

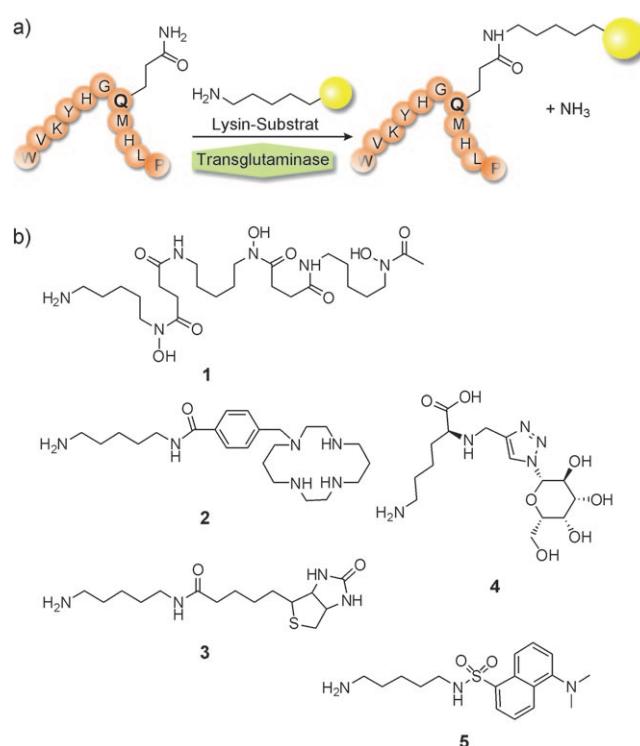
# Ortsspezifische und stöchiometrische Modifikation von Antikörpern durch bakterielle Transglutaminase\*\*

Simone Jeger, Kurt Zimmermann, Alain Blanc, Jürgen Grünberg, Michael Honer,  
Peter Hunziker, Harriet Struthers und Roger Schibli\*

Die therapeutische Wirksamkeit von Antikörpern kann durch die Konjugation mit cytotoxischen Verbindungen wie Chemotherapeutika oder Partikel-emittierenden Radionukliden wesentlich verstärkt werden.<sup>[1]</sup> Intuitiv würde man annehmen, dass der therapeutische Index erhöht wird, je mehr Moleküle der cytotoxischen Substanz an den Antikörper gebunden werden. Neuere Studien mit Auristatin-Antikörper-Konjugaten in Mäusen haben aber gezeigt, dass ein molares Verhältnis von Chemotherapeutika zu Antikörper von 4:1 eine optimale Wirksamkeit ergibt und dass diese Konjugate gut verträglich sind.<sup>[2]</sup>

Herkömmliche chemische Proteinmodifikationsstrategien sind schwierig zu steuern und führen zu heterogenen Produktgemischen aus Immunkonjugaten, die eine unterschiedliche Zahl an Liganden aufweisen. Jedes dieser unterschiedlichen Immunkonjugate hat ein eigenes In-vivo-Verhalten.<sup>[3]</sup> Die Einführung von künstlichen bioorthogonalen Gruppen zur ortsspezifischen und stöchiometrischen Proteinmodifikation stellt eine mögliche Lösung der genannten Probleme dar.<sup>[4–6]</sup> Solche Strategien sind zwar in Mode, sie sind aber oft auch arbeitsaufwändig, und sie bergen noch immer das Risiko heterogener Produkte.

Transglutaminasen (TG, E.C. 2.3.2.13) können katabolisch stabile isopeptidische Bindungen bilden, indem sie Acyltransferreaktionen zwischen der  $\gamma$ -Carboxamidgruppe eines Glutamins (eine Seitenkette, die unter physiologischen Bedingungen chemisch reaktionsträge ist) und der primären  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins katalysieren (Abbildung 1 a).<sup>[7]</sup> Die meisten TGs sind unspezifisch in Bezug auf das Lysin-Substrat und akzeptieren sogar einfache 5-Aminopentylgruppen als Lysin-Surrogate. Für die Erkennung eines Glutamin-Rests als Enzymsubstrat müssen jedoch strikte Kriterien erfüllt sein: Der Rest sollte sich sowohl in einer flexiblen Region des Proteins befinden als auch von bestimmten



**Abbildung 1.** a) T-Modifikation von Glutamin (Q) mit Lysin oder einem Lysinsurrogat durch TG. b) Substrate, die in dieser Studie verwendet wurden.

Aminosäuren umgeben sein.<sup>[8]</sup> Aufgrund dieser Selektivität des Enzyms haben wir die Hypothese aufgestellt, dass die Anwendung der TG eine neue Option zur ortsspezifischen und stöchiometrischen Funktionalisierung von Antikörpern darstellen könnte.<sup>[9]</sup> Für die hier vorgestellten Studien haben wir bakterielle Transglutaminase (BTG) verwendet, weil sie robust, kostengünstig und leicht zu handhaben ist.

Unsere Arbeitsgruppe ist an Radioimmunkonjugaten für diagnostische und therapeutische Anwendungen interessiert, wobei eine geringe Anreicherung von Radioaktivität außerhalb der Zielregion von größter Wichtigkeit ist. Frühere Studien mit radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpern (mAb) haben gezeigt, dass eine große Zahl an Metallchelatoren einen negativen Einfluss auf das biologische Verhalten der Radioimmunkonjugate hatte.<sup>[10,11]</sup> Wir haben die Anwendbarkeit der BTG zur Herstellung von Immunkonjugaten geprüft, indem wir Antikörper mit verschiedenen Metallchelatoren funktionalisiert und anschließend mit diagnostischen und therapeutischen Radionukliden markiert haben. Deferoxamin (DF, 1), ein Gegenmittel bei Metall-

[\*] Dr. S. Jeger, Dr. M. Honer, Dr. H. Struthers, Prof. Dr. R. Schibli  
Department of Chemistry and Applied Biosciences  
ETH Zürich, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: roger.schibli@pharma.ethz.ch  
Homepage: <http://www.pharma.ethz.ch>

K. Zimmermann, A. Blanc, Dr. J. Grünberg  
Center for Radiopharmaceutical Science ETH-PSI-USZ  
Paul Scherrer Institut, Villigen-PSI (Schweiz)  
Dr. P. Hunziker  
Functional Genomics Center, UNI ETH Zürich (Schweiz)

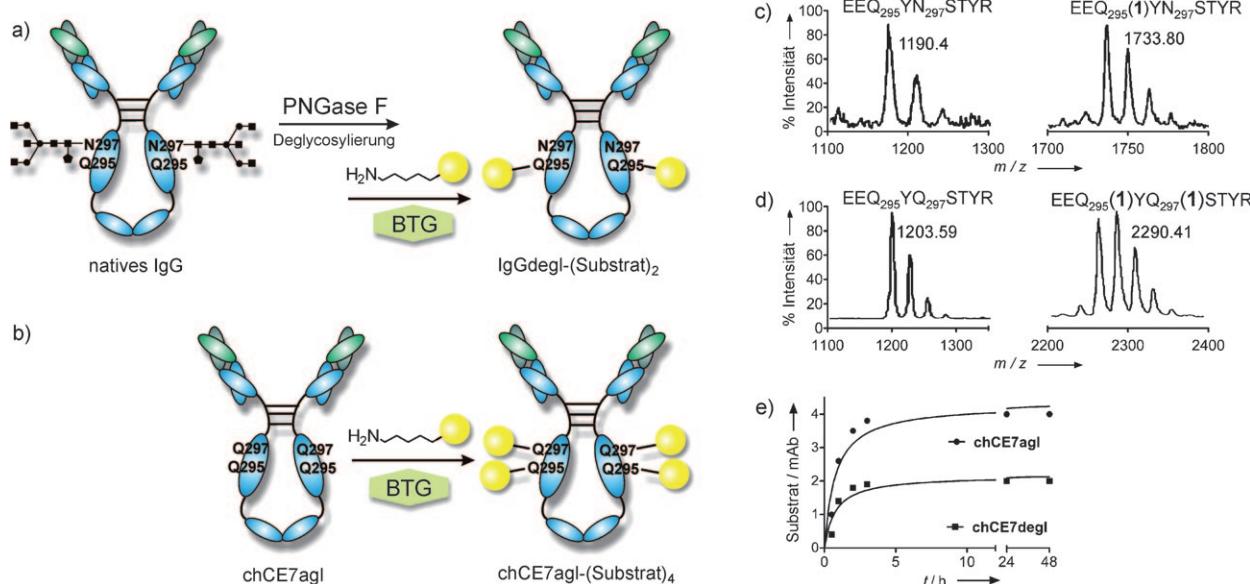
[\*\*] Dieser Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (No. 112437) unterstützt.  
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201004243> zu finden.

vergiftungen, wurde kürzlich als ein sehr guter Chelator für Radionuklide wie  $^{67}\text{Ga}$  oder  $^{89}\text{Zr}$  identifiziert.<sup>[12]</sup> Im Verlauf unserer Studien haben wir festgestellt, dass Deferoxamin ohne weitere Derivatisierung bereits ein gutes Substrat für BTG ist. Des Weiteren haben wir den Metallchelator 4-(1,4,8,11-Tetraazacyclotetradec-1-yl)-methylbenzoësäure (CPTA, **2**) mit einem 1,5-Diaminopentan(Cadaverin)-Abstandhalter derivatisiert (Abbildung 1b; siehe die Hintergrundinformationen für Details zur Synthese). Um die Anwendungsbreite der neuen Strategie zu erkunden, haben wir weitere Substrate untersucht, die für die Antikörpermodifikation von Bedeutung sein könnten, so zum Beispiel Biotin-Cadaverin (**3**), ein Galactopyranoselysin-Derivat (**4**) und den Fluoreszenzfarbstoff Dansyl-Cadaverin (**5**). Der anti-L1-CAM-mAb chCE7 und der kommerzielle anti-CD20-Antikörper Rituximab (RTX) wurden in Gegenwart von BTG mit diesen Substraten funktionalisiert. Die Immunkonjugate wurden nach Reduktion mit Dithiothreitol durch LC/MS charakterisiert (siehe die Hintergrundinformationen).

Zu unserer Überraschung wurde keine Modifizierung der nativen chCE7 oder RTX mit einem der Substrate in Gegenwart von BTG beobachtet, obwohl eine Sequenzanalyse die Anwesenheit zahlreicher Glutaminreste gezeigt hatte (siehe die Hintergrundinformationen). Parallel zu diesen Experimenten wurde auch der aglykosyierte Antikörper chCE7agl getestet, bei dem Asparagin an der Position 297 durch Glutamin ersetzt wurde, um eine N-Glykosylierung zu verhindern.<sup>[13]</sup> Diese Mutation wurde ursprünglich eingeführt, um die Halbwertszeit des radioaktiv markierten Immunkonjugats im Serum zu verkürzen.<sup>[13]</sup> Im Rahmen unserer Studie

hat diese N297Q-Mutation zwei wesentliche Konsequenzen: Erstens trägt der Antikörper ein zusätzliches Glutamin, und zweitens wird in der Literatur beschrieben, dass die Entfernung der Fc-Glycane die Flexibilität der C/E-Schleife (Q295-T299) erhöht.<sup>[14–16]</sup>

Die Massenspektren der chCE7agl-Konjugate zeigten, dass die leichte Kette (LC) nicht modifiziert wird, während die schwere Kette (HC) mit allen getesteten Substraten genau zwei Modifikationen aufwies (siehe die Hintergrundinformationen). Daraus folgt, dass vollkommen homogene Immunkonjugate mit einem definierten Substrat/Antikörper-Verhältnis von 4:1 (dies ist auch das optimale Verhältnis, das für Auristatin-Immunkonjugate gefunden wurde<sup>[2]</sup>) hergestellt wurden (Abbildung 2b,d). SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen der enzymatisch funktionalisierten Immunkonjugate (mit Biotin und dem Fluoreszenzfarbstoff) haben bestätigt, dass nur die HC modifiziert wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Dagegen zeigen die Massenspektren von chCE7 und RTX, die chemisch über Lysinreste mit Isothiocyanat- oder Hydroxysuccinimid-Analoga mit den Substraten **1–3** funktionalisiert wurden, dass eine variierende Anzahl an Molekülen sowohl an die LC als auch an die HC gebunden sind (siehe die Hintergrundinformationen). Die chemische Konjugation führt also zu einem in zweifacher Hinsicht heterogenen Produktgemisch: Zum einen gibt es Spezies, die eine unterschiedliche Zahl an Molekülen pro mAb tragen, und zum anderen sind die Moleküle bei isostochiometrischen Immunkonjugaten an verschiedene Stellen des Antikörpers gebunden. MALDI-TOF-MS-Analysen belegen eindeutig, dass Q295 und Q297 in chCE7agl tatsächlich

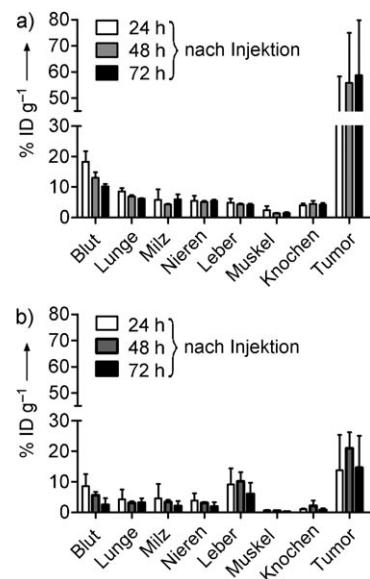


**Abbildung 2.** a) BTG erkennt ausschließlich die Aminosäure Q295, die sich in der Fc-Region von deglykosylierten IgG-Antikörpern (IgGdegI) befindet, als Modifikationsstelle mit einem geeigneten Substrat. Dies führt zu einem Verhältnis von Substrat zu mAb von exakt zwei. Deglykosylierung: mAb ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), PNGase F (100 U), PBS (pH 7,4),  $37^\circ\text{C}$ , über Nacht. Konjugation: mAb ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), BTG ( $1 \text{ U/mL}$ ), **1–5** ( $400 \mu\text{M}$ ), PBS (pH 8),  $37^\circ\text{C}$ . b) Im aglykosylierten Antikörper chCE7agl (N297Q) wird unter den gleichen Reaktionsbedingungen Q297 als zweite Modifikationsstelle erkannt, was zu einem Substrat/mAb-Verhältnis von exakt vier führt. c, d) MALDI-TOF-MS-Analysen der tryptischen Fragmente mit Q295 oder Q295 und Q297 (links) und der entsprechenden Immunkonjugate (rechts) zeigen exakte Stelle und stöchiometrisches Verhältnis der Modifikation. e) Zeitabhängiger Umsatz von chCE7degI (■) und chCE7agl (●) mit **1** durch BTG. Das Substrat/mAb-Verhältnis erreichte nach ungefähr 4 Stunden ein Plateau.

die Konjugationsstellen der BTG sind. Das tryptische Fragment des nichtkonjugierten chCE7agl-Antikörpers, das Q295 und Q297 enthält ( $[EEQ_{295}YQ_{297}STYR + H]^+$ : ber. 1203.52, gef. 1203.59), war zweifelsohne mit zwei Substraten modifiziert. Zum Beispiel entsprach die Masse des tryptischen Produkts der Reaktion mit dem Substrat **1** dem Fragment  $[EEQ_{295}(1)YQ_{297}(1)STYR + H]^+$  (ber. 2290.17, gef. 2290.41; Abbildung 2 d).

Eine vergleichende B-Faktoranalyse des glykosylierten Fc-Fragments von RTX (DOI:10.2210/pdb116x/pdb) und dem deglykosylierten Fc-Fragment eines humanen IgG1-Antikörpers (DOI:10.2210/pdb3dnk/pdb) hat ergeben, dass der Wert für das C $\alpha$  in der C/E-Schleife des deglykosylierten Antikörpers zu einer offeneren Konformation verschoben ist (für die Positionen Q295 und N/D297 der deglykosylierten Variante wurde beispielsweise ein Wert von 5 Å ermittelt; siehe die Hintergrundinformationen). Aus diesen Beobachtungen haben wir geschlossen, dass die Unterschiede bezüglich der enzymatischen Konjugierbarkeit zwischen nativen und aglykosylierten Antikörpern vor allem auf die erhöhte Flexibilität der C/E-Schleife zurückzuführen sind. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir die Glycane der nativen Antikörper chCE7 und RTX mit N-Glycosidase F (PNGase F) entfernt. Die deglykosylierten Antikörper (chCE7degI und RTXdegI) wurden anschließend mit BTG und den Substraten **1** und **2** umgesetzt. MS-Analysen der Reaktionsprodukte haben ergeben, dass beide deglykosylierten Antikörper genau ein Substrat pro HC trugen, während die LC nicht modifiziert wurde. Dies führte zu homogenen Immunkonjugaten mit einem Substrat/Antikörper-Verhältnis von genau zwei. Durch MALDI-TOF-MS wurde außerdem Q295 als Konjugationsstelle bestätigt (Abbildung 2 c).

Um die Effekte des moderaten Substrat/Antikörper-Verhältnisses und der Homogenität der Immunkonjugate auf das In-vivo-Verhalten zu ermitteln, wurde chCE7agl-(**1**)<sub>4</sub> mit <sup>67</sup>Ga radiochemisch markiert und in weibliche Nacktmäuse injiziert, die humane SKOV3ip-Ovarialkarzinome trugen. Die maximale durchschnittliche Tumoraufnahme betrug 58.7 % ID g<sup>-1</sup> und wurde 72 h nach der Injektion erreicht (Abbildung 3a, Tabelle S11). Die unspezifische Aufnahme in alle anderen untersuchten Organe war zu allen Zeitpunkten geringer als 9 % ID g<sup>-1</sup> (mit Ausnahme des Blutes). Diese Verteilung ergab hohe Tumor/Leber- und Tumor/Nieren-Werte von 14.0 bzw. 10.7 (72 h nach der Injektion). Im Vergleich dazu betrug die maximale durchschnittliche Tumoraufnahme eines chemisch konjugierten Analogons (mit einer berechneten durchschnittlichen Zahl von vier Chelatoren pro mAb) 21.0 % ID g<sup>-1</sup> und wurde 48 h nach der Injektion erreicht. Außerdem wurden hohe Radioaktivitätswerte in der Leber gemessen (zwischen 6.0 und 10.2 % ID g<sup>-1</sup>; Abbildung 3b und Tabelle S11). Positronenemissionstomogramme von Mäusen, denen <sup>89</sup>Zr-markiertes chCE7agl-(**1**)<sub>4</sub> injiziert worden war, korrelierten gut mit den Bioverteilungsdaten des <sup>67</sup>Ga-chCE7agl-(**1**)<sub>4</sub> (Abbildung S5). Eine vergleichende Studie von Bioverteilungen in Mäusen mit CD20-positiven Ramos-Xenotransplantaten wurde mit enzymatisch oder chemisch modifizierten <sup>64/67</sup>Cu-CPTA-RTXdegI durchgeführt. Wieder wurde mit dem enzymatisch hergestellten Konjugat ein beseres Zielgewebe/Normalgewebe-Verhältnis beobachtet.



**Abbildung 3.** Zeitabhängige Organverteilung von a) enzymatisch und b) chemisch konjugiertem <sup>67</sup>Ga-chCE7agl-(**1**)<sub>4</sub> in tumortragenden Mäusen.

