

Schlussbericht – I Kurzbericht		FKZ: 161B0758A
Zuwendungsempfänger: Partner 1: nanoPET Pharma GmbH (kurz nanoPET)		
Vorhabensbezeichnung: Innovative CyTOF-Reagenzien zur Analyse von B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen – InnoCyT Teilprojekt A: Synthese und Funktionalisierung der neuartigen Nanopartikeln für Antikörper-Kopplung		
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2019 - 31.10.2022	Berichtszeitraum: 01.02.2019 - 31.10.2022	

Die Massenzytometrie basiert auf den Prinzipien der Durchflusszytometrie, nutzt jedoch die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma – eine Technologie aus der Elementaranalyse – für die Detektion zellulärer Proteine. Dies wird durch analytische Antikörper erreicht, die mit hoch aufgereinigten Metallisotopen markiert sind. Die CyTOF-Technologie findet schnell Verbreitung und viele internationale Forschungseinrichtungen und Pharmafirmen nutzen die Technologie (u.a. Stanford, Harvard, Roche, Pfizer). Die stetig steigende Anzahl an Publikationen belegt die Akzeptanz des Systems in der biomedizinischen Forschung. Jegliche Zellvermessung mit dem CyTOF-Gerät basiert auf der Detektion von Metallionen im Massenbereich zwischen 75 (Arsen) und 209 u (Bismut). Schlüsselreagenzien sind Antikörper, die an zelluläre Rezeptoren binden und verschiedenen Zelltypen mit spezifischen Isotopenmustern markieren. Während das CyTOF-Messgerät in wenigen Jahren über drei Geräte-Generationen weiterentwickelt wurde, stagniert die Verfügbarkeit neuer Reagenzien. Dabei hat das Messgerät das Potenzial gleichzeitig > 120 Parameter zu bestimmen, doch ist derzeit nur für rund 40 Isotope die Kopplung an Antikörper etabliert. Deshalb sollen in diesem Projekt neue und zusätzliche Nanopartikel-basierte Antikörperkonjugate mit bislang ungenutzten Metallisotopen entwickelt werden. Zusätzliche Messkanäle steigern den Informationsgehalt von zytometrischen Messungen exponentiell, sodass die hier geplante Etablierung von zusätzlichen Messkanälen auf Basis entsprechender Nanopartikel zu einer beeindruckenden Erhöhung der Zellinformation aus einer einzelnen Probe führt.

Das Verbundvorhaben InnoCyT wurde so konzipiert, dass beide Projektpartner in ihren Teilprojekten im Wesentlichen drei Arbeitszielkomplexe bearbeiteten. Diese Arbeitsziele umfassten die Entwicklung von drei Arten von Reagenzien für die Massenzytometrie und ihrer Anwendung in der B-Zell-Forschung wobei wissenschaftliche Kenntnisse und Fähigkeiten in der Nanotechnologie (nanoPET), Zytometrie (DRFZ), und B-Zell- Biologie/Immunologie (DRFZ) benötigt wurden.

nanoPET konzentrierte sich dabei auf alle wesentlichen Aufgabestellungen, welche chemisches und pharmazeutischen Knowhow beinhalteten. Um die Ziele zu erreichen, wurden zwei

Syntheserouten von nanopartikulären Systemen, basierend auf Gadolinium- und Zinn-Ionen, etabliert. Die Produkte waren schwerlösliche Verbindungen in Form von Gadoliniumvanadat ($GdVO_4$) und Zinnsulfid (SnS). Zinn eignet sich bspw. besonders, da >7 stabile Isotope existieren. Damit würden mit einer Synthesestrategie mindestens 7 weitere Antikörper-Konjugate bzw. Messkanäle im CyTOF vorliegen. Die SnS-Synthese wurde mit dem natürlich vorkommenden Zinn (Isotopengemisch) etabliert. Für den späteren Konjugationsversuchen und CyTOF-Messungen wurde die Synthese mit Isotopenreinen Sn-117 und Sn-118 durchgeführt. Auch hier konnten vergleichbare und reproduzierbare Partikeleigenschaften erzielt werden. Die synthetisierten Nanopartikel wurden intensiv physikochemisch charakterisiert und auf Reproduzierbarkeit und Langzeitstabilität hin überprüft. Anschließend wurde durch eine pharmazeutische Formulierung der nanopartikulären Systeme sichergestellt, dass diese keine zytotoxischen Effekte zeigen. Die Partikel-Oberflächen wurden mit verschiedenen Polymeren beschichtet, welche funktionelle Carboxyl-Gruppen trugen, sodass eine reproduzierbare Kopplung an Antikörper möglich war. Um diese Antikörper an die funktionellen Gruppen zu konjugieren, wurde bereits etablierte Kopplungschemie verwenden. Dies war zu einem die EDC/NHS-Kopplung und zum anderen die HSTU/DIPEA-Kopplung. Beide Strategien erlaubten es, durch die Aktivierung der Oberflächen-Carboxyl-Gruppen und anschließender Bildung sogenannter Aktivester, die Antikörper direkt über vorhanden Amino-Funktionalitäten an den Nanopartikeln zu koppeln. Um eine optimale Konjugation zu erhalten, waren mehrere Optimierungsschritte notwendig. Als weitere Kopplungsstrategie wurde die Neutravidin/Biotin-Bindung untersucht. Hierbei wurden die Nanopartikel zuerst mit Neutravidin mittels den bereits beschriebenen Kopplungsstrategien beschichtet und anschließend mit biotinylierten Antikörpern konjugiert. Der Vorteil dieser Methode ist die sehr starke und spezifische Neutravidin/Biotin-Bindung, welche theoretisch auf alle biotinylierten Antikörper übertragen werden kann. Somit wäre dieser Ansatz universell einsetzbar. Es wurden verschieden Antikörper über beide Strategien an die Partikel konjugiert und dem Projektpartner DRFZ zur Verfügung gestellt. Die Testung im CyTOF-Assay sollte die generelle Anwendbarkeit der neu synthetisierten Konjugate zeigen.

Es war uns möglich CD4- und CD8-spezifische und isotoopenreine Partikel-Antikörper-Konjugate herzustellen, was im CyTOF-Assay bestätigt werden konnte. Damit konnte die generelle Anwendbarkeit der SnS-Partikel als CyTOF-Reagenz gezeigt werden und somit die Projektzeile erreicht werden.

Die Zusammenarbeit mit dem Projektpartner DRFZ war stets einwandfrei. Durch den regen Ergebnisaustausch konnten die Konjugationsexperimente stetig verbessert werden. Auch regelmäßige Treffen und Online-Meetings während der Corona-Pandemie trugen zu der Zielerfüllung bei. Auch die Zusammenarbeit mit anderen Stellen, bspw. der Auftragsanalytik, waren soweit es die Corona-bedingten Umstände zuließen, stets ergebnisorientiert und zielführend.

Schlussbericht – II Eingehende Darstellung		FKZ: 161B0758A
Zuwendungsempfänger: Partner 1: nanoPET Pharma GmbH (kurz nanoPET)		
Vorhabensbezeichnung: Innovative CyTOF-Reagenzien zur Analyse von B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen – InnoCyT Teilprojekt A: Synthese und Funktionalisierung der neuartigen Nanopartikeln für Antikörper-Kopplung		
Laufzeit des Vorhabens: 01.02.2019 - 31.10.2022	Berichtszeitraum: 01.02.2019 - 31.10.2022	

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung der Zielsetzung	2
Eingehende Darstellung	2
1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele	2
1.1 Nanopartikel-basierte Antikörperkonjugate für hochsensitive CyTOF-Assays	2
1.2 Generierung neuer Schwermetall-Label für die Massenzytometrie	5
1.3 Universelle Zelloberflächenmarker für das Multiplexing bei CyTOF-Analysen	11
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	13
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	13
4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes	13
5. Darstellung des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen	14
6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	14

Kurzfassung der Zielsetzung

Ziel des Projektes ist die Generierung und Entwicklung innovativer Reagenzien für die Massenzytometrie (cytometry by time-of-flight, CyTOF-Technologie) für Anwendungen in der Gesundheitsforschung (precision medicine, Nanotechnologie). Die CyTOF-Technologie ist eine derzeit stark gefragte Einzelzelltechnologie, die perspektivisch zur klinischen Diagnostik beiträgt. Alle Schlüsselreagenzien für die Plattform sind derzeit praktisch nur von einer Firma (Fluidigm, USA) erhältlich; Innovationsdruck und Wettbewerb sind kaum vorhanden. Die Reagenzien sind meist spezifische Antikörper, die mit einer chemischen Gruppe, die Metallatome aufnehmen kann oder beinhaltet, konjugiert. In diesem Projekt sollen drei innovative Reagenzien-Typen synthetisiert und auf ihre Anwendbarkeit in der Massenzytometrie/Gesundheitsforschung getestet werden: i) Antikörperkonjugate mit maßgeschneiderten Nanopartikeln für speziell hochsensitive Massenzytometrie-Assays, ii) Antikörperkonjugate mit bislang ungenutzten Metallen für noch höherdimensionale Zellcharakterisierung sowie iii) Reagenzien für ein universelles Zelloberflächen-Barcoding für das Multiplexing von Zellproben. Die anvisierten Reagenzien sind besonders für die immunologische Forschung von großem Nutzen, und werden auch von anderen Nutzern stark nachgefragt, weshalb ihre perspektivische Entwicklung zu kommerziellen Produkten besonderen Erfolg verspricht.

Die Hauptaufgabe von nanoPET in diesem Kooperationsprojekt war die Synthese und Charakterisierung der nanopartikulären Systeme und die Etablierung der Kopplungschemie für die Konjugation der spezifischen Antikörper. Die Charakterisierung dieser AK-Konjugate im CyTOF war Aufgabe des Projektpartners DRFZ.

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

1.1 Nanopartikel-basierte Antikörperkonjugate für hochsensitive CyTOF-Assays

Ziel in AP1 war es maßgeschneiderte Nanopartikel (NP) auf Gadolinium-Basis für die Antikörper-Konjugation, die speziell in hochsensitiven Massenzytometrie-Assays zur Detektion schwach oder /und selten exprimierter B-Zell-Antigene eingesetzt werden sollen. Die einzelnen Schritte waren die Etablierung der Synthese von Gd-basierten Nanopartikeln, eine anschließende Funktionalisierung und Vorbereitung für die Nanopartikelkopplung und schlussendlich die Herstellung spezifischer AK-Konjugate.

Die Synthese der nanopartikulären Reagenzien auf Basis von Gadoliniumvanadat (GdVO_4) wurde unter solvothermalen Bedingungen erfolgreich aus Natriumorthovanadat und Gadoliniumnitrat in einer Ethylenglykol Wasser-Mischung durchgeführt. Die Reaktionsgleichung war wie folgt:



Die Funktionalisierung der Nanopartikel (NPs) diente im Weiteren der Konjugation an Antikörper, bzw. zur Größen- und Stabilitätskontrolle. Des Weiteren bietet die sterische Stabilisierung mit Polymeren eine erhöhte kolloidale Langzeitstabilität im Vergleich zu elektrostatisch stabilisierten Partikeln und

bietet auch erhebliche Vorteile für die Kopplungschemie, da die Stabilisierungspolymere bereits funktionelle Gruppen enthalten.

In den ersten Versuchen wurden die NPs mit Polyacrylsäure (PAA) stabilisiert. Die PAA-funktionalisierten NPs wiesen eine mittlere Größe von 70 nm (hydrodynamischen Durchmesser, d_h) auf, bestimmt mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), der Feststoffgehalt betrug 10,5 mg/mL mit einem pH-Wert von 7,93. Der Ansatz konnte hochskaliert werden, die erzielte Ausbeute beträgt 75%. Die NP's wurden anschließend mittels Pulver-Röntgendiffraktometrie (PXRD) zur Bestimmung der Kristallstruktur der Kerne sowie mittels Fourier-transformierten Infrarotspektroskopie (FTIR) zur Analyse der organischen Oberflächenfunktionalisierung gemessen und die Ergebnisse analysiert.

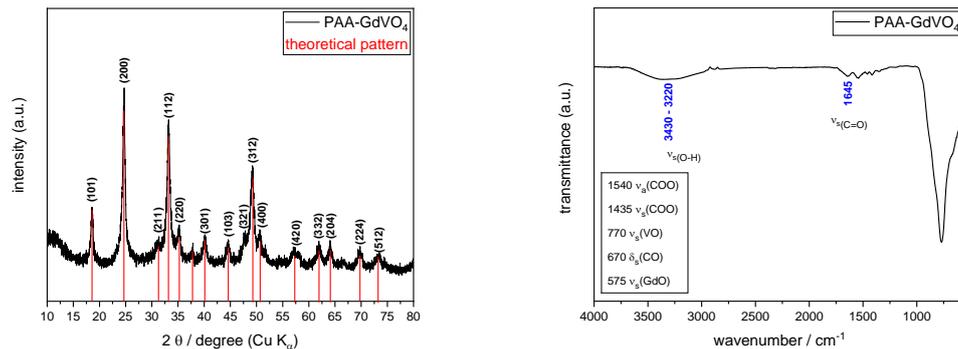


Abb. 1: PXRD-Diffraktogramm (links) und FTIR-Spektrum (rechts) der synthetisierten PAA-GdVO₄-NP, verglichen mit den Literaturwerten.

Das Pulverdiffraktogramm der GdVO₄ – NP's zeigte kristalline Beugungsreflexe (Abb. 1 schwarz), welche mit dem theoretischen Beugungsreflexen (Abb. 1 rot) übereinstimmten. Eine leichte Peak-Verbreiterung des Spektrums kann mit der nanopartikulären Natur des GdVO₄ erklärt werden. Im Infrarotspektrum konnten die typischen Banden der COO⁻-Schwingung identifiziert werden. Zusätzlich wurde die Bildung der gewünschten Nanopartikel sowie deren Größe mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, FEI Tecnaï G² 20 S-TWIN, FEI Company, OR, USA) bestätigt. Die entstandenen Partikel waren sogenannte *Multikernteilchen*, aus einzelnen Kristalliten zusammengesetzte größere Teilchen, zu erkennen in Abb. 2b. Die Größe der Kristallite war dabei ca. 5 nm, die Größe der Teilchen lag durchschnittlich bei $d = 46$ nm. Die einzelnen Kristallite waren dabei hoch kristallin, gut zu erkennen an den Gitternetzlinien in Abb. 2b. Die Form der Teilchen war rund/kubisch und sehr einheitlich in der Größe.

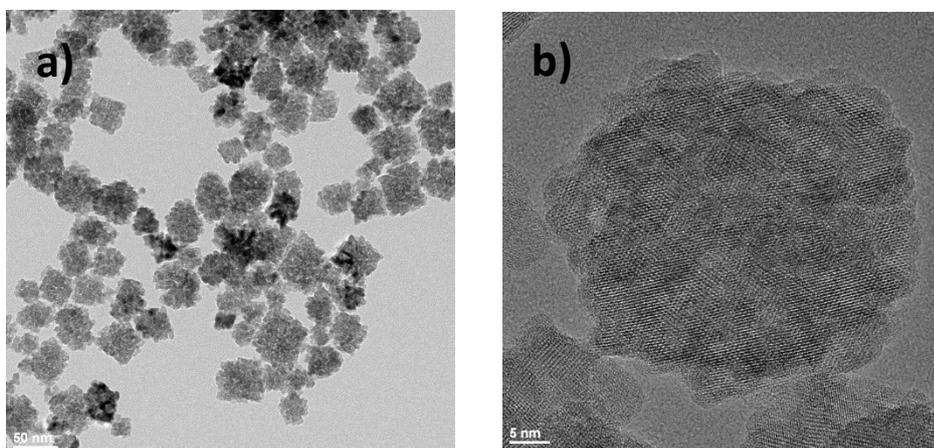


Abb. 2: TEM-Aufnahmen der PAA-GdVO₄-NP; a) zoom-out, b) zoom-in; durchschnittliche Größe beträgt 46,3 nm.

In einem weiteren Schritt wurde die Thermogravimetrische Analyse (TGA) durchgeführt, um den Anteil der organischen Oberflächenfunktionalisierung zu quantifizieren. Bei dieser Methode wird der organische Anteil der nanopartikulären Systeme verbrannt und der Massenverlust prozentuell auf die Gesamtmasse des Materials bestimmt. Die GdVO₄-Partikel wiesen einen organischen Anteil von 10 % auf.

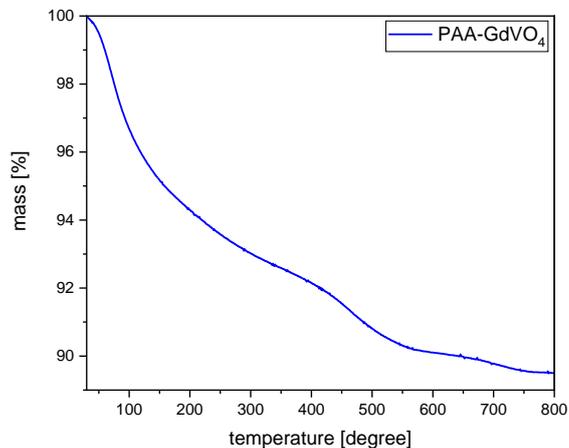


Abb. 3: TGA-Ergebnisse für PAA-GdVO₄-NP

In einem zweiten Versuchsansatz wurden GdVO₄-NP's mit Carboxydextran (CMD) als Stabilisierungspolymer verwendet. Die Charakterisierung zeigte ähnliche Ergebnisse verglichen zu den PAA-stabilisierten Partikeln. Größere Unterschiede gab es nur bei dem hydrodynamischen Durchmesser, welcher hier bei $d_h = 150$ nm lag. Beide Partikelsysteme waren grundsätzlich für ein Kopplung geeignet.

Um Zeit und Kosten der CyTOF-Messungen zu sparen, wurden zusätzlich Konjugate markiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) erzeugt und vorerst aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften, am konventionellen Durchflusszytometer (FACS, fluorescence-activated cell sorting) untersucht. Erst die Proben, die positive Ergebnisse am FACS erzielen, werden im CyTOF weiterverfolgt.

Die ersten Versuche der Antikörper-Kopplung erfolgten nach der in der Biochemie gängigen Methode über EDC/NHS-Chemie. Hierbei werden die auf den NP's vorhandenen COOH-Gruppen mittels EDC aktiviert. In einem zweiten Schritt bildet sich mittels NHS ein sogenannter Aktivester aus, welcher anschließend mit NH₂-Gruppen des Antikörpers reagieren kann. Die Reaktion läuft zusammengefasst über folgendes Schema ab:

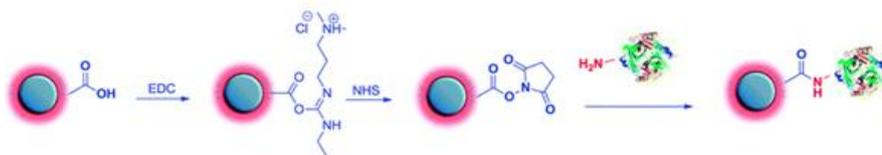


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung der Carboxylgruppe mit EDC/NHS.

Die NP's wurden mit den vom DRFZ zur Verfügung gestellten HLA-DR- und CD8-Antikörpern gekoppelt. Da die genaue Molmasse der jeweiligen Antikörper nicht bekannt war, wurden verschiedene Konzentrationen der Reaktanden untersucht, um das optimale Ergebnis der Messungen zu erzielen.

Am vielversprechendsten war die Kopplung des CD8-Antikörpers an die CMD-funktionalisierten GdVO₄-Partikel.

Die NP's wurden unter Berücksichtigung der physiologischen Bedingungen formuliert (pH = 7,4; Osmolarität = 300 mOsmol/L) und zeigten eine gute kolloidale Langzeitstabilität > 6 Monate ohne nennenswerte Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers. Mit den formulierten Partikeln wurden MTT-Tests durchgeführt, um die Partikel bzgl. Zytotoxizität zu charakterisieren. Die Partikel zeigten ab einer Konzentration von < 0,25 mg/mL Gd³⁺ (entspricht 0,43 mg/mL GdVO₄) keine zytotoxischen Effekte (Zellviabilität > 80%). Bedenk man noch, dass im CyTOF viel geringere Konzentrationen eingesetzt werden, können zytotoxische Effekte auf die Zellen nahezu ausgeschlossen werden.

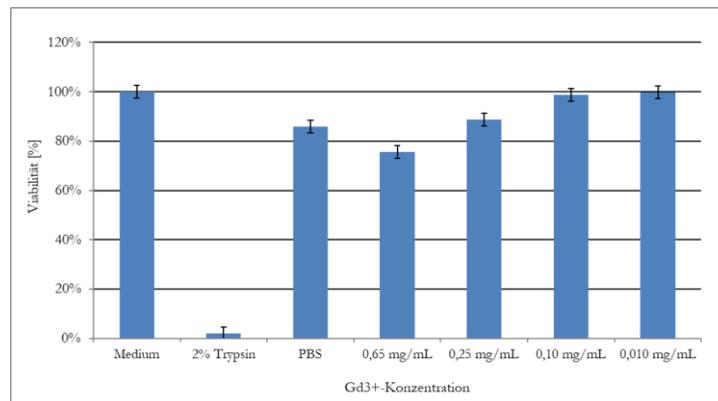


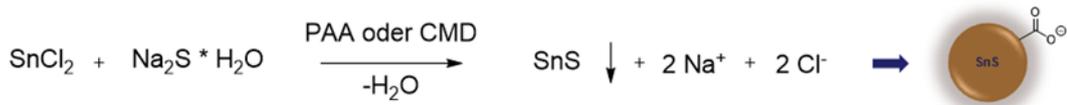
Abb. 7: MTT-Test der formulierten GdVO₄ NP's mit unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu einer negativ Kontrolle (Medium, 100 % Viabilität) und einer positiv Kontrolle (2 % Trypsin, 100 % Zelltod), Inkubation 24 h auf U937 Zellen.

Zusammengefasst konnten Nanopartikel auf Gadolinium-basis reproduzierbar synthetisiert und so oberflächenfunktionalisiert werden, dass eine Kopplung mit spezifischen Antikörpern möglich ist. Die Partikel zeigten eine gute kolloidale Langzeitstabilität und zeigten in den relevanten Konzentrationsbereich keine zellschädigenden Effekte. Damit sind die Konjugate potentiell für die CyTOF-Anwendung einsetzbar.

1.2 Generierung neuer Schwermetall-Label für die Massenzytometrie

Aufgabe dieses Arbeitspaketes war es, nanopartikuläre Reagenzien mit bislang in der Massenzytometrie ungenutzten Metallen (u.a. Zinn, Rhenium oder Barium) für die Antikörper-Konjugation zu synthetisieren. Auch hier war die Hauptaufgabe die Etablierung der Synthese, eine anschließende Funktionalisierung und Vorbereitung für die Nanopartikelkopplung und schlussendlich die Herstellung spezifischer AK-Konjugate.

Nach mehreren Vorversuchen mit den Elementen Zinn, Rhenium und Barium, lag der Fokus für das Projekt auf dem Element Zinn (Sn), da hier NP's in dem gewünschten Größenbereich synthetisiert werden konnten. Die Synthese basiert auf einer Fällungsreaktion von Sn²⁺ und S²⁻ Ionen im wässrigen Medium nach folgendem Schema:



Die Stabilisierung der Partikel erfolgte auch hier mit PAA und CMD, wobei die CMD stabilisierten Partikel für alle weiteren Kopplungsversuche verwendet wurden. Das Vorhandensein des Polymeres auf der Partikeloberfläche konnte auch hier mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden (Abb. 8b). Der Anteil von organischem Material (Polymer) lag hier bei ca. 25 % bezogen auf den Gesamtfeststoffgehalt. Das Röntgendiffraktogramm der entstanden Nanopartikel zeigte sehr breite Beugungssignale mit amorphem Charakter, welche in der Überstruktur aber dem SnS zugeordnet werden konnten. Dies weist auf sehr kleine Partikel mit geringer Kristallinität hin, was mit TEM-Untersuchungen bestätigt wurde.

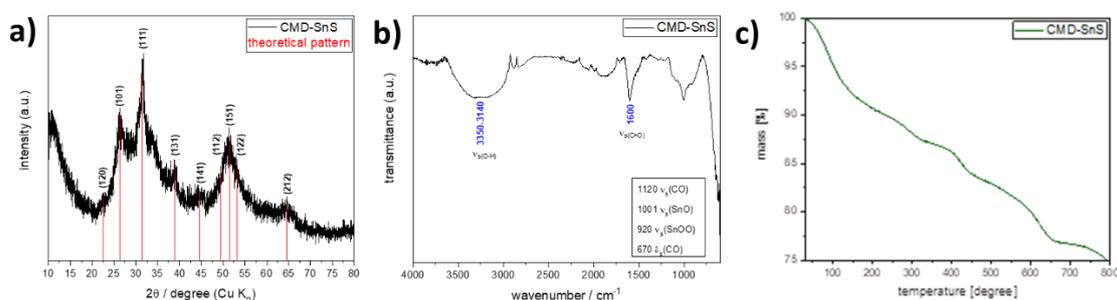


Abb. 8: a) PXRD-Diffraktogramm, b) FTIR-Spektrum und c) TGA der synthetisierten CMD-SnS-NP

Die durch TEM ermittelte Morphologie der SnS-Nanopartikel sind aggregierte Mehrkernteilchen, welche aus ca. 4-5 nm großen Einzelteilchen bestehen. Ein Nachteil dieser Fällungsreaktion ist, dass die erhaltenen Mehrkernteilchen eine sehr breite Größenverteilung aufweisen, weshalb die entstandenen Partikel nach der Reaktion fraktioniert werden müssen. Dies geschah durch Zentrifugation. Im Endeffekt wurden Partikel erhalten, die ca. 50 nm im Durchmesser (d_h) waren und somit den Anforderungen entsprachen.

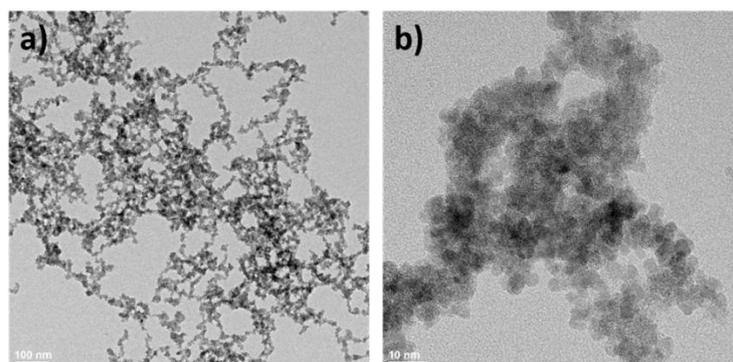


Abb. 9: TEM-Aufnahmen der CMD-SnS-NP; a) zoom-out, b) zoom-in; durchschnittliche Größe beträgt 4,6 nm.

Um diese Synthese zu optimieren, wurde für die Zugabe der Reaktanten eine Peristaltikpumpe verwendet. Dies hatte den Effekt, dass die Zugabe sehr langsam und gleichmäßig erfolgte, was einerseits die Kristallinität der Partikel erhöhte (langsame Zugabe) und andererseits die Größenverteilung positiv beeinflussen sollte.

In Abb. 10a ist das Röntgenbeugungsspektrum der Partikel, hergestellt mittels Peristaltikpumpe, dargestellt. Es sind eindeutig kristalline Beugungsreflexe erkennbar (blaues Spektrum), was mit der

Literatur (rotes Spektrum) zu 85 % mit dem SnS übereinstimmt. Bei den übrigen 15 % handelt es sich um andere Kristallmodifikationen des Zinnsulfids. Auch hier ist die typische Verbreiterung der Beugungspeaks zu erkennen, was wiederum auf kleine Partikel schließen lässt. TEM-Aufnahmen (Abb. 10b) der so synthetisierten Partikel bestätigen die Ergebnisse, kleine und kristalline ca. 4 – 5 nm große Primärpartikel, welche in größeren Aggregaten vorliegen.

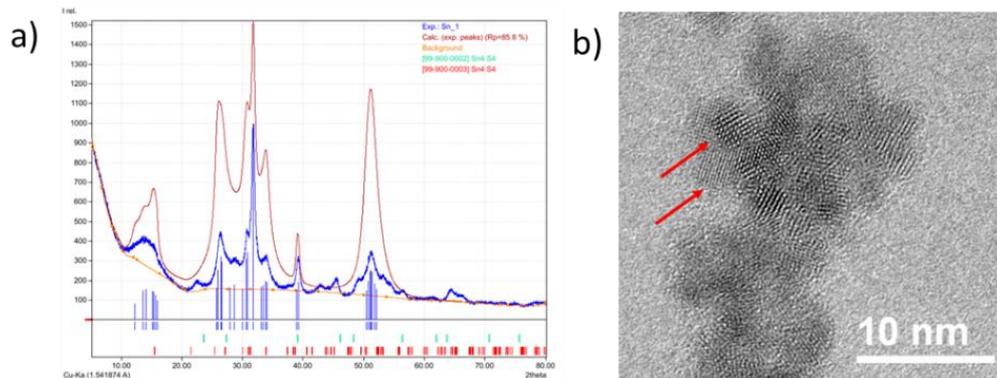


Abb. 10: a) SnS – Partikel, hergestellt mittels Peristaltikpumpe, zeigt ein kristallines Beugungsbild was mit b) TEM Untersuchungen bestätigt werden kann. Die Gitternetzlinien sind eindeutig zu erkennen, was auf kristalline Partikel schließen lässt.

Ein weiterer Vorteil der Synthese mittels Peristaltikpumpe ist die höhere Reproduzierbarkeit, was in n = 10 Ansätzen gezeigt wurde. Durch das gleichmäßige Zutropfen sind sowohl Ausbeuten als auch die erzielten Partikelgrößen reproduzierbar. Die mittleren Werte der Partikelparameter, welche für die folgenden Kopplungsversuche verwendet wurden, waren wie folgt:

- pH = 6,4; $d_h = 67$ nm; $\beta = 2,7$ mg/mL

Die NP's wurden unter Berücksichtigung der physiologischen Bedingungen formuliert (pH = 7,4; Osmolarität = 300 mOsmol/L) und zeigten eine gute kolloidale Langzeitstabilität > 6 Monate ohne nennenswerte Veränderung des hydrodynamischen Durchmessers. Mit den formulierten Partikeln wurden MTT-Tests durchgeführt, um die Partikel bzgl. Zytotoxizität zu charakterisieren. Die Partikel zeigten ab einer Konzentration von < 0,17 mg/mL SnS keine zytotoxischen Effekte (Zellviabilität $\geq 80\%$). Bedenkt man noch, dass im CyTOF viel geringere Konzentrationen eingesetzt werden und die Inkubation mit den Zellen weniger als 24 h ist, können zytotoxische Effekte auf die Zellen nahezu ausgeschlossen werden.

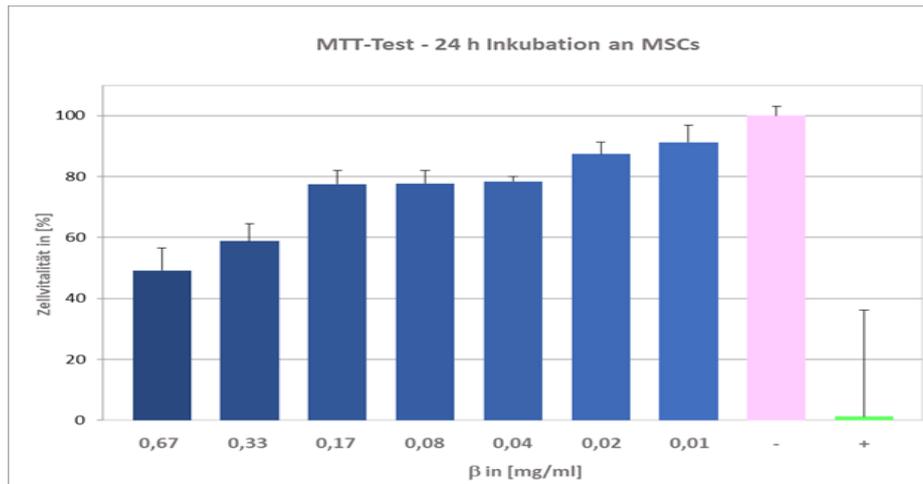


Abb. 11: MTT-Test der formulierten SnS NP's mit unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zu einer negativ Kontrolle (Medium, 100 % Viabilität) und einer positiv Kontrolle (2 % Trypsin, 100 % Zelltod), Inkubation 24 h auf mesenchymalen Stammzellen (MSC's).

Da auch diese Partikel mittels CMD stabilisiert sind, kann eine Antikörperkopplung auch hier mittels EDC/NHS-Chemie erfolgen. Neben der bereits etablierten Kopplungschemie wurde ein weiterer Ansatz, mittels des Uronium-Salzes HSTU, etabliert. In einem ersten Schritt werden bei dieser Reaktion die COOH-Gruppen mittels N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) deprotoniert, anschließend bilden sich mittels HSTU hochreaktive Aktivester, welche wiederum mit den Amin-Funktionen der Antikörper reagieren können. Der Reaktionsmechanismus ist im Folgenden dargestellt

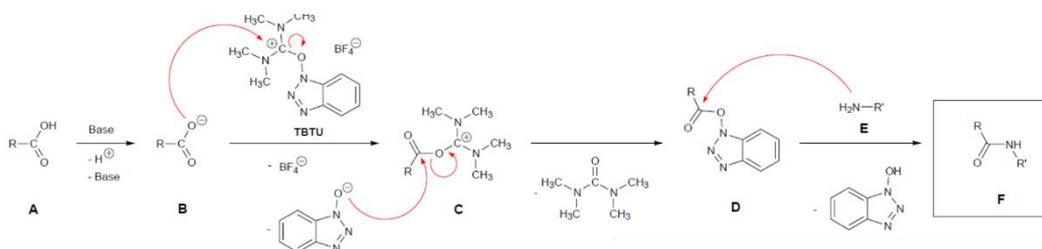


Abb. 12: Reaktionsmechanismus der Uronium-Salz basierten Kopplungschemie, hier dargestellt mit TBTU. Die Reaktion mit HSTU ist äquivalent.

Bevor auch hier die Kopplung mit CD8 erfolgte, wurde in zwei unterschiedlichen Versuchen die generelle Funktionalisierbarkeit der SnS-NP's gezeigt.

In einem ersten Versuch wurden die Partikel mit einem FITC-markierten Modelantikörper gekoppelt. FITC ist ein literaturbekannter Farbstoff, welcher in vielen in vitro Versuchen standardmäßig eingesetzt wird und für welchen es einen Standardfilter (FITC/Texas Red – Filter) am Fluoreszenzmikroskop gibt. Die SnS-Partikel wurden mittels etablierten EDC/NHS- und HSTU/DIPEA-Protokoll mit diesem FITC-Antikörper gekoppelt und anschließend mittels Dialyse aufgereinigt, so dass kein freier FITC-Antikörper mehr in Lösung vorhanden war. Anschließend wurden die Partikel auf ein Sheet Zellulosefaser (dient nur als Matrix) gegeben und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 13). Zusätzlich wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei welchen kein Kopplungsreagenz eingesetzt wurde.

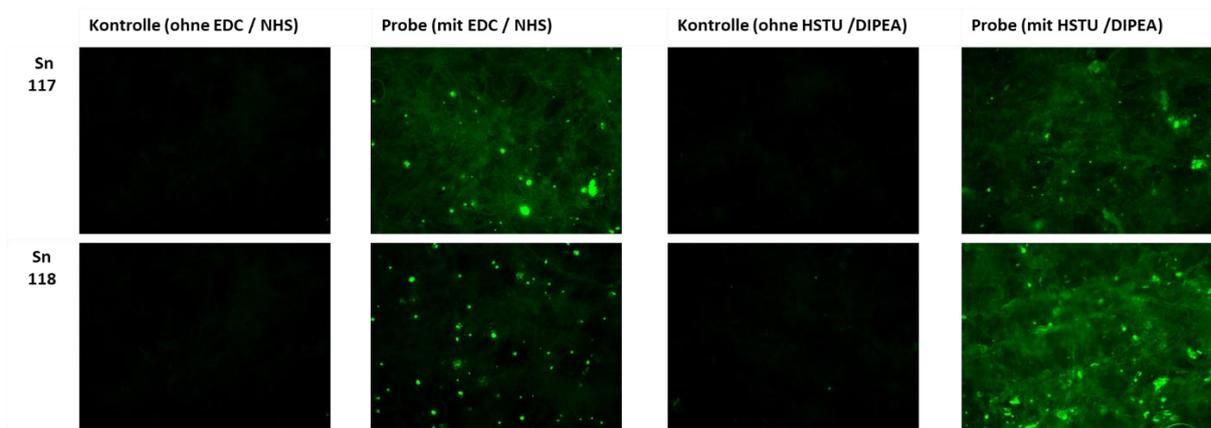


Abb. 13: FITC-markierte SnS-Partikel und Kontrollproben. Mikroskopeinstellung bzw. Beleuchtungsintensität bei allen Messungen konstant.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kontrollproben ohne Kopplungsreagenz kein Signal im Mikroskop zeigen, folglich auch kein FITC-AK auf den Partikeln gebunden hat. Die Proben mit Kopplungsreagenz zeigen ein deutliches Signal, folglich hat der FITC-AK auf den SnS-Partikeln gebunden.

Ein zweites Experiment wurde unternommen, um die kopplungsfähigen Gruppen zu quantifizieren. Dafür wurden die SnS-Partikel in einem ersten Schritt mit Neutravidin funktionalisiert und anschließend mit Biotin-HRP (**horseradish peroxidase**) inkubiert und durch Dialyse aufgereinigt. Streptavidin-Biotin bildet eine sehr starke Bindung was dazu führt, dass alle zur Verfügung stehenden kopplungsfähigen Gruppen mit HRP beladen sind. Diese können anschließend mit dem Farbstoff TMB (3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine) umgesetzt werden, was im neutralen Bereich und oxidierenden Bedingungen zu einer blauen Färbung führt (Fig. 13a). Wird jetzt der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben, wandelt sich der blaue Farbstoff in den gelben Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1-4,4-diimin um (Fig. 13b) und kann am UV/VIS-Photometer bei 450 nm vermessen werden.

Diese Reaktion ist quantitativ, da nur gebundenes Biotin-HRP auch eine Farbreaktion hervorrufen kann. Mittels Kalibrierung kann nun die Menge an gebundenen HRP bestimmt werden und damit auch Rückschlüsse auf die kopplungsfähigen Gruppen gezogen werden.

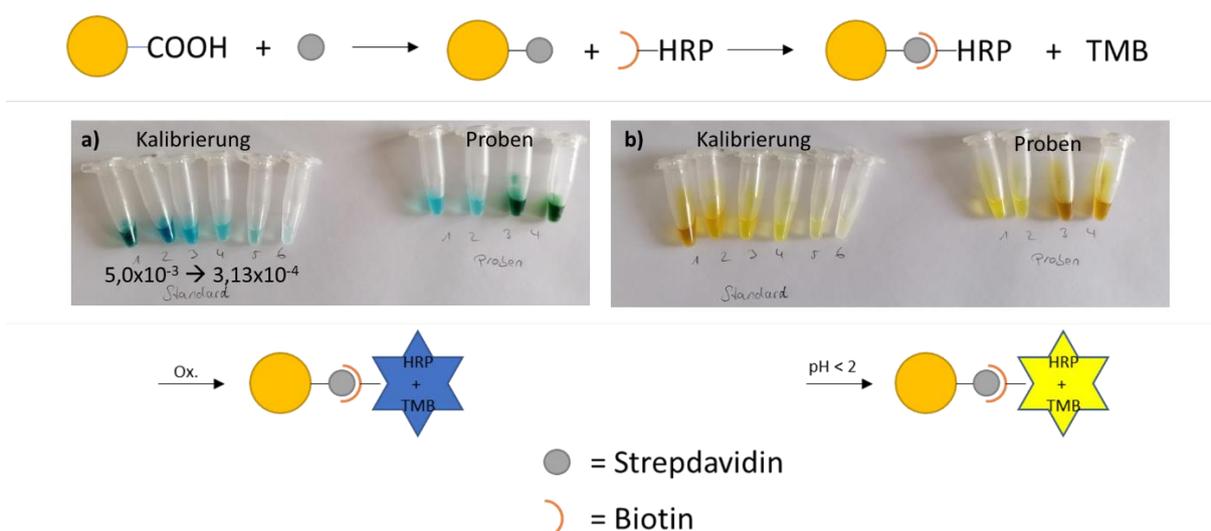


Abb. 14: a) Kalibrierlösungen (links) und Proben (rechts) nach TMB-Zugabe, die Blaufärbung ist deutlich zu erkennen, b) nach Säurezugabe Umwandlung in den gelben Farbstoff

In Abb. 14a ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Kalibrierlösungen als auch die Proben blau gefärbt waren, bzw. bei Verschieben des pH-Wertes in das saure Milieu die Farbänderung zu gelb auftrat (14b). Eine erste quantitative Bestimmung der kopplungsfähigen Gruppen konnte nicht erfolgen, da die SnS-Partikel unter Zugabe des TMB stark aggregierten und aus der Lösung ausfielen. Nach Optimierung der Messbedingungen war eine photometrische Bestimmung möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass Biotin-HRP auf der Partikeloberfläche bindet, was mit dem Nachweis verbunden ist, dass eine Kopplung theoretisch möglich ist. Mit diesem und dem vorangegangenen Experiment konnte das Kopplungsprotokoll für die SnS-NP optimiert werden und verschiedene Chargen, mit dem vom Projektpartner bereitgestellten α h CD8-Antikörper, konnten gekoppelt werden. Die fertige Konjugate wurden dem Projektpartner für weitere Messungen zur Verfügung gestellt.

Im Folgenden sind verschiedene CyTOF-Messungen dargestellt. Es wurden verschiedene SnS-Batches mit dem α hCD8-Antikörper unter verschiedenen Kopplungsbedingungen gekoppelt. Alle diese Ansätze lieferten ein CD8-spezifisches Zinn-Signal. Damit konnte die generelle Anwendbarkeit der Sn-Nanopartikel im CyTOF gezeigt werden. Eine ausführliche Auswertung wurde vom Projektpartner DRFZ durchgeführt.

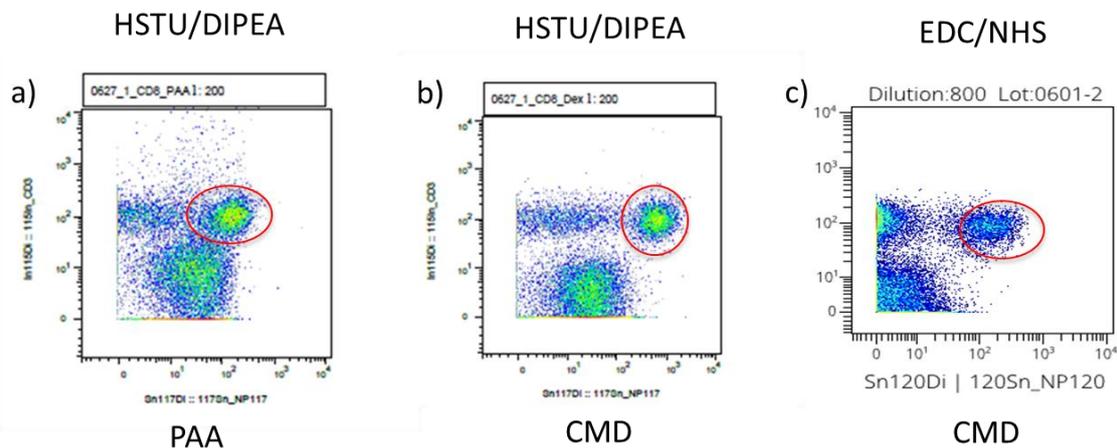


Abb. 15: Ergebnisse der CyTOF-Messung von verschiedenen SnS-Chargen a) PAA-funktionalisierte Partikel mit HSTU/DIPEA, b) CMD-funktionalisierte Partikel mit HSTU/DIPEA und c) CMD-funktionalisierte Partikel mit EDC/NHS gekoppelt. Alle Partikel zeigen ein spezifisches Sn-Signal (roter Kreis)

Im Zusammenhang mit diesem Arbeitspaket konnte der Meilenstein MS1 erfüllt werden:

Mindestens ein neuartiges Metall-Label aus AP1 oder AP2 konnte erfolgreich hergestellt und für die AK-Kopplung funktionalisiert werden (M18)

- Sn-Nanopartikel konnten erfolgreich für die Anwendung im CyTOF hergestellt und funktionalisiert werden

1.3 Universelle Zelloberflächenmarker für das Multiplexing bei CyTOF-Analysen

Ziel in diesem AP war es aus den vorangegangenen Versuchen ein universell nutzbares Zelloberflächen-Barcoding zur Harmonisierung von CyTOF-Messungen zu etablieren. Abweichend vom geplanten Arbeitsplan wurden Versuche bzgl. Zell-Barcoding nicht mit den GdVO₄-Partikeln untersucht, sondern mit den neu etablierten SnS-Partikeln. Der Vorteil dieser Partikel war, dass sie in der Literatur für CyTOF-Anwendungen noch nicht erwähnt waren und im Fall von positiven Ergebnissen ein erheblicher wissenschaftlicher Mehrwert mit diesen Partikeln erzielt werden kann.

Dafür wurden isopenreine SnS-NP's synthetisiert. Es wurden Sn-117 und Sn-118 Isotope des Zinns in Form des Chlorids kommerