APS	0,1% (w/v)
SDS-Laufpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	0,192 mM
	SDS	0,1% (w/v)
Coomassie-Brilliantblau Gelfärbelösung	Brilliantblau R250	1,21 mM
	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie-Brilliantblau Entfärbungslösung	Methanol	50% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
TAE-Puffer	Tris	40 mM
	Reine Essigsäure	5,71% (v/v)
	EDTA	1 mM
10 x PBS (pH 7,4)	Na ₂ HPO ₄	76,8 mM

	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	23,2 mM
	NaCl	1,54 M
LB-Medium (pH 7,0)	LB-Medium (Luria/Miller)	25 g
	Milli-Q-Wasser	1000 ml
LB-Medium mit Ampicillin	LB-Medium Ampicillin	- 0,27 mM
LB-Ampicillin-Agar mit Agar	LB-Medium Agar agar Ampicillin	- 0,015% (w/v) 0,27 mM

2.1.3. Kits

Tabelle 3: Liste verwendeter Kits

Name des Kits	Hersteller
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Gel- und PCR- Aufreinigungskit	Macherey-Nagel
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs

2.1.4. Säulen

Tabelle 4: Liste verwendeter Säulen

Name	Verwendung	Hersteller	
Ni-NTA superflow Kartusche	Proteinpurifikation	Qiagen	
40K MWCO Zeba™ Spin Entsalzungssäulen	Größenausschlusschromatographie	Thermo Scientific	Fisher

2.1.5. Antikörper

Tabelle 5: Liste verwendeter Antikörper und Antikörperfragmente

Material	Bezugsquelle
425-scFv-SNAP-BG647	Eigenständig hergestellt
425-scFv-SNAP-BG488	Eigenständig hergestellt
425-scFv-SNAP-BG546	Eigenständig hergestellt
CSPG4-scFv-SNAP-BG647	Eigenständig hergestellt
CSPG4-scFv-SNAP-BG488	Eigenständig hergestellt
CSPG4-scFv-SNAP-BG546	Eigenständig hergestellt
α EpCAM-scFv-SNAP-BG647	Eigenständig hergestellt
α EpCAM-scFv-SNAP-BG488	Eigenständig hergestellt
α EpCAM-scFv-SNAP-BG546	Eigenständig hergestellt
Farlet-scFv-SNAP-BG488	Eigenständig hergestellt
Farlet-scFv-SNAP-BG647	Eigenständig hergestellt
EGFR Monoclonal Antibody (H11)	Invitrogen
CSPG4-Antibody: NG2 Monoclonal Antibody (D120.43/D4.11/N143.8/N109.6) 37-2700	Invitrogen
α EpCAM-Antibody: CD326 Monoclonal Antibody (1B7)	Invitrogen
Folate Receptor Alpha Monoclonal Antibody (548908)	Invitrogen
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor TM Plus 647	Invitrogen

2.1.6. Geräte

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte

Name	Hersteller
ÄKTA Start System	GE Healthcare Bio-Sciences AB
Waagen	Kern&Sohn
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences
Zentrifuge Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf
ChemiDoc XRS+ System	BIORAD
DMI8 S Live-cell Mikroskop	Leica Microsystems
ECLIPSE Ts2 invertiertes Mikroskop	Nikon
Eppendorf ThermoMixer® F2.0	Eppendorf
Fisherbrand™ Multi-Platform Schüttler	Fisher Scientific
Inkubator IN75	Memmert
Inkubationsschüttler Multitron Standard	Infors
Inkubator Model CB 170	BINDER
NanoDrop™ One/OneC	ThermoFisher Scientific
Odyssey DLx Imager	LI-COR Biosciences
Schott CG 840 pH Meter	Schott
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BIORAD
Vortex RS-VA 10	Phoenix Instrument

Wasserbad WB 7	Memmert
----------------	---------

2.1.7. Software zur Datenanalyse

Tabelle 7: Liste verwendeter Software

Software	Hersteller	Anwendung
FlowJo™ v10.8 Software	BD Life Sciences	Bild- und Datenanalyse
Image Lab 6.0.1 Software	Bio Rad	Bildanalyse
UNICOR start 1.1 (Build 1.1.0.2)	GE Healthcare	Bedienungssoftware ÄKTA start
SnapGene 5.1.3.1	SnapGene Software (www.snapgene.com)	Plasmidanalyse
Image Studio™ Software v5.5	LI_COR Biosciences	Bildanalyse
Leica LAS X Software	Leica	Bildanalyse
FIJI (Version 2,15.0)	Schindelin et al. 2012	Bildbearbeitung und -analyse
Adobe Photoshop 2021	Adobe	Bildbearbeitung
PowerPoint 2019	Microsoft	Bildbearbeitung
ImageJ	National Institutes of Health	Bildanalyse

2.1.8. Zelllinien

Die endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa wurden freundlicherweise von PD Dr. Lutz Konrad (Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde UKGM Gießen) zur Verfügung gestellt. Die Ovarialkarzinomzelllinie IGROV1 wurde vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen. Die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 (93112519) und die menschliche embryonale Nierenzelllinie HEK293T (CRL-11268) wurden von der American Type Culture Collection bezogen. One Shot MAX Efficiency *DH5α*™ kompetente Zellen wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

2.1.9. Zellkultur

Die Zellkulturmedien DMEM hoher Glukosegehalt (Thermo Fisher Scientific), DMEM F12 (Thermo Fisher Scientific) und RPMI 1640 (Biowest) enthielten 10 % (v/v) fetales Rinderserum (FBS) (Thermo Fisher Scientific) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Zur Selektion transfizierter Zellen während der Proteinexpression wurde dem Medium RPMI 1640 zusätzlich 0,1 % (v/v) Zeocin (InvivoGen) hinzugefügt. DMEM F12 enthielt zusätzlich 1 % Insulin-Transferrin-Selenium (Thermo Fisher Scientific). Das Zellkulturmedium MEM Glutamax (Thermo Fisher Scientific) enthielt 5 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) nicht essentielle Aminosäuren (MEM NEAA) (Thermo Fisher Scientific) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin.

2.1.10. Enzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs bezogen.

2.1.11. Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP

Die verschiedenen Gensequenzen, die für die scFv-Antikörperfragmente Farletuzumab-scFv, α EpCAM-scFv, CSPG4-scFv und 425-scFv kodieren, wurden aus öffentlich zugänglichen Quellen (Patente, Zeitschriften und Antikörperdatenbanken) bezogen und durch In-silico-Expressionsplasmiddesign mit dem SNAP-tag fusioniert.

2.1.12. Verwendete Fluorophore

Tabelle 8: Liste verwendeter Fluorophore

Material	Bezugsquelle
SNAP-Surface Alexa Fluor 488	New England Biolabs
SNAP-Surface Alexa Fluor 647	New England Biolabs
SNAP-Surface Alexa Fluor 546	New England Biolabs

2.2. Methode

Alle Experimente wurden mindestens drei Mal unabhängig voneinander wiederholt.

2.2.1. Zellkultivierung

Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, sobald eine Konfluenz von ca. 80 % vorlag. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gespült, um Mediumrückstände zu entfernen. Das PBS wurde verworfen und anschließend wurde 1 ml Trypsin (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 37°C für 2-3 Minute inkubiert und 8 ml des entsprechenden Kulturmediums hinzugefügt. 1 ml der Zellen wurde in eine neue Flasche überführt, die 19 ml Kulturmedium enthielt.

Die Zelllinien 12Z und 49Z wurden in „DMEM hoher Glukosegehalt komplettem Kulturmedium“ kultiviert, die Zelllinie THESC wurde in „DMEM F12 komplettem Kulturmedium“ kultiviert, die Zelllinie Ishikawa wurde in „MEM Glutamax komplettem Kulturmedium“ kultiviert, die Zelllinien IGROV1, A2780 und HEK293T wurden in „RPMI 1640 komplettem Kulturmedium“ kultiviert. Transfizierte HEK293T-Zellen wurden in „RPMI 1640 komplettem Kulturmedium mit 0,1 % Zeocin“ kultiviert, Die Zellkulturen wurden bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert

2.2.2. Zellen einfrieren

Das Einfriermedium wurde vorbereitet, indem 27 ml frisches Kulturmedium mit 3 ml (10 %) DMSO vermischt wurden. Das Einfriermedium wurde anschließend durch einen 0,22 µm Filter filtriert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben suspendiert und für 5 Minuten bei 500 r.p.m. zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge Einfriermedium resuspendiert, um eine Suspension mit 1×10^6 Zellen pro Milliliter herzustellen. Die Zellen wurden in 1 ml-Aliquots eingefroren.

2.2.3. Zellen auftauen

Die Zellen (1×10^6) wurden in 15 ml adäquaten auf 37°C vorgewärmten Mediums aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen bei 350 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 7 ml adäquaten Mediums resuspendiert und in einer T25-Kulturflasche bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.4. Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP

Die codierenden Sequenzen für die scFv-Fragmente wurden in einen pSecTag2-modifizierten pMS-Vektor (Stöcker et al. 2003) kloniert, der bereits die SNAP-tag-Sequenz enthielt. Je nach verwendeten Restriktionsenzymen wurde der Restriktionsverdau entweder unter einem Inkubationsschritt (XbaI und BlnI) durchgeführt oder unter zwei Inkubationsschritten (SfiI) durchgeführt. Zum Restriktionsverdau mit den Enzymen XbaI und BlnI wurde 1 μ g DNA mit je 5 U der entsprechenden Restriktionsenzyme und 1 x Restriktionsenzymverdaupuffer (New England Biolabs) vermischt und das Gesamtvolumen mit Milli-Q-Wasser auf 25 μ l angepasst. Der Reaktionsansatz wurde mittels Pipettierens und anschließendem Zentrifugieren in einer Mikrozentrifuge vermischt. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C. Wenn die Restriktionsenzyme SfiI und XbaI verwendet wurden, wurde zuerst ein Reaktionsansatz mit SfiI vorbereitet, dieser dann bei 50°C inkubiert, auf 37°C gekühlt und anschließend das Restriktionsenzym XbaI hinzugefügt und der Reaktionsansatz für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Tabelle 9 zeigt den Reaktionsansatz für den Restriktionsenzymverdau.

Tabelle 9: Reaktionsansatz Restriktionsenzymverdau

Komponenten	Volumen (μ l)	Finale Konzentration
DNA	Variabel	1 μ g
Restriktionsenzym	Variabel	5 U
10 X CutSmart® Puffer (Restriktionsenzymverdaupuffer)	2,5 μ l	1 x
Milli-Q-Wasser	Auffüllen auf 25 μ l	

Die verdaute DNA wurde mit 6 x violetterm Gelladefarbstoff (New England Biolabs) gemischt und bei 100 V für 30 Minuten in einem 1 % (wt/vol) Agarosegel separiert, das mit 1 x SYBR Safe DNA-Gelfärbelösung (Invitrogen) versetzt wurde. Als Größenstandard wurde eine 2-log DNA-Leiter (New England Biolabs) verwendet. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht mit dem ChemiDoc XRS+ System und der

ImageLab Software (BIORAD) analysiert. Die Banden für die scFv-Fragmente und das pMS-Vektor-Grundgerüst wurden mit einem NucleoSpin Gel und PCR Clean-Up Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Konzentration der DNA-Produkte wurde mittels UV-Spektrophotometrie gemessen. Die scFv-DNA wurde mithilfe des Quick Ligation™ Kit nach Angaben des Herstellers in den pMS-Vektor kloniert. Dazu wurde der in Tabelle 10 dargestellte Reaktionsansatz hergestellt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz Ligationsreaktion

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Quick Ligase Puffer (2X)	10 µl	1 X
pMS-DNA-Vektor	Variabel	50 ng
scFv-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 Vektor:Insert ¹	Variabel	Variabel
Quick-Ligase	1 µl	1 µg
Reinstwasser	Auffüllen auf 20 µl	
1: Formel: erforderliche Masse des Inserts (g) = gewünschtes molares Verhältnis von Insert/Vektor × Masse des Vektors (g) × Verhältnis von Insert-zu Vektorlänge		

Es wurde als Negativkontrolle ein weiterer Ligationsansatz hergestellt bei dem die scFv-DNA mit Reinstwasser ersetzt wurde. Die Ligationsansätze wurden vorsichtig vermischt und bei 25°C für 5 Minuten inkubiert. Dann wurden die Ansätze auf Eis gekühlt.

Die Ligationsansätze wurden zur Transfektion von DH5α-kompetenten Zellen genutzt. Dazu wurden die DH5α-Zellen auf Eis aufgetaut. Für jede Transfektion wurden 50 µl DH5α-Zellen genutzt. Es wurden 5 µl Ligationsansatz zu den DH5α-Zellen hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C inkubiert und danach sofort auf Eis für 5 Minuten gekühlt. Es wurden 800 µl LB-Medium (Raumtemperatur) zu den Zellen hinzugefügt und diese für 60 Minuten bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 250 r.p.m. inkubiert. Anschließend wurden die

Zellen bei 5000 r.p.m. für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen resuspendiert und je 100 µl auf einer vorgewärmten LB-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielt, ausgesät. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten auf Koloniewachstum überprüft. Mit einer sterilen Pipette wurden 5 einzelne Kolonien in je 5 sterile Röhrchen übertragen, die 2 ml LB-Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin enthielten. Die Röhrchen wurden bei 37°C über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 220 r.p.m.. inkubiert. Zur Kryokonservierung wurden je 500 µl der Zellen mit 500 µl 50% (vol/vol) Glycerol versetzt, in 250 µl Aliquots verteilt und bei -80°C gelagert. Mittels des NucleoSpin-Plasmid-DNA-Purifikationskit wurde die Plasmid-DNA von den restlichen 1,5 ml der Bakterienkultur isoliert. Zur Konfirmation der DNA-Sequenz erfolgte eine Sangersequenzierung bei Eurofins Genomics (85560 Ebersberg, Deutschland). Dazu wurde der IgK-For Primer (5' ACACACTCCTGCTATGGG 3') verwendet.

2.2.5. Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinexpression

Die Transfektion erfolgte mithilfe der Transfektionsreagenz Roti®Fect (Carl Roth). Je Plasmid wurden 2×10^5 HEK293T-Zellen auf je zwei Wells einer 6-well-Platte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. DNA (2 µg) wurde in 100 µl serumfreien Kulturmedium verdünnt (Mixtur eins). Rotifect-Transfektionsreagenz (10 µl) wurde mit 90 µl serumfreien Kulturmedium zusammengefügt (Mixtur zwei). Beide Mixturen wurden vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium der HEK293T-Zellen wurde verworfen und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurde 1,5 ml antibiotikafreies FBS-haltiges Kulturmedium hinzugefügt. Die Nukleinsäurelipidkomplexe wurden den Zellen tröpfchenweise hinzugefügt und die Zellen über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Das antibiotikafreie Kulturmedium wurde nach 24 Stunden entfernt und ein 0,1 %-Zeocin-haltiges Kulturmedium hinzugefügt. Der Transfektionserfolg wurde mikroskopisch per Erfassung des GFP-Signals kontrolliert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in eine T25-Kulturflasche übertragen. Die Präsenz des SNAP-tag-Fusionsproteins wurde untersucht, indem 10 µl des Kulturüberstandes der transfizierten HEK293T-Zellen (optimalerweise bei mindestens 80% Konfluenz der Zellen) mit 0,05 nM SNAP-Surface Alexa Fluor 488 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Als

Negativkontrolle wurden 10 µl Kulturüberstand untransfizierter Zellen mit derselben Menge SNAP-Surface Alexa Fluor 488 unter denselben Bedingungen inkubiert.

Anschließend wurden die Proben zusammen mit einem „blue prestained protein standard broad range“ (New England Biolabs) in einem 12% SDS-PAGE Gel in TGS-Puffer für 60 Minuten bei 160 V separiert. Das Gel wurde mit einem Fluoreszenzbildgebungssystem (ChemiDoc XRS+ System und ImageLab Software (BIORAD) untersucht. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Das Gel wurde zur Entfärbung mit Entfärbungslösung inkubiert (6-24h) bis der Hintergrund klar erschien. Anschließend wurde das Gel mit ChemiDoc XRS+ System untersucht.

Um die antigenbindenden Eigenschaften des exprimierten Zielproteins gegen Zielzellen mit entsprechender Antigenexpression zu untersuchen, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Es wurde 7 ml Kulturüberstand von den transfizierten Zellen entnommen und dieser durch einen 0,22 µm Filter filtriert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden 10 µl dieses zellfreien Kulturüberstandes der transfizierten HEK293T-Zellen mit 0,05 nM SNAP-Surface Alexa Fluor 488 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um ein scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugat herzustellen. Der konjugierte Kulturüberstand wurde mit PBS anschließend auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt.

Die zu bindenden Zielzellen (4×10^5) wurden zwei Mal mit 1,8 ml PBS gewaschen. Die Zielzellen sowie Zellen zur Negativkontrolle wurden bei 500 r.p.m. für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Zielzellen mit dem konjugierten Kulturüberstand (10 µl konjugierter Kulturüberstand in 190 µl PBS) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als weitere Negativkontrolle wurde ein Ansatz nur mit PBS behandelt. Alle Zellen wurden anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen, indem sie bei 500 r.p.m. für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert. Die Zellen wurden per Durchflusszytometrie im BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer mit entsprechendem Farbkanal untersucht.

Nach Bestätigung der Präsenz und Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins wurden 7×10^7 der transfizierten HEK293T-Zellen in eine drei-lagige Zellkulturflasche (525 cm² Kulturfläche) mit 150 ml 0,1%-Zeocin-haltigem Kulturmedium transferiert, um eine größere Produktionsmenge zu erreichen. Der Kulturüberstand wurde in einer sterilen Flasche gesammelt und frisches Medium hinzugefügt, ohne die Zellen zu passagieren.

Insgesamt wurde aus einer Kulturflasche zweimal Kulturüberstand gewonnen und anschließend eine neue Kultur angelegt. Der gesammelte Kulturüberstand wurde bei 4°C für bis zu 2 Wochen gelagert.

2.2.6. Proteinpurifikation mittels „Immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie“ (IMAC)

Der Kulturüberstand wurde bei 5000 r.p.m. für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und dann durch ein 0,45-µm „bottle-top vacuum filter system“ (Corning®) filtriert, um einen zellfreien Überstand zu erhalten. Der zellfreie Überstand wurde im Verhältnis von 1:4 mit 4 x Ni-NTA Bindungspuffer gemischt, um den pH-Wert anzupassen.

Die Ni-NTA-Kartusche wurde mit 10 Säulenvolumen (50 ml) 1 x Ni-NTA Bindungspuffer mit einer Flussrate von 1 ml/Minute kalibriert. Alle anschließend eluierten Fraktionen wurden gesammelt. Der Kulturüberstand lief mit einer Flussrate von 1 ml/Minute durch die Kartusche. Die Kartusche wurde danach mit 1x Ni-NTA Bindungspuffer bei einer Flussrate von 1 ml/Minute gewaschen, bis die UV-Extinktion wieder ihren Grundwert erreicht hat. Die Kartusche wurde mit 10 Säulenvolumen Ni-NTA-Waschpuffer mit einer Flussrate von 1 ml/Minute gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das mit einem 6xHis-Rest versehene Fusionsprotein wurde mittels Ni-NTA Elutionspuffer aus der Kartusche eluiert und gesammelt. Die Elutionsfraktion wurde gesammelt mit Ansteigen der UV-Extinktion und bis diese wieder ihren Grundwert erreicht hatte.

Die Kartusche wurde anschließend mit NaOH (0,5 M) gefolgt von Strippingpuffer gewaschen um noch verbliebene Proteine und Zinkionen zu eluieren. Die Säule wurde dann mit NiCl₂-Lösung regeneriert. Hiernach war ein erneutes Nutzen der Säule möglich.

Um die Präsenz des Proteins zu bestätigen, wurde ein SDS-Gel wie bereits in Abschnitt 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Der Elutionspuffer wurde gegen PBS ausgetauscht, indem mithilfe einer Dialysemembran (Spektrum™ Labs Spectra/Por™ 2 12-14 kDa MWCO Trockene standardmäßige Dialyse-Kits aus regenerierter Cellulose, Thermo Fisher Scientific) eine Dialyse gegen 5 Liter PBS über Nacht bei 4°C durchgeführt wurde.

Zur Bestimmung der Konzentration des Fusionsproteins wurde ein SDS-Gel mit Rinderserumalbumin-(BSA)-Standard durchgeführt und die Konzentration mittels

ImageLab Software (BIORAD) bestimmt. Dazu wurde BSA (New England Biolabs 20 mg/ml) mit PBS verdünnt um vier definierte Konzentrationen (0,2; 0,1; 0,05; 0,025 µg/µl) zu erreichen. Die Proben und je 10 µl des BSA-Standards wurden in 10% SDS-Gel separiert. Die Standardkurve und Proteinkonzentration wurde anschließend durch die ImageLab Software bestimmt.

2.2.7. Konjugation mit BG-modifizierten Fluorophoren

Die SNAP-Surface Fluorophore (SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488, SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647, SNAP-Surface® Alexa Fluor® 546) wurden in DMSO zu einer finalen Konzentration von 1 mM aufgelöst. Die scFv-SNAP-Fusionsproteine wurden mit einem zweifachen molaren Überschuss des jeweiligen SNAP-Surface-Fluorophor für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die mit einem Fluorophor verknüpften scFv-SNAP-Fusionsproteine wurden mithilfe einer 7K-MWCO Zeba SpinTM Entsalzungssäule nach Angaben des Herstellers purifiziert. Die Konjugation des Fluorophors an die Fusionsproteine wurde bestätigt, indem die Fusionsproteine wie zuvor beschrieben auf ein SDS -Gel aufgetragen wurden. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe eines BSA-Standards und der ImageLab-Software bestimmt.

2.2.8. Durchflusszytometrie

Es wurde angestrebt mindestens 400.000 Zellen pro Probenröhrchen zu erreichen. Es wurden Probenröhrchen für alle in dem jeweiligen Experiment verwendeten Antikörper hergestellt sowie ein Probenröhrchen ohne Antikörperzusatz als Negativkontrolle. Die Zellen wurden 2 Mal mit PBS gewaschen, indem sie bei 500 r.p.m. für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 1,8 ml PBS resuspendiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Je Probenröhrchen wurde 1 µg des entsprechenden Fusionsproteins hinzugefügt, für die kommerziellen IgG-Antikörper wurde die vom Hersteller empfohlene Menge verwendet. Die Zellen und Antikörper wurden für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zwei Mal mit PBS gewaschen wie oben beschrieben. Falls primäre IgG-Antikörper verwendet wurden, erfolgte eine zweite Inkubation mit dem sekundären fluorophor-gekoppelten Antikörper ebenfalls für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zwei Mal mit PBS gewaschen wie oben beschrieben. Nach dem letzten

Waschschritt wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert. Die Probenröhrchen wurden mit einem BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer und der FlowJo™ v10.8 Software analysiert.

2.2.9. Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden mittels Trypsins von der Kulturflasche gelöst und in 8 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, bei 500 r.p.m. für 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert und je 5×10^5 Zellen pro Ansatz in ein Well (Screenstar, 96 Well Mikroplatte, schwarz, Greiner bio-one) pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium vorsichtig abpipettiert und die Zellen vorsichtig drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde den Zellen 1 µg scFv-Fluorophor-Konjugat (konjugiert mit SNAP-Surface® Alexa Fluor® 488, SNAP-Surface® Alexa Fluor® 647, SNAP-Surface® Alexa Fluor® 546) in 100 µl PBS je Well hinzugefügt. Für die Durchführung des „Multiplex-Imaging“ wurden je 1 µg zweier verschiedener Antikörper in ein Well hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend für 30 Minuten auf Eis in einer angefeuchteten Umgebung inkubiert. Die Inkubationszeit für jedes scFv-Fluorophor-Konjugat war gleich lang. Nach der Inkubation wurden die Zellen drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit „Hoechst 33,342 fluorescent nuclear counterstain“ (1:500 in PBS) (Thermo Fisher Scientific) für 15 Minuten auf Eis. Nach der Inkubation wurden die Zellen drei Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (DMi8 S Live-cell Mikroskop, Leica Microsystems) mithilfe der Software Leica LAS X. Es erfolgte zudem eine Benchtop-Inkubation bei 37°C. Die Bilder wurden mit der Software FIJI (Version 2,15.0) analysiert (Schindelin et al. 2012).

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate

Im ersten Schritt wurden die scFv-Gene in den pMS-Vektor kloniert. Das so entwickelte Plasmid „pMS-scFv-SNAP“ wurde genutzt, um HEK293T-Zellen zu transfizieren. Die Fusionsproteine wurden von diesen exprimiert und in den Kulturüberstand sezerniert. Aus dem Kulturüberstand wurden die Fusionsproteine per IMAC purifiziert. Die purifizierten Fusionsproteine wurden mit SNAP-Surface-Alexa-Fluorophoren konjugiert. Zum Nachweis der Funktionsfähigkeit der Fusionsproteine wurde deren Bindungsfähigkeit an Zelllinien mit bekanntem Expressionsstatus in der Durchflusszytometrie untersucht.

