

Durch Design verbrückt: ein konformativ eingeschränkter Transglutaminase-Marker ermöglicht effiziente ortsspezifische Konjugation

Vanessa Siegmund, Stefan Schmelz, Stephan Dickgiesser, Jan Beck, Aileen Ebenig, Heiko Fittler, Holm Frauendorf, Birgit Piater, Ulrich A. K. Betz, Olga Avrutina, Andrea Scrima, Hans-Lothar Fuchsbauer und Harald Kolmar*

Abstract: Basierend auf der Kristallstruktur eines natürlichen Proteinsubstrats von mikrobieller Transglutaminase, einem Enzym, das die Vernetzung von Proteinen katalysiert, wurde eine Erkennungssequenz für ortsspezifische Konjugation rational entworfen. Dieses Strukturmimetikum einer nativen Konjugationsstelle wurde konformativ über eine intramolekulare Disulfidbrücke fixiert und ermöglichte dadurch die effiziente Konjugation eines Reportermoleküls an den therapeutischen monoklonalen Antikörper Cetuximab, ohne dessen Bindungseigenschaften zu beeinträchtigen.

Die Biokonjugation sowohl an natürliche als auch an synthetische Makromoleküle hat sich als leistungsfähiges Hilfsmittel erwiesen, um die Architektur dieser Moleküle zu verändern und ihre funktionellen Eigenschaften zu verbessern.^[1] Durch Verwendung verschiedenster Ligationsstrategien wurden zahlreiche Proteine fluoreszenz- oder radiomarkiert, aneinandergefügt oder mit funktionellen Molekülen wie Polyethylenglycolen (PEGs), Porphyrinen, Peptiden, Peptid-Nukleinsäuren und pharmazeutischen Wirkstoffen verknüpft.^[1b] Unter diesen Konstrukten sind in den letzten Jahren Biokonjugate, die einen funktionellen Wirkstoff mit einem monoklonalen Antikörper kombinieren, auf großes Interesse gestoßen.^[2] Bei diesen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten (ADCs) übernimmt der Antikörper die Aufgabe, ein hochpotentes Toxin gerichtetet in eine Tumorzelle einzubringen, das dort freigesetzt wird und den Zelltod herbeiführt.^[3] Normalerweise gestaltet sich die Herstellung von definierten Antikörperkonjugaten unter physiologischen Bedingungen mit Blick auf die erforderliche Selektivität, Spezifität und Reaktivität als besonders schwierig.^[1a]

Idealerweise erfolgt die Konjugation von Toxinen oder anderen funktionellen Einheiten an ein Antikörpergerüst mit definierter Stöchiometrie und Regiospezifität,^[1b] allerdings basieren die bis heute entwickelten chemischen Strategien zur Proteinmodifikation meistens auf einer Konjugation an oberflächenexponierte Lysin- oder Cysteinreste.^[4] Dieses Vorgehen führt häufig zu heterogenen Populationen von Konjugaten mit unterschiedlicher Beladungsverteilung, die dann möglicherweise verschiedene Eigenschaften aufweisen und ein uneinheitliches Verhalten *in vivo* zeigen.^[4g,5]

Die Herstellung definierter ADCs kann mithilfe verschiedener Ansätze,^[6] darunter auch einer enzymkatalysierten Konjugation,^[7] erfolgen. In diesem Kontext wurden mikrobielle Transglutaminase (MTG) und Sortase A bereits zur ortsspezifischen Ligation eines Antikörpers mit einer zytotoxischen/markierenden Substanz durch Bildung einer Isopeptid-^[8] bzw. Peptidbindung^[9] eingesetzt.

Transglutaminasen (TGs, E.C.2.3.2.13) katalysieren den Acyltransfer zwischen der ϵ -Aminogruppe von Lysin und der γ -Carboxamidgruppe von Glutamin, wobei sie ein breites Spektrum an Aminsubstraten akzeptieren, die der Seitenkette von Lysin ähnlich sind.^[10] Das Glutaminsubstrat unterliegt hingegen strengeren Anforderungen. Um von einer Transglutaminase als Substrat akzeptiert zu werden, muss der Glutaminrest in einem speziellen Aminosäurekontext vorliegen, der eine bestimmte Konformation und ausreichend Flexibilität aufweist.^[10b] Bisher erschweren fehlende Informationen über die Zusammensetzung und Architektur dieser Konjugationsstellen in natürlichen Transglutaminasesubstraten die breite Anwendung dieser Enzyme zur Herstellung von Proteinkonjugaten. In den letzten Jahren gab es Versuche zur Optimierung von MTG in Bezug auf Stabilität, Aktivität und Spezifität.^[11] Um die Substratspezifität von MTG aufzuklären, wurden fluoreszierende Derivate des künstlichen Substrats *N*-Benzylloxycarbonyl-L-glutaminylglycin als Acyldonor und verschiedene primäre Amine als Acylakzeptor eingesetzt.^[12] Darüber hinaus wurden mithilfe von Phagendisplay- und mRNA-Display-Techniken Glutamin-Konsensussequenzen für MTG identifiziert, die für die enzymkatalysierte Konjugation und die Herstellung von homogenen ADCs verwendet werden können.^[8c,13]