Wir konnten zeigen, dass die enzymatische Modifikation von Antikörpern durch BTG ortsspezifisch und vielseitig anwendbar ist (mit Möglichkeit zur Anwendung des Prozesses im größeren Maßstab) und zu homogenen Immunkonjugaten mit einer definierten stöchiometrischen Zusammensetzung führt. Die In-vivo-Charakteristika solcher Immunkonjugate waren besser als diejenigen der chemisch hergestellten Analoga. Da sich die Position 295 in der konstanten Fc-Region befindet, sollte die enzymatische Konjugationsstrategie nicht nur auf andere humane IgG1s, sondern auch auf Antikörper der Subtypen IgG2, IgG3 und IgG4, die alle den konservierten Rest Q295 enthalten, anwendbar sein.<sup>[17]</sup> Daher könnte diese Methode breite Anwendungsmöglichkeiten haben und die systematische Bewertung und Verbesserung von Immunkonjugaten ermöglichen.

Eingegangen am 12. Juli 2010,  
veränderte Fassung am 13. September 2010  
Online veröffentlicht am 25. November 2010

**Stichwörter:** Bakterielle Transglutaminase · Enzyme · Proteinmarkierung · Radioimmunkonjugate

- [1] P. Carter, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 118–129.
- [2] K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. C. Sun, J. Lenox, C. G. Cerveny, K. M. Kissler, S. X. Bernhardt, A. K. Kopcha, R. F. Zabinski, D. L. Meyer, J. A. Francisco, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7063–7070.
- [3] T. U. Gerngross, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1409–1414.
- [4] J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. Tsai, M. S. Dennis, Y. Lu, Y. G. Meng, C. Ng, J. Yang, C. C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S. D. Spencer, W. Lee Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925–932.

- [5] P. Wu, W. Q. Shui, B. L. Carlson, N. Hu, D. Rabuka, J. Lee, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3000–3005.
- [6] W. Peters, S. Willnow, M. Duisken, H. Kleine, T. Macherey, K. E. Duncan, D. W. Litchfield, B. Lüscher, E. Weinhold, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5296–5299; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5170–5173.
- [7] L. Lorand, R. M. Graham, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 140–156.
- [8] A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F. M. Veronese, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 13–28.
- [9] M. Bartholomä, J. Valliant, K. P. Maresca, J. Babich, J. Zubieta, *Chem. Commun.* **2009**, 493–512.
- [10] K. Knogler, J. Grünberg, I. Novak-Hofer, K. Zimmermann, P. A. Schubiger, *Nucl. Med. Biol.* **2006**, *33*, 883–889.
- [11] D. L. Kukis, G. L. DeNardo, S. J. DeNardo, G. R. Mirick, L. A. Miers, D. P. Greiner, C. F. Meares, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 878–884.
- [12] E. C. Dijkers, J. G. Kosterink, A. P. Rademaker, L. R. Perk, G. A. van Dongen, J. Bart, J. R. de Jong, E. G. de Vries, M. N. Lub-de Hooge, *J. Nucl. Med.* **2009**, *50*, 974–981.
- [13] K. Knogler, J. Grünberg, K. Zimmermann, S. Cohrs, M. Honer, S. Ametamey, P. Altevogt, M. Fogel, P. A. Schubiger, I. Novak-Hofer, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 603–611.
- [14] S. Matsumiya, Y. Yamaguchi, J. Saito, M. Nagano, H. Sasakawa, S. Otaki, M. Satoh, K. Shitara, K. Kato, *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 767–779.
- [15] M. J. Feige, S. Nath, S. R. Catharino, D. Weinfurtner, S. Steinbacher, J. Buchner, *J. Mol. Biol.* **2009**, *391*, 599–608.
- [16] S. Krapp, Y. Mimura, R. Jefferis, R. Huber, P. Sondermann, *J. Mol. Biol.* **2003**, *325*, 979–989.
- [17] P. Sondermann, R. Huber, V. Oosthuizen, U. Jacob, *Nature* **2000**, *406*, 267–273.