

## Zellbiologische Methoden

# Antikörperkonjugate – Präzisionswerkzeuge mit grenzenloser Vielfalt?

JONATHAN SCHWACH, ANDREAS STENGL  
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, LMU MÜNCHEN

**Antibody conjugates are a prime example of Aristotle's famous quote: "The whole is more than the sum of its parts". Connecting the antibody's high binding specificity with molecules such as toxins, dyes and nucleic acids opens the doors wide to a world of high precision molecules with high versatility. In this article, we outline the concept of antibody conjugates, describe why the conjugation method matters and introduce two prominent examples that have made their way into the clinic and research labs.**

DOI: 10.1007/s12268-022-1834-2  
© Die Autoren 2022

■ 1890 entwickelten Emil von Behring und Kitasato Shibasaburo mit dem „Diphtherie-Antitoxin“ das erste weithin verfügbare Therapeutikum aus Pferdeserum – ein Meilenstein der heutigen Medizin. Paul Ehrlich postulierte ein Jahr später seine Seitenkettentheorie: Er vermutete „Antikörper“ im Blut, die die Fähigkeit besitzen, andere Stoffe anhand des Schlüssel-Schloss-Prinzips zu binden. Heute wissen wir, dass Antikörper der Wirkstoff in von Behrings Antitoxin waren, und aus der Seitenkettentheorie entwickelte sich unser heutiges Verständnis der humoralen Immunität. Obwohl es noch Jahrzehnte dauerte bis die grundlegenden Eigenschaften und Entstehung von Antikörpern

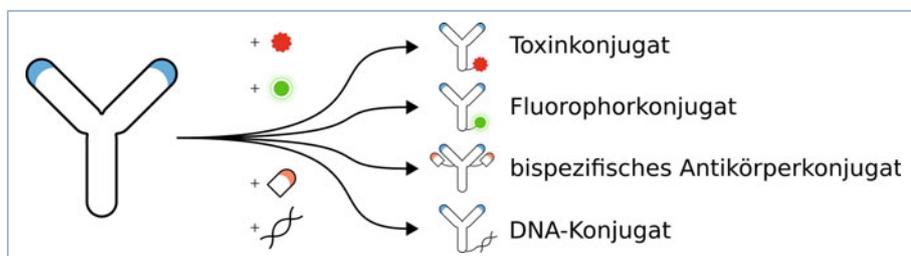
aufgeklärt werden konnten, war seit der Entwicklung des Diphtherie-Antitoxins ein klarer Antikörper haben einzigartige Fähigkeiten zwischen Strukturen zu unterscheiden, und wir können uns diese Eigenschaft im Kampf gegen eine Vielzahl an Krankheiten zu Nutze machen. Deshalb zielte Ehrlich zunächst auf Antikörper ab, als er das berühmte Wort der „Zauberkegel“ prägte. Neben den medizinischen Anwendungen haben sich Antikörper ebenfalls als spezifisches Nachweisreagenz im Labor als extrem nützlich erwiesen. So sind sie heute Standardwerkzeuge für eine Vielzahl von Analysemethoden in der biomedizinischen Forschung. In den letzten Jahren ist insbesondere die Verknüpfung von Anti-

körpern mit weiteren Molekülen in den Vordergrund gerückt. Auf diese Weise kann die Selektivität von Antikörpern mit den Eigenschaften des Kopplungspartners gepaart werden, um völlig neue, einzigartige Werkzeuge zu kreieren. Diese Antikörperkonjugate erlauben uns, neue Wege und Lösungen in Medizin und Forschung zu finden, die mit den einzelnen Bausteinen alleine unmöglich wären. Auf Antikörperkonjugate trifft somit Aristoteles über 2000 Jahre alte Weisheit zu: „Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.“

### Präzisionsmedikamente: Antikörper-Wirkstoffkonjugate

Unsere heutige Form von Ehrlichs Zauberkegel, die kranke Zellen töten und gesunde verschonen soll, sind therapeutische Antikörper-Wirkstoffkonjugate (*antibody drug conjugates*, ADCs). Diese bestehen aus einem monoklonalen Antikörper, meist vom Typ IgG, einer Verbindungseinheit (Linker) und einem Wirkstoff. Der Antikörper bestimmt, welches Ziel auf der Zelloberfläche spezifisch gebunden wird und beeinflusst das Verhalten des Konjugats im Körper. Der Linker bestimmt die Konjugationschemie, trägt entscheidend zur Stabilität des Konjugats bei und regelt die Freisetzung des Wirkstoffs. Während der Wirkstoff grundsätzlich in vielen verschiedenen zellulären Prozessen eingreifen kann, haben sich bei therapeutischen ADCs Toxine durchgesetzt, die die Zelle durch Schädigung der DNA oder des Zytoskeletts in die Apoptose treiben [1]. Diese Toxine sind gewöhnlich zu potent für eine systemische Gabe. Erst die Kopplung an einen Antikörper erlaubt ein spezifisches Targeting von Zellpopulationen wie beispielsweise Krebszellen, um systemische Toxizität zu minimieren. Nach Bindung des ADCs an sein Antigen auf der Zelloberfläche wird der ADC-Antigen-Komplex internalisiert. Der Linker wird in der Zelle gespalten und somit der Wirkstoff freigesetzt.

Wie viele Toxinmoleküle an ein Antikörpermolekül angeheftet werden (*antibody-drug-ratio*, DAR) und an welcher Position

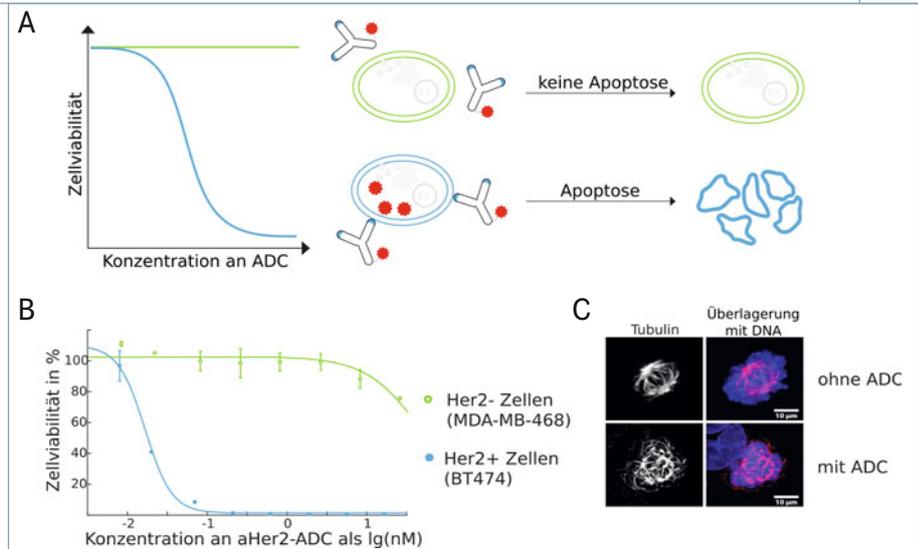


▲ **Abb. 1:** Antikörper binden Zielstrukturen hochspezifisch und werden ausgestattet mit weiteren Funktionalitäten zu Präzisionswerkzeugen. Moderne, modulare Konjugationsmethoden erlauben es uns eine Vielzahl von Molekülen ortsspezifisch und in definierter Anzahl anzuheften. Ausgehend von einem Antikörpermolekül können sehr effizient unterschiedlichste Antikörperkonjugate hergestellt werden; so u. a. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, Antikörper-Fluorophor-Konjugate, multispezifische Antikörper und Antikörper-Nukleinsäure-Konjugate.

beeinflusst stark die Effektivität, Stabilität sowie Toleranz des ADCs [2]. Hier gilt es eine feine Balance zu finden, die je nach Krebstyp und der Wahl des Antikörpers und Toxins ein anders Optimum haben kann. Weitere Herausforderungen sind die große Heterogenität der Krebszellen, sodass oft nicht alle Zellen das Antigen auf der Zelloberfläche exprimieren, an das der Antikörper bindet, sowie Resistenzmechanismen. Ein vielversprechendes Antigen hat im Optimalfall folgende Eigenschaften: Es wird exklusiv oder zumindest stark erhöht auf Krebszellen exprimiert, es muss effizient internalisiert werden und es sollte für die Krebszelle überlebenswichtig sein, sodass die Bildung von Resistenzen unwahrscheinlicher wird. Nebenwirkungen werden häufig durch eine vorzeitige Abspaltung des Toxins, Ansammlungen in der Leber und unspezifische Aufnahme in Körpergewebe oder Immunzellen verursacht [3]. An Lösungen für diese Herausforderungen wird aktuell auf Hochdruck geforscht, sowohl in akademischen wie auch industriellen Forschungseinheiten. Unterstrichen wird diese Tatsache dadurch, dass acht der 12 ADC-Präparate innerhalb der letzten fünf Jahre zugelassen wurden, obwohl die Zulassung des allerersten ADC-Medikaments bereits im Jahr 2000 erfolgte. Die neueren Präparate konnten einige der Nebenwirkungen insbesondere durch Verbesserungen in Linker- und Konjugationschemie reduzieren.

### Das Zusammenfügen der einzelnen Bausteine: Die Konjugation

Die Methode, wie Antikörper mit anderen Molekülen konjugiert werden, ist von entscheidender Bedeutung. Frühe Technologien setzten auf Konjugation an Aminosäureseitenketten. Während die Strategie technisch sehr einfach ist und bei allen Antikörpern funktioniert, führt sie vor allem bei häufig vorkommenden Aminosäuren wie beispielsweise Lysin zu einem hochdiversen Mischprodukt aus verschiedenen Konjugat-spezies mit unterschiedlicher Beladungsdichte und undefinierter Positionierung. Im Gegensatz dazu erlaubt die ortsspezifische Konjugation eine gezielte Platzierung an bestimmte Aminosäuren des Antikörpers und ermöglicht somit ein besser definiertes Produkt. Hauptsächlich verwendet werden die wesentlich selteneren Cysteine, die entweder natürlich vorhanden oder zuvor über Mutagenese auf der Antikörperoberfläche eingebracht werden. Eine Möglichkeit liegt



▲ **Abb. 2:** Zytotoxische Wirkung von Antikörper-Wirkstoffkonjugaten. **A,** Antikörper können zwischen Zelltypen unterscheiden. So kann man mithilfe von Antikörper-Wirkstoffkonjugaten (*antibody-drug conjugate*, ADC) gezielt bei Krebszellen Apoptose auslösen. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass diese ein Antigen auf der Oberfläche präsentieren, das bei gesunden Zellen nicht oder nur in geringem Umfang vorkommt. **B,** Zytotoxizitätsprofil eines ADCs, der das tumor-assoziierte Antigen Her2 erkennt. Die selektive Reduktion von Zellen, die das Antigen überexprimieren (BT474), ist deutlich erkennbar. Zellen mit geringer Antigenexpression (MDA-MB-468) bleiben im Gegensatz nahezu unbeeinflusst. **C,** Eine genauere Betrachtung ADC-behandelter, Her2-exprimierender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie lässt eine starke Dysregulation der Tubulinpolymerisation erkennen. Dies zeigt sich deutlich durch die gestörte Ausbildung des Spindelapparates während der Zellteilung durch das eingebrachte Toxin MMAF (Tubulin in Magenta, kondensierte DNA in Blau).

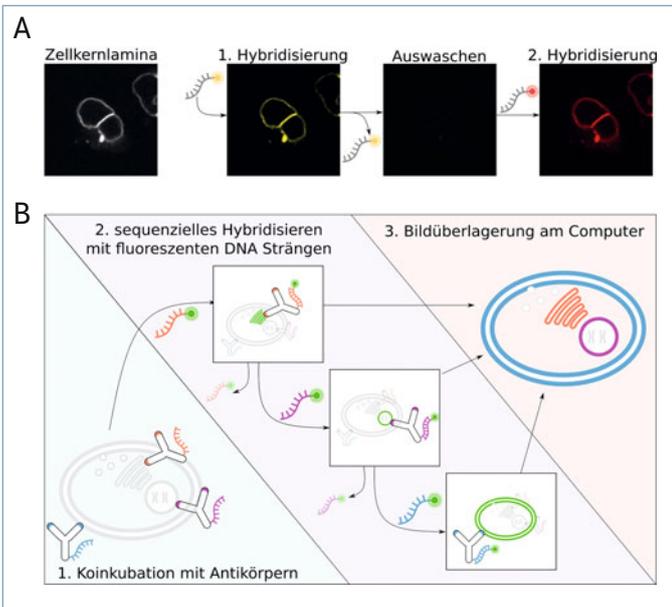
in der Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Ketten des Antikörpers um reaktive Cysteine zu generieren [4]. So lassen sich für Antikörper des Typs IgG1 ADCs mit definierter Positionierung und maximaler Beladung von acht Wirkstoffen generieren. Weitere Möglichkeiten bestehen in der Konjugation an Glykanstrukturen oder der Nutzung unnatürlicher Aminosäuren. Letztere ermöglicht die Verwendung von neuen Kopplungsreaktionen, die mit proteinogenen Aminosäuren unmöglich wäre. Als Alternative zur chemischen Konjugation haben sich enzymatische Methoden etabliert, bei denen die Konjugation durch ein Protein katalysiert wird [5]. Im Gegensatz zur chemischen Konjugation muss hierbei die Aminosäuresequenz des Antikörpers bekannt sein und mit einer Erkennungssequenz ausgestattet werden, an die das Enzym binden kann. Dadurch erlauben sie die Herstellung eines äußerst definierten und homogenen Produkts.