Wir sind hier von der Hypothese ausgegangen, dass Transglutaminase-Erkennungssequenzen, welche natürlichen

[*] Dr. V. Siegmund, S. Dickgiesser, J. Beck, A. Ebenig, H. Fittler, Dr. O. Avrutina, Prof. Dr. H. Kolmar
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität Darmstadt
Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt (Deutschland)
E-Mail: Kolmar@biochemie.tud.de

Prof. Dr. H.-L. Fuchsbauer
Fachbereich Chemie- und Biotechnologie
Hochschule Darmstadt (Deutschland)

Dr. H. Frauendorf
Institut für Organische und Biomolekulare Chemie
Zentrale Analytik/Massenspektrometrie
Universität Göttingen (Deutschland)

Dr. S. Schmelz, Dr. A. Scrima
Arbeitsgruppe Strukturbioologie der Autophagie
Abteilung Struktur und Funktion der Proteine
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Braunschweig (Deutschland)

Dr. B. Piater, Dr. U. A. K. Betz
Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201504851> zu finden.

MTG-Substraten entnommen wurden und die natürliche Strukturumgebung imitieren, effizient vom Enzym erkannt werden. Aus früheren Arbeiten ist zudem bekannt, dass die Tertiärstruktur mitunter wichtiger für die Protein-Protein-Wechselwirkung sein kann als die primäre Aminosäuresequenz.^[14] In der hier vorgestellten Arbeit wurde molekulares Design auf Grundlage der Kristallstruktur eines natürlichen Proteinsubstrats der bakteriellen Transglutaminase angewendet, um ein Strukturmimetikum einer nativen MTG-Konjugationsstelle zu entwerfen. Dieser so genannte MTG-Marker ermöglichte die kovalente Verknüpfung zwischen Reportermolekülen und a) einem Modellpeptid sowie b) einem monoklonalen Volllängenantikörper mit einer ausgezeichneten Konjugationseffizienz.

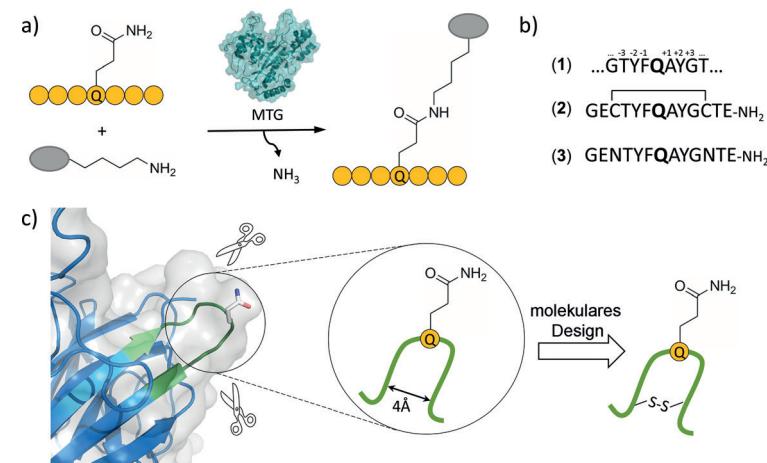
Bakterielle Transglutaminase kann effizient für die Transglutaminierung teilweise oder vollständig denaturierter Proteine eingesetzt werden, wohingegen sie bei gefalteten Spezies sequenz- und konformationsabhängig arbeitet.^[10b,f] In der Tat haben unsere Vorversuche gezeigt, dass keiner der 64 Glutaminreste innerhalb des monoklonalen Antikörpers Cetuximab, eines EGFR-bindenden Antikörpers (EGFR = Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor), der in der Klinik für die Behandlung von Dickdarmkrebs eingesetzt wird, effizient als MTG-Substratrest für die ortsspezifische Konjugation mit einem primären Amin erkannt wird (Abbildung S14 der Hintergrundinformationen). Diese Beobachtungen sind in völliger Übereinstimmung mit vorherigen Befunden.^[10c,d,15] Bis heute sind weder die Sequenz noch die Strukturumgebung von natürlichen MTG-Substratstellen bekannt. Aus diesem Grund war es bisher nicht möglich, einen generischen Ansatz zu entwickeln, bei dem ein Fragment für Zwecke der spezifischen und effizienten MTG-Markierung in ein Zielprotein eingebracht wird, das der Sequenz und der Struktur nach einem natürlichen MTG-Erkennungsmotiv möglichst nahe kommt.

Wir haben kürzlich drei natürliche Substratproteine der MTG identifiziert.^[16] Unter diesen befindet sich auch das 37 kDa große Dispase-Autolyse Induzierende Protein (DAIP), das die Autolyse von neutralen Metalloproteasen auslöst.^[16c] Dieses Protein wurde zunächst ausgehend vom Aminoterminus ansequenziert. Außerdem wurde das für DAIP kodierende Gen durch die Sequenzierung des gesamten Genoms von *Streptomyces mobaraensis* Stamm 40847 identifiziert. Mit diesen Informationen wurden daraufhin das ursprüngliche DAIP mit seinen fünf Glutaminresten sowie Derivate mit verschiedenen Gln-zu-Asn-Austauschen rekombinant in *E. coli*-Zellen produziert. Im Anschluss daran wurden MTG-vermittelte Ligationen mit Monobiotinylcadaverin durchgeführt und schließlich drei MTG-Konjugationsstellen identifiziert – Q39, Q298 und Q345 –, die eine ausgesprochen hohe Markierungseffizienz gezeigt hatten.^[16d]

Um weitere Erkenntnisse über das MTG-Substraterkennungsmuster zu erhalten, lösten wir die Kristallstruktur von DAIP mit einer Auflösung von 1.7 Å. Es zeigte sich, dass DAIP eine β-Propellerstruktur aufweist, bei der alle MTG-Substratstellen

auf oberflächenexponierten Schleifen lokalisiert sind. Dennoch wird der Gln-Rest in unterschiedlichen Sequenzkontexten und Schleifenkonformationen vorgefunden. Im Speziellen ist die MTG-Stelle Q298 über eine Typ-II-β-Schleife definiert, die zwei β-Stränge miteinander verbindet (Schema 1, Sequenz 1) und Q39 in einer Schleife mit erweiterter Konformation lokalisiert, während die Struktur um Q345 nicht aufgelöst ist. Sequenz 1 zeigt um Q298 keinerlei Ähnlichkeit mit den Konsensussequenzen von mikrobieller Transglutaminase, die über Phagendisplay-Durchmusterung von linearen Peptiden identifiziert wurden.^[13c] Sie weist weder aromatische Aminosäuren noch Arginine an den drei dem reaktiven Glutaminrest vorhergehenden Positionen auf (Schema 1b). Darüber hinaus fehlen dieser Sequenz doppelte Q-Paare, die zuvor als bevorzugte Substratstellen identifiziert wurden.^[17]

Ausgehend von der Erkennungssequenz 1 haben wir Oligopeptid 2 entworfen. Um den funktionellen Loop Q298 aus DAIP genau zu imitieren, der von G295 und G302 mit einem C_α-Abstand von ungefähr 4 Å begrenzt wird, wurden flankierende Cysteine eingefügt, die die β-Schleife nach der Oxidation zu einem kovalenten Disulfid konformativ fixieren sollten (Schema 1, Peptid 2). Um die Position für das strukturstabilisierende Cystin zu definieren, haben wir die Struktur von 2 mit klassischen disulfidhaltigen Peptidmolekülen überlagert. Disulfidverbrückte Peptide dieser Größenordnung haben typischerweise Cys-Cys-C_α-Abstände von etwa 4 Å (z. B. 3.8 Å beim offenkettigen Sonnenblumen-Trypsin-Inhibitor SFTI; PDB-Code: 1JBN).^[18] Des Weiteren konnten wir eine MTG-katalysierte Modifizierung von reduziertem und mit Iodacetamid S-alkylierten Substrat 2 beobachten (Abbildungen S4-S7 der Hintergrundinformationen). Als Kontrolle und um die Auswirkung der Schleifenfixierung auf die MTG-vermittelte Konjugation zu untersuchen, wurde Peptid 3 synthetisiert, bei dem die Cysteine durch Asparagine ersetzt wurden. Da die Kernsequenz von 2 und 3 recht hy-



Schema 1. a) Transglutaminase-vermittelte Konjugation von Glutamin (Q) mit einem Aminoterminussubstrat. b) Aminosäuresequenz einer natürlichen Transglutaminase-Erkennungssequenz aus dem Substratprotein DAIP (1) sowie daraus abgeleitete Sequenzen 2 und 3, die für die Konjugation verwendet wurden. c) Design einer weiterentwickelten Transglutaminase-Erkennungssequenz (MTG-Marker), die die funktionelle Q298-Schleife in DAIP imitiert.