3.1.1. Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP

Zielsetzung dieses Experiments war es ein Plasmid herzustellen, mithilfe dessen das rekombinante Fusionsprotein Farlet-scFv-SNAP exprimiert und isoliert werden konnte. Das Gen für das Farlet-scFv-Fragment wurde bei Genscript (2288EB Rijswijk, Niederlande) bestellt und in einem pEX-A128-Vektor bereitgestellt. Zur Bereitstellung des Plasmidgerüsts wurde der pSec-Tag2-modifizierte pMS-Vektor pMS-„Insert“-SNAP verwendet. Die beiden Plasmide wurden mithilfe der Restriktionsenzyme SfiI und XbaI verdaut und anschließend das Zielgen und das pMS-Plasmidgerüst miteinander ligiert, sodass die Gensequenz für das Farlet-scFv-Fragment downstream der SNAP-tag-sequenz eingefügt wurde (Abbildung 4). Die Korrektheit der Sequenz wurde durch eine DNA-Sequenzierung bestätigt (Sanger Sequencing Services, Eurofins Genomics, Germany).

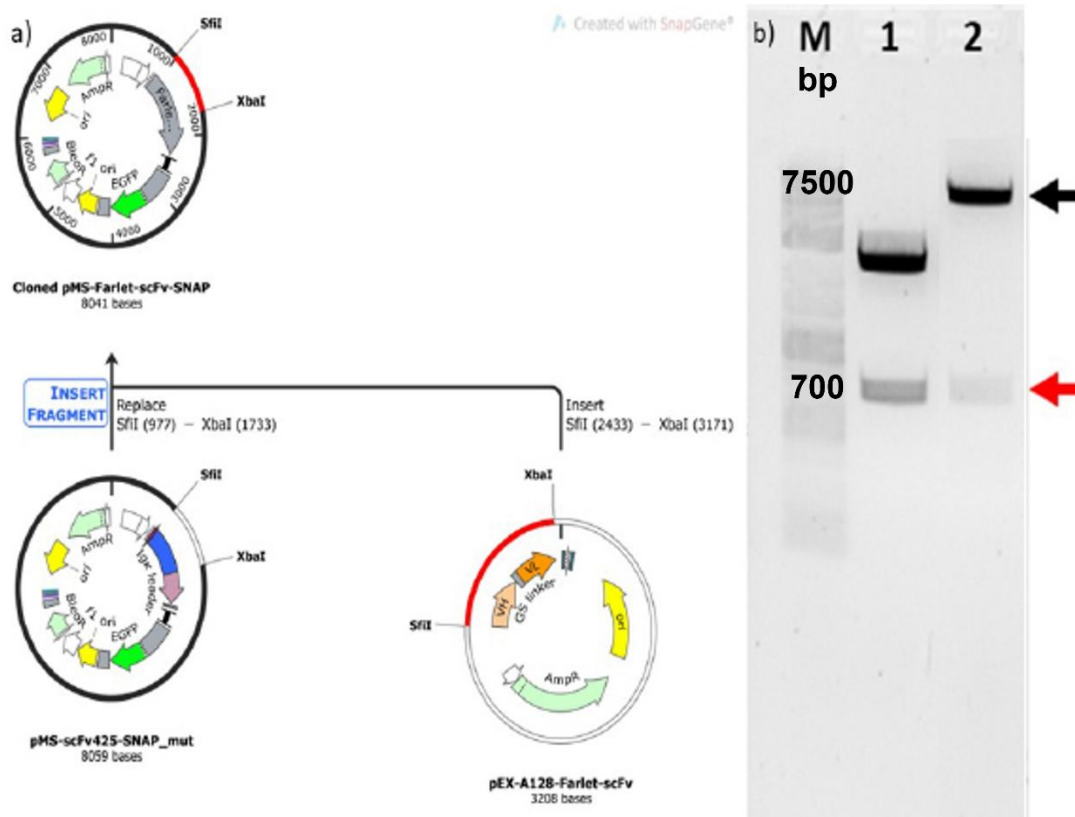


Abbildung 4: Klonierung des Plasmids *pMS-Farlet-scFv-SNAP* aus den Ursprungsplasmiden *pMS-scFv-425-SNAP* (Plasmidgerüst) und *pEX-A128-Farlet-scFv* (Farlet-scFv-Gen), verwendete Restriktionsenzyme: *SfiI*, *XbaI* a) Schematische Darstellung der Klonierung b) Agarose-Gel nach Klonierung, M: DNA-Größenstandard, 1: *pEX-A128-Farlet-scFv*; 2: *pMS-425-scFv-SNAP*; schwarzer Pfeil: Plasmidgrundgerüst des *pMS*-Vektors; roter Pfeil: Gen für Farlet-scFv; *AmpR*, ampicillin resistance; *BleoR*, bleomycin resistance gene; *f1*, class I filamentous phage; *GS*, glycine-serine; *Igκ*, immunoglobulin κ ; *IRES*, internal ribosome entry site; *ori*, origin of replication; *rev*, reverse; *VH*, variable heavy; *VL*, variable light region. Hergestellt mit SnapGene

3.1.2. Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinexpression

Die Transfektion wurde mit vier verschiedenen Plasmiden durchgeführt:

- *pMS-Farlet-scFv-SNAP* (Im Folgenden als Beispielploid verwendet)
- *pMS-425-scFv-SNAP*
- *pMS-CSPG4-scFv-SNAP*
- *pMS-αEpCAM-scFv-SNAP*

Für die Genübertragung wurde die Transfektionsreagenz RotiFect gewählt. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte in einem Zeocin-haltigen Medium (RPMI, 5 % FBS, 1% P/S, 0.1 % Zeocin). Die Resistenz gegen das Zeocin wurde über das Bleomycin-Resistenzgen des Plasmids vermittelt. Ein Monitoring der Produktion des Zielproteins erfolgte fluoreszenzmikroskopisch über die Expression des „Enhanced Green Fluorescence Protein“ (EGFP). Das EGFP-Gen dient als Reportergen, es ist über eine „Internal Ribosome Entry Site“ (IRES) mit dem Gen für das rekombinante Fusionsprotein verknüpft und wird somit mit diesem cotranslationiert. Die transfizierten Zellen zeigten ein deutliches EGFP-Signal. Dies wurde als Zeichen einer funktionierenden Plasmidtransformation und Proteinexpression gewertet. Das rekombinante Fusionsprotein wurde mittels des IgK-Leaders in das Kulturmedium sezerniert. Um die Präsenz und Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins im Kulturüberstand orientierend zu überprüfen, wurde sowohl die Aktivität des SNAP-tags per Konjugation mit einem BG-modifizierten Fluorophor (Abbildung 5a) als auch die Bindungseigenschaften des Farlet-scFv-Anteils an bekannte FR α -positive Zelllinien in der Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 5b). Der Kulturüberstand wurde gesammelt und bei 4°C gelagert.

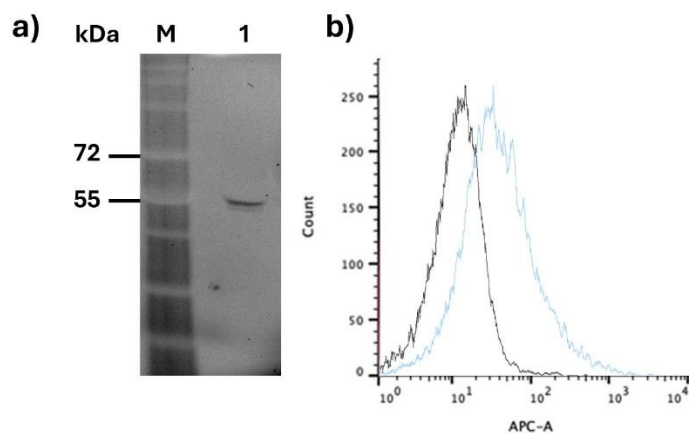


Abbildung 5: Nachweis des Fusionsproteins Farlet-scFv-SNAP im Kulturüberstand von HEK293T-Zellen, die mit pMS-Farlet-scFv-SNAP transfiziert wurden. a) Nachweis der SNAP-tag Aktivität mittels In-Gel-Visualisierung des gekoppelten Alexa SNAP Surface 488 mit ChemiDoc XRS+ System nach Inkubation von Kulturüberstand der transfizierten HEK293T-Zellen mit Alexa-SNAP-Surface-BG488; M: Blue Prestained Protein Standard Broad Range (11–250 kDa); Bahn 1: Kulturüberstand. b) Bindung von Farlet-scFv-SNAP-BG647 aus dem Kulturüberstand transfizierter HEK293T-Zellen an FR α -positive Ishikawa-Zellen; schwarzer Graph: Negativkontrolle; blauer Graph: Farlet-scFv-SNAP-BG647

3.1.3. Proteinpurifikation mittels IMAC

Die Extraktion der rekombinanten Fusionsproteins aus dem Kulturüberstand erfolgte mittels IMAC, dies beruht auf einer Bindung des C-terminalen 6-x-His-tag an immobilisierte Zink-Ionen in der Chromatographie-Säule.

Die aufgesammelten Probenfraktionen wurden mittels SDS-Page-Gelelektrophorese auf die Präsenz des Zielproteins und die Aktivität des SNAP-tags untersucht. Mithilfe der Software SnapGene wurde die theoretische Größe des rekombinanten Fusionsproteins ermittelt, diese beträgt 51.6 kDa für Farlet-scFv-SNAP. Für den Nachweis der Aktivität des SNAP-tags wurden die Proben mit dem Fluorophore SNAP-Surface Alexa Fluor 488 inkubiert, eine Bindung an diesen BG-modifizierten Farbstoff ist nur über die katalytische Aktivität des SNAP-tag möglich.

Der durchgeflossene Kulturüberstand, die Bindungspufferfraktion, die Waschpufferfraktion und die Elutionspufferfraktion wurden gesammelt und analysiert. In der SDS-Page Gelelektrophorese zeigten sich im gesammelten Kulturüberstand, der Waschpufferfraktion und der Elutionspufferfraktion Banden in dem erwarteten Größenbereich von ca. 52 kDa. Zudem zeigte sich bei der In-Gel-Visualisierung in diesen Fraktionen ein Fluoreszenzsignal (Abbildung 6). In einem Dialyseverfahren gegen 5 L PBS mit einer Dialysemembran (Molekulargewichtgrenzwert von 12-14 kDa) wurde der Elutionspuffer gegen PBS ausgetauscht.

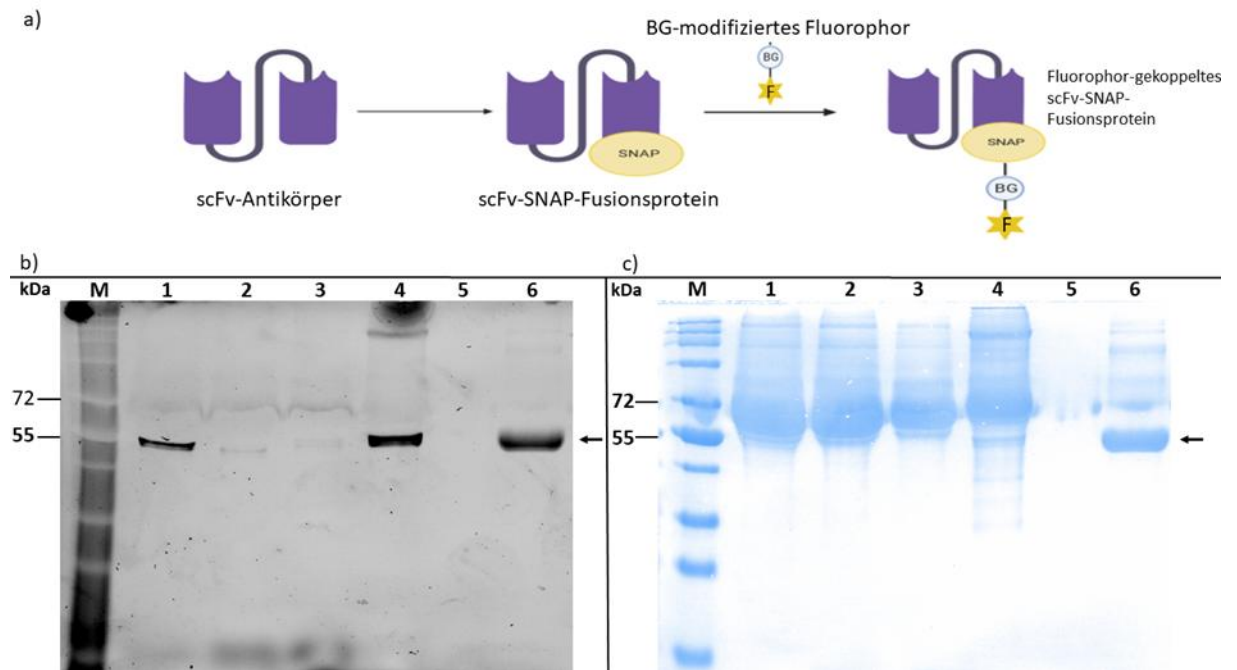


Abbildung 6: Purifikation des Fusionsproteins Farlet-scFv-SNAP. a) Schematische Darstellung der Konjugation von scFv-SNAP-Antikörpern mit BG-modifizierten Fluorophoren. b) In-Gel-Visualisierung des gekoppelten Alexa SNAP Surface 488 mit ChemiDoc XRS+ System. c) korrespondierende Coomassie-Blau-Färbung des SDS-Page-Gels. M: Blue Prestained Protein Standard Broad Range (11–250 kDa); Bahn 1: Kulturüberstand; Bahn 2: Durchfluss; Bahn 3: Bindungspuffer; Bahn 4: Waschpuffer; Bahn 5: leer; Bahn 6: Elutionspuffer. Abschnitt a) hergestellt mit BioRender.com

Die Konzentration aller Proteine wurde mithilfe eines BSA-Standards und der ImageLab Software bestimmt. Abbildung 7 zeigt beispielhaft das SDS-Gel zur Bestimmung der Konzentration des konjugierten Fusionsproteins Farlet-scFv-SNAP-BG647. Die Konzentration der purifizierten unkonjugierten Fusionsproteine ist in Tabelle 11 angezeigt.

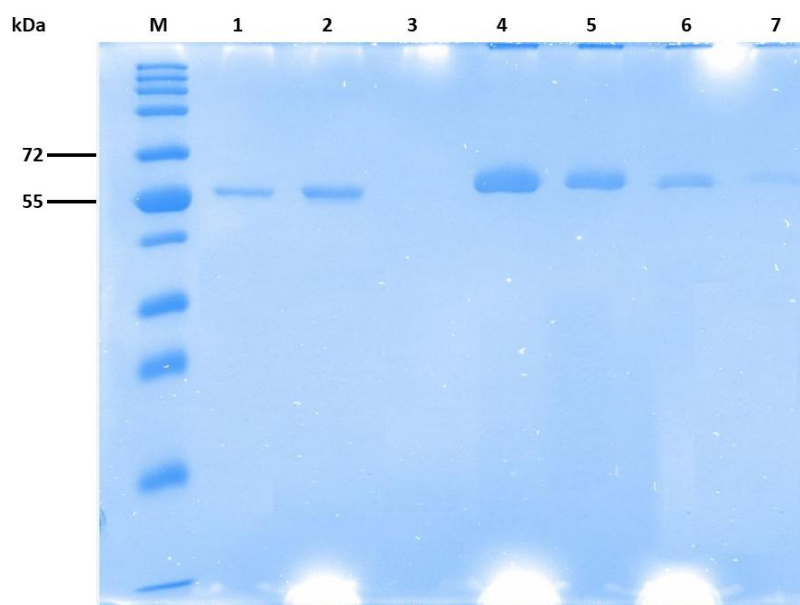


Abbildung 7: Konzentrationsbestimmung mittels BSA-Standard in Coomassie-Blau-Färbung eines SDS-Page-Gels. M: Blue Prestained Protein Standard Broad Range (11–250 kDa); Bahn 1: 0,5 µl Farlet-scFv-SNAP-BG647; Bahn 2: 1 µl Farlet-scFv-SNAP-BG647; Bahn 3: leer; Bahn 4: 2000ng BSA-Standard; Bahn 5 1000 ng BSA-Standard; Bahn 6: 500 ng BSA-Standard; Bahn 7: 250 ng BSA-Standard

Tabelle 11: Konzentration purifizierter Proteine

Protein	Konzentration
Farlet-scFv-SNAP	2000 ng/µl
425-scFv-SNAP	1000 ng/µl
CSPG4-scFv-SNAP	700 ng/µl
αEpCAM-scFv-SNAP	320 ng/µl

Die Proteine wurden erfolgreich mit SNAP-Surface Alexa Fluor 647 konjugiert (Abbildung 8b). Nach Konjugation mit SNAP-Surface Alexa Fluor 647 erfolgte eine Postinkubation mit SNAP-Surface Alexa Fluor 488. Hier zeigte sich kein Fluoreszenzsignal in der In-Gel-Visualisierung (Abbildung 8a). Diese Postinkubation bestätigt, dass nach der ersten Inkubation alle scFv-SNAP-Fusionsproteine erfolgreich konjugiert wurden. Tabelle 12 stellt die Konzentration der konjugierten Fusionsproteine dar.

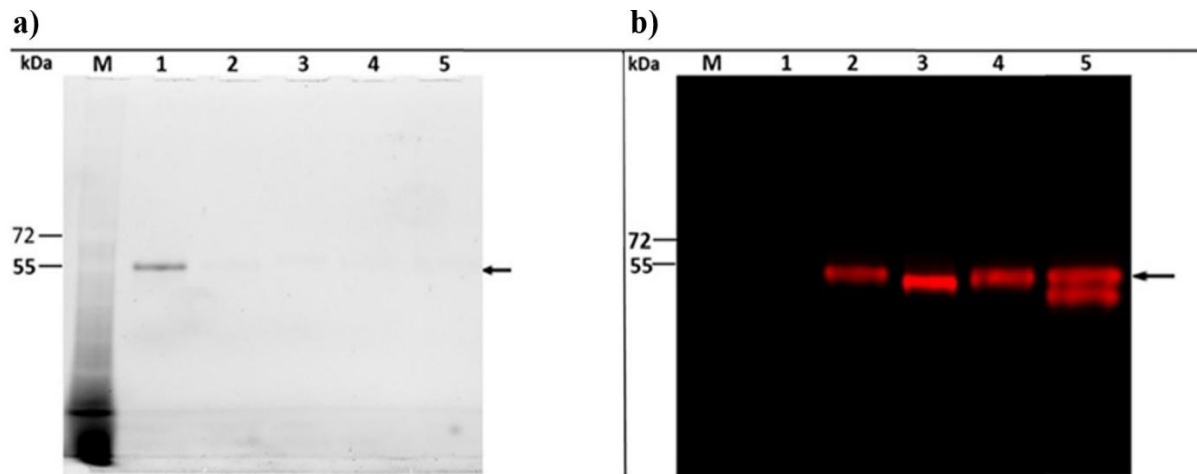


Abbildung 8: Konjugation der Fusionsproteine mit BG-modifizierten Fluorophoren. a) In-Gel-Visualisierung von SNAP Surface Alexa Fluor 488, b) In-Gel-Visualisierung von SNAP-Surface Alexa Fluor 647. M: Blue Prestained Protein Standard Broad Range (11–250 kDa); 1: Farlet-scFv-SNAP-BG488; 2: Farlet-scFv-SNAP-BG647; 3: 425-scFv-SNAP-BG647; 4: α EpCAM-scFv-SNAP-BG647; 5: CSPG4-scFv-SNAP-BG647. Die Fusionsproteine in den Banden 2-5 wurden nach Konjugation mit SNAP-Surface Alexa Fluor 488 postinkubiert

Tabelle 12: Konzentration konjugierter Fusionsproteine

Protein	Konzentration
Farlet-scFv-SNAP-BG647	1500 ng/ μ l
425-scFv-SNAP-BG647	400 ng/ μ l
CSPG4-scFv-SNAP-BG647	800 ng/ μ l
α EpCAM-scFv-SNAP-BG647	349 ng/ μ l

3.1.4. Analyse der Antigenbindung durch das Fusionsprotein Farlet-scFv-SNAP

Zur Analyse der Antigenbindungseigenschaften des Fusionsproteins Farlet-scFv-SNAP wurden eine FR α -positive und eine FR α -negative Zelllinie mit Farlet-scFv-SNAP-BG647 inkubiert und anschließend eine Durchflusszytometrie durchgeführt.

Farlet-scFv-SNAP zeigte eine gute Bindungsfähigkeit an die FR α -positive Zelllinie IGROV1 (Abbildung 9b) (Siwowska et al. 2017; Wen et al. 2015) und keine unspezifische Bindung an die FR α -negative Zelllinie A2780 (Abbildung 9a) (Wen et al. 2015; Saito et al. 2020).

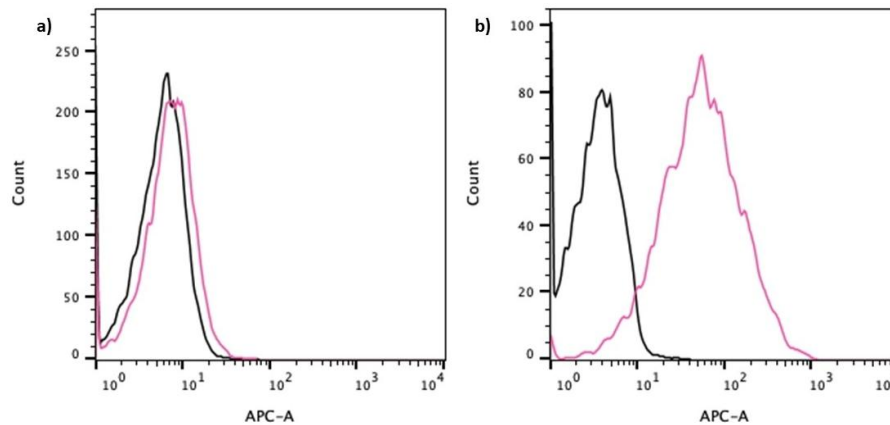


Abbildung 9: Nachweis der antigenbindenden Funktion des rekombinanten Fusionsproteins Farlet-scFv-SNAP-BG647. a) FRA-negative Zelllinie A2780, b) FRA-positive Zelllinie IGROV1. Schwarzer Graph: unbehandelte Zellen; magentafarbener Graph: Farlet-scFv-SNAP-BG647

3.2. Evaluation der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zur Detektion endometrioider Antigene

Der Expressionsstatus der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa wurde mithilfe von validierten kommerziellen monoklonalen IgG-Antikörpern bestimmt. Anschließend wurde die Fähigkeit der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate untersucht die endometrioiden Zelllinien zu binden. Dies erfolgte mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.

3.2.1. Bestimmung des Expressionslevels der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa für die untersuchten Antigene mittels monoklonaler IgG-Antikörper

Zur Bestimmung des Expressionslevels wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit validierten kommerziellen primären monoklonalen IgG-Antikörpern, die gegen EGFR, CSPG4, α EpCam und FR α gerichtet sind, und einem korrespondierendem sekundären 647-gekoppelten-monoklonalen Antikörper durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse der Bestimmung der Expressionslevel werden in Tabelle 13 angezeigt.

Tabelle 13: Expressionslevel der verwendeten endometrioiden Zelllinien:

	12Z	49Z	THESC	Ishikawa
EGFR	+++	+++	+++	+++
CSPG4	++	++	++	-
αEpCAM	-	+	-	++
FRα	-	-	-	++

3.2.2. Vergleich der Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Fluorophor-Antikörper mit der Bindungsfähigkeit monoklonaler IgG-Antikörper an die endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa.

Die Bindungsaktivität der Fluorophor-gekoppelten scFv-Antikörper 425-scFv-SNAP, CSPG4-scFv-SNAP, α EpCAM-scFv-SNAP und Farlet-scFv-SNAP im Vergleich zu korrespondierenden monoklonalen IgG-Antikörpern wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Das Bindungsverhalten der Fluorophor-gekoppelten scFv-Antikörper 425-scFv-SNAP, CSPG4-scFv-SNAP und Farlet-scFv-SNAP stimmte in allen Zellreihen mit dem Bindungsverhalten der monoklonalen IgG-Antikörper überein (Abbildung 10). Das Bindungsverhalten des α EpCAM-scFv-SNAP-BG647-Antikörper stimmte für die Zelllinien 12Z, THESC und Ishikawa mit dem monoklonalen α EPCAM-IgG-Antikörper überein. Der kommerzielle α EpCAM-IgG-Antikörper zeigte eine Bindung an die Zelllinie 49Z, der α EpCAM-scFv-SNAP-BG647-Antikörper zeigte keine Bindung an die Zelllinie 49Z (Abbildung 10).

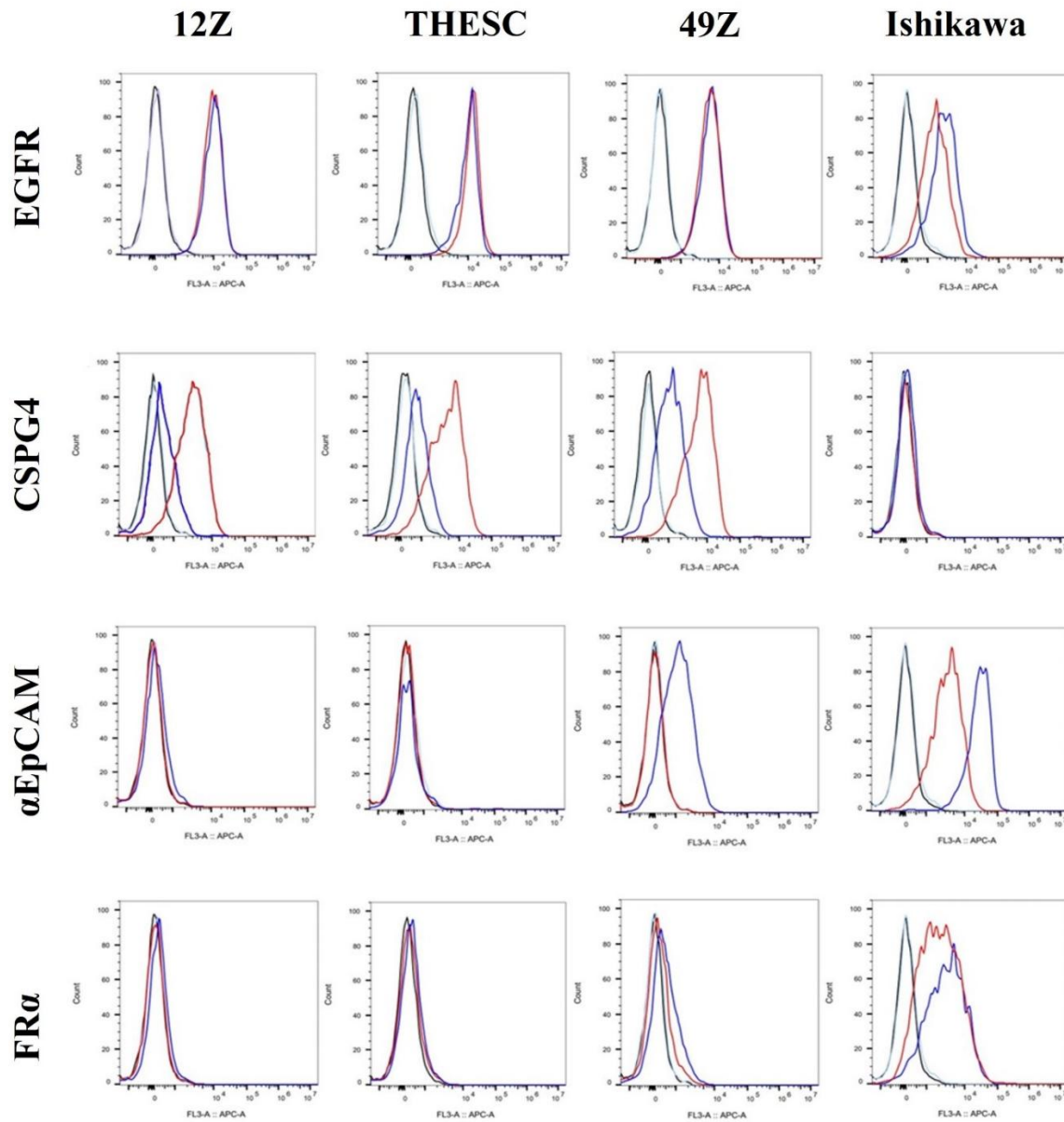


Abbildung 10: Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Fluorophor-Antikörper an endometrioide Zelllinien in Relation zu validierten kommerziellen monoklonalen IgG-Antikörper. schwarzer Graph: Negativkontrolle; roter Graph: mit scFv-SNAP-Fluorophor inkubierte Zellen; blauer Graph mit Maus-IgG + anti-Maus-IgG-647 inkubierte Zellen, lila Graph: mit anti-Maus-IgG-647 inkubierte Zellen

3.2.3. Untersuchung der Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Antikörper an endometrioide Zellen, die EGFR, CSPG4, α EpCAM oder Farlet exprimieren mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie

Die Zelllinien 12Z, 49Z und THESC konnten durch die scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate 425-scFv-SNAP-BG647 und CSPG4-scFv-SNAP-BG647 markiert werden. In der Durchflusszytometrie zeigten beide scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate für alle drei Zelllinien ein ähnlich starkes Signal. Zudem zeigte sich kein Unterschied in der Signalstärke zwischen den beiden scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugaten. Die Zelllinie Ishikawa konnte durch die scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate 425-scFv-SNAP-BG647, Farlet-scFv-SNAP-BG647 und α EpCAM-scFv-SNAP-BG647 markiert werden. In der Durchflusszytometrie zeigten diese drei scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate ein ähnlich starkes Signal bei der Bindung an die Zelllinie Ishikawa.

Nach der Inkubation der Zellen 12Z, 49Z und THESC mit 425-scFv-SNAP-BG647 auf Eis zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie eine klare Membranfärbung. Unter Inkubation bei 37°C wurde zudem auch ein intrazelluläres Signal beobachtet. CSPG4-scFv-SNAP-BG647 zeigte nach Inkubation mit den Zellen auf Eis als auch bei 37°C nur eine Membranfärbung.

Nach Inkubation der Zelllinien Ishikawa mit 425-scFv-SNAP-BG647 und α EpCAM-scFv-SNAP-BG647 auf Eis zeigte sich in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung eine klare Membranfärbung für beide Antikörper. Nach Inkubation bei 37°C wurde zudem für beide Antikörper ein intrazelluläres Signal beobachtet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

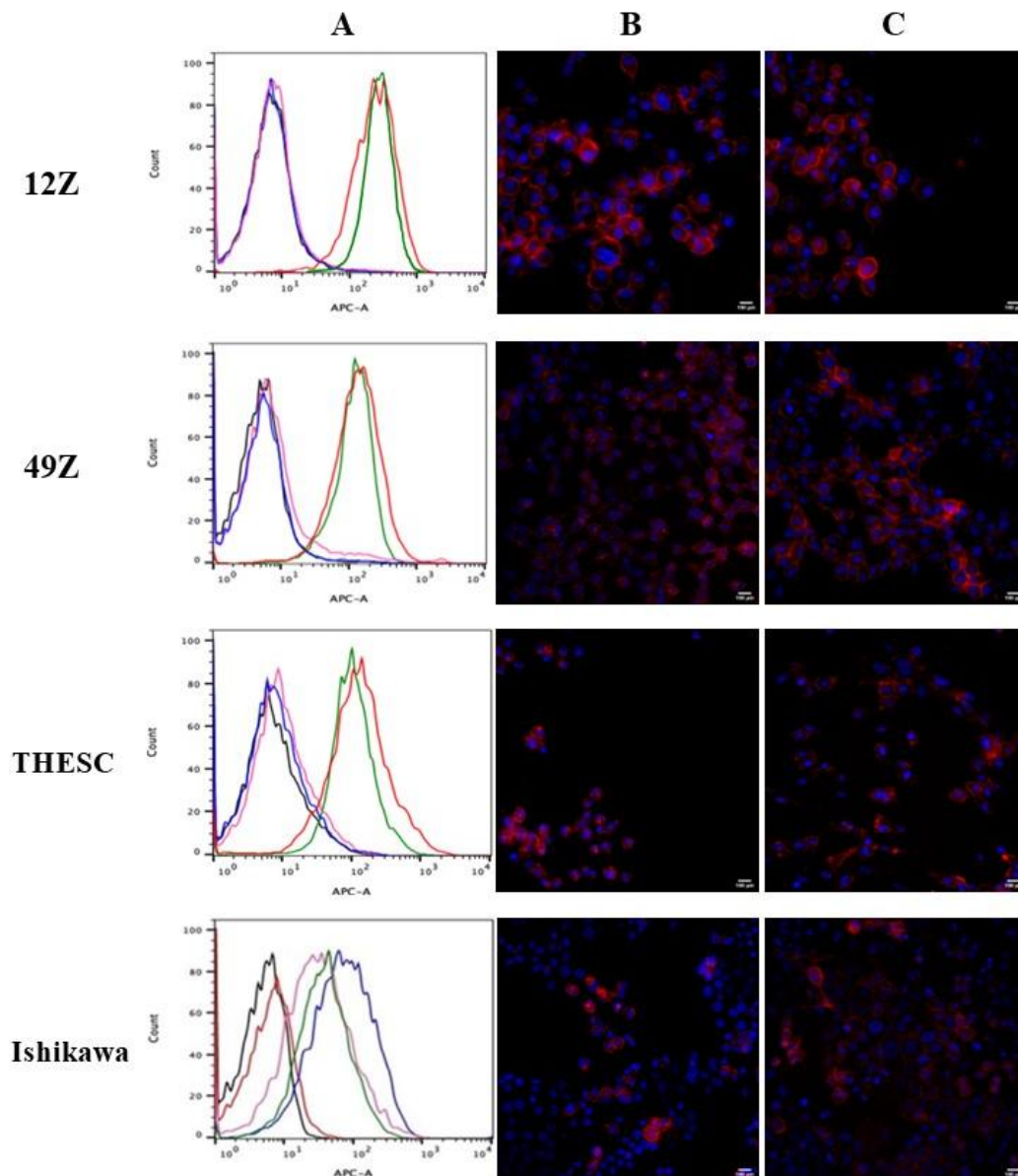


Abbildung 11: Detektion der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z, THESC und Ishikawa mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie 12Z, 49Z, THESC a) Durchflusszytometrie, schwarzer Graph: Negativkontrolle, grüner Graph: mit 425-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen, roter Graph: mit CSPG4-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen, blauer Graph: mit αEpCAM-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen, magentafarbener Graph: mit Farlet-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen; b) Fluoreszenzmikroskopie der mit 425-scFv-SNAP-BG647 inkubierten Zellen c) Fluoreszenzmikroskopie der mit CSPG4-scFv-SNAP-BG647 inkubierten Zellen; blaues Signal: DAPI, rotes Signal: BG647-gekoppelte scFv-Antikörper **Ishikawa** a) Durchflusszytometrie, schwarzer Graph: Negativkontrolle, grüner Graph: mit 425-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen, roter Graph: mit CSPG4-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen, blauer Graph: mit αEpCAM-scFv-SNAP-BG647 inkubierte Zellen, magentafarbener Graph: mit Farlet-scFv-SNAP-inkubierte Zellen ; b) Fluoreszenzmikroskopie der mit 425-scFv-SNAP-BG647 inkubierten Zellen c) Fluoreszenzmikroskopie der mit αEpCAM-scFv-SNAP-BG647 inkubierten Zellen; blaues Signal: DAPI, rotes Signal: BG647-gekoppelte scFv-Antikörper. Der Maßstab zeigt 100 μm an

3.2.4. Multiplex Imaging der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z und THESC mit den scFv-Antikörperfluorophorkonjugaten 425-scFv-SNAP-BG546 und CSPG4-scFv-SNAP-BG647

Die Zelllinien 12Z, 49Z und THESC wurden gleichzeitig mit den AFC 425-scFv-SNAP-BG546 und CSPG4-scFv-SNAP-BG647 inkubiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die gleichzeitige Bindung beider Antikörper an die Zellen war möglich. Für 425-scFv-SNAP-BG546 zeigte sich eine klare Membranfärbung. Unter Inkubation bei 37°C wurde zudem auch ein intrazelluläres Signal beobachtet. CSPG4-scFv-SNAP-BG647 zeigte nach Inkubation mit den Zellen auf Eis als auch bei 37°C nur eine Membranfärbung. In der Kombination beider AFC wurden in allen untersuchten Zelllinien jeweils mehr Zellen detektiert als bei der Verwendung eines einzelnen AFC (Abbildung 12).

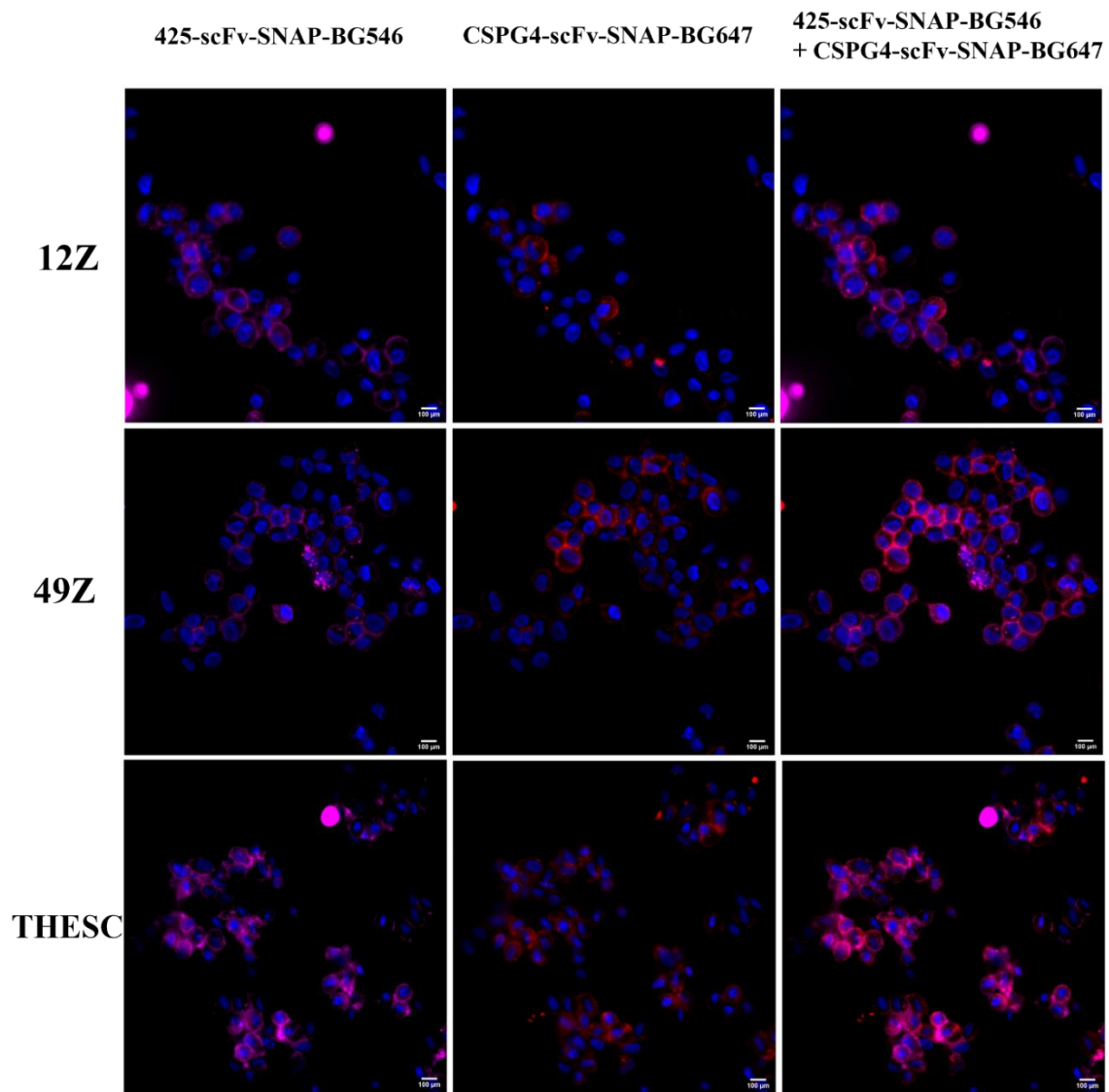


Abbildung 12: Multiplex Imaging der endometrioiden Zelllinien 12Z, 49Z und THESC mit den AFC 425-scFv-SNAP-BG546 und CSPG4-scFv-SNAP-BG647; blaues Signal: DAPI, lila Signal: 425-scFv-SNAP-BG546, rotes Signal: CSPG4-scFv-SNAP-BG647. Der Maßstab zeigt 100 µm an

4. Diskussion

4.1. Entwicklung der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate

4.1.1. Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP

Die vorliegende Arbeit zeigt die Herstellung der Plasmide pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP. Die Arbeitsschritte in der Herstellung der jeweiligen Plasmide gleichen sich, sodass im Folgenden die Diskussion am Beispiel des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP durchgeführt wird. Dieses Plasmid wurde in dieser Studie erstmals hergestellt. Die Plasmide pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP wurden bereits in vorangehenden Projekten der Arbeitsgruppe entwickelt und verwendet (Hussain et al. 2019b; Hussain et al. 2011; Amoury et. al 2016).

Die Entwicklung des Plasmids pMS-Farlet-scFv-SNAP beruht auf der Klonierung des Farlet-scFv-Gens in einen pMS-Vektor. Dadurch erfolgt eine gentechnische Fusion des Farlet-scFv-Fragments mit dem SNAP-tag. Das pMS-Vektor-Grundgerüst dient zudem der Optimierung der weiteren Proteinherstellung, da dem Fusionsprotein funktionelle Charakteristika vermittelt werden, die für die weiteren Produktionsschritte notwendig sind und die Effizienz der Produktion steigern. Beispielsweise wird über den IgK-Leader eine Sekretion des exprimierten Proteins in den Kulturüberstand initiiert. Das Protein kann so durch ein einfaches Sammeln des Kulturüberstandes der Purifikation zugänglich gemacht werden. Die hier durchgeführte Klonierung wurde mittels eines kommerziell erwerblichen Kits durchgeführt und entspricht den gängigen Standards.

Das hier verwendete Farlet-scFv-Fragment beruht auf dem Fv-Fragment des monoklonalen IgG-Antikörpers (mAb) Farletuzumab. Farletuzumab ist ein humanisierter mAb, der gegen den FR α gerichtet ist. Die Sicherheit dieses monoklonalen Antikörpers wurde bereits in Phase I und II Studien klinisch geprüft (Sato und Itamochi 2016). Um die beiden Domänen des Fv-Fragments zu verknüpfen, wurde ein (Gly₄Ser)₃-Linker verwendet. Dieser Linker verfügt über eine gute Flexibilität und ermöglicht so die korrekte räumliche Orientierung der variablen Domänen zueinander (Bird et al. 1988; Huston et al. 1988). Dieser Linker wurde auch in der gesichteten Literatur zu scFv-

basierten Molecular-Imaging-Ansätzen am häufigsten verwendet (Lu et al. 2021; Khantasup et al. 2018; Sato et al. 2014; Hussain et al. 2019b; Kampmeier et al. 2010; Kampmeier et al. 2009). Für das Design des scFv-Fragments wird im Allgemeinen ein korrespondierender mAb ausgewählt, dessen Fv-Fragment als Grundlage für die Herstellung des scFv-Fragments verwendet wird. Die Gene für die VH- und VL-Region werden beispielsweise aus Hybridom-Zelllinien gewonnen, die diese mAbs sezernieren (Toleikis und Frenzel 2012; Ahmad et al. 2012). In der Literatur gibt es verschiedene Ansätze für dieses scFv-Design. Lu et al. haben ein anti-EGFR-scFv verwendet, das basierend auf dem mAb Nimotuzumab entwickelt wurde (Lu et al. 2021). Nimotuzumab wurde bereits in mehreren klinischen Studien hinsichtlich seiner Effektivität und Sicherheit geprüft und wurde in mehreren Ländern zur Therapie von Plattenepithelkarzinomen und pädiatrischen Gliomen zugelassen (Yang et al. 2015; Parenrengi et al. 2022). Kessler et al. haben einen anti-PCSA-scFv-Antikörper verwendet, dessen Fv-Fragment auf einem affinitätsgereiften Minibody beruht. Grundlage für diesen Minibody war der humanisierte mAb huIG8. Diese beiden Antikörper wurden bisher präklinisch evaluiert, weder der affinitätsgereifte Minibody noch huIG8 waren bisher Gegenstand klinischer Studien (Kessler et al. 2017; Olafsen et al. 2007). Khantasup et al. haben einen gegen α EpCAM gerichteten humanisierten scFv verwendet, den sie basierend auf einem in ihrer Arbeitsgruppe entwickelten und *ex vivo* evaluierten mAb hergestellt haben (Khantasup et al. 2018; Chantima et al. 2017).

Für die Auswahl der passenden VH- und VL-Domäne muss zudem berücksichtigt werden, welche Frage mit dem zugrundeliegenden Projekt beantwortet werden soll. Bei Khantasup et al. sowie bei Kessler et al. wurde eine weitere Anwendungsmöglichkeit eines in der präklinischen Entwicklung befindlichen monoklonalen Antikörpers beziehungsweise für dessen CDR untersucht. Fehlende klinische Studien sind hier eine wichtige Einschränkung, da sie, auch wenn eine eingeschränkte Übertragbarkeit berücksichtigt wird, keine Aussage darüber zulassen, ob die Spezifität und Sensitivität des gewählten Antikörpers im humanen Organismus vorteilhaft sind. Lu et al. dagegen bedienen sich mit der VH- und VL-Domäne des mAb Nimotuzumab eines Antikörpers, der bereits klinisch evaluiert ist. Fokus ist also nicht die Entwicklung eines neuen Antikörpers, sondern die Optimierung der Verwendung bereits evaluierter CDR, in dem diese in ein neues Antikörpergerüst (scFv-Fragment) implementiert werden. Es muss also unterschieden werden, ob der Fokus darauf liegt, eine neue CDR mittels verschiedener

präklinischer Studien zu evaluieren oder ob die Anwendung einer bereits etablierten CDR optimiert werden soll. Zielsetzung der Entwicklung unserer scFv-Fluorophor-Konjugate ist der perspektivische klinische Einsatz zur intraoperativen Detektion von Endometrioseherden. Hieraus ergibt sich, dass bereits beim scFv-Design möglichst klinisch gedacht werden sollte. Daher ist es am sinnvollsten als Grundlage eines scFv-Fragments einen monoklonalen IgG-Antikörper zu verwenden, der bereits im Rahmen klinischer Studien evaluiert wurde. Außerdem sollte darauf geachtet werden humanisierte monoklonale Antikörper zu verwenden, da bei diesen die potenzielle Immunogenität am geringsten ist (Jabbour et al. 2021; McDonagh et al. 2006). Die Sensitivität und Spezifität eines Antikörpers wird maßgeblich durch die CDR beeinflusst. Antikörperderivate wie scFv-Fragmente können zwar über dieselben CDR wie IgG-Antikörper verfügen, haben im Vergleich zu diesen aber andere pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften, beispielsweise aufgrund der größeren Molekülstruktur und dem Fc-Fragment. Aus diesem Grund können die Erkenntnisse, die in Studien mit einem IgG-Antikörper erhoben worden sind, nur eingeschränkt auf scFv-Fragmente übertragen werden. Dennoch erscheint es sinnvoll als Grundlage für die Entwicklung eines scFv-Fragment, das perspektivisch klinisch eingesetzt werden soll, die CDR eines IgG-Antikörpers zu wählen, dessen Sensitivität und Spezifität bereits in klinischen Studien geprüft wurden. Eine vollständige eigenständige Evaluation des hergestellten scFv-Fragments in weiteren Studien ist allerdings weiterhin notwendig.(Jabbour et al. 2021; McDonagh et al. 2006).

4.1.2. Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinexpression

HEK293T-Zellen wurden erfolgreich mit den Plasmiden pMS-Farlet-scFv-SNAP, pMS-425-scFv-SNAP, pMS- α EpCAM-scFv-SNAP und pMS-CSPG4-scFv-SNAP transient transfiziert und die Proteinexpression wurde induziert. Die Plasmide enthielten ein Zeocinresistenzgen, durch Kultivierung in einem Zeocin-haltigem Medium erfolgte so eine effiziente Selektion transfizierter Zellen. Zudem wurde über eine IRES EGFP mit dem Fusionsprotein koexprimiert, wodurch eine einfache optische Kontrolle der Expression möglich war. Die IgK-Leadersequenz bewirkt die Sekretion des Fusionsprotein in den Kulturüberstand und ermöglicht über das Sammeln des Kulturüberstands eine einfache Möglichkeit zur Anreicherung des Fusionsproteins. Ein weiterer Vorteil der Sekretion der Fusionsproteine in den Kulturüberstandes ist, dass die tatsächliche Expression der Fusionsproteine bereits während der Expressionsphase

schnell kontrolliert werden kann. Um die Präsenz und Aktivität des SNAP-tag nachzuweisen wurde Kulturüberstand mit BG-modifiziertem Alexa488 inkubiert und das Alexa488-Signal in einem SDS-Gel dargestellt. Zur Kontrolle der Aktivität des scFv-Fragments wurde die Bindung an Zelllinien, die das entsprechende Antigen exprimieren, in der Durchflusszytometrie untersucht.

Die Auswahl eines geeigneten Expressionssystems ist ein wichtiger Faktor in der Produktion von scFv-Fragmenten, um ein funktionierendes Protein in ausreichender Menge zu erhalten. Häufig verwendete Expressionssysteme sind *E.coli*, *Pichia pastoris* und Säugetierzellen wie CHO-Zellen und HEK293-Zellen (Brondyk 2009). Alle der genannten Expressionssysteme wurden bereits erfolgreich zur Produktion von scFv-Fragmenten eingesetzt (Kessler et al. 2017; Sato et al. 2014; Yakushiji et al. 2019; Duranti et al. 2018).