### Gezielte Lieferung von Sequenzinformation: Antikörper-Nukleinsäurekonjugate

Die Modularität heutiger Konjugationsmethoden erlaubt es Biomoleküle zu kombinieren, die sehr unterschiedliche Herstellungsverfahren benötigen. So z. B. die Verknüpfung von Proteinen und Nukleinsäuren.

Solche Konjugate bieten beispielsweise als Werkzeug in der Diagnostik und Mikroskopie eine attraktive Lösung, um die limitierte Verfügbarkeit an Farbkanälen zu umgehen. Hierzu wird das Zellpräparat zunächst mit dem Antikörper-DNA-Konjugat behandelt und erst in einem zweiten Schritt der komplementäre, fluoreszierende DNA-Strang an das Konjugat hybridisiert. Die reversible Bindung der beiden DNA-Stränge aneinander erlaubt es, den fluoreszierenden DNA-Strang nach der Aufnahme des Bildes auszuwaschen und somit diesen Farbkanal wiederzuverwenden. Somit wird es möglich eine größere Anzahl an Strukturen, in derselben Zelle oder in einem Gewebe anzufärben [6, 7].

Neben der Anwendung in der Mikroskopie und Diagnostik sind Antikörper-Nukleinsäurekonjugate auch als therapeutische Moleküle interessant. Vor allem Antikörper-RNA-Konjugate befinden sich in Entwicklung. Hierzu wird silencing-RNA oder antisense-RNA an den Antikörper gekoppelt. Der Antikörper stellt sicher, dass nur der gewünschte Zelltyp, z. B. eine kranke Zelle, adressiert wird. Diese Konstrukte erlauben über Knock-Downs einen gezielten Eingriff in die Expression einzelner Gene und stellen aufgrund dieses einzigartigen Wirkmechanismus' eine interessante Alternative zu den etablierten Toxinkonjugaten dar [8].



◀ **Abb. 3:** Antikörper-Nukleinsäure-Konjugate als Werkzeug für die Mikroskopie. **A,** Durch Antikörper-DNA-Konjugate können Zellstrukturen reversibel angefärbt werden. In diesem Experiment bindet ein Antikörper-DNA-Konjugat an GFP-fusioniertes Lamin B1. Anschließend wird ein fluoreszierender „Imagerstrand“ an das Antikörper-DNA-Konjugat hybridisiert (gelbe Pseudofarbe), und nach Aufnahme des Bildes wieder ausgewaschen. Die zweite Hybridisierung eines Imagerstrands mit gleicher DNA-Sequenz, aber mit anderem Fluorophor (rote Pseudofarbe), zeigt, dass das Antikörper-DNA-Konjugat nach dem Waschschritt weiter gebunden und funktional ist. **B,** Antikörper-Nukleinsäurekonjugate erlauben die parallele Färbung einer Vielzahl von Zellstrukturen, indem sie die Limitierung durch die beschränkte Anzahl an Farbkämen umgehen. Dies geschieht durch sequenzielles Hybridisieren und Auswaschen fluoreszierender Imagerstrands, sodass der derselbe Farbkanal wiederverwendet werden kann. Am Computer können die Einzelbilder überlagert und zu einem Gesamtbild zusammengefügt werden.

### Chancen und Herausforderungen für die Zukunft

Antikörper haben nicht nur unser Verständnis der Biologie radikal beschleunigt, sondern stellen zudem einen Eckpfeiler der modernen Tumorthherapie dar. Die Fähigkeit, durch Antikörperkonjugate die Spezifität von Antikörpern auf andere Moleküle übertragen zu können, ermöglicht die Verwendung eines großen Spektrums an Wirkstoffen, die zuvor für therapeutische Zwecke unzugänglich waren. Während bereits zugelassene Antikörpertherapeutika einen vergleichsweise einfachen Aufbau aufweisen, steht die nächste Generation schon in den Startlöchern: Bispezifische Antikörper, die mehrere Antigene auf der Zelloberfläche gleichzeitig angreifen, Antikörper-Antikörperkonjugate, die mehr als zwei Spezifitäten aufweisen können, sowie weitere experimentelle Wirkstoffe wie Zytokine und toxische Proteine. Der modulare Aufbau von Antikörperkonjugaten ist hierbei eine der größten Stärken: Antikörper und Konjugationspartner lassen sich frei kombinieren, um die vielversprechendsten Kandidaten für Klinik und Forschung zu identifizieren. Daraus resultiert eine enorme Kombinationsvielfalt.

Zusätzlich stellen die neuartigen Anwendungen neue Ansprüche an die Antikörper selbst. Eigenschaften, die für einen klassischen therapeutischen Antikörper bisher unbedeutend oder sogar nachteilig waren, können z. B. in Kombination mit Wirkstoffen wichtig sein. Genau hier wollen wir einen wertvollen Beitrag leisten: Zum einen entwickeln wir Methoden, die es erlauben, Antikörperbausteine bereits mit Blick auf diese

neuen Anforderungen zu selektieren; zum anderen forschen wir an Technologien, um effizient eine Vielzahl von Kombinationsmöglichkeiten herzustellen und diese mit hohem Durchsatz zu charakterisieren.

Denn, auch wenn das Ganze mehr als die Summe seiner Teile ergibt, bleibt es eine Herausforderung, die hochwertigsten Teile für die Beste aller Summen zu finden.

### Literatur

- [1] Schwach J, Abdellatif M, Stengl A (2022) More than Toxins – Current Prospects in Designing the Next Generation of Antibody Drug Conjugates. *Front Biosci – Landmark* 27:240
- [2] Sun X, Ponte JF, Yoder NC et al. (2017) Effects of Drug–Antibody Ratio on Pharmacokinetics, Biodistribution, Efficacy, and Tolerability of Antibody–Maytansinoid Conjugates. *Bioconjug Chem* 28:1371–1381
- [3] Loganzo F, Sung M, Gerber H-P (2016) Mechanisms of Resistance to Antibody–Drug Conjugates. *Mol Cancer Ther* 15:2825–2834
- [4] Kasper M-A, Stengl A, Ochtrup P et al. (2019) Ethynylphosphonamidates for the Rapid and Cysteine-Selective Generation of Efficacious Antibody–Drug Conjugates. *Angew Chem Int Ed* 58:11631–11636
- [5] Schumacher D, Hackenberger CP, Leonhardt H et al. (2016) Current Status: Site-Specific Antibody Drug Conjugates. *J Clin Immunol* 36 Suppl 1:100–7

- [6] Jungmann R, Avedaño MS, Woehrstein JB et al. (2014) Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat Methods* 11:313
- [7] Schwach J, Kolobynina K, Brandstetter K et al. (2021) Site-Specific Antibody Fragment Conjugates for Reversible Staining in Fluorescence Microscopy. *ChemBioChem* 22:1205–1209
- [8] Arnold AE, Malek-Adamian E, Le PU et al. (2018) Antibody–Antisense Oligonucleotide Conjugate Downregulates a Key Gene in Glioblastoma Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 11:518–527

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>

### Korrespondenzadresse:

Dr. Andreas Stengl  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Fakultät für Biologie  
Lehrstuhl für Humanbiologie und Biomaging  
BioSysM  
Butenandtstraße 1  
D-81377 München  
stengl@biologie.uni-muenchen.de

### AUTOREN



#### Jonathan Schwach

2012–2018 Studium der molekularen Biotechnologie und Biochemie mit Schwerpunkt Protein Engineering und Immuntherapie an der TU München. Seit 2019 Promotion im Bereich Antikörperkonjugate und Antikörpertherapie an der LMU München.



#### Andreas Stengl

2009–2015 Studium der molekularen Biotechnologie mit Schwerpunkt therapeutische Proteine an der TU München. 2015–2020 Promotion im Bereich Protein und Antikörper Engineering an der LMU München. 2020–2021 Scientist im Bereich therapeutische Antikörperentwicklung bei Adivo GmbH. Seit 2022 Team Lead für Protein Engineering und In Vitro Antibody Discovery am Lehrstuhl für Humanbiologie und Biomaging der LMU München.