

Richard Julian Schneider

Dr. med.

## **Eliminierung der unspezifischen Hepatotoxizität des anti-CD22-Onconase-Diabody-Fusionsproteins durch Entfernung der N69-Glykosylierung**

Einrichtung: NCT (Nationales Centrum für Tumorerkrankungen)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Jürgen Krauss

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde ein Antikörper-Ribonuklease-Fusionsprotein (ImmunRNase) als neuartiges Immuntherapeutikum zur Behandlung von Lymphomen und Leukämien weiterentwickelt und charakterisiert. Der Schwerpunkt bei der Weiterentwicklung des Immuntherapeutikums lag dabei auf der Eliminierung unspezifischer Nebenwirkungen.

In Vorarbeiten wurde im Promotionslabor eine ImmunRNase generiert, die sich aus einem humanisierten CD22-spezifischen Diabody-Antikörperfragment und der amphibischen Ribonuklease Onconase (ONC) mit zytotoxischen Eigenschaften zusammensetzt. Eine spezifische und potente Zytotoxizität des Fusionsproteins gegenüber CD22-positiven Krebszellen konnte in Zellkulturexperimenten belegt werden, jedoch zeigte die ImmunRNase im Tierversuch eine unspezifische Lebertoxizität in NOD/SCID-Mäusen. Als mögliche Ursache dieser unspezifischen Hepatotoxizität stand das Glykosylierungsmuster an Position 69 von ONC im Fokus. Durch die Deglykosylierung von ONC sollte die unspezifische Nebenwirkung der ImmunRNase beseitigt werden.

Zur Generierung einer weiterentwickelten ImmunRNase mit eliminiertes unspezifischer Hepatotoxizität erfolgte die Deglykosylierung von ONC molekulargenetisch durch die Einführung einer Punktmutation in kodierende ONC-DNA-Sequenz, sodass die N-Glykosylierungsstelle von ONC an Position 69 entfernt wurde.

Zur quantitativen Produktion des rekombinanten Fusionsproteins wurden die transiente und die stabile Transfektion miteinander verglichen. Für die transiente Expression wurde zunächst verschiedene Transfektionsmethoden (Polyethylenimin (PEI), Nucleofection, Calcium-Chlorid) sowie verschiedene Produktionszelllinien (CHO-K1, Freestyle CHO-S, HEK293-6E) getestet und verglichen, wobei die effektivste Methode optimiert wurde. So konnte durch transiente Transfektion der Suspensionszelllinie HEK293-6E mittels PEI-Transfektionsreagenz eine Proteinmenge von 135 µg/l bereits nach drei Tagen produziert werden. Die Etablierung einer stabil exprimierenden Zelllinie (NSO) dagegen dauerte sieben Wochen, lieferte aber höhere Proteinausbeuten mit 197 µg/l für die serumfreie und 250 µg/l für die serumhaltige Produktion.

Die Deglykosylierung von ONC bewirkte eine signifikante Zunahme der ribonukleolytischen Aktivität um 49%. Die ImmunRNase mit deglykosylierter ONC wies im Vergleich zur glykosylierten Parental-ImmunRNase eine Steigerung der Zytotoxizität um bis zu 26% gegenüber CD22-positiven Lymphomzellen auf. Es konnte gezeigt werden, dass durch die

Entfernung der Glykosylierung die hepatische Aufnahme des Fusionsproteins um mehr als 50% in vivo gesenkt werden konnte und die Überlebenszeit einer Maus nach intravenöser Applikation signifikant verlängert werden konnte. Somit konnte durch Deglykosylierung von ONC die unspezifische Hepatotoxizität der Parental-ImmunRNase eliminiert werden.

Diese Arbeiten stellen eine wichtige Grundlage zur klinischen Weiterentwicklung der ImmunRNase als neuartiges Immuntherapeutikum zur Behandlung von Lymphomen und Leukämien.