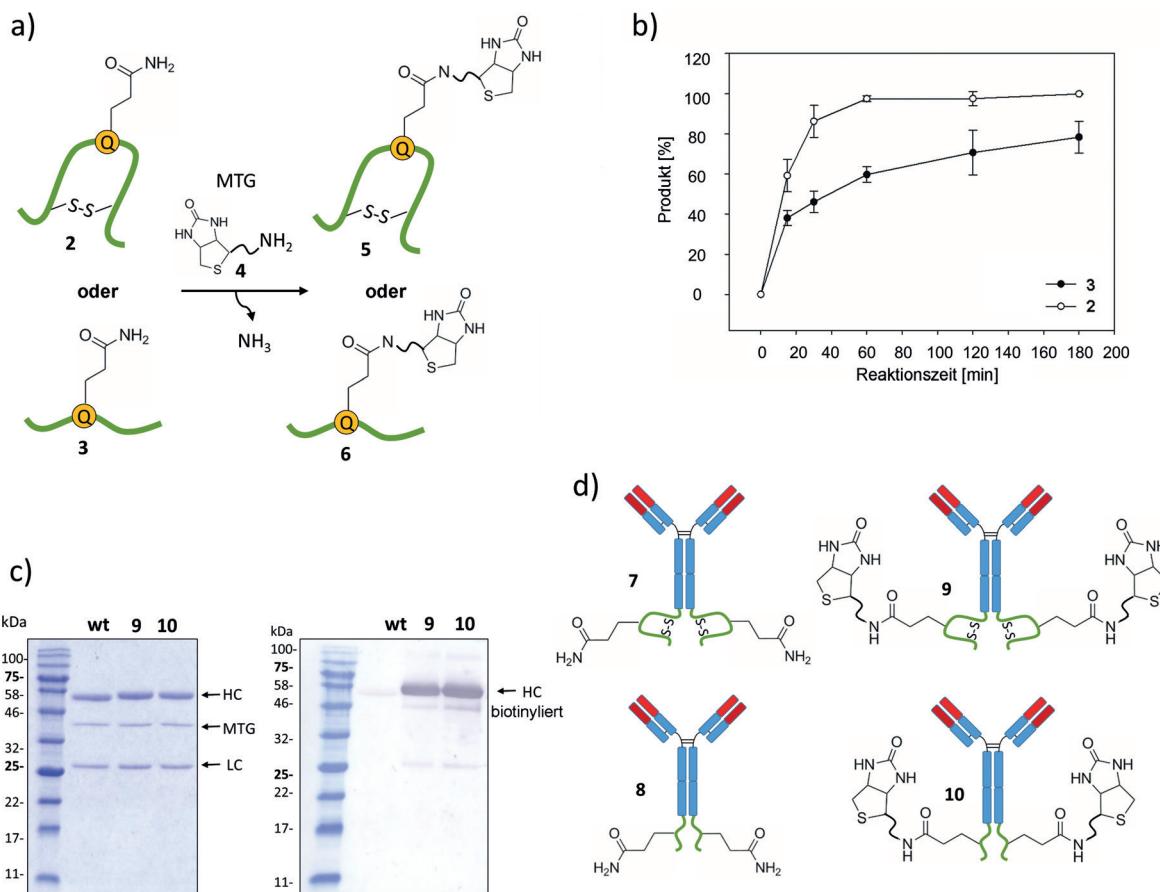


Abbildung 1. MTG-vermittelte Konjugation der entwickelten Modellpeptide und monoklonaler Volllängenantikörper. a) Die Modellpeptide **2** und **3**, die ein Transglutaminase-Erkennungsmotiv aufweisen, wurden in MTG-katalysierten Reaktionen mit Monobiotinylcadaverin (**4**, MBC) biotinyliert. b) Kinetiken der Biotinylierung des konformativ eingeschränkten Peptids **2** (○) und des linearen Peptids **3** (●). Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Dreifachbestimmungen an (Abbildungen S11 und S12 der Hintergrundinformationen). c) SDS-PAGE-Gel und Western-Blot-Analyse von biotinylierten Cetuximab-Varianten mit C-terminalen MTG-Markern (**9** und **10**). Die Biotinylierung wurde über Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugate und NBT/BCIP nachgewiesen (rechte Seite). wt = Wildtyp. d) Übersicht der Cetuximab-Varianten mit C-terminalen MTG-Markern (**7** und **8**), die in der MTG-vermittelten Biotinylierung eingesetzt wurden, und der entsprechenden konjugierten Antikörper (**9** und **10**).

drophob ist, wurden flankierende GE- und TE-Reste hinzugefügt, um die Wasserlöslichkeit der Peptide zu erhöhen.

Im Anschluss an die Festphasensynthese von **2** und **3** mit nachfolgender oxidativer Faltung im Fall des Cys-haltigen Peptids **2** (Kapitel 1.2 und Abbildungen S1, S2, S8, S9 der Hintergrundinformationen), wurden MTG-katalysierte Ligations in Proof-of-Concept-Experimenten mit diesen Peptiden und Biotinylcadaverin **4** als Amindonor (Abbildung 1a) in wässrigem Puffer bei pH 7 durchgeführt (Abbildungen S3, S10–S12, S23–S26 und Kapitel 1.5 der Hintergrundinformationen).

Über HPLC-Analysen der durch Enzymkatalyse hergestellten Konjugate **5** und **6** konnte die erwartete Auswirkung der induzierten konformativen Einschränkung auf das Erkennen des Gln-Substratrestes bestätigt werden, da Substrat **2** signifikant schneller umgesetzt wurde als **3** (Abbildung 1b). Tatsächlich wurde in der Gegenwart eines molaren Überschusses an **4** (5 Äquiv. bezüglich des jeweiligen Peptids) nach 60 min in der Reaktionsmischung kein **2** mehr vorgefunden (Abbildung S11 der Hintergrundinformationen), wohingegen **3** auch nach 3 h noch nachgewiesen werden konnte.

Ermutigt von diesen Befunden entschieden wir uns dazu, unser Strukturdesign eines konformativ eingeschränkten Erkennungsmotivs für die regioselektive Konjugation eines Antikörpers mit einem Molekül der Wahl zu nutzen. Für die ersten Experimente wurden Cetuximab-Varianten mit dem jeweiligen MTG-Marker ausgestattet, sowohl mit der disulfidverbrückten (**7**; Abbildung 1d) als auch mit der nichtverbrückten (**8**; Abbildung 1d) Erkennungssequenz (Abbildung S13 der Hintergrundinformationen). Das Vorhandensein der Disulfidbrücke in **7** wurde über den Ellman's Assay nachgewiesen (Abbildung S22 der Hintergrundinformationen). Dabei konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt mit zwei Cysteinen in der Marker-Sequenz den gleichen Gehalt an freien Cysteinen hatte wie **8** mit zwei Asn anstelle von Cys, ein Hinweis darauf, dass keine zusätzlichen freien Thiole vorhanden waren. Da in ersten Vorversuchen eine MTG-katalysierte intramolekulare Verknüpfung über das C-terminale Lysin (K447) der Wildtypsequenz beobachtet wurde, wurde dieser Rest aus der Sequenz deletiert (Abbildung S20 der Hintergrundinformationen). Als Testmarkierung wurde Biotinylcadaverin **4** verwendet. Nach einer dreistündigen

Inkubation von **7** oder **8** mit **4** in Gegenwart von MTG bei Raumtemperatur wurde eine SDS-PAGE-Analyse mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Unter denaturierenden Bedingungen konnten die biotinylierten schweren Ketten (**9**, **10**; Abbildung 1 c) mithilfe eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugats und den Substraten 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) sowie Nitroblau-Tetrazolium (NBT) sichtbar gemacht werden; so ließ sich eine erfolgreiche Konjugation im Fall beider Antikörper nachweisen (Abbildung 1 c). Durch die MTG-katalysierte Reaktion von **7** und **8** mit fluoreszenzmarkiertem Cadaverin wurde eine Konjugationseffizienz von 85 bzw. 86% erreicht (Abbildung S21 der Hintergrundinformationen).

Um die Spezifität der MTG-Marker-Konjugation zu untersuchen, wurden die schweren, unter denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen erhaltenen Ketten von Konstrukt **10** (Abbildung S15 der Hintergrundinformationen) im SDS-PAGE-Gel reduziert, die erhaltenen freien Thiole mit Iodacetamid alkyliert und die Proben mit Trypsin umgesetzt.^[19] Die verdauten Produkte wurden über MALDI-TOF-MS analysiert (Abbildungen S16–S18 der Hintergrundinformationen). Die Kondensation mit Substrat **4** wurde dabei ausschließlich am Glutaminrest innerhalb des MTG-Markers nachgewiesen (der Position Q453 in der modifizierten schweren Kette entspricht). Da dieses Vorgehen in unserem Fall nur zu einer Sequenzabdeckung von 56% geführt hat, kann eine unspezifische Biotinylierung, vermutlich am modifikationsanfälligen Rest Q295 (oder auch an anderen Glutaminen), nicht ausgeschlossen werden.^[10d,15]

Um zu überprüfen, ob die C-terminale Modifikation des Antikörpers nach Einführung eines MTG-Markers die Biaktivität des EGFR-spezifischen Cetuximab beeinträchtigt hatte, wurden zelluläre Bindungsassays mit EGFR-überexprimierenden EBC-1-Krebszellen und EGFR-negativen CHO-K1-Zellen als Kontrolle durchgeführt (Abbildung 2 a). Nachdem die Zellen sowohl mit den aufgereinigten Konjugaten **7–10** als auch mit Cetuximab-Wildtyp in An- (Konjugate **9**, **10** und Wildtyp) und Abwesenheit (Antikörper **7**, **8** und Wildtyp) von MTG inkubiert worden waren (Abbildung 2 a, mittlere und obere Reihe), wurde die Bindung auf der Zelloberfläche durch eine Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbten Zellkernen (blau) und den mit Streptavidin-Alexa-Fluor-488-Konjugat markierten Zellen (grün) sichtbar gemacht.

Die intensive grüne Fluoreszenz zeigte im Fall der Konjugate **9** und **10** eine Bindung an die Zielzellen an. Allerdings wurde ebenfalls geringfügig Hintergrundfluoreszenz im Fall des unveränderten Wildtypantikörpers beobachtet, was auf einen kleinen Anteil an unspezifischer Biotinylierung schließen lässt. Bislang wurden noch keine Versuche unternommen, die Selektivität der Markierung über das eingesetzte Verhältnis von Antikörper zu Enzym, Reaktionszeit, Temperatur oder Ligandenkonzentration zu optimieren. Wie erwartet wurde keine grüne Fluoreszenz im Fall der EGFR-negativen Kontrollzellen (untere Reihe) und im Fall der unkonjugierten Antikörper **7** und **8** beobachtet.

Ergänzend wurden die Bindungseigenschaften der hergestellten Konjugate über Durchflusszytometrie unter Ver-

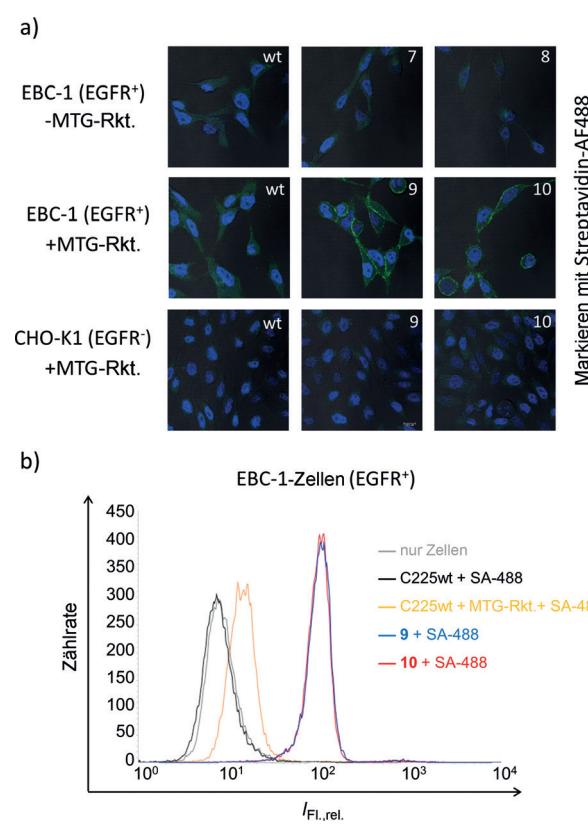


Abbildung 2. Untersuchung der Bindung von biotinyliertem Cetuximab anhand von zellbasierten Assays und Durchflusszytometrie. a) Zellbindungsassays von Konstrukt 7–10 sowie Cetuximab-Wildtyp. Obere Reihe: nicht-biotinylierte Antikörper **7** und **8** sowie Wildtyp unter Verwendung von EGFR-positiven EBC-1-Zellen. Mittlere und untere Reihe: Biotinylierte Cetuximab-Varianten **9** und **10** verglichen mit Cetuximab-Wildtyp unter Verwendung von EGFR-positiven EBC-1-Zellen und EGFR-negativen CHO-K1-Zellen (+/–MTG-Rkt.: Reaktionen mit/ohne MTG). Zellen wurden mit ProLong Diamond Antifade Mountant mit DAPI (blau) eingebettet, und die Biotinylierung wurde mittels Streptavidin-AF488-Markierung (grün) sichtbar gemacht. Zellen wurden unter Verwendung eines Konfokalmikroskops untersucht. Überlagerte Bilder sind mittels Differentialinterferenzkontrast (DIC) dargestellt. b) Durchflusszytometrie von EGFR-positiven EBC-1-Zellen, die mit den biotinylierten Cetuximab-Varianten **9** und **10** inkubiert wurden (blau und rot). Zellen, an die biotinyliertes Cetuximab gebunden vorlag, wurden durch die Zugabe von Streptavidin-Alexa-Fluor-488-Konjugat fluoreszenzmarkiert (Abbildung S19 der Hintergrundinformationen).

wendung der gleichen Zelllinien nach einer Inkubation mit Streptavidin-Alexa-Fluor-488-Konjugat und anschließendem Auslesen der Alexa-Fluor-vermittelten Fluoreszenz überprüft (Abbildung 2 b). Eine intensive Fluoreszenz der EBC-1-Zellen in Gegenwart der Konjugate **9** und **10** bestätigte die Befunde der Fluoreszenzmikroskopie. Hier wurde ebenfalls eine schwache unspezifische Bindung des Wildtyp-Cetuximabs beobachtet (Abbildung 2 b, orange Linie), wenn auch mit einer um eine Größenordnung schwächeren Intensität, die sehr wahrscheinlich durch Markierungen an unspezifischen Stellen hervorgerufen wurde.^[10d,15] In der Tat ist bekannt, dass Q295 bereits leicht von MTG modifiziert wird, besonders in Abwesenheit der natürlichen IgG1-Glykosylierung am benachbarten Asn297.^[10c]