Für die Expression von scFv-SNAP-tag-Fusionsproteinen wurden in der Literatur mit gutem Erfolg HEK293T-Zellen verwendet (Hussain et al. 2019b; Hussain et al. 2011; Kampmeier et al. 2010; Kampmeier et al. 2009). Aus diesem Grund wurde dieses Expressionssystem auch zur Produktion der hier verwendeten rekombinanten Fusionsproteine genutzt. HEK293T-Zellen sind eine genetisch modifizierte Version der HEK293-Zellen, die das SV40-T-Antigen exprimieren. Dies ermöglicht für Vektoren, die den „SV40-origin of replication“ tragen, eine Erhöhung der Anzahl an Plasmidkopien in den transfizierten Zellen (Baldi et al. 2007). Der pSEC-Tag2-modifizierte pMS-Vektor, der in dieser Arbeit verwendet wurde, enthält ebenfalls diesen „SV40-origin of replication“. Ein Vorteil von Säugetierzellen ist, dass sie den anderen Expressionssystemen in der Komplexität der Faltung und der Vielfalt an möglichen posttranslationalen Modifikationen überlegen sind. Außerdem verfügen sie über ein humanes Glykosylierungsmuster. Diese Faktoren sind wichtig, damit die rekombinanten Proteine ihre volle Bioaktivität entfalten können, zudem wird die Immunogenität reduziert (Baldi et al. 2007; Brondyk 2009; Mark et al. 2022). Der Proteinertrag ist bei Säugetierexpressionssystemen hoch (Dübel et al. 2019). Mithilfe des IgK-Leaders wird das rekombinante Protein ebenfalls sezerniert, dies ermöglicht die Anreicherung des Proteins im Kulturüberstand und erleichtert die Proteingewinnung, da der Kulturüberstand unkompliziert abgeschöpft werden kann. Dies hat beispielsweise im

Vergleich zu *E.coli* den Vorteil, dass das rekombinante Protein nicht als unlösliche und inaktive Einschlusskörper ausfällt (Brondyk 2009).

Es kann zwischen einer stabilen und einer transienten Transfektion unterschieden werden. Die stabile Transfektion führt zu einer langfristigen Produktstabilität und ist zu bevorzugen, wenn die rekombinanten Proteine klinisch eingesetzt werden sollen. Allerdings ist sie im Vergleich zur transienten Transfektion teuer, zeit- und arbeitsaufwendig und erfordert einen höheren Sicherheitsstandard. Aus diesen Gründen ist die transiente Transfektion für Forschungsansätze hinreichend effektiv (Frenzel et al. 2013).

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass die transiente Transfektion von HEK293T-Zellen eine geeignete Methode zur präklinischen Evaluation der rekombinanten scFv-SNAP-Antikörper ist. Stärken der Methode sind die schnelle und kostengünstige Produktion des gewünschten Proteins und die Vorteile, die sich aus der Verwendung von Säugetierexpressionssystemen ergeben. Für eine perspektivische klinische Evaluation sollte allerdings eine Umstellung auf eine stabile Transfektion eines Expressionssystems, wie beispielsweise CHO-Zellen oder HEK293-Zellen, erwogen werden (Brondyk 2009; Mark et al. 2022). Als Kritikpunkt an dem in dieser Arbeit verwendeten Protokolls muss erwähnt werden, dass zur Optimierung der Proteinproduktion eine Selektion stark exprimierender HEK293T-Zellen beispielsweise mittels GFP-Signal-gesteuerter Zellsortierung eine sinnvolle Ergänzung darstellen würde. Außerdem wurde für die Kultivierung der HEK293T-Zellen RPMI-Medium mit 10 % FBS-Zusatz verwendet, während FBS für das Zellwachstum einige vorteilhafte Eigenschaften aufweist, wie beispielsweise ein Fördern der Zellproliferation, muss kritisch angemerkt werden, dass die exakte biochemische Zusammensetzung des FBS unbekannt ist und zwischen verschiedenen Chargen variieren kann. Dies kann Einfluss auf die Proteinexpression haben und so eine Störvariable hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse darstellen (Mark et al. 2022). Ein Ansatz zur Verbesserung ist beispielsweise die Verwendung von Serum-freien Medium mit einer definierten und reproduzierbaren Zusammensetzung (Mark et al. 2022).

4.1.3. Proteinpurifikation mittels IMAC

Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mittels Ni-NTA-IMAC aus dem Kulturüberstand gewonnen (Abbildung 6). Die rekombinanten Fusionsproteine Farlet-scFv-SNAP, CSPG4-scFv-SNAP, 425-scFv-SNAP und α EpCAM-scFv-SNAP konnten in hoher Konzentration purifiziert werden (Tabelle 12).

Die Purifikation von rekombinanten Antikörperfragmenten erfolgt in der Regel mithilfe einer Affinitätschromatographie (Dübel et al. 2019; Huse et al. 2002). Eine Herausforderung bei der Purifikation der hier verwendeten rekombinanten Fusionsproteine ist, dass diese in einen serumhaltigen Kulturüberstand sezerniert werden, aus dem sie wieder extrahiert werden müssen. Da das Serum eine Störvariable hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sein kann, ist eine Purifikation unabdingbar (Huse et al. 2002). Im Allgemeinen gibt es verschiedene Purifikationsmethode, je nach zu extrahierendem Protein kann eine andere Methode sinnvoll sein. Zu berücksichtigende Faktoren sind dabei, dass Struktur und Funktion des Proteins erhalten bleiben müssen, zudem müssen bei der Wahl der Purifikationsmethode der erwünschte Proteinertrag und Reinheitsgrad sowie die Kosten berücksichtigt werden (Huse et al. 2002). In der gesichteten Literatur zur Produktion von scFv-Fragmenten nahm die IMAC eine zentrale Rolle ein. In den meisten Fällen wurde eine Methode gewählt, die auf der Bindung des His-tag mittels IMAC beruhte (Khantasup et al. 2018; Kessler et al. 2017; Sato et al. 2014; Frigerio et al. 2013; Duranti et al. 2018; Kampmeier et al. 2010; Kampmeier et al. 2009; Hussain et al. 2011). Ein Beispiel für einen anderen Tag ist der von Lu et al. verwendete Glutathion-S-Transferase (GST)-tag (Lu et al. 2021). Proteine, die einen GST-tag aufweisen können per Glutathion-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Malhotra 2009). Der GST-tag kann zudem die Löslichkeit von Proteinen erhöhen, dies kann insbesondere dann sinnvoll sein, wenn *E.coli* als Expressionssystem verwendet werden, um die Wahrscheinlichkeit für das Ausfällen unlöslicher Einschlusskörper zu minimieren (Brondyk 2009). Da Lu et al. ebenfalls *E.coli* als Expressionssystem verwendet haben, könnte dies möglicherweise der Grund für die Verwendung des GST-tags sein (Lu et al. 2021; Lu et al. 2016).

Der 6xHis-tag ist ein kurzer Peptidtag bestehend aus sechs Histidin-Molekülen, der gentechnisch an das zu extrahierende Protein gebunden wird. Über den Imidazolring des Histidins kann eine koordinative Bindung an Nickel-, Zink- oder Cobaltionen formiert werden. Diese Funktion wird sich bei der Ni-NTA-IMAC zu Nutze gemacht (Malhotra 2009; Dübel et al. 2019). Die Elution erfolgt über die Behandlung der Säule mit einem Puffer der Imidazol in hoher Konzentration enthält. Ein Vorteil dieser Methode sind die milden Elutionsbedingungen (Dübel et al. 2019; Malhotra 2009). Wie in Abbildung 6b und 6c ersichtlich, konnte mittels der Ni-NTA-IMAC das His-tag-scFv-SNAP-Fusionsprotein gut aus dem FBS-haltigen Kulturüberstand aufgereinigt werden. Durch die niedrige bis mittlere Imidazolkonzentration im Bindungspuffer und Waschpuffer konnten schwach gebundene Proteine aus dem Medium erfolgreich aus der Säule entfernt werden, bevor mit dem Elutionspuffer das rekombinante Fusionsproteine eluiert wurde. In der In-Gel-Visualisierung des BG-488 in Abbildung 6b zeigt sich allerdings, dass sowohl im Durchfluss als auch in Bindungs- und Waschpuffer ein BG488-Signal zu erkennen ist. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Menge an Fusionsprotein und generell Proteinen mit der die Säule beladen wurde die Bindungskapazität der Säule überschritten hat. Um dieses Problem zu beheben, können Puffer, in denen eine Präsenz des Fusionsproteins im SDS-Gel per In-Gel-Visualisierung dargestellt wurde, einer zweiten Ni-NTA-IMAC zugeführt werden. Beachtenswert ist zudem, dass in der BG488-In-Gel-Visualisierung im Elutionspuffer zwei schwache BG488-Signale im Größenbereich von etwa 110 kDa und etwa 180 kDa zu sehen sind. Im Waschpuffer zeigt sich ebenfalls im Bereich von etwa 180 kDa ein Signal (Abbildung 6b). Dies lässt sich dadurch erklären, dass es in geringem Ausmaß zu einer Dimerisierung beziehungsweise Trimerisierung des scFv-SNAP-Fusionsproteins gekommen sein könnte. Dieses Phänomen ist für scFv-Fragmente beschrieben worden (Arndt et al. 1998). Um die Monomere von den Oligomeren zu trennen, kann eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt werden. Dies wurde auch von Sato et al. durchgeführt, um scFv-Monomere von scFv-Dimeren zu trennen (Sato et al. 2014). Gegen diese Erklärung spricht, dass scFv-Fragmente mit einer Linkerlänge von über 12 Aminosäuren, wie in diesem Projekt verwendet, laut Literatur am häufigsten Monomere bilden und Dimere und Trimere erst bei kürzeren Linkerlängen bevorzugt auftreten (Hudson und Kortt 1999). Eine weitere Erklärung für das Auftreten verschiedener Größenfraktionen wird von Duranti et al. geliefert. In einer SEC ihres scFv-Fragments zeigten sich sowohl

Fraktionen mit einer größeren Größe als erwartet, als auch mit einer kleineren Größe (Duranti et al. 2018). Die Autoren führten die größere Fraktion auf eine Aggregation zurück und die kleinere Fraktion auf eine Degradierung des scFv-Fragments und interpretierten dies in Zusammenschau mit einem niedrigen Proteinertrag als Zeichen einer instabilen Struktur des scFv-Fragments. Nach Austausch eines Phenylalanin mit einem Cystein per zielgerichteter Mutagenese konnte ein stabiles scFv-Cis-Fragment produziert werden, bei dem in der SEC keine unerwarteten Peaks auftraten (Duranti et al. 2018). Mit Blick auf die erhaltene Funktion des SNAP-tag in den Banden bei 180 und 100 kDa und des hohen Proteinertrags von 2 µg/µl für Farlet-scFv-SNAP erscheint die Oligomerisierung hier als wahrscheinlichere Erklärung. Um eine abschließende Erklärung geben zu können sind aber dennoch weitere Analysen notwendig, beispielsweise eine SEC mit anschließender Aktivitätskontrolle der einzelnen Fraktionen mittels Durchflusszytometrie.

Nach der Purifikation besteht die Möglichkeit Tags von den rekombinanten Proteinen abzuspalten (Malhotra 2009). Für manche Tags wird dies regelhaft durchgeführt, beispielsweise beim GST-Tag (Harper und Speicher 2011). Gründe hierfür können sein, dass große Tags die korrekte Proteinfaltung unterbinden können und sich so negativ auf die Funktion auswirken können. Um eine Abspaltung des Tags zu ermöglichen, muss zwischen Tag und Protein ein Spaltungsmotiv vorhanden sein, an das Proteasen binden können (Malhotra 2009). Für den His-Tag ist eine Abspaltung in der Regel nicht notwendig, da er die Struktur der Proteine nicht signifikant beeinflusst (Carson et al. 2007). In der Literatur finden sich Beispiele für scFv-SNAP-Antikörper, die mit einem His6-Tag versehen sind und eine gute Funktion aufweisen (Kampmeier et al. 2010; Kampmeier et al. 2009). Basierend auf diesen Studien wurde der His-Tag bei den in dieser Arbeit verwendeten scFv-SNAP-Antikörpern, einschließlich des neuen Farlet-scFv-SNAP, belassen.

Zusammenfassend gibt es verschiedene Methoden zur Proteinpurifikation und verschiedene Tags, mithilfe derer die Proteine gebunden werden können. Es ist nicht möglich eine bestimmte Methode als obligat überlegen zu benennen. Je nach Anforderungen sind bestimmte Methoden vorteilhaft. Daher ist es sinnvoll sich bei der Auswahl der verwendeten Methode an dem jeweiligen rekombinanten Protein zu orientieren und die für das spezifische Vorhaben beste Methode individuell auszuwählen.

In diesem Projekt wurden die Ni-NTA-IMAC und der His-tag ausgewählt. Gründe für diese Auswahl sind die milden Elutionsbedingungen, dass der His-Tag die Funktion der scFv-Fragmente nicht beeinflusst und daher nicht nachträglich entfernt werden muss, sowie dass sich in der Literatur weitere Arbeiten finden, bei denen scFv-SNAP-Fusionsproteine mit gutem Erfolg mit dieser Methode purifiziert worden sind.

4.1.4. Konjugation mit BG-modifizierten Fluorophoren und Analyse der Antigenbindung

Das Fusionsprotein Farlet-scFv-SNAP-BG-Fluorophor zeigte nach Konjugation mit einem BG-modifizierten Fluorophor eine erhaltene Funktionsfähigkeit. Sowohl die antigenbindenden Eigenschaften des scFv-Anteils (Abbildung 9) als auch die autokatalytischen Eigenschaften des SNAP-tags (Abbildung 8) wurden demnach durch die gentechnische Fusion von scFv-Fragment und SNAP-tag sowie durch die nachfolgende Konjugation mit dem Fluorophor nicht beeinträchtigt. Es konnte damit erstmal gezeigt werden, dass die SNAP-tag-Technologie ein geeignetes Mittel ist, um ein gegen den FR α -gerichtetes scFv-Fluorophor-Konjugat herzustellen.

Die durch den SNAP-tag vermittelte Konjugation der Fusionsproteine Farlet-scFv-SNAP, 425-scFv-SNAP, α EpCAM-scFv-SNAP und CSPG4-scFv-SNAP mit einem BG-modifizierten Fluorophor verfügt über eine hohe Konjugationseffizienz (Abbildung 8).

Die Konjugation nimmt in der Produktion von AWK eine zentrale Rolle ein. In der Literatur finden sich bestimmte Anforderungen, die bei der Konjugation von Antikörperfragmenten mit Wirkstoffen erfüllt sein sollten. Eine effektive Konjugation muss sowohl die Funktionalität beider Konjugationspartner erhalten als auch ein verlässlich reproduzierbares Endprodukt erzielen. Voraussetzung hierfür ist, dass das pharmakodynamische und -kinetische Profil des Endprodukts fest definiert ist. Dies ist dann der Fall, wenn ein möglichst hoher Grad an Homogenität des Endprodukts erreicht wird. Eine Konjugation, die die Funktionalität des Antikörpers erhält, wird als inert bezeichnet (Cohen et al. 2011; Ducry und Stump 2010; Panowski et al. 2014). Nach der Wahl des Wirkstoffs sind weitere wichtige Faktoren für das Erzielen einer inerten Konjugation und eines homogenen Produkts mit kontrollierbaren pharmakodynamischen und -kinetischen Profils der Konjugationsort, das Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis und die Konjugationseffizienz (Panowski et al. 2014; Strop et al. 2013; Hamblett et al. 2004).

Zur Konjugation gibt es verschiedene Ansätze, der am weitesten verbreitete Ansatz ist die Verwendung von Aminosäure-Reste, die bereits in der nativen Struktur des Antikörpers vorkommen. Die am häufigsten verwendeten Konjugationsmethoden bedienen sich natürlich vorkommender Lysin- oder Cystein-Reste. Es gibt bereits einige von der FDA zugelassene Antikörper-Konjugate, die mittels dieser Methoden hergestellt worden sind (Katz et al. 2011). In der Literatur finden sich ebenfalls Beispiele für scFv-Fluorophor-Konjugate, die mittels Lysin-Konjugation hergestellt worden sind (Sato et al. 2014; Duranti et al. 2018). Der zentrale Vorteil dieser Methoden ist, dass keine Modifikation des Antikörpers zwecks Hinzufügens einer zusätzlichen Reaktionsseite notwendig ist, allerdings weisen diese Methoden Schwächen auf, die im Folgenden dargelegt werden sollen.

Sowohl Lysinreste als auch Cysteinreste kommen mehrfach in Antikörpern vor. Ein typisches IgG-Molekül enthält 40 Lysinreste und acht Cysteinreste¹, das Farlet scFv-Molekül enthält beispielsweise sieben Lysinreste², dies führt zu einer unzureichenden Kontrolle über den Konjugationsort und das entstehende Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis (WAV)³ (Panowski et al. 2014). Gibt es beispielsweise nur zwei zur Verfügung stehende Lysinreste, ergeben sich hieraus bereits vier verschiedene Produkte, mit potenziell vier verschiedenen pharmakologischen und funktionellen Charakteristika. Diese Konjugationsmethoden definieren demnach zwar die jeweiligen nativ vorkommenden Aminosäuren als Konjugationspartner, aufgrund der Mehrfachvorhandenheit dieser Aminosäuren in einem Antikörper, kann der genaue Konjugationsort aber nicht bestimmt werden. Außerdem kann nicht die Anzahl an Konjugationsereignissen kontrolliert werden. Dies führt zu einem insgesamt heterogenen Produktgemisch (Panowski et al. 2014). Prinzipiell kann zwar durch weitere Reinigungsschritte eine höhere Homogenität erzielt werden, beispielsweise durch

¹ Für die Konjugation werden vier Disulfidbrücken zwischen den Antikörperketten reduziert und die freiwerdenden acht Cysteine verwendet.

² Da für die Cysteinkonjugation nur Interketten-Cysteine verwendet werden erfolgt keine Konjugation an native Cysteine der scFv, sondern es werden gentechnisch eingefügte Cysteinreste verwendet. Anzahl der Lysinreste in Farlet-scFv übernommen aus SNAPGene Analyse des Vektors pMS-Farlet-scFv-SNAP

³ Lysinkonjugation: WAV 0-40, über eine Million AWK-Subtypen, Cysteinkonjugation: WAV 0-8, über 100 AWK-Subtypen Panowski et al. 2014

Anschließen einer SEC an den Konjugationsschritt, dies führt aber zu einem aufwendigeren Protokoll. Eine optimale Konjugationsmethode definiert also nicht nur den Konjugationspartner, sondern auch den genauen Konjugationsort und ermöglicht die Kontrolle über die Anzahl an ablaufenden Konjugationen.

Ein Ansatz hierfür ist das Einfügen von Reaktionsseiten in den Antikörper, die mit definierten Reaktionspartnern eine Konjugation eingehen. Beispiele hierfür sind unnatürliche Aminosäuren wie p-Acetylphenylalanin und Selenocysteine oder das Einfügen von enzymatischen Tags wie der SortaseA und dem SNAP-tag. Durch die seitenspezifische Konjugation wird so ein homogeneres Endprodukt erreicht (Panowski et al. 2014; Kampmeier et al. 2009; Popp et al. 2009). Das Einfügen spezifischer Konjugationsseiten ermöglicht somit eine Kontrolle über den definitiven Konjugationsort. Werden mehr als eine Konjugationsseite eingefügt, können folglich auch wieder verschiedenen Konjugationsorte vorkommen. Für AWK mit einem angestrebten WAV von eins ist es demnach sinnvoll eine einzelne spezifische Konjugationsseite einzufügen. Die gentechnische Modifikation von Antikörpern mit diesen Konjugationsseiten ermöglicht auch die Wahl des optimalen Ortes innerhalb des Moleküls, ohne die funktionellen Charakteristika des Antikörpers zu beeinträchtigen bei gleichzeitig guter Zugänglichkeit des Konjugationsortes (Panowski et al. 2014; Junutula et al. 2008a). Die Homogenität des Endprodukts ist in diesem Fall nur noch von der Konjugationseffizienz abhängig. Eine hierfür optimale Konjugationsmethode muss also über eine hohe Konjugationseffizienz (nahe 100 %) verfügen. Die SNAP-tag Technologie erfüllt diese Bedingungen, da sie spezifisch mit BG-modifizierten Wirkstoffen reagiert und über eine hohe Konjugationseffizienz verfügt (Abbildung 8) (Kampmeier et al. 2009).

Die Auswahl des passenden WAV ist von verschiedenen Variablen abhängig. Bezogen auf die Herstellung von AFK besteht in der Literatur kein Konsens über das optimale Verhältnis von Fluorophoren pro Antikörper. Vira et al. haben den Einfluss verschiedener Fluorophor-Antikörper-Verhältnisse auf den Anteil inaktiver und unkonjugierter Antikörper untersucht. Sie benennen ein Verhältnis von 2,8 als optimal und ein Verhältnis zwischen 1,6 und 5 als ausreichend gut (Vira et al. 2010). Rijpkema et al., empfehlen ein Verhältnis von 1 – 1.5 Fluorophoren pro Antikörper, fügen allerdings ergänzend hinzu, dass das optimale Verhältnis für jeden Antikörper individuell bestimmt werden sollte

(Rijpkema et al. 2015). Vor dem Hintergrund, dass AFK mit mehr als einem Fluorophor eine erhöhte Leberaufnahme und eine schnellere Blutclearance zeigen, empfehlen Cohen et al., ein Verhältnis von 1:1 (Cohen et al. 2011). Außerdem muss beachtet werden, dass der Konjugationsmechanismus bei der Angabe des optimalen Fluorophor-Antikörper-Verhältnisses eine wichtige Rolle spielt. Die Empfehlungen von Vira et al. und Rijpkema et al. müssen vor dem Hintergrund interpretiert werden, dass sie sich auf Lysin-NHS-Konjugate beziehen (Rijpkema et al. 2015; Vira et al. 2010).

Auch wenn in der Literatur keine allgemeingültige Angabe zur optimalen Anzahl von Fluorophoren pro Antikörper gefunden werden kann, lassen sich einige Ergebnisse finden, die bei der Auswahl des richtigen Verhältnisses unterstützen können. So führt ein hohes WAV zu einer schnelleren Clearance des Konjugats aus dem Blut (Hamblett et al. 2004; Rijpkema et al. 2015; Cohen et al. 2011) und zu einem größeren Verteilungsvolumen (Hamblett et al. 2004). Ein größeres Verteilungsvolumen ist nicht wünschenswert, da die AFK zur kontrastreichen Darstellung hauptsächlich am Zielort akkumulieren sollen. Bei einem zu hohen WAV kann es außerdem zu einer Abnahme der Fluoreszenz-Intensität und der Bildqualität kommen (Tadatsu et al. 2006).

Bei der Auswahl des optimalen WAV müssen auch die Charakteristika der verwendeten Antikörperklasse beachtet werden. Die Angaben zum optimalen WAV, die in der Literatur zu finden sind, beziehen sich auf IgG-Antikörper (Rijpkema et al. 2015; Vira et al. 2010). Von einer vollständigen Übertragbarkeit dieser Annahmen auf die hier verwendeten scFv-Fragmente kann nicht ausgegangen werden. Während IgG-Antikörper beispielsweise eine lange Zirkulationszeit aufweisen, zeigen scFv-Fragmente aufgrund ihrer geringen Größe eine schnelle Clearance-Rate (Rath et al. 2015; Fu et al. 2018; Dammes und Peer 2020). Dies muss bei der Wahl des optimalen WAV berücksichtigt werden, da hohe WAV die Clearance-Rate beschleunigen (Hamblett et al. 2004; Rijpkema et al. 2015; Cohen et al. 2011). Es kann die Annahme aufgestellt werden, dass scFv-Fragmente sensibler auf diese Zunahme der Clearance-Rate reagieren als die IgG-Antikörper, die aufgrund ihrer Größe und des Fc-Fragments eine lange Zirkulationszeit haben.

Basierend auf diesen Überlegungen wurde in diesem Projekt bei der Herstellung des rekombinanten Fusionsproteins ein Ziel-WAV von eins gewählt. Dies entspricht den

Empfehlungen von Rijpkema et al. und Cohen et al. Die prinzipielle Effektivität von scFv-SNAP-basierten AFK, die ein maximales WAV von eins anstreben konnte von Kampmeier et al. sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* bereits dargestellt werden (Kampmeier et al. 2010). Auch wenn diese Ergebnisse die Auswahl eines Ziel-WAV von eins unterstützen, muss einschränkend erwähnt werden, dass das optimale WAV für die verschiedenen scFv-Antikörper individuell im Rahmen weiterer Studien bestimmt werden sollte, da konkrete Empfehlungen zum optimalen WAV bei scFv-Fluorophor-Konjugaten in der Literatur nicht vorhanden sind.

Um dieser Einschränkung Rechnung zu tragen, soll im Folgenden kurz erläutert werden, welche Möglichkeiten es gibt scFv-SNAP-Fluorophor Konjugate mit einem WAV größer eins herzustellen.

Es erscheint auf den ersten Blick naheliegend, dass eine Konjugationsmethode wie die SNAP-tag Technologie mit einem maximalen WAV von eins für AFK, die ein WAV größer eins anstreben, ungeeignet ist und dass in diesem Kontext Konjugationsmethoden, der Vorzug gegeben werden sollte, die ein höheres WAV ermöglichen. Bei genauerer Betrachtung erweist sich dies als nur eingeschränkt zutreffend. Wie bereits dargelegt, führt das Vorhandensein mehrerer gleicher Konjugationsseiten zu einem Kontrollverlust über den genauen Konjugationsort. Zudem ist auch die Kontrolle über das WAV nur eingeschränkt möglich. Verfügt ein Antikörper beispielsweise über vier einer Konjugation gleichermaßen gut zugänglichen gleichen Reaktionsseiten - beispielsweise vier Lysinreste - sind WAV von null bis vier möglich. Ein homogenes Produkt würde hier nur bei einer Konjugationseffizienz von null Prozent (WAV null) oder von 100 % (WAV vier) entstehen. Für ein WAV zwischen eins bis drei müsste eine niedrigere Konjugationseffizienz gewählt werden, mit dem Ergebnis eines heterogenen Produktgemisches mit einem durchschnittlichen WAV. Das Ausmaß der Kontrolle über das entstehende Produktgemisch ist dabei gering, es kommt nicht nur zu einem heterogenen Produktgemisch bezogen auf das WAV, sondern innerhalb eines definierten WAV auch zu einer Heterogenität bezüglich des Konjugationsortes. Das gentechnische Einfügen von Konjugationsseiten ermöglicht mehr Kontrolle, da je nach gewünschtem WAV die benötigte Anzahl an Konjugationsseiten eingefügt werden kann. Durch das Verwenden verschiedener Konjugationsseiten können auch verschiedene Effektormoleküle gleichzeitig mit einem Antikörper konjugiert werden.

Zur Generierung von scFv-Fluorophor-Konjugaten mit einem WAV von zwei kann ein scFv-Molekül mit zwei SNAP-tags versehen werden. Dies kann aufgrund der hohen Konjugationseffizienz des SNAP-tags die Produktion von nahezu homogenen AFC mit einem WAV von zwei ermöglichen (Kampmeier et al. 2009). Zurzeit gibt es keine Studien, die einen scFv-Antikörper mit zwei SNAP-tags versehen. Wollschlaeger et al. haben allerdings einen anti-EGFR-scFv-Antikörper entwickelt, der zusätzlich zum SNAP-tag ebenfalls mit einem CLIP-tag versehen wurde (Wollschlaeger et al. 2018). Der CLIP-tag ist ähnlich wie der SNAP-tag eine gentechnisch modifizierte Version der humanen O⁶-AGT, die in einer Ein-Schritt-Reaktion unter physiologischen Bedingungen mit O²-Benzylcytosin-(BC)-modifizierten Molekülen reagiert. SNAP-tag und CLIP-tag können gleichzeitig mit einer Selektivität von 99 % mit den entsprechend modifizierten Substraten reagieren (Gautier et al. 2008). Die CLIP-EGFR-scFv-SNAP-Konjugate waren dazu in der Lage simultan und unabhängig voneinander BC- und BG-modifizierte Moleküle in einem einzigen Reaktionsansatz zu binden und dabei die Bindungseigenschaften des korrespondierenden scFv- respektive scFv-SNAP-Antikörpers zu erhalten (Wollschlaeger et al. 2018). Mithilfe des CLIP-tags könnte demnach ein weiteres BC-modifiziertes Fluorophor an das scFv-Fragment konjugiert werden, um ein optimales WAV zu erreichen. Zudem kann die Arbeit von Wollschlaeger et al. auch als Grundlage für die Produktion von scFv-Antikörpern mit zwei SNAP-tags genutzt werden, da sie die prinzipielle Funktionalität von scFv-Antikörpern, die mit zwei Tags versehen wurden, nachweist. Was bei Verwendung von CLIP-scFv-SNAP-Konstrukten unabhängig von den verwendeten Effektormolekülen beachtet werden muss, ist, dass das Molekulargewicht des Konstrukts vergrößert wird. Das von Wollschlaeger et al. hergestellte CLIP-EGFR-scFv-SNAP-Konstrukt hat eine Größe von 75 kDa verglichen mit 52 kDa eines EGFR-scFv-SNAP-Antikörpers.

Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung von BG-Molekülen, die mit mehr als einem Fluorophor beladen sind. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass nur das Substrat, nicht aber das scFv-Fragment modifiziert werden müssten und zudem die insgesamt Molekülgröße nur um die zusätzlichen Fluorophore steigen würde. Ein denkbarer Nachteil ist eine mögliche Fluoreszenzauslöschung (engl. Quenching), wenn ein BG-Molekül mit mehr als einem Fluorophor beladen wird (Vira et al. 2010).

Andere seitenspezifische Konjugationsmethoden eignen sich prinzipiell ebenfalls zur Konstruktion homogener AWK. Der Vorteil der SNAP-tag Technologie gegenüber diesen Methoden ist vornehmlich das einfache Protokoll mit Durchführung der Konjugation unter physiologischen Bedingungen in einem einzigen Reaktionsansatz. Khantasup et al. modifizieren beispielsweise zur Produktion ihres anti- α EpCam-scFv-Gd-Konstruktes das C-terminale Ende des scFv-Fragments mit einem Cystein-Rest und nutzen diesen zur Konjugation. Eine zentrale Schwäche dieses Verfahrens ist, dass es zwischen den Cystein-Resten einzelner scFv-Molekülen zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommt, die vor Durchführung der Konjugation mittels Reduktion gespalten werden müssen. Dies führt zu einem aufwendigeren Protokoll. In der zitierten Studie war dies für etwa 20 % der hergestellten anti- α EpCAM-scFv-Cys-Moleküle notwendig (Khantasup et al. 2018). Bei der SNAP-tag Technologie kommt es dagegen nicht zu einer solchen Dimerbildung.

Zusammenfassend ist die SNAP-tag Technologie eine geeignete Methode, um rekombinante scFv-Fluorophor-Konjugate herzustellen. Stärken der Methode sind die Seitenspezifität und die hohe Konjugationseffizienz. Eine Schwäche der SNAP-tag-Technologie ist, dass pro SNAP-tag nur ein Effektormolekül konjugiert werden kann, damit kann mit den hergestellten rekombinanten scFv-SNAP-Fusionsproteinen ein maximales WAV von eins erreicht werden. Ein Weg, um diese Limitation zu umgehen, ist die Produktion von scFv-Molekülen, die mehr als ein SNAP-tag enthalten oder die Konjugation von mehreren Fluorophoren an ein BG-Molekül.

4.1.5. Fazit und Ausblick

Die scFv-SNAP-Fusionsproteine verknüpfen die antigenbindenden Eigenschaften der scFv-Fragmente mit den autokatalytischen Eigenschaften des SNAP-tags. Hiermit wird eine Möglichkeit geschaffen seitenspezifisch und kontrolliert AWK herzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde dies anhand der Produktion der AFK 425-scFv-SNAP-BG-Fluorophor, α EpCAM-scFv-SNAP-BG-Fluorophor, CSPG4-scFv-BG-Fluorophor und Farlet-scFv-SNAP-BG-Fluorophor demonstriert. Es ist auch möglich mithilfe dieses Protokolls andere BG-modifizierte Wirkstoffe an die scFv-SNAP-Fusionsproteine zu konjugieren. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein rekombinantes

Fusionsprotein bestehend aus dem Farlet-scFv-Fragment und dem SNAP-tag hergestellt und evaluiert.

Hervorzuhebende Stärken der Arbeit sind die Passgenauigkeit der verwendeten Methode für die angestrebte klinische Nutzung des Fusionsproteins, dies zeigt sich vor allem in der Verwendung eines klinisch evaluierten Antikörpers als Grundlage zur Entwicklung des scFv-Fragments und in der Nutzung eines Expressionssystem, das humane posttranslationale Modifikationen ermöglicht. Zudem ermöglicht das Protokoll eine schnelle und simultane Produktion und Evaluation mehrerer verschiedener rekombinanter scFv-SNAP- Fusionsproteine, in diesem Projekt: Farlet-scFv-SNAP-BG-Fluorophor, 425-scFv-SNAP-BG-Fluorophor, α EpCAM-scFv-SNAP-BG-Fluorophor und CSPG4-scFv-SNAP-BG-Fluorophor. Besondere Stärken der SNAP-tag Technologie sind dabei die Möglichkeit bereits während der Expressionsphase mittels Inkubation des Kulturüberstandes mit BG-modifizierten Fluorophoren schnell und spezifisch die Expression des Zielproteins nachzuweisen, die schnelle Konjugation unter physiologischen Bedingungen mit hoher Konjugationseffizienz, sowie die Entwicklung homogener Produkte mit definiertem WAV und echter Seitenspezifität der Konjugation.

Im Folgenden sollen einige Möglichkeiten zur weiteren Optimierung des Protokolls aufgeführt werden.

Zur Selektion stark exprimierender transfizierter HEK293T-Zellen kann eine fluoreszenz-gesteuerte Zellsortierung durchgeführt werden. Um eventuelle Oligomere aus der eluierten Fraktion nach der IMAC zu entfernen kann an diese eine Größenausschlusschromatographie angeschlossen werden.

Die Bestimmung der Konjugationseffizienz erfolgte visuell-qualitativ, ergänzend kann dies um weitere quantitative Methoden wie beispielsweise eine Photometrie ergänzt werden (Kampmeier et al. 2009; Hussain et al. 2011). Zudem kann kritisiert werden, dass die Strichprobenzahl der untersuchten Zelllinien zur Kontrolle der Bindungsspezifität des Farlet-scFv-Fluorophor-Konjugats gering ist. Da es sich bei den untersuchten Zelllinien aber um gut untersuchte Zelllinien mit bekanntem Rezeptorstatus handelt, wurde die niedrige Stichprobenzahl akzeptiert (Siwowska et al. 2017; Wen et al. 2015).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Entwicklung von rekombinanten Proteinen ist die Beurteilung des immunogenen Potentials der Proteine. Die Immunogenität eines

rekombinanten Proteins hat Einfluss auf dessen Effektivität und pharmakologische Sicherheit. Für eine abschließende Beurteilung der Immunogenität sind klinische Studien notwendig, hierzu gibt es standardisierte Protokolle, mit denen die Immunogenität eines rekombinanten Proteins erfasst werden kann (Rosenberg und Sauna 2018). Nichtsdestotrotz können bereits beim Proteindesign Überlegungen hinsichtlich einer möglichen Immunogenität aufgestellt werden. Aus den Anfängen der antikörperbasierten Therapien ist bekannt, dass das Immunsystem auf murine Antikörper mit der Bildung von humanen anti-murinen Antikörpern reagiert. Die Immunogenität dieser Antikörper konnte mittels Humanisierung reduziert werden. Farletuzumab, dessen VH- und VL-Domäne zur Entwicklung des Farlet-scFv-Fragments verwendet wurden ist beispielsweise ebenfalls ein humanisierter Antikörper (Dübel et al. 2019). Ein weiterer Faktor, der die Immunogenität eines rekombinanten Proteins beeinflusst, ist die Auswahl des Expressionssystems, hier sind insbesondere posttranslationale Modifikationen wie die Glykosylierung potentiell immunogene Faktoren. Aus diesem Aspekt heraus ist es sinnvoll ein Expressionssystem zu wählen, das posttranslationale Modifikationen durchführen kann, die denen im humanen Organismus gleich oder zumindest sehr ähnlich sind. Die in diesem Projekt verwendeten HEK293T-Zellen sind aufgrund ihres humanen Ursprungs dazu in der Lage.

Neben diesen methodischen Aspekten zur Reduzierung der Immunogenität müssen auch funktionelle und strukturelle Eigenschaften der rekombinanten Proteine berücksichtigt werden. Da scFv-Fragmente über keine Fc-Domäne verfügen und so nicht mit dem Fc-Rezeptor interagieren, ist ihre Immunogenität geringer als die korrespondierender IgG-Antikörper (Chiu et al. 2019).

Der SNAP-tag ist ein weiterer Faktor, der zu einer erhöhten Immunogenität führen kann, da der Tag trotz seines humanen Ursprungs durch das gentechnische Einfügen von Mutationen verändert wurde (Hussain et al. 2013).

Auf Grundlage dieser Arbeit ergeben sich weitere Forschungsfelder. Zur Bestimmung des optimalen WAV für die rekombinanten scFv-SNAP-Fusionsproteine sowie zur weiteren Charakterisierung der pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften sind weitere *in vitro* und *in vivo* Studien notwendig. In diesem Kontext ist es sinnvoll Möglichkeiten zur Entwicklung von scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugaten mit einem

WAV größer eins zu evaluieren. Hierzu gehört die Entwicklung von scFv-Fragmenten, die über zwei SNAP-tags verfügen sowie die Kombination des SNAP-tags mit dem CLIP-tag.

Zudem sollten Anwendungsmöglichkeiten der rekombinanten scFv-SNAP-Fusionsproteine als diagnostisches, therapeutisches und theranostisches Tool evaluiert werden. Auf Basis dieser Überlegung wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Anwendung der entwickelten scFv-SNAP-Fusionsproteine zur Detektion endometrioider Antigene untersucht. Diese Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

4.2. Evaluation der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zur Detektion endometrioider Antigene

Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit war zu überprüfen, ob scFv-SNAP-Fusionsproteine dazu geeignet sind als Grundlage für die Entwicklung eines antikörperbasierten Bildgebungssystems zur Detektion von Endometriose verwendet zu werden. Dazu wurde die Fähigkeit der scFv-SNAP Fusionsproteine untersucht endometrioide Zelllinien *in vitro* zu erkennen.

Die Ergebnisse stellen dar, dass scFv-SNAP-Fusionsproteine dazu in der Lage sind Antigene auf endometrioiden Ziellinien sensitiv und spezifisch zu binden. Das Expressionslevel für die untersuchten Antigene auf den endometrioiden Zelllinien wurde mittels validierter IgG-Antikörper definiert. Die scFv-SNAP-Fusionsproteine zeigten dabei qualitativ das gleiche Bindungsverhalten wie die validierten IgG-Antikörper. Einschränkung muss hier erwähnt werden, dass sich bei der Untersuchung der 49Z-Zelllinie mittels IgG-Antikörper eine Expression von α EpCAM zeigte, es aber nicht möglich war ein Bindungssignal nach Inkubation mit α EpCAM-scFv-SNAP-BG647 zu detektieren. Da derselbe scFv-Antikörper in derselben Versuchsreihe eine Bindung an die α EpCAM-positive Zelllinie Ishikawa zeigte (Abbildung 10), kann davon ausgegangen werden, dass die Funktion des scFv-Antikörpers erhalten war. Das fehlende Bindungssignal an 49Z-Zellen kann also nicht auf eine Funktionslosigkeit des α EpCAM-scFv-Fragments zurückgeführt werden. Die Zelllinie 49Z zeigt im Vergleich zur Zelllinie Ishikawa allerdings eine geringer ausgeprägte Expression von α EpCAM (Tabelle 13). Die scFv-Antikörper verfügen im Vergleich zu IgG-Antikörpern über eine geringere Avidität (Fu et al. 2018). Zudem verfügt das scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugat nur über

ein einzelnes Fluorophor, während der sekundäre anti-Maus-IgG-Antikörper, der an den primären α EpCAM-IgG-Antikörper bindet, über mehrere Fluorophore verfügt, wodurch es pro gebundenem Antigen zu einem stärkeren Fluoreszenzsignal kommt. Eine mögliche Erklärung für das vorliegende Bindungsverhalten ist also, dass die primären α EpCAM-IgG-Antikörper aufgrund ihrer höheren Avidität eine bessere Bindung an die 49Z-Zellen zeigen und zudem der sekundäre anti-Maus-IgG-Antikörper aufgrund der mehrfach vorhandenen Fluorophore ein stärkeres Fluoreszenzsignal zeigt. Es ist zudem möglich, dass der α EpCAM-scFv-SNAP-BG647-Antikörper zwar an die 49Z-Zellen gebunden hat, die Signalstärke aufgrund des geringen α EpCAM-Expressionslevels der 49Z-Zellen und des 1:1 WAV des scFv-Antikörpers zu schwach war um durch das Durchflusszytometer detektiert zu werden.

Die Bindungseigenschaften der scFv-SNAP-Fusionsproteine an die endometrioiden Zelllinien konnten sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Die scFv-SNAP-Fusionsproteine konnten an die Oberfläche der Zellen binden und teils auch internalisiert werden. Zudem war ein Multiplex-Imaging mit der simultanen Verwendung mehrerer scFv-SNAP-Fusionsproteine möglich. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen damit, dass die scFv-SNAP-Fusionsproteine über vorteilhafte Eigenschaften für die Entwicklung eines antikörperbasierten Bildgebungssystems verfügen.

Hier ist vor allem die schnelle und effiziente Produktion der scFv-SNAP-Fusionsproteine zu nennen. Das hier verwendete und von Hussain et al. etablierte Protokoll ermöglichte die Produktion und Evaluation von scFv-SNAP-Fusionsproteinen in einem Zeitraum von etwa acht Wochen (Hussain et al. 2019b). Es war möglich darzustellen, dass die scFv-SNAP-Fusionsproteine sowohl über die Sensitivität und Spezifität der scFv-Fragmente verfügen als auch über die katalytischen Eigenschaften des SNAP-tags. Dadurch war es möglich BG-modifizierte Fluorophore mittels einer seitenspezifischen Reaktion mit definierter 1:1-Stöchiometrie an die scFv-SNAP-Fusionsproteine zu konjugieren. Dies ermöglicht die Herstellung homogener AFK. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt dargelegt, ist die Entwicklung homogener Produkte ein wichtiges Kriterium in der Entwicklung sicherer Produkte mit definierter Pharmakokinetik und -dynamik.

Die scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zeigten ein sensitives und spezifisches Bindungsverhalten an endometrioiden Zelllinien. Es konnte eine Bindung sowohl an Zelllinien epithelialen (12Z, 49Z, Ishikawa) als auch mesenchymalen Ursprungs (THESC) gezeigt werden. (Zeitvogel et al. 2001; T HESCs - CRL-4003 | ATCC 2023). Durch die Untersuchung des Bindungsverhaltens sowohl in der Durchflusszytometrie als auch in der Fluoreszenzmikroskopie, war es möglich das Bindungsverhalten der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate mit verschiedenen Modalitäten zu charakterisieren. Es konnte dargestellt werden, dass die 425-scFv-SNAP-Fusionsproteine, die gegen den EGF-Rezeptor gerichtet sind, dazu in der Lage sind eine Internalisierung der Antikörper-Rezeptor-Komplexe zu induzieren. Hier muss beachtet werden, dass die Internalisierung nicht nur von dem Antikörper abhängt, sondern auch von dem entsprechenden Rezeptor-Zielantigen. Daher kommt auch der Auswahl der Targets eine besondere Bedeutung zu. Eine Internalisierung ist für ein antikörperbasiertes Kontrastmittel eine wichtige Eigenschaft, weil es zu einer intrazellulären Anreicherung des AFK kommt. Diese Anreicherung führt zu einer kontrastreichen Darstellung (van Oosten et al. 2011). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch die gleichzeitige Anwendung mehrerer scFv-SNAP-Fusionsproteine möglich ist, ohne dass es zu einer gegenseitigen Beeinträchtigung der verwendeten Fusionsproteine gekommen ist. Zudem konnten bei der gleichzeitigen Verwendung von zwei scFv-SNAP-Fusionsproteinen mehr Zellen dargestellt werden als bei der Verwendung eines einzelnen scFv-SNAP-Fusionsproteins. Dies weist darauf hin, dass für die Entwicklung eines Bildgebungssystems sinnvoll ist, mehrere Antigene anzuvisieren, da die Detektion eines einzelnen Antigens im Allgemeinen weniger sensitiv und spezifisch für ein bestimmtes Gewebe ist, als die Darstellung eines Expressionsprofils mit mehreren Zielantigenen.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse weist die Arbeit einige wichtige Einschränkungen auf. Die Ergebnisse der Studie beziehen sich lediglich auf *in vitro* Untersuchungen von endometrioiden Zelllinien. Das Expressionsprofil von Zelllinien kann sich deutlich von der Expression in Gewebe unterscheiden. Eine Erklärung für diesen Umstand ist, dass durch die Kulturbedingungen wie beispielsweise die Zusammensetzung des Mediums die Expression bestimmter Antigene gefördert oder gehemmt werden kann. Ein Beispiel hierfür ist, dass etablierte Zelllinien bekannter FR α -positiver Malignome oft einen negativen FR α -Status aufweisen, dies könne laut Elnakat

et al. durch Rekombinationen im FR α -Genlocus oder die Langzeitwirkungen der Kulturbedingungen bedingt sein (Elnakat und Ratnam 2004). Die hier erhobenen Ergebnisse können demnach nur eingeschränkt auf *ex vivo* und *in vivo* Studien übertragen werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit weitere Experimente durchzuführen, die diese Lücke schließen. Zudem ist die Stichprobenzahl der Studie gering. Als weitere Einschränkung muss erwähnt werden, dass die Zelllinie Ishikawa zwar endometrioiden Ursprungs ist, es sich hier allerdings um eine Endometriumkarzinom-Zelllinie handelt (Nishida et al. 1985). Aufgrund des endometrioiden Ursprungs der Zelle wurde sie dennoch in die Untersuchungen eingeschlossen, da die primäre Zielsetzung des Projektes darin lag die Detektionsfähigkeit der scFv-SNAP-Fusionsproteine für endometrioide Antigene darzustellen. Die weitere Passgenauigkeit des Konzepts für die Darstellung von Endometriose muss im Rahmen weiterer Studien evaluiert werden.

In dieser Arbeit war nur für das AFK gegen den EGF-Rezeptor eine Internalisierung darstellbar. Es gibt allerdings Publikationen, in denen beispielsweise auch für Antikörper, die gegen CSPG4 gerichtet sind, eine Internalisierung dargestellt wurde (Jordaan et al. 2017). Eine mögliche Erklärung dafür, dass in dieser Arbeit für das AFK gegen CSPG4 keine Internalisierung darstellbar war, könnte sein, dass die Inkubationszeit nicht ausreichend lang war. Hieraus ergibt sich, dass für die AFK zudem längere Inkubationszeiten erprobt werden müssen, beispielsweise könnte eine Inkubation über Nacht durchgeführt werden.

Trotz der vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig, um die spezifischen Bindungseigenschaften der rekombinanten Fusionsproteine an humanes Primärgewebe zu untersuchen. Ein entsprechendes Projekt wird aktuell in der Arbeitsgruppe „Molekulare Gynäkologie“, in der diese Arbeit entstanden ist, durchgeführt. Es werden die Bindungseigenschaften der rekombinanten Fusionsproteine an Tissue-Micro-Arrays untersucht. Die Tissue Micro-Arrays enthalten 90 Gewebeproben, die verschiedenen klinische Erscheinungsformen der Endometriose abbilden.

4.2.1. Die Wahl des Antikörpers für antikörperbasierte Bildgebungssysteme: IgG-Antikörper oder scFv-Fragmente?

Eine wichtige Frage ist die Auswahl des passenden Antikörpers für die Entwicklung eines antikörperbasierten Bildgebungssystems. Wie in Abbildung 10 dargestellt war die Detektion von 49Z-Zellen, die α EpCAM niedrig exprimieren, durch α EpCAM-scFv-SNAP-Fluorophor nicht möglich, während die Detektion durch gegen α EpCAM gerichtete IgG-Antikörper möglich war. Nichtsdestotrotz weisen scFv-Fragmente im Vergleich zu IgG-Antikörpern vorteilhafte Eigenschaften für die Verwendung als antikörperbasiertes Kontrastmittel auf. Durch ihre geringere Größe ist ihre Halbwertszeit geringer, zudem fehlt ihnen die Fc-Domäne, wodurch nochmals die Halbwertszeit verkürzt wird. Die längere Halbwertszeit der IgG-Antikörper führt zu einem stärkeren Background-Signal und einer unspezifischen Anreicherung in Organen wie Leber und Niere (Kobayashi et al. 2016).

Da über die Interaktion der Fc-Domäne mit dem Fc-Rezeptor auf Zellen der Immunabwehr auch eine Immunreaktion ausgelöst wird, führt die fehlende Fc-Domäne der scFv-Fragmente auch zu einer niedrigeren Immunogenität. IgG-Antikörper führen dagegen zu einer Aktivierung des Immunsystems. Sollen IgG-Antikörper diagnostisch und nicht therapeutisch verwendet werden, müssen niedrigere Dosierungen verwendet werden (Kobayashi et al. 2016). Dies kann bei bildgebenden Ansätzen zu einer eingeschränkten Darstellung des Zielgewebes führen. Die unspezifische Bindung, die über die Fc-Domäne vermittelt wird, kann die Bildqualität negativ beeinflussen (Fu et al. 2018).

Darüber hinaus weisen die scFv-Fragmente eine gute Gewebepenetration auf und verteilen sich im Zielgewebe gleichmäßiger als IgG-Antikörper. Allerdings ist die Akkumulation der scFv-Fragmente im Zielgewebe im Vergleich zu IgG-Antikörpern geringer ausgeprägt (Kobayashi et al. 2016)

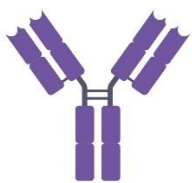
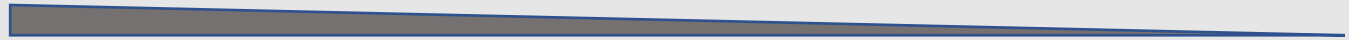
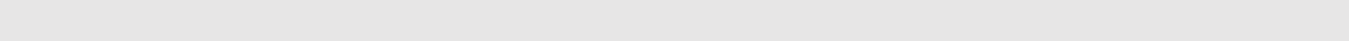
Zudem muss berücksichtigt werden, dass scFv-Fragmente im Vergleich zu IgG-Antikörpern aufgrund ihrer Monovalenz über eine geringere Avidität verfügen (Fu et al. 2018). Nichtsdestotrotz gibt es Studien, die vorteilhafte Eigenschaft der scFv-Fragmente gegenüber IgG-Antikörpern mit Blick auf die Bildgebung zeigen. In einer Studie im Mausmodell konnten Sato et al. eine gute *in vivo* Detektionsfähigkeit eines Alexa-647

gelabelten anti-Tissue-Factor-scFv darstellen. Im Vergleich zu einem korrespondierenden IgG-Antikörper zeigte das scFv-Fragment eine schnellere Akkumulation im Zielgewebe, eine schnellere Clearance und ein schnelleres Erreichen des maximalen Tumor-Hintergrund-Verhältnisses (Sato et al. 2014). Ein von Frigerio et al. entwickelter anti-PSMA-scFv-Alexa 680-Antikörper zeigte im murinen Tumormodell im Vergleich zu einem korrespondierenden IgG-Antikörper eine spezifischere und schnellere Tumordarstellung (Frigerio et al. 2013). In einer Studie am murinen Pankreas-Xenograft-Model konnten Kampmeier et al. darstellen, dass ein gegen den EGF-Rezeptor gerichtetes scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugat eine schnelle und spezifische Akkumulation im Tumorgebiet sowie eine schnelle vollständige Clearance aus dem Blut zeigte. Dies resultierte in einem signifikant höheren Tumor-Hintergrund-Verhältnis verglichen mit dem korrespondierenden monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab (Kampmeier et al. 2010).

Diese Studien untermauern eindrücklich das Potenzial, dass in der Verwendung von scFv-Antikörpern zur Entwicklung eines antikörperbasierten Bildgebungssystems liegt und unterstützen zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die weitere Erforschung eines endometriose-spezifischen Bildgebungssystem basierend auf scFv-SNAP-AFK.

Es muss erwähnt werden, dass neben scFv-Fragmenten viele verschiedene weitere Antikörperderivate entwickelt wurden, um die Limitationen von IgG-Antikörpern zu umgehen. Eine Auswahl einiger Antikörperderivate ist in Tabelle 14 dargestellt (Kobayashi et al. 2016). Diese modifizierten Fragmente haben im Vergleich zu IgG-Antikörpern eine schnellere Clearance und führen so zu einem geringeren Background. Allerdings weisen sie auch eine geringere Akkumulation im Zielgewebe auf, sodass bei der Wahl des passenden Antikörpers zwischen einer maximalen Akkumulation im Zielgewebe und einem minimalen Background abgewogen werden muss (Kobayashi et al. 2016). Insgesamt kann keine dieser Antikörperklassen als den anderen obligatorisch überlegen bezeichnet werden. Stattdessen muss das passende Antikörperderivat je nach spezifischer Fragestellung, anvisiertem Zielgewebe und Expressionslevel des Zielantigens ausgewählt werden.

Tabelle 14 Übersicht ausgewählter Antikörperderivate, modifiziert nach (Kobayashi et al. 2016; Fu et al. 2018; Dammes und Peer 2020; Kaur et al. 2012)

	IgG	F(ab') ₂	Fab	Diabody	scFv
Struktur					
Größe (kDa)	150	110	50	50	26
Valenz	2	2	1	2	1
Herstellung (gentechnisch vs enzymatisch)		Enzymatisch zum Beispiel Pepsin	Enzymatisch zum Beispiel Papain	Gentechnisch	Gentechnisch
Elimination	Hepatisch	Hepatisch	Renal	Renal	Renal
Gewebeaufnahme					
Clearance-Rate					
Gewebepenetration					

4.2.2. Einordnung der Ergebnisse in den Kontext klinischer Herausforderungen in Diagnostik und Therapie der Endometriose

Die Entwicklung endometriosespezifischer scFv-SNAP-Antikörper bietet vielfältige Möglichkeiten zur klinischen Anwendung und zur gezielten Verbesserung aktueller Herausforderungen in Diagnostik und Therapie der Endometriose.

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es kein etabliertes nicht-invasives Verfahren zur definitiven Diagnosestellung der Endometriose. Goldstandard ist weiterhin die diagnostische Laparoskopie mit Probenentnahme und histologischer Bestätigung. Selbst ein blander klinischer Untersuchungsbefund und eine unauffällige Bildgebung schließen das Vorliegen einer Endometriose nicht aus. Zudem ist das Beschwerdebild der Endometriose heterogen und es gibt eine Symptomüberlappung mit anderen Krankheitsbildern wie der „Chronic Inflammatory Pelvic Disease“ (Ulrich 2020; Zondervan et al. 2020; Becker et al. 2022). Dies führt in der klinischen Entscheidungsfindung zu einer Herausforderung bei der Selektion derjenigen Patientinnen, die tatsächlich von einer Laparoskopie profitieren würden. Hier besteht also die Notwendigkeit eines diagnostischen Tools, das nicht-invasiv Patientinnen mit Endometriose identifizieren kann. Ein vielversprechender Ansatz ist der von Bendifallah et al. vorgestellte Speicheltest, der anhand eines miRNA-Profiles Endometriosepatientinnen identifizieren kann (Bendifallah et al. 2022). Eine Schwachstelle dieses Speicheltests ist, dass er keine Aussage über Krankheitslast und -lokalisation treffen kann (Bendifallah et al. 2022). Dies ist allerdings eine wichtige Information, um das intraoperative Vorgehen planen zu können. Aktuelle bildgebende Verfahren verfügen über keine ausreichende Sensitivität in der Detektion von Endometrioseherden. Insbesondere oberflächliche peritoneale Endometrioseherde sind zum jetzigen Zeitpunkt keiner bildgebenden Diagnostik zugänglich (Zondervan et al. 2020; Becker et al. 2022). Die Entwicklung eines endometriosespezifischen antikörperbasierten Bildgebungssystems könnte eine sinnvolle Ergänzung in der Diagnostik der Endometriose darstellen, da dadurch auch funktionelle Charakteristika wie Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen sichtbar gemacht werden können, die bereits vor makroskopisch erkennbaren Veränderungen auftreten (Dammes und Peer 2020). Ein denkbarer Ansatz ist die Herstellung eines scFv-SNAP-Gadolinium

Konjugats zur Durchführung einer kontrastmittelgestützten MRT-Untersuchung. Ein Beispiel hierfür ist ein von Kuriu et al. entwickeltes IgG-Gadolinium-Konjugat, das gegen ein Glykoprotein auf Zellen des humanen kolorektalen Karzinoms gerichtet ist. Im Mausmodell war eine gute Darstellung eines Tumor-Xenografts mithilfe dieses Kontrastmittels möglich (Kuriu et al. 2006). Mit einem endometriose-spezifischen Kontrastmittel könnten zudem auch extraabdominelle Läsionen einer Identifizierung besser zugänglich gemacht werden. Ein weiterer Vorteil eines endometriosespezifischen antikörperbasierten Bildgebungsverfahrens ist die Möglichkeit zur Anwendung im postoperativen Follow-up um eine erneute Zunahme der Krankheitslast frühzeitig erkennen zu können.

Auch die operative Therapie der Endometriose kann von der Entwicklung eines antikörperbasierten Bildgebungssystems profitieren. Aktuell ist die Identifikation von Endometrioseherden auch abhängig von der individuellen Erfahrung des Operators, zudem sind nicht alle Endometrioseherde mit dem bloßen Auge sicher erkennbar (Nisenblatt et al. 2016). Eine Methode, die hier Abhilfe schaffen sollte ist die „Fluorescence Guided Surgery“. Fluoreszenz-basierte Bildgebungsverfahren beruhen auf elektromagnetischer Strahlung, deren Spektrum im ultravioletten bis Nahinfrarot-Bereich liegt. Die Fluorophore werden mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt (Exzitation) und emittieren daraufhin Licht einer ebenfalls spezifischen Wellenlänge (Emission). Ein wichtiger Vorteil der Fluoreszenzbildgebung für den intraoperativen Gebrauch ist, dass damit eine Darstellung in Echtzeit möglich ist, die eine sinnvolle Integration in das operative Prozedere ermöglicht (Alam et al. 2018). Bisherige klinische Erfahrungen mit Fluorophoren zeigen eine gute Sicherheit der Präparate (Marshall et al. 2010; Hope-Ross et al. 1994; Obana et al. 1994). Ein wichtiger Faktor, der die Sicherheit erhöht, ist das Fehlen ionisierender Strahlung (Zhang et al. 2017; Vahrmeijer et al. 2013). Zudem sind Bildgebungssysteme für die Darstellung von Fluoreszenzsignalen im Vergleich zu anderen Bildgebungsverfahren günstiger und weisen eine einfachere Handhabung auf (Schouw et al. 2021). Für den intraoperativen Gebrauch verfügt Licht im Nahinfrarot-Bereich (700-1000nm) über sinnvolle Eigenschaften. Es liegt eine geringere Autofluoreszenz vor, die Gewebepenetration ist tiefer und die Streuung gering (Weissleder und Ntziachristos 2003; Frangioni 2003; Zhang et al. 2017). Die Gewebepenetrationstiefe von Nahinfrarotlicht liegt bei mehreren Millimetern bis

wenigen Zentimetern (Vahrmeijer et al. 2013). Bei tief liegenden Strukturen ist die Detektion nicht sicher gegeben (Kampmeier et al. 2010).

In der Endometriosechirurgie findet sich die Verwendung von Nahinfrarot-Indocyaningrün (NIR-ICG) als intraoperatives fluoreszierendes Kontrastmittel (Raffone et al. 2022). Auch wenn dadurch die Detektionsrate von Endometrioseherden verbessert werden kann, weist diese Methode wichtige Limitationen auf. So beruht die Darstellung der Herde auf Unterschieden in der Gewebepfusion, also einer indirekten Darstellung der Herde. Der diagnostische Wert des NIR-ICG ist insbesondere bei avaskulären und hypovaskulären Endometrioseherden niedrig (Raimondo et al. 2020). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Entwicklung eines Kontrastmittels, das Endometrioseläsionen nicht nur indirekt, sondern direkt darstellt. Ein vielversprechendes Beispiel aus der Ovarialkarzinomchirurgie ist hier Pafolacianine, eine gegen den FR α gerichtete Bildgebungsreagenz. Sie besteht aus der Pteroyl-Einheit der Folsäure, gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff und wurde von der FDA zugelassen zur intraoperativen Detektion von Ovarialkarzinomgewebe. Mittels Pafolacianine konnte FR α -positives Gewebe von umgebendem Gewebe unterschieden werden. Es wurden mehr Läsionen als mit bloßem Auge erkannt (Tanyi et al. 2023; FDA 2021 Wed, 2021; Gul und Henary 2023). Beachtenswert ist hier, dass es eine Überschneidung zwischen der abdominalen Lokalisation von Ovarialkarzinom- und Endometriosegewebe gibt (Hrsg.: Leitlinienprogramm Onkologie 2022 2022). Hiermit wird der Bedarf und das Potenzial einer zielgerichteten intraoperativen Bildgebung in der Endometriosechirurgie nochmals hervorgehoben. (FDA 2021 Wed, 2021; Gul und Henary 2023; Hrsg.: Leitlinienprogramm Onkologie 2022 2022).

Dieser Bedarf kann durch ein antikörperbasiertes fluoreszierendes Kontrastmittel gedeckt werden. Die Verbesserung der Detektion von Endometrioseläsionen ist für den therapeutischen Erfolg von besonderer Relevanz, da die Symptomkontrolle direkt mit dem Resektionsausmaß zusammenhängt. Darüber hinaus führt ein höheres Resektionsausmaß zu einer geringeren Anzahl an Krankheitsrezidiven und Folgeoperationen und bewirkt einen Anstieg der Rate an postoperativen Spontanschwangerschaften (Kaiser et al. 2009; Hart et al. 2008; Vignali et al. 2005). Ein wichtiger Vorteil, den die FGS bietet ist zudem die Darstellung des Operationssitus in Echtzeit (van Dam et al. 2011; Rosenthal et al. 2015; Zhang et al. 2017). Dies kann auch

bei der Exzision zystischer Adenomyoseherde hilfreich sein. Bei diesen ist die Erkennung der Schichtung insbesondere laparoskopisch schwierig, dies führt zu einer höheren Rezidivrate bei laparoskopischen Operationen im Vergleich zu einem offenen chirurgischen Vorgehen (Ulrich 2020; Osada 2018). Eine zielgenaue funktionelle Darstellung der Endometrioseläsionen könnte die Identifizierung der Schichten erleichtern. Die bessere Differenzierung von endometrioidem Gewebe von gesundem Gewebe kann zudem zu einem schonenderen und komplikationsärmeren operativen Vorgehen führen, weil auch gesundes und funktionell wichtiges Gewebe wie Nervengewebe besser erkannt werden könnte (Ceccaroni et al. 2012).

Ein antikörperbasiertes Kontrastmittel verfügt demnach über das Potenzial sowohl Diagnostik als auch Therapie der Endometriose zu verbessern. Zur Herstellung von AWK gibt es dabei verschiedene Methoden. Wie bereits dargelegt verfügen scFv-Antikörper im Vergleich zu IgG-Antikörpern über vorteilhafte Eigenschaften mit Blick auf die Verwendung als antikörperbasiertes Kontrastmittel. Die vorliegende Arbeit postuliert darüber hinaus, dass die hier vorgestellten scFv-SNAP-BG-Fluorophor-Konjugate anderen scFv-Fluorophor-Konjugaten aufgrund der vorteilhaften Eigenschaften der SNAP-tag-Technologie überlegen sind. Dies liegt vor allem in der seitenspezifischen Konjugation mit definierter 1:1 Stöchiometrie begründet. Dadurch wird die Herstellung homogener Produkte ermöglicht. Eine detaillierte Ausführung zu den Stärken dieser Konjugationsmethode kann dem ersten Abschnitt der Diskussion entnommen werden. Im Folgenden sollen die relevantesten Vorteile nochmals zusammengefasst werden und in einen klinischen Kontext gestellt werden.

Der größte Vorteil der SNAP-tag Methode gegenüber anderen Konjugationsmethoden ist die schnelle und effiziente Herstellung homogener Produkte (Hussain et al. 2019b; Hamblett et al. 2004). Methoden wie die Lysin-NHS-Konjugation führen zu Produktgemischen, bei denen ein Anteil der scFv-Antikörper unkonjugiert sein wird, ein weiterer Anteil wird über ein ineffizientes Wirkstoff-Antikörper-Verhältnis verfügen, bei dem es beispielsweise zu einer schnelleren hepatischen Elimination, einem Quenching kommt oder die Konjugation führt zu einer Inaktivierung des scFv-Antikörpers (Panowski et al. 2014; Vira et al. 2010). Solche Probleme können aufgrund ihrer Kontrolliertheit mit der SNAP-tag Methode umgangen werden. Bei heterogenen Produktgemischen ist die Pharmakokinetik und -dynamik unter Umständen sehr variabel

(Hamblett et al. 2004; Panowski et al. 2014). Über die Entwicklung von scFv-Molekülen mit zwei Tags - zwei SNAP-tags, ein SNAP-tag und ein CLIP-tag - oder von Benzylguanin-Molekülen, die mit mehr als einem Fluorophor verknüpft sind, können zudem weitere kontrollierte Optimierungen erfolgen (Wollschlaeger et al. 2018). Die Möglichkeit höhere Wirkstoff-Antikörper-Verhältnisse mit der SNAP-tag Technologie zu erreichen ist ein wichtiges Forschungsfeld, da es bei einem 1:1 WAV möglich ist, dass die Signalstärke zur sicheren Detektion nicht ausreichend ist. Dies ist insbesondere für Zielantigene relevant, die für Endometriose zwar hochspezifisch sind, aber nur in niedriger Kopienzahl vorkommen.

Von einem klinischen Standpunkt aus betrachtet ist es darüber hinaus notwendig, dass das Signal eines AFK eindeutig interpretiert werden kann. Für heterogene Produktgemische mit unterschiedlichen WAV ist dies nicht der Fall. Bei einem starken Signal kann nicht eindeutig unterschieden werden, ob das Signal durch eine ausgeprägte Gewebsansammlung hervorgerufen wird oder ob das Signal an der fraglichen Stelle nur deswegen stärker ist, weil dort vermehrt AFK mit einem hohen WAV vorkommen. Dies kann zu klinischen Fehleinschätzungen führen. Im Kontext einer prä- oder postoperativen Bildgebung demnach zu einer Fehleinschätzung der Krankheitslast und im Kontext der intraoperativen Fluoreszenzdarstellung zu einer falschen Einschätzung des notwendigen Resektionsausmaßes mit einer Schädigung umliegenden gesunden Gewebes. Die scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate bieten hier den Vorteil, dass die Interpretation eines Signals aufgrund der definierten 1:1 Stöchiometrie und der homogenen Produkte eindeutig ist. Ein stärkeres Signal kann nur durch eine stärkere Ansammlung des Zielgewebes verursacht werden.

Diese Überlegungen unterstützen zusammen mit den vielversprechenden Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Weiterentwicklung eines antikörperbasierten Kontrastmittels anhand der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zur Verbesserung der Diagnostik und Therapie der Endometriose.

4.2.3. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit stellt dar, dass scFv-SNAP-Fusionsproteine dazu in der Lage sind Antigene auf endometrioiden Zelllinien zu erkennen. Langfristiges Ziel ist es mithilfe dieser scFv-SNAP-Fusionsproteine ein antikörperbasiertes Kontrastmittel für die Detektion von Endometriose zu entwickeln. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl, des heterogenen Ursprungs der Zelllinien und der fehlenden Untersuchung von Gewebeproben kann anhand der vorliegenden Arbeit keine Aussage über die Auswahl passender Zielmoleküle getroffen werden. In der Literatur finden sich allerdings Nachweise dafür, dass die untersuchten Antigene in endometrioidem Gewebe exprimiert sind. In einer Studie mit Gewebeproben von 18 verschiedenen Endometriosepatientinnen konnten van den Berg et al. die Expression von EpCAM und FR α darstellen. Von Bedeutung ist hier zudem, dass eine Expression dieser beiden Antigene im umliegenden gesunden Gewebe nicht vorhanden war. Dies ist für die Verwendung als Kontrastmittel vorteilhaft (van den Berg et al. 2013). Prentice et al. konnten in einer Studie mit Gewebeproben von 27 Endometriosepatientinnen die Expression des EGF-Rezeptors nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression keinen Schwankungen während des Menstruationszyklus unterliegt (Prentice et al. 1992). Winship et al. konnten darstellen, dass CSPG4 sowohl im Endometrium als auch im Endometriumkarzinom exprimiert wird. Die Expression in Gewebe des Endometriumkarzinoms war dabei im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöht (Winship et al. 2017).

Im Folgenden soll ein geeigneter Versuchsaufbau für die weitere Auswahl von endometriosespezifischen Zielmolekülen und die Entwicklung entsprechender scFv-SNAP-Fusionsproteine skizziert werden.

Als Untersuchungsmaterial sollten *ex vivo* Patientenproben in ausreichend hoher Stichprobenzahl verwendet werden. Die Diagnose „Endometriose“ sollte bei den verwendeten Gewebeproben durch einen erfahrenen Pathologen gesichert sein. Ein entsprechendes Projekt wird in der Arbeitsgruppe wie bereits unter 4.2 erläutert bereits durchgeführt.

Die verschiedenen Unterformen und Lokalisationen der Endometriose sollten durch das Stichprobenkollektiv repräsentiert werden. Zudem müssen relevante Charakteristika der Patientinnen erfasst werden. Dazu gehören das Alter der Patientin, Vorerkrankungen,

Voroperationen, Medikamenteneinnahmen und Zeitpunkt des Menstruationszyklus bei Probenentnahme. Da die Expression bestimmter Zielmoleküle auch durch Hormone beeinflusst wird - so kommt es beispielsweise unter Östrogeneinfluss zu einer Rezeptor-Downregulation des FR α (Elnakat und Ratnam 2004) - sind der Zeitpunkt des Menstruationszyklus und bestehende (hormonelle) medikamentöse Therapien von besonderer Relevanz.

Außerdem sollte als Kontrollgruppe gesunde Gewebeproben untersucht werden von Lokalisationen, an denen häufig Endometrioseherde aufzufinden sind. Dazu gehört beispielsweise das Peritoneum, die Darmwand oder die Blase. Dies ist bei der Auswahl von Zielmolekülen relevant, da Moleküle, die sowohl in Endometrioseherden als auch in umliegendem Gewebe hoch exprimiert sind als Zielmoleküle ungeeignet sind.

Zur Untersuchung des Expressionslevels des Gewebes sollten ausreichend validierte Antikörper mit bekannter Antigenspezifität und -sensitivität verwendet werden.

Um eine Nachvollziehbarkeit und Reproduzierbarkeit der Auswahl zu erzielen ist es sinnvoll die Zielmoleküle nach einem definierten System auszuwählen. Eine sinnvolle Möglichkeit dazu bietet der TASC-Score, der von Van Oosten et al. zur Auswahl von Zielmolekülen für intraoperative Bildgebungsansätze entwickelt wurde. Eine wichtige Stärke dieses Scoring-Systems ist die strukturierte und reproduzierbare Auswahl von Zielmolekülen basierend auf Moleküleigenschaften, die für bildgebende Ansätze vorteilhaft sind. Anhand des TASC-Scores wurden bereits einige mögliche Zielmoleküle zur Detektion von Endometriose evaluiert. So zeigten beispielsweise EpCAM und VEGF vielversprechende Ergebnisse (van Oosten et al. 2011; van den Berg et al. 2013).

Nach Auswahl passender Zielmoleküle müssen gegebenenfalls entsprechende scFv-SNAP-Fusionsproteine hergestellt und *in vitro* evaluiert werden. Dazu kann das in dieser Arbeit verwendete Protokoll verwendet werden (Hussain et al. 2019b).

Die Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Fusionsproteine muss ebenfalls an *ex vivo* Patientenproben evaluiert werden. Die sinnvolle Zusammensetzung eines Stichprobenkollektivs wurde im vorherigen Absatz bereits skizziert. Um die Bindungsfähigkeit der scFv-SNAP-Fusionsproteine zu charakterisieren ist es sinnvoll, diese mit der Bindungsfähigkeit etablierter IgG-Antikörper zu vergleichen.

Um weitere relevante Charakteristika der scFv-SNAP-Fusionsproteine zu untersuchen, sind Tiermodelle notwendig. Dazu gehört die Untersuchung der Biodistribution und der Toxizität sowie der Pharmakokinetik und -dynamik. Wichtige Fragen sind hier, ob ausreichende Mengen des Fusionsproteins das Zielgewebe erreichen, welche Halbwertszeit die scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate im lebenden Organismus aufweisen und ob ein wünschenswertes Tumor-Hintergrund-Verhältnis erreicht werden kann (Weissleder et al. 2000).

Besondere praktische Herausforderungen in der Umsetzung des skizzierten Forschungskonzepts sind, eine repräsentative Stichprobe an Gewebeproben zu sammeln, bei der sowohl alle Unterformen der Endometriose als auch alle Lokalisationen ausreichend beinhaltet sind. Zudem ist die Etablierung eines passenden tierischen Endometriosemodells herausfordernd. Prinzipiell sind Spezies vorteilhaft, bei denen eine spontane Entwicklung von Endometriose bekannt ist. Dazu gehören beispielsweise Rhesusaffen. Ein wichtiger Nachteil sind hier die hohen Kosten, eine aufwändigere Handhabung und ethische Aspekte. Kostengünstiger und einfacher in der Handhabung sind Mausmodelle. Nachteilig ist hier, dass es bei Mäusen nicht zu einer spontanen Entwicklung von Endometriose kommt (Burns et al. 2021). Aufgrund der einfacheren Handhabung und der besseren Möglichkeit ein ausreichend hohes Stichprobenkollektiv zu generieren, wäre ein murines Endometriosemodell für die initiale *in vivo* Untersuchung der scFv-SNAP-Fusionsproteine zu bevorzugen.

Die im Rahmen dieser Arbeit hervorgehobenen Stärken der scFv-SNAP-Fluorophor-Konjugate zeigen das vielversprechende Potential dieser Methode zur Entwicklung eines endometriosespezifischen antikörperbasierten Kontrastmittels auf. Nichtsdestotrotz kann die Frage, welche AFK sich am besten zur Entwicklung eines solchen Kontrastmittels eignen, anhand der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden und sollte im Rahmen weiterer Studien evaluiert werden. Zu untersuchende Fragen sind beispielsweise, ob andere Antikörperderivate den scFv-Fragmenten überlegen sind. Beispielsweise könnten bivalente Diabodies den monovalenten scFv-Fragmenten überlegen sein.

5. Zusammenfassung/Summary

5.1. Zusammenfassung

Endometriose ist eine chronische Erkrankung, die durch ektopes endometrioides Gewebe verursacht wird. Häufige Lokalisationen sind die Ovarien, die Eierstöcke und das Peritoneum. Die Laparoskopie stellt den diagnostischen und therapeutischen Goldstandard dar. Eine zentrale Herausforderung ist hierbei die korrekte Identifikation der Krankheitsherde. Dies führt zu einer unvollständigen Resektionsrate mit Symptompersistenz. Aktuelle Verfahren zur optimierten Darstellung der Krankheitsherde wie die NIR-ICG-assistierte Endometriosechirurgie führen ebenfalls nicht zu einer sicheren vollständigen Resektion. In dieser Studie wurden Antikörper-Fluorophor-Konjugate (AFK) entwickelt, die spezifisch für endometrioide Antigene sind und potenziell die intraoperative Detektionsrate verbessern könnten. Die AFK bestehen aus rekombinanten scFv-Antikörpern, die genetisch mit dem SNAP-tag verknüpft sind, was eine seitenspezifische Konjugation mit BG-modifizierten Fluorophoren ermöglicht. Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Fähigkeit der entwickelten AFK zu demonstrieren, endometrioide Zelllinien spezifisch zu detektieren und zu binden. Es wurden dazu rekombinante scFv-SNAP-Fusionsproteine hergestellt, die gegen vier verschiedene Antigene gerichtet sind, die in endometrioidem Gewebe exprimiert werden: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4), Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) und Folate Receptor alpha (FR α). Um die Detektionsfähigkeit der AFK zu zeigen, wurde ihr Bindungsverhalten an vier verschiedene endometrioide Zelllinien (12Z, 49Z, THESC, Ishikawa) in der Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die AFK konnten spezifisch an endometrioide Zelllinien binden, die die Antigene EGFR, CSPG4, EpCAM und FR α exprimierten. Es war zudem möglich mit den scFv-SNAP-Fusionsproteinen gleichzeitig zwei verschiedenen Antigene zu detektieren.

Zusammenfassend waren die AFK, die mittels der SNAP-tag-Technologie hergestellt wurden, dazu in der Lage endometrioide Zelllinien zu detektieren. Damit wurde eine Grundlage zur weiteren Erforschung dieser scFv-SNAP-Fusionsproteine als Bildgebungsmodalität in der Diagnostik und Therapie der Endometriose gelegt.

5.2. Summary

Endometriosis is a chronic disease caused by ectopic endometrial tissue. Common localizations are the ovaries, the fallopian tubes and the peritoneum. Today's diagnostic and therapeutic standard is the laparoscopic resection of these foci. However, identifying the pathological tissue can be challenging leading to incomplete resection and symptom persistence. Current imaging methods like NIR-ICG-assisted surgery trying to address this issue lack specificity. We therefore developed antibody-fluorophore-conjugates (AFC) targeting antigens, which are specific for endometrioid cells and could potentially improve the detection specificity. These AFCs consist of a single-chain-Fragment-variable (scFv) genetically fused to the SNAP-tag. This tag allows a single-step conjugation with a benzylguanine-modified fluorophore in a defined 1:1 stoichiometry. In this study, we aim to show that these conjugates are capable of specifically detecting endometrioid cell lines *in vitro* using flow cytometry and fluorescence microscopy.

We generated recombinant scFv-fusion-proteins containing the SNAP-tag, a self-labeling protein used for site-directed conjugation with a fluorophore. These scFv-SNAP-fusion-proteins targeted four antigens known to be expressed by endometrial tissue: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) and Folate Receptor alpha (FR α). To assess their detection capabilities, we conjugated the proteins with fluorophores, incubated them with four endometrioid cell lines (12Z, 49Z, THESC, Ishikawa) and evaluated their binding activity using flow cytometry and fluorescence microscopy.

The generated AFCs were suitable for the specific detection of endometrioid cell lines expressing the target antigens EGFR, CSPG4, EpCAM and FR α . It was also possible to perform multiplex imaging by combining two different scFv-SNAP-fusion-proteins for the simultaneous detection of two antigens.

In conclusion AFCs generated by using the SNAP-tag-technology were able to detect endometrioid cell lines by targeting specific antigens. However, the possible role as a diagnostic tool needs further studies e.g. the ability of the conjugates to detect endometrial tissue samples.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, Sascha; Ihle, Peter; Köster, Ingrid; Schubert, Ingrid (2012): Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany. In: *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 160 (1), S. 79–83. DOI: 10.1016/j.ejogrb.2011.09.041.
- Ahmad, Zuhaida Asra; Yeap, Swee Keong; Ali, Abdul Manaf; Ho, Wan Yong; Alitheen, Noorjahan Banu Mohamed; Hamid, Muhajir (2012): scFv antibody: principles and clinical application. In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 980250. DOI: 10.1155/2012/980250.
- Alam, Israt S.; Steinberg, Idan; Vermesh, Ophir; van den Berg, Nynke S.; Rosenthal, Eben L.; van Dam, Gooitzen M. et al. (2018): Emerging Intraoperative Imaging Modalities to Improve Surgical Precision. In: *Mol Imaging Biol* 20 (5), S. 705–715. DOI: 10.1007/s11307-018-1227-6.
- Alexa Fluor 647 dye | Thermo Fisher Scientific - DE (2022). Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/alexa-fluor-647.html>, zuletzt aktualisiert am 24.09.2022, zuletzt geprüft am 24.09.2022.
- Al-Taher, Mahdi; van den Bos, Jacqueline; Terink, Ivon; van Kuijk, Sander; van Hanegem, Nehalennia; Bouvy, Nicole et al. (2021): Near-Infrared Fluorescence Imaging for the Intraoperative Detection of Endometriosis: A Pilot Study. In: *Life (Basel, Switzerland)* 12 (1). DOI: 10.3390/life12010015.
- Amzel, L. M.; Poljak, R. J. (1979): Three-dimensional structure of immunoglobulins. In: *Annual review of biochemistry* 48, S. 961–997. DOI: 10.1146/annurev.bi.48.070179.004525.
- Arndt, K. M.; Müller, K. M.; Plückthun, A. (1998): Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. In: *Biochemistry* 37 (37), S. 12918–12926. DOI: 10.1021/bi9810407.
- Baldi, Lucia; Hacker, David L.; Adam, Myriam; Wurm, Florian M. (2007): Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. In: *Biotechnology letters* 29 (5), S. 677–684. DOI: 10.1007/s10529-006-9297-y.
- Becker, Christian M.; Bokor, Attila; Heikinheimo, Oskari; Horne, Andrew; Jansen, Femke; Kiesel, Ludwig et al. (2022): ESHRE guideline: endometriosis. In: *Human reproduction open* 2022 (2), hoac009. DOI: 10.1093/hropen/hoac009.
- Behrens, Christopher R.; Ha, Edward H.; Chinn, Lawrence L.; Bowers, Simeon; Probst, Gary; Fitch-Bruhns, Maureen et al. (2015): Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Derived from Interchain Cysteine Cross-Linking Demonstrate Improved Homogeneity and Other Pharmacological Properties over Conventional Heterogeneous ADCs. In: *Molecular pharmaceutics* 12 (11), S. 3986–3998. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00432.

- Bendifallah, Sofiane; Suisse, Stéphane; Puchar, Anne; Delbos, Léa; Poilblanc, Mathieu; Descamps, Philippe et al. (2022): Salivary MicroRNA Signature for Diagnosis of Endometriosis. In: *Journal of Clinical Medicine* 11 (3). DOI: 10.3390/jcm11030612.
- Bird, R. E.; Hardman, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S. M. et al. (1988): Single-chain antigen-binding proteins. In: *Science (New York, N.Y.)* 242 (4877), S. 423–426. DOI: 10.1126/science.3140379.
- Brondyk, William H. (2009): Chapter 11 Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. In: Richard R. Burgess und Murray P. Deutscher (Hg.): Guide to protein purification, Bd. 463. 2. ed. Amsterdam: Elsevier (Methods in enzymology 0076-6879, v. 463), S. 131–147.
- Carson, Mike; Johnson, David H.; McDonald, Heather; Brouillette, Christie; Delucas, Lawrence J. (2007): His-tag impact on structure. In: *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 63 (Pt 3), S. 295–301. DOI: 10.1107/S0907444906052024.
- Ceccaroni, Marcello; Clarizia, Roberto; Bruni, Francesco; D'Urso, Elisabetta; Gagliardi, Maria Lucia; Roviglione, Giovanni et al. (2012): Nerve-sparing laparoscopic eradication of deep endometriosis with segmental rectal and parametrial resection: the Negrar method. A single-center, prospective, clinical trial. In: *Surgical endoscopy* 26 (7), S. 2029–2045. DOI: 10.1007/s00464-012-2153-3.
- Champaneria, Rita; Abedin, Parveen; Daniels, Jane; Balogun, Moji; Khan, Khalid S. (2010): Ultrasound scan and magnetic resonance imaging for the diagnosis of adenomyosis: systematic review comparing test accuracy. In: *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 89 (11), S. 1374–1384. DOI: 10.3109/00016349.2010.512061.
- Chantima, Warangkana; Thepthai, Charin; Cheunsuchon, Pornsuk; Dharakul, Tararaj (2017): EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix detected by monoclonal antibody to the membrane-proximal part of EpCAM. In: *BMC cancer* 17 (1), S. 811. DOI: 10.1186/s12885-017-3798-z.
- Chiu, Mark L.; Goulet, Dennis R.; Teplyakov, Alexey; Gilliland, Gary L. (2019): Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. In: *Antibodies* 8 (4). DOI: 10.3390/antib8040055.
- Chothia, Cyrus; Novotný, Jirí; Brucoleri, Robert; Karplus, Martin (1985): Domain association in immunoglobulin molecules. In: *Journal of Molecular Biology* 186 (3), S. 651–663. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90137-8.
- Chouman, Karinna; Woitok, Mira; Mladenov, Radoslav; Kessler, Claudia; Weinhold, Elmar; Hanz, Gisela et al.: Fine Tuning Antibody Conjugation Methods using SNAP-tag Technology.
- Cohen, Ruth; Stammes, Marieke A.; Roos, Inge Hc de; Stigter-van Walsum, Marijke; Visser, Gerard Wm; van Dongen, Guus Ams (2011): Inert coupling of IRDye800CW to monoclonal antibodies for clinical optical imaging of tumor targets. In: *EJNMMI Research* 1 (1), S. 31. DOI: 10.1186/2191-219X-1-31.
- Cosentino, Francesco; Vizzielli, Giuseppe; Turco, Luigi Carlo; Fagotti, Anna; Cianci, Stefano; Vargiu, Virginia et al. (2018): Near-Infrared Imaging with Indocyanine Green for Detection of Endometriosis Lesions (Gre-Endo Trial): A Pilot Study. In: *Journal of minimally invasive gynecology* 25 (7), S. 1249–1254. DOI: 10.1016/j.jmig.2018.02.023.

- Dammes, Niels; Peer, Dan (2020): Monoclonal antibody-based molecular imaging strategies and theranostic opportunities. In: *Theranostics* 10 (2), S. 938–955. DOI: 10.7150/thno.37443.
- Dübel, Stefan; Breitling, Frank; Frenzel, André; Jostock, Thomas; Marschall, Andrea L. J.; Schirrmann, Thomas; Hust, Michael (2019): Rekombinante Antikörper. Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis, Seite 4-24, 148, 168, 180-183. Seite 4-24, 148, 168, 180-183. 2. Aufl. 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1563683>.
- Ducry, Laurent; Stump, Bernhard (2010): Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. In: *Bioconjugate chemistry* 21 (1), S. 5–13. DOI: 10.1021/bc9002019.
- Duepree, Hans J.; Senagore, Anthony J.; Delaney, Conor P.; Marcello, Peter W.; Brady, Karen M.; Falcone, Tommaso (2002): Laparoscopic Resection of Deep Pelvic Endometriosis with Rectosigmoid Involvement. In: *Journal of the American College of Surgeons* 195 (6), S. 754–758. DOI: 10.1016/s1072-7515(02)01341-8.
- Duranti, Claudia; Carraresi, Laura; Sette, Angelica; Stefanini, Matteo; Lottini, Tiziano; Crescioli, Silvia et al. (2018): Generation and characterization of novel recombinant anti-hERG1 scFv antibodies for cancer molecular imaging. In: *Oncotarget* 9 (79), S. 34972–34989. DOI: 10.18632/oncotarget.26200.
- Ebert, Andreas D. (2019): Endometriose. Ein Wegweiser für die Praxis. Berlin.
- Eisenberg, V. H.; Weil, C.; Chodick, G.; Shalev, V. (2018): Epidemiology of endometriosis: a large population-based database study from a healthcare provider with 2 million members. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 125 (1), S. 55–62. DOI: 10.1111/1471-0528.14711.
- Elnakat, Hala; Ratnam, Manohar (2004): Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. In: *Advanced drug delivery reviews* 56 (8), S. 1067–1084. DOI: 10.1016/j.addr.2004.01.001.
- FDA 2021 (Wed, 2021): FDA approves pafolacianine for identifying malignant ovarian cancer lesions. In: *FDA*, Wed, 01.12.2021. Online verfügbar unter <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-pafolacianine-identifying-malignant-ovarian-cancer-lesions>, zuletzt geprüft am 29.04.2024.
- Frangioni, John V. (2003): In vivo near-infrared fluorescence imaging. In: *Current opinion in chemical biology* 7 (5), S. 626–634. DOI: 10.1016/j.cbpa.2003.08.007.
- Frenzel, André; Hust, Michael; Schirrmann, Thomas (2013): Expression of recombinant antibodies. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 217. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00217.
- Frigerio, B.; Fracasso, G.; Luison, E.; Cingarlini, S.; Mortarino, M.; Coliva, A. et al. (2013): A single-chain fragment against prostate specific membrane antigen as a tool to build theranostic reagents for prostate cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 49 (9), S. 2223–2232. DOI: 10.1016/j.ejca.2013.01.024.
- Fu, Ruisi; Carroll, Laurence; Yahiloglu, Gokhan; Aboagye, Eric O.; Miller, Philip W. (2018): Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications. In: *Chemmedchem* 13 (23), S. 2466–2478. DOI: 10.1002/cmdc.201800624.

- Gautier, Arnaud; Juillerat, Alexandre; Heinis, Christian; Corrêa, Ivan Reis; Kindermann, Maik; Beaufils, Florent; Johnsson, Kai (2008): An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. In: *Chemistry & Biology* 15 (2), S. 128–136. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.01.007.
- Ghai, Vishalli; Jan, Haider; Shakir, Fevzi; Haines, Pat; Kent, Andrew (2020): Diagnostic delay for superficial and deep endometriosis in the United Kingdom. In: *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology* 40 (1), S. 83–89. DOI: 10.1080/01443615.2019.1603217.
- Gong, Haibiao; Kovar, Joy; Zhang, Aihua; Correa, Ivan R.; Xu, Ming-Qun; Olive, Michael (2011): Abstract 5295: Near-infrared fluorescence in vivo tumor imaging using SNAP-tag technology. In: *Cancer research* 71 (8_Supplement), S. 5295. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2011-5295.
- Gul, Zaryab; Henary, Maged (2023): Pafolacianine, the magic wand of intraoperative imaging of folate-receptor positive ovarian cancer. In: *Annals of Translational Medicine* 11 (11), S. 394. DOI: 10.21037/atm-23-467.
- Hamann, Philip R.; Hinman, Lois M.; Hollander, Irwin; Beyer, Carl F.; Lindh, Delores; Holcomb, Ryan et al. (2002): Gemtuzumab ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia. In: *Bioconjugate chemistry* 13 (1), S. 47–58. DOI: 10.1021/bc010021y.
- Hamblett, Kevin J.; Senter, Peter D.; Chace, Dana F.; Sun, Michael M. C.; Lenox, Joel; Cervený, Charles G. et al. (2004): Effects of drug loading on the antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate. In: *Clin Cancer Res* 10 (20), S. 7063–7070. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0789.
- Harper, Sandra; Speicher, David W. (2011): Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 681, S. 259–280. DOI: 10.1007/978-1-60761-913-0_14.
- Hart, R. J.; Hickey, M.; Maouris, P.; Buckett, W. (2008): Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (2), CD004992. DOI: 10.1002/14651858.CD004992.pub3.
- Hong, Mihe; Clubb, Justin D.; Chen, Yvonne Y. (2020): Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy. In: *Cancer cell* 38 (4), S. 473–488. DOI: 10.1016/j.ccell.2020.07.005.
- Hope-Ross, Monique; Yannuzzi, Lawrence A.; Gragoudas, Evangelos S.; Guyer, David R.; Slakter, Jason S.; Sorenson, John A. et al. (1994): Adverse Reactions due to Indocyanine Green. In: *Ophthalmology* 101 (3), S. 529–533. DOI: 10.1016/S0161-6420(94)31303-0.
- Hrsg.: Leitlinienprogramm Onkologie 2022 (2022): Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 5.1, 2022, AWMF-Registernummer: 032/035OL. <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/>,
- Hudelist, G.; Fritzer, N.; Thomas, A.; Niehues, C.; Oppelt, P.; Haas, D. et al. (2012): Diagnostic delay for endometriosis in Austria and Germany: causes and possible consequences. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 27 (12), S. 3412–3416. DOI: 10.1093/humrep/des316.

- Hudson, Peter J.; Kortt, Alexander A. (1999): High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. In: *Journal of Immunological Methods* 231 (1-2), S. 177–189. DOI: 10.1016/S0022-1759(99)00157-X.
- Huehls, Amelia M.; Coupet, Tiffany A.; Sentman, Charles L. (2015): Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy. In: *Immunology and cell biology* 93 (3), S. 290–296. DOI: 10.1038/icb.2014.93.
- Huse, Klaus; Böhme, Hans-Joachim; Scholz, Gerhard H. (2002): Purification of antibodies by affinity chromatography. In: *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 51 (3), S. 217–231. DOI: 10.1016/S0165-022X(02)00017-9.
- Hussain, Ahmad Fawzi; Amoury, Manal; Barth, Stefan (2013): SNAP-tag technology: a powerful tool for site specific conjugation of therapeutic and imaging agents. In: *Current pharmaceutical design* 19 (30), S. 5437–5442. DOI: 10.2174/1381612811319300014.
- Hussain, Ahmad Fawzi; Heppenstall, Paul A.; Kampmeier, Florian; Meinhold-Heerlein, Ivo; Barth, Stefan (2019a): One-step site-specific antibody fragment auto-conjugation using SNAP-tag technology. In: *Nature protocols* 14 (11), S. 3101–3125. DOI: 10.1038/s41596-019-0214-y.
- Hussain, Ahmad Fawzi; Heppenstall, Paul A.; Kampmeier, Florian; Meinhold-Heerlein, Ivo; Barth, Stefan (2019b): One-step site-specific antibody fragment auto-conjugation using SNAP-tag technology. In: *Nat Protoc* 14 (11), S. 3101–3125. DOI: 10.1038/s41596-019-0214-y.
- Hussain, Ahmad Fawzi; Kampmeier, Florian; Felbert, Verena von; Merk, Hans-F; Tur, Mehmet Kemal; Barth, Stefan (2011): SNAP-tag technology mediates site specific conjugation of antibody fragments with a photosensitizer and improves target specific phototoxicity in tumor cells. In: *Bioconjugate chemistry* 22 (12), S. 2487–2495. DOI: 10.1021/bc200304k.
- Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; Novotný, J.; Margolies, M. N. et al. (1988): Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (16), S. 5879–5883. DOI: 10.1073/pnas.85.16.5879.
- Hwang, William Ying Khee; Foote, Jefferson (2005): Immunogenicity of engineered antibodies. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 36 (1), S. 3–10. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.01.001.
- ICG-SNAP (2022). Online verfügbar unter <https://www.iris-biotech.de/de/rl-3830>, zuletzt aktualisiert am 29.09.2022, zuletzt geprüft am 29.09.2022.
- IRDye® 800 (2022). Online verfügbar unter <https://www.trilinkbiotech.com/irdye-800.html>, zuletzt aktualisiert am 24.09.2022, zuletzt geprüft am 24.09.2022.
- Jabbour, Elias; Paul, Shilpa; Kantarjian, Hagop (2021): The clinical development of antibody-drug conjugates - lessons from leukaemia. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 18 (7), S. 418–433. DOI: 10.1038/s41571-021-00484-2.
- Johansen, Mette L.; Gao, Ying; Hutnick, Melanie A.; Craig, Sonya E. L.; Pokorski, Jonathan K.; Flask, Chris A.; Brady-Kalnay, Susann M. (2017): Quantitative Molecular Imaging with a Single Gd-Based Contrast Agent Reveals Specific Tumor Binding and Retention in Vivo. In: *Analytical chemistry* 89 (11), S. 5932–5939. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00384.

- Johnson, Neil P.; Hummelshoj, Lone; Adamson, G. David; Keckstein, Jörg; Taylor, Hugh S.; Abrao, Mauricio S. et al. (2017): World Endometriosis Society consensus on the classification of endometriosis. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 32 (2), S. 315–324. DOI: 10.1093/humrep/dew293.
- Jordaan S, Chetty S, Mungra N, Koopmans I, van Bommel PE, Helfrich W, Barth S. CSPG4: A Target for Selective Delivery of Human Cytolytic Fusion Proteins and TRAIL. *Biomedicines*. 2017 Jun 28;5(3):37. doi: 10.3390/biomedicines5030037. PMID: 28657611; PMCID: PMC5618295.
- Junutula, Jagath R.; Bhakta, Sunil; Raab, Helga; Ervin, Karen E.; Eigenbrot, Charles; Vandlen, Richard et al. (2008a): Rapid identification of reactive cysteine residues for site-specific labeling of antibody-Fabs. In: *Journal of Immunological Methods* 332 (1-2), S. 41–52. DOI: 10.1016/j.jim.2007.12.011.
- Junutula, Jagath R.; Raab, Helga; Clark, Suzanna; Bhakta, Sunil; Leipold, Douglas D.; Weir, Sylvia et al. (2008b): Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. In: *Nature biotechnology* 26 (8), S. 925–932. DOI: 10.1038/nbt.1480.
- Kaiser, Andrea; Kopf, Andreas; Gericke, Christine; Bartley, Julia; Mechsner, Sylvia (2009): The influence of peritoneal endometriotic lesions on the generation of endometriosis-related pain and pain reduction after surgical excision. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 280 (3), S. 369–373. DOI: 10.1007/s00404-008-0921-z.
- Kampmeier, Florian; Niesen, Judith; Koers, Alexander; Ribbert, Markus; Brecht, Andreas; Fischer, Rainer et al. (2010): Rapid optical imaging of EGF receptor expression with a single-chain antibody SNAP-tag fusion protein. In: *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37 (10), S. 1926–1934. DOI: 10.1007/s00259-010-1482-5.
- Kampmeier, Florian; Ribbert, Markus; Nachreiner, Thomas; Dembski, Sofia; Beaufils, Florent; Brecht, Andreas; Barth, Stefan (2009): Site-specific, covalent labeling of recombinant antibody fragments via fusion to an engineered version of 6-O-alkylguanine DNA alkyltransferase. In: *Bioconjugate chemistry* 20 (5), S. 1010–1015. DOI: 10.1021/bc9000257.
- Katz, Jessica; Janik, John E.; Younes, Anas (2011): Brentuximab Vedotin (SGN-35). In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (20), S. 6428–6436. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0488.
- Kaur, Sukhwinder; Venktaraman, Ganesh; Jain, Maneesh; Senapati, Shantibhusan; Garg, Pradeep K.; Batra, Surinder K. (2012): Recent trends in antibody-based oncologic imaging. In: *Cancer letters* 315 (2), S. 97–111. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.10.017.
- Kennedy, Stephen; Bergqvist, Agneta; Chapron, Charles; d'Hooghe, Thomas; Dunselman, Gerard; Greb, Robert et al. (2005): ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 20 (10), S. 2698–2704. DOI: 10.1093/humrep/dei135.
- Kessler, Claudia; Pardo, Alessa; Tur, Mehmet K.; Gattenlöhner, Stefan; Fischer, Rainer; Kolberg, Katharina; Barth, Stefan (2017): Novel PSCA targeting scFv-fusion proteins for diagnosis and immunotherapy of prostate cancer. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 143 (10), S. 2025–2038. DOI: 10.1007/s00432-017-2472-9.
- Khantasup, Kannika; Saiviroonporn, Pairash; Jarussophon, Suwatchai; Chantima, Warangkana; Dharakul, Tararaj (2018): Anti-EpCAM scFv gadolinium chelate: a novel targeted MRI

- contrast agent for imaging of colorectal cancer. In: *Magma (New York, N.y.)* 31 (5), S. 633–644. DOI: 10.1007/s10334-018-0687-7.
- Klinger, Matthias; Brandl, Christian; Zugmaier, Gerhard; Hijazi, Youssef; Bargou, Ralf C.; Topp, Max S. et al. (2012): Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. In: *Blood* 119 (26), S. 6226–6233. DOI: 10.1182/blood-2012-01-400515.
- Knowles, Scott M.; Wu, Anna M. (2012): Advances in immuno-positron emission tomography: antibodies for molecular imaging in oncology. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (31), S. 3884–3892. DOI: 10.1200/JCO.2012.42.4887.
- Kobayashi, Hisataka; Choyke, Peter L.; Ogawa, Mikako (2016): Monoclonal antibody-based optical molecular imaging probes; considerations and caveats in chemistry, biology and pharmacology. In: *Current opinion in chemical biology* 33, S. 32–38. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.05.015.
- Konrad, L.; Dietze, R.; Kudipudi, P. K.; Horné, F.; Meinhold-Heerlein, I. (2019): Endometriosis in MRKH cases as a proof for the coelomic metaplasia hypothesis? In: *Reproduction* 158 (2), R41–R47. DOI: 10.1530/REP-19-0106
- Kuriu, Yoshiaki; Otsuji, Eigo; Kin, Syuichi; Nakase, Yuen; Fukuda, Ken-Ichiro; Okamoto, Kazuma et al. (2006): Monoclonal antibody conjugated to gadolinium as a contrast agent for magnetic resonance imaging of human rectal carcinoma. In: *Journal of surgical oncology* 94 (2), S. 144–148. DOI: 10.1002/jso.20411.
- Leroy, Henri-Arthur; Vermandel, Maximilien; Lejeune, Jean-Paul; Mordon, Serge; Reyns, Nicolas (2015): Fluorescence guided resection and glioblastoma in 2015: A review. In: *Lasers in surgery and medicine* 47 (5), S. 441–451. DOI: 10.1002/lsm.22359.
- Leyendecker, G.; Wildt, L.; Mall, G. (2009): The pathophysiology of endometriosis and adenomyosis: tissue injury and repair. In: *Archives of gynecology and obstetrics* 280 (4), S. 529–538. DOI: 10.1007/s00404-009-1191-0.
- Loeffelmann, A. C.; Hoerscher, A.; Riaz, M. A.; Zeppernick, F.; Meinhold-Heerlein, I.; Konrad, L. (2022): Claudin-10 Expression Is Increased in Endometriosis and Adenomyosis and Mislocalized in Ectopic Endometriosis. In: *Diagnostics* 12 (11), Artikel 2848. DOI: 10.3390/diagnostics12112848
- Lu, Yuan; Huang, Jing; Li, Fakai; Wang, Yuan; Ding, Ming; Zhang, Jian et al. (2021): EGFR-specific single-chain variable fragment antibody-conjugated Fe₃O₄/Au nanoparticles as an active MRI contrast agent for NSCLC. In: *Magma (New York, N.y.)* 34 (4), S. 581–591. DOI: 10.1007/s10334-021-00916-1.
- Lu, Yuan; Liu, Li; Wang, Yuan; Li, Fakai; Zhang, Jian; Ye, Mingxiang et al. (2016): siRNA delivered by EGFR-specific scFv sensitizes EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells. In: *Biomaterials* 76, S. 196–207. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.036.
- Malhotra, Arun (2009): Chapter 16 Tagging for Protein Expression. In: Richard R. Burgess und Murray P. Deutscher (Hg.): *Guide to protein purification*, Bd. 463. 2. ed. Amsterdam: Elsevier (Methods in enzymology 0076-6879, v. 463), S. 239–258.

- Mansour, Nemataallah; Dumulon-Perreault, Véronique; Ait-Mohand, Samia; Paquette, Michel; Lecomte, Roger; Guérin, Brigitte (2017): Impact of dianionic and dicationic linkers on tumor uptake and biodistribution of ⁶⁴CuCu/NOTA peptide-based gastrin-releasing peptide receptors antagonists. In: *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 60 (4), S. 200–212. DOI: 10.1002/jlcr.3491.
- Mark, Jacqueline Kar Kei; Lim, Crystale Siew Ying; Nordin, Fazlina; Tye, Gee Jun (2022): Expression of mammalian proteins for diagnostics and therapeutics: a review. In: *Molecular biology reports* 49 (11), S. 10593–10608. DOI: 10.1007/s11033-022-07651-3.
- Marshall, Milton V.; Draney, Daniel; Sevic-Muraca, Eva M.; Olive, D. Michael (2010): Single-dose intravenous toxicity study of IRDye 800CW in Sprague-Dawley rats. In: *Mol Imaging Biol* 12 (6), S. 583–594. DOI: 10.1007/s11307-010-0317-x.
- McCombs, Jessica R.; Owen, Shawn C. (2015): Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. In: *AAPS J* 17 (2), S. 339–351. DOI: 10.1208/s12248-014-9710-8.
- McDonagh, Charlotte F.; Turcott, Eileen; Westendorf, Lori; Webster, Jennifer B.; Alley, Stephen C.; Kim, Kristine et al. (2006): Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment. In: *Protein engineering, design & selection : PEDS* 19 (7), S. 299–307. DOI: 10.1093/protein/gz1013.
- Mestecky, J. (1972): Structure of antibodies. In: *Journal of oral pathology* 1 (6), S. 288–300. DOI: 10.1111/j.1600-0714.1972.tb01667.x.
- Moradi, Maryam; Parker, Melissa; Sneddon, Anne; Lopez, Violeta; Ellwood, David (2014): Impact of endometriosis on women's lives: a qualitative study. In: *BMC women's health* 14, S. 123. DOI: 10.1186/1472-6874-14-123.
- Muñoz-López, Paola; Ribas-Aparicio, Rosa María; Becerra-Báez, Elayne Irene; Fraga-Pérez, Karla; Flores-Martínez, Luis Fernando; Mateos-Chávez, Armando Alfredo; Luria-Pérez, Rosendo (2022): Single-Chain Fragment Variable: Recent Progress in Cancer Diagnosis and Therapy. In: *Cancers* 14 (17). DOI: 10.3390/cancers14174206.
- Neelapu, Sattva S.; Locke, Frederick L.; Bartlett, Nancy L.; Lekakis, Lazaros J.; Miklos, David B.; Jacobson, Caron A. et al. (2017): Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. In: *The New England journal of medicine* 377 (26), S. 2531–2544. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
- New England Biolabs (2022). Online verfügbar unter https://www.neb-online.de/4DCGI/ezshop?action=caspardo_search&hid=47&sprachnr=de&enter=caspardo&query=SNAP, zuletzt aktualisiert am 29.09.2022, zuletzt geprüft am 29.09.2022.
- Nisenblatt, Vicki; Bossuyt, Patrick M. M.; Farquhar, Cindy; Johnson, Neil; Hull, M. Louise (2016): Imaging modalities for the non-invasive diagnosis of endometriosis. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 2, CD009591. DOI: 10.1002/14651858.CD009591.pub2.
- Nishida, M.; Kasahara, K.; Kaneko, M.; Iwasaki, H.; Hayashi, K. (1985): Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors. In: *Nihon Sanka Fujinka Gakkai zasshi* 37 (7), S. 1103–1111.
- Nnoaham, Kelechi E.; Hummelshoj, Lone; Webster, Premila; d'Hooghe, Thomas; Cicco Nardone, Fiorenzo de; Cicco Nardone, Carlo de et al. (2011): Impact of endometriosis on quality of life

- and work productivity: a multicenter study across ten countries. In: *Fertility and sterility* 96 (2), 366-373.e8. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.090.
- Obana, Akira; Miki, Tokuhiko; Hayashi, Kazuhiko; Takeda, Muneyasu; Kawamura, Akiyuki; Mutoh, Tsutomu et al. (1994): Survey of Complications of Indocyanine Green Angiography in Japan. In: *American Journal of Ophthalmology* 118 (6), S. 749–753. DOI: 10.1016/S0002-9394(14)72554-1.
- Olafsen, Tove; Gu, Zhennan; Sherman, Mark A.; Leyton, Jeffrey V.; Witkosky, Michael E.; Shively, John E. et al. (2007): Targeting, imaging, and therapy using a humanized antiprostata stem cell antigen (PSCA) antibody. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 30 (4), S. 396–405. DOI: 10.1097/CJI.0b013e318031b53b.
- Osada, Hisao (2018): Uterine adenomyosis and adenomyoma: the surgical approach. In: *Fertility and sterility* 109 (3), S. 406–417. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.01.032.
- Panowski, Siler; Bhakta, Sunil; Raab, Helga; Polakis, Paul; Junutula, Jagath R. (2014): Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. In: *mAbs* 6 (1), S. 34–45. DOI: 10.4161/mabs.27022.
- Parenrengi, Muhammad A.; Suryaningtyas, Wihasto; Al Fauzi, Asra; Hafid Bajamal, Abdul; Kusumastuti, Kurnia; Utomo, Budi et al. (2022): Nimotuzumab as Additional Therapy for GLIOMA in Pediatric and Adolescent: A Systematic Review. In: *Cancer Control : Journal of the Moffitt Cancer Center* 29, 10732748211053927. DOI: 10.1177/10732748211053927.
- Polson, Andrew G.; Calemene-Fenau, Jill; Chan, Pamela; Chang, Wesley; Christensen, Erin; Clark, Suzanna et al. (2009): Antibody-drug conjugates for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: target and linker-drug selection. In: *Cancer research* 69 (6), S. 2358–2364. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2250.
- Popp, Maximilian Wei-Lin; Antos, John M.; Ploegh, Hidde L. (2009): Site-specific protein labeling via sortase-mediated transpeptidation. In: *Current protocols in protein science* Chapter 15, Unit 15.3. DOI: 10.1002/0471140864.ps1503s56.
- Prentice, A.; Thomas, E. J.; Weddell, A.; McGill, A.; Randall, B. J.; Horne, C. H. (1992): Epidermal growth factor receptor expression in normal endometrium and endometriosis: an immunohistochemical study. In: *British journal of obstetrics and gynaecology* 99 (5), S. 395–398. DOI: 10.1111/j.1471-0528.1992.tb13756.x.
- Raffone, Antonio; Raimondo, Diego; Oliviero, Alessia; Raspollini, Arianna; Travaglino, Antonio; Torella, Marco et al. (2022): The Use of near Infra-Red Radiation Imaging after Injection of Indocyanine Green (NIR-ICG) during Laparoscopic Treatment of Benign Gynecologic Conditions: Towards Minimalized Surgery. A Systematic Review of Literature. In: *Medicina (Kaunas, Lithuania)* 58 (6). DOI: 10.3390/medicina58060792.
- Raimondo, Diego; Mastronardi, Manuela; Mabrouk, Mohamed; Cafagna, Gabriella; Salucci, Paolo; Arena, Alessandro et al. (2020): Rectosigmoid Endometriosis Vascular Patterns at Intraoperative Indocyanine Green Angiography and their Correlation with Clinicopathological Data. In: *Surgical innovation* 27 (5), S. 474–480. DOI: 10.1177/1553350620930147.
- Rath, Timo; Baker, Kristi; Dumont, Jennifer A.; Peters, Robert T.; Jiang, Haiyan; Qiao, Shuo-Wang et al. (2015): Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and

- more effective therapeutics. In: *Critical reviews in biotechnology* 35 (2), S. 235–254. DOI: 10.3109/07388551.2013.834293.
- Rijpkema, Mark; Bos, Desirée L.; Cornelissen, Alex S.; Franssen, Gerben M.; Goldenberg, David M.; Oyen, Wim J.; Boerman, Otto C. (2015): Optimization of Dual-Labeled Antibodies for Targeted Intraoperative Imaging of Tumors. In: *Molecular Imaging* 14 (7), 7290.2015.00015. DOI: 10.2310/7290.2015.00015.
- Rosenberg, Amy S.; Sauna, Zuben E. (2018): Immunogenicity assessment during the development of protein therapeutics. In: *J Pharm Pharmacol* 70 (5), S. 584–594. DOI: 10.1111/jphp.12810.
- Rosenthal, Eben L.; Warram, Jason M.; Boer, Esther de; Chung, Thomas K.; Korb, Melissa L.; Brandwein-Gensler, Margie et al. (2015): Safety and Tumor Specificity of Cetuximab-IRDye800 for Surgical Navigation in Head and Neck Cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 21 (16), S. 3658–3666. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3284.
- Saito, Shinichi; Koya, Yoshihiro; Kajiya, Hiroaki; Yamashita, Mamoru; Kikkawa, Fumitaka; Nawa, Akihiro (2020): Folate-appended cyclodextrin carrier targets ovarian cancer cells expressing the proton-coupled folate transporter. In: *Cancer science* 111 (5), S. 1794–1804. DOI: 10.1111/cas.14379.
- Sampson, J. A. (1927a): Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation. In: *The American Journal of Pathology* 3 (2), 93–110.43.
- Sampson, John A. (1927b): Peritoneal endometriosis due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. In: *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 14 (4), S. 422–469. DOI: 10.1016/S0002-9378(15)30003-X.
- Sato, Ryuta; Obonai, Toshifumi; Tsumura, Ryo; Tsumoto, Kouhei; Koga, Yoshikatsu; Yasunaga, Masahiro; Matsumura, Yasuhiro (2014): Preparation and characterization of anti-tissue factor single-chain variable fragment antibody for cancer diagnosis. In: *Cancer science* 105 (12), S. 1631–1637. DOI: 10.1111/cas.12557.
- Sato, Seiya; Itamochi, Hiroaki (2016): Profile of farletuzumab and its potential in the treatment of solid tumors. In: *OncoTargets and therapy* 9, S. 1181–1188. DOI: 10.2147/OTT.S98242.
- Satoma, Tero; Pynnönen, Henna; Vilkin, Anja; Kotiranta, Titta; Pitkän, Virve; Heiskanen, Annamari et al. (2018): Hydrophilic Auristatin Glycoside Payload Enables Improved Antibody-Drug Conjugate Efficacy and Biocompatibility. In: *Antibodies (Basel, Switzerland)* 7 (2). DOI: 10.3390/antib7020015.
- Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- Schouw, H. M.; Huisman, L. A.; Janssen, Y. F.; Slart, R. H. J. A.; Borra, R. J. H.; Willemsen, A. T. M. et al. (2021): Targeted optical fluorescence imaging: a meta-narrative review and future perspectives. In: *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 48 (13), S. 4272–4292. DOI: 10.1007/s00259-021-05504-y.

- Schroeder, Harry W.; Cavacini, Lisa (2010): Structure and function of immunoglobulins. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S41-52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- Shafirir, A. L.; Farland, L. V.; Shah, D. K.; Harris, H. R.; Kvaskoff, M.; Zondervan, K.; Missmer, S. A. (2018): Risk for and consequences of endometriosis: A critical epidemiologic review. In: *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 51, S. 1–15. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2018.06.001.
- Siwowska, Klaudia; Schmid, Raffaella M.; Cohrs, Susan; Schibli, Roger; Müller, Cristina (2017): Folate Receptor-Positive Gynecological Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Characterization. In: *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 10 (3). DOI: 10.3390/ph10030072.
- Soliman, Ahmed M.; Fuldeore, Mahesh; Snabes, Michael C. (2017): Factors Associated with Time to Endometriosis Diagnosis in the United States. In: *Journal of women's health (2002)* 26 (7), S. 788–797. DOI: 10.1089/jwh.2016.6003.
- Spirig, Thomas; Weiner, Ethan M.; Clubb, Robert T. (2011): Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. In: *Molecular microbiology* 82 (5), S. 1044–1059. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x.
- Stöcker, Michael; Tur, Mehmet K.; Sasse, Stefanie; Krüßmann, Anne; Barth, Stefan; Engert, Andreas (2003): Secretion of functional anti-CD30-angiogenin immunotoxins into the supernatant of transfected 293T-cells. In: *Protein expression and purification* 28 (2), S. 211–219. DOI: 10.1016/S1046-5928(02)00709-X.
- Strop, Pavel; Liu, Shu-Hui; Dorywalska, Magdalena; Delaria, Kathy; Dushin, Russell G.; Tran, Thomas-Toan et al. (2013): Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates. In: *Chemistry & Biology* 20 (2), S. 161–167. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.01.010.
- Sun, Xiuxia; Ponte, Jose F.; Yoder, Nicholas C.; Laleau, Rassol; Coccia, Jennifer; Lanieri, Leanne et al. (2017): Effects of Drug-Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody-Maytansinoid Conjugates. In: *Bioconjugate chemistry* 28 (5), S. 1371–1381. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00062.
- T HESCs - CRL-4003 | ATCC (2023). Online verfügbar unter <https://www.atcc.org/products/crl-4003>, zuletzt aktualisiert am 09.08.2023, zuletzt geprüft am 09.08.2023.
- Tanyi, Janos L.; Randall, Leslie M.; Chambers, Setsuko K.; Butler, Kristina A.; Winer, Ira S.; Langstraat, Carrie L. et al. (2023): A Phase III Study of Pafolacianine Injection (OTL38) for Intraoperative Imaging of Folate Receptor-Positive Ovarian Cancer (Study 006). In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 41 (2), S. 276–284. DOI: 10.1200/JCO.22.00291.
- Toleikis, Lars; Frenzel, André (2012): Cloning single-chain antibody fragments (ScFv) from hybridoma cells. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 907, S. 59–71. DOI: 10.1007/978-1-61779-974-7_3.
- Tsuchikama, Kyoji; An, Zhiqiang (2018): Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries. In: *Protein Cell* 9 (1), S. 33–46. DOI: 10.1007/s13238-016-0323-0.

- Ulrich (2020): Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose. Arbeitsgruppe „Leitlinie für die Diagnostik und Therapie der Endometriose“ der Deutschen, Österreichischen, Schweizerischen und Tschechischen Gesellschaften für Gynäkologie und Geburtshilfe unter Mitarbeit der Stiftung Endometrioseforschung und der Europäischen Endometriose Liga 2020.
- Vahrmeijer, Alexander L.; Hutteman, Merlijn; van der Vorst, Joost R.; van de Velde, Cornelis J. H.; Frangioni, John V. (2013): Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 10 (9), S. 507–518. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.123.
- van Dam, Gooitzen M.; Themelis, George; Crane, Lucia M. A.; Harlaar, Niels J.; Pleijhuis, Rick G.; Kelder, Wendy et al. (2011): Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. In: *Nature medicine* 17 (10), S. 1315–1319. DOI: 10.1038/nm.2472.
- van den Berg, Liseth L.; Crane, Lucia M. A.; van Oosten, Marleen; van Dam, Gooitzen M.; Simons, Arnold H. M.; Hofker, H. Sijbrand; Bart, Joost (2013): Analysis of biomarker expression in severe endometriosis and determination of possibilities for targeted intraoperative imaging. In: *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 121 (1), S. 35–40. DOI: 10.1016/j.ijgo.2012.10.025.
- van der Vorst, Joost R.; Schaafsma, Boudewijn E.; Hutteman, Merlijn; Verbeek, Floris P. R.; Liefers, Gerrit-Jan; Hartgrink, Henk H. et al. (2013): Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. In: *Cancer* 119 (18), S. 3411–3418. DOI: 10.1002/cncr.28203.
- van Oosten, Marleen; Crane, Lucia Ma; Bart, Joost; van Leeuwen, Fijs W.; van Dam, Gooitzen M. (2011): Selecting Potential Targetable Biomarkers for Imaging Purposes in Colorectal Cancer Using TArget Selection Criteria (TASC): A Novel Target Identification Tool. In: *Translational oncology* 4 (2), S. 71–82. DOI: 10.1593/tlo.10220.
- Vignali, Michele; Bianchi, Stefano; Candiani, Massimo; Spadaccini, Giovanna; Oggioni, Giulia; Busacca, Mauro (2005): Surgical treatment of deep endometriosis and risk of recurrence. In: *Journal of minimally invasive gynecology* 12 (6), S. 508–513. DOI: 10.1016/j.jmig.2005.06.016.
- Vira, Shaleen; Mekhedov, Elena; Humphrey, Glen; Blank, Paul S. (2010): Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. In: *Analytical biochemistry* 402 (2), S. 146–150. DOI: 10.1016/j.ab.2010.03.036.
- Weissleder, Ralph; Ntziachristos, Vasilis (2003): Shedding light onto live molecular targets. In: *Nature medicine* 9 (1), S. 123–128. DOI: 10.1038/nm0103-123.
- Weissleder, Ralph; Ross, Brian D.; Rehemtulla, Alnawaz (2000): Molecular Imaging-Chapter 1 General Principles of Molecular Imaging Seite 1-9. Shelton, UNITED STATES: PMPH USA, Ltd. Online verfügbar unter <http://ebookcentral.proquest.com/lib/unigiessen/detail.action?docID=3386912>.
- Wen, Yunfei; Graybill, Whitney S.; Previs, Rebecca A.; Hu, Wei; Ivan, Cristina; Mangala, Lingegowda S. et al. (2015): Immunotherapy targeting folate receptor induces cell death associated with autophagy in ovarian cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal*

of the American Association for Cancer Research 21 (2), S. 448–459. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1578.

- Winship, Amy; van Sinderen, Michelle; Heffernan-Marks, Ariella; Dimitriadis, Eva (2017): Chondroitin sulfate proteoglycan protein is stimulated by interleukin 11 and promotes endometrial epithelial cancer cell proliferation and migration. In: *International journal of oncology* 50 (3), S. 798–804. DOI: 10.3892/ijo.2017.3848.
- Wollschlaeger, Carolin; Meinhold-Heerlein, Ivo; Cong, Xiaojing; Bräutigam, Karen; Di Fiore, Stefano; Zeppernick, Felix et al. (2018): Simultaneous and Independent Dual Site-Specific Self-Labeling of Recombinant Antibodies. In: *Bioconjugate chemistry* 29 (11), S. 3586–3594. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00545.
- Yakushiji, Hiromasa; Kobayashi, Kazuko; Takenaka, Fumiaki; Kishi, Yoshiro; Shinohara, Midori; Akehi, Masaru et al. (2019): Novel single-chain variant of antibody against mesothelin established by phage library. In: *Cancer science* 110 (9), S. 2722–2733. DOI: 10.1111/cas.14150.
- Yang, Qun-ying; Guo, Cheng-cheng; Chen, Zhong-ping (2015): Profile of nimotuzumab in the treatment of high-grade glioma. In: *OncoTargets and therapy* 8, S. 819–825. DOI: 10.2147/OTT.S60032.
- Zeitvogel, Andreas; Baumann, Rudolf; Starzinski-Powitz, Anna (2001): Identification of an Invasive, N-Cadherin-Expressing Epithelial Cell Type in Endometriosis Using a New Cell Culture Model. In: *The American Journal of Pathology* 159 (5), S. 1839–1852. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63030-1.
- Zhang, Ray R.; Schroeder, Alexandra B.; Grudzinski, Joseph J.; Rosenthal, Eben L.; Warram, Jason M.; Pinchuk, Anatoly N. et al. (2017): Beyond the margins: real-time detection of cancer using targeted fluorophores. In: *Nature reviews. Clinical oncology* 14 (6), S. 347–364. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.212.
- Zimmerman, Erik S.; Heibeck, Tyler H.; Gill, Avinash; Li, Xiaofan; Murray, Christopher J.; Madlansacay, Mary Rose et al. (2014): Production of site-specific antibody-drug conjugates using optimized non-natural amino acids in a cell-free expression system. In: *Bioconjugate chemistry* 25 (2), S. 351–361. DOI: 10.1021/bc400490z.
- Zondervan, Krina T.; Becker, Christian M.; Missmer, Stacey A. (2020): Endometriosis. In: *The New England journal of medicine* 382 (13), S. 1244–1256. DOI: 10.1056/NEJMra1810764.

7. Publikationsverzeichnis

„Development and Evaluation of Antibody Fluorophore Conjugates To Detect Endometrial Tissue” A Grimm, AF Hussain, W Sheng, C Zhang, M Al-Rawe, I Meinhold-Heerlein, Posterbeitrag DGGG-Kongress 2022 der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe

Auszeichnung mit einem Posterpreis

“Toward Homogenous Antibody Drug Conjugates Using Enzyme-Based Conjugation Approaches” Pharmaceuticals Basel (2021)

Ahmad Fawzi Hussain, **Armin Grimm**, Wenjie Sheng, Chaoyu Zhang, Marwah Al-Rawe, Karen Bräutigam, Mobarak Abu Mraheil, Felix Zeppernick, Ivo Meinhold-Heerlein

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Promotion unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Ivo Meinhold-Heerlein, für die Betreuung dieser Arbeit sowie für die freundliche Hilfe und Unterstützung. Einen besonderen Dank möchte ich an Herrn Dr. rer. nat. Ahmad Fawzi Hussain richten. Er stand mir während der gesamten Dauer der Promotion sowohl praktisch als auch theoretisch mit Rat und Tat zur Seite. Ohne seine Hilfe wäre dieses Projekt sicherlich nicht möglich gewesen. Insbesondere der konstruktive Austausch und die Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene waren stets eine große Hilfe für mich und haben mich positiv beeinflusst und ermutigt.

Unerlässlich für den Erfolg dieser Arbeit waren ebenfalls Chaoyu, Wenjie, Mohiuddin und Swantje. Die kollegiale Zusammenarbeit war von Beginn an konstruktiv und lehrreich. Vor allem ist hieraus eine Freundschaft und Verbundenheit entstanden, die über die gemeinsame Arbeit hinaus viel Freude gegeben hat.

Besonders wertvoll war für mich die Unterstützung meiner Eltern, Simin Salehi Naghani und Harald Grimm, und meines Bruders Adrian Grimm. Sie haben mich durch die Höhen und Tiefen dieser Promotion begleitet und mir mehr als einmal eine helfende Hand gereicht. Die beständige Unterstützung, die ich durch Euch erfahre, geht über diese Promotion hinaus und es erfüllt mich mit Dankbarkeit und Liebe Euch bei jedem Schritt an meiner Seite zu wissen.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Studienkollegen, die mich auch in schwierigen Zeiten unterstützt und immer wieder aufgeheitert haben. Dies war stets ein großer Rückhalt für mich, der als wichtiger Teil zum Erfolg dieses Projekts beigetragen hat.