Wir haben basierend auf der Kristallstruktur eines natürlichen Proteinsubstrats der bakteriellen Transglutaminase einen MTG-Marker entworfen, der eine schnelle und quantitative Transglutaminase-katalysierte Konjugation bei niedrigem molarem Überschuss an Amindonorsubstrat ermöglicht. Dieser neue Marker weist eine besondere Aminosäurezusammensetzung auf, die keine Ähnlichkeiten mit den Oligopeptiden zeigt, die bisher über Phagendisplay-Bibliotheken identifiziert wurden. Wir haben die Konformation des Markers durch Einführung einer intramolekularen Disulfidbrücke fixiert und konnten bestätigen, dass das disulfidverbrückte Modellpeptid bedeutend schneller von Transglutaminase umgesetzt wurde als das entsprechende lineare Peptid. Wir nehmen daher an, dass die effiziente Substraterkennung durch die Transglutaminase über die Architektur des Markers vermittelt wird. Wir konnten die Nützlichkeit des MTG-Markers anhand der Herstellung von Biokonjugaten des therapeutischen Antikörpers Cetuximab nachweisen und haben festgestellt, dass seine Bindung an EGFR-überexprimierende Tumorzellen nicht durch die genetische Veränderung beeinflusst wird.

Danksagung

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms SPP1623 KO1390/10-1 und vom Merck Serono Innovation Cup unterstützt.

Stichwörter: Antikörper · Biokonjugation · Mikrobielle Transglutaminase · Monoklonale Antikörper · Ortsspezifische Ligation

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13420–13424
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13618–13623

- [1] a) N. Stephanopoulos, M. B. Francis, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 876–884; b) Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4182–4200.
- [2] S. C. Alley, N. M. Okeley, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 529–537.
- [3] a) P. Carter, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 118–129; b) A. Younes, U. Yasothan, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 19–20; c) J. A. Francisco, C. G. Cerveny, D. L. Meyer, B. J. Mixan, K. Klussman, D. F. Chace, S. X. Rejniak, K. A. Gordon, R. De-Blanc, B. E. Toki, C. L. Law, S. O. Doronina, C. B. Siegall, P. D. Senter, A. F. Wahl, *Blood* **2003**, *102*, 1458–1465.
- [4] a) G. J. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052–5053; b) Y. A. Lin, J. M. Chalker, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16805–16811; c) J. M. McFarland, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490–13491; d) B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S. F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 184–189; e) K. Tanaka, M. Kitadani, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5346–5349; f) K. Tanaka, T. Masuyama, K. Ha-

segawa, T. Tahara, H. Mizuma, Y. Wada, Y. Watanabe, K. Fukase, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 102–105; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 108–111; g) L. Wang, G. Amphlett, W. A. Blattler, J. M. Lambert, W. Zhang, *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2436–2446.

- [5] a) C. A. Boswell, E. E. Mundo, C. Zhang, D. Bumbaca, N. R. Valle, K. R. Kozak, A. Fourie, J. Chuh, N. Koppada, O. Saad, H. Gill, B. Q. Shen, B. Rubinfeld, J. Tibbitts, S. Kaur, F. P. Theil, P. J. Fielder, L. A. Khawli, K. Lin, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1994–2004; b) K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. 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.
- [6] a) J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. A. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, A. F. Santidrian, K. Stafin, Y. Lu, H. Tran, A. J. Seller, S. L. Biroc, A. Szydlik, J. K. Pinkstaff, F. Tian, S. C. Sinha, B. Felding-Habermann, V. V. Smider, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16101–16106; b) 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. L. Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwkowski, R. H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925–932; c) N. M. Okeley, B. E. Toki, X. Zhang, S. C. Jeffrey, P. J. Burke, S. C. Alley, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1650–1655; d) R. A. Scheck, M. B. Francis, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 247–251; e) F. Tian, Y. Lu, A. Manibusan, A. Sellers, H. Tran, Y. Sun, T. Phuong, R. Barnett, B. Hehli, F. Song, M. J. DeGuzman, S. Ensari, J. K. Pinkstaff, L. M. Sullivan, S. L. Biroc, H. Cho, P. G. Schultz, J. DiJoseph, M. Dougher, D. Ma, R. Dushin, M. Leal, L. Tchitsiakova, E. Feyfant, H. P. Gerber, P. Sapra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1766–1771; f) H. Xiao, A. Chatterjee, S. H. Choi, K. M. Bajjuri, S. C. Sinha, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14080–14083; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14330–14333; g) K. Zuberbühler, G. Casi, G. J. Bernardes, D. Neri, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7100–7102.
- [7] M. Rashidian, J. K. Dozier, M. D. Distefano, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1277–1294.
- [8] a) P. Dennler, A. Chiotellis, E. Fischer, D. Bregeon, C. Belmant, L. Gauthier, F. Lhospice, F. Romagne, R. Schibli, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 569–578; b) P. Strop, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 855–862; c) P. Strop, S. H. Liu, M. Dorywalska, K. Delaria, R. G. Dushin, T. T. Tran, W. H. Ho, S. Farias, M. G. Casas, Y. Abdiche, D. Zhou, R. Chandrasekaran, C. Samain, C. Loo, A. Rossi, M. Rickert, S. Krimm, T. Wong, S. M. Chin, J. Yu, J. Dilley, J. Chaparro-Riggers, G. F. Filzen, C. J. O'Donnell, F. Wang, J. S. Myers, J. Pons, D. L. Shelton, A. Rajpal, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 161–167.
- [9] a) P. Kornberger, A. Skerra, *MABS* **2014**, *6*, 354–366; b) B. M. Paterson, K. Alt, C. M. Jeffery, R. I. Price, S. Jagdale, S. Rigby, C. C. Williams, K. Peter, C. E. Hagemeyer, P. S. Donnelly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6115–6119; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 6229–6233; c) M. W. Popp, S. K. Dougan, T. Y. Chuang, E. Spooner, H. L. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3169–3174.
- [10] a) J. Buchardt, H. Selvig, P. F. Nielsen, N. L. Johansen, *Biopolymers* **2010**, *94*, 229–235; b) A. Fontana, B. Spolaore, A. Mero, F. M. Veronese, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 13–28; c) S. Jeger, K. Zimmermann, A. Blanc, J. Grunberg, M. Honer, P. Hunziker, H. Struthers, R. Schibli, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9995–9997; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 10191–10194; d) A. Josten, L. Haalck, F. Spener, M. Meusel, *J. Immunol. Methods* **2000**, *240*, 47–54; e) T. L. Mindt, V. Jungi, S. Wyss, A. Friedli, G. Pla, I. Novak-Hofer, J. Grunberg, R. Schibli, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 271–278; f) B. Spolaore, S. Raboni, A. R.

- Molina, A. Satwekar, N. Damiano, A. Fontana, *Biochemistry* **2012**, *51*, 8679–8689.
- [11] a) C. K. Marx, T. C. Hertel, M. Pietzsch, *J. Biotechnol.* **2008**, *136*, 156–162; b) K. Yokoyama, H. Utsumi, T. Nakamura, D. Ogaya, N. Shimba, E. Suzuki, S. Taguchi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 2087–2096.
- [12] a) M. T. Gundersen, J. W. Keillor, J. N. Pelletier, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 219–230; b) N. Kamiya, H. Abe, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *751*, 81–94.
- [13] a) T. Ohtsuka, M. Ota, N. Nio, M. Motoki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2608–2613; b) Y. Sugimura, M. Hosono, F. Wada, T. Yoshimura, M. Maki, K. Hitomi, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17699–17706; c) Y. Sugimura, K. Yokoyama, N. Nio, M. Maki, K. Hitomi, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *477*, 379–383; d) T. Tanaka, N. Kamiya, T. Nagamune, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 491–497.
- [14] R. S. Kiss, R. O. Ryan, G. A. Francis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2001**, *1531*, 251–259.
- [15] P. Strop, M. G. Dorywalska, A. Rajpal, D. Shelton, S. H. Liu, J. Pons, R. Dushin, WO patent 2012059882, **2012**.
- [16] a) A. Sarafeddinov, A. Arif, A. Peters, H. L. Fuchsbauer, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *21*, 617–626; b) A. Sarafeddinov, S. Schmidt, F. Adolf, M. Mainusch, A. Bender, H. L. Fuchsbauer, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2009**, *73*, 993–999; c) S. Schmidt, F. Adolf, H. L. Fuchsbauer, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3132–3138; d) M. P. Madej, G. Coia, C. C. Williams, J. M. Caine, L. A. Pearce, R. Attwood, N. A. Bartone, O. Dolezal, R. M. Nisbet, S. D. Nuttall, T. E. Adams, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 1461–1470.
- [17] a) J. H. Lee, C. Song, D. H. Kim, I. H. Park, S. G. Lee, Y. S. Lee, B. G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110*, 353–362; b) H. Sato, N. Yamada, N. Shimba, Y. Takahara, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 68–76.
- [18] M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, K. J. Rosengren, J. West, B. A. Condie, L. Otvos, M. A. Anderson, D. J. Craik, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 579–591.
- [19] M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweiger, T. Fotsis, M. Mann, *Nature* **1996**, *379*, 466–469.

Eingegangen am 28. Mai 2015,
veränderte Fassung am 13. Juli 2015
Online veröffentlicht am 14. September 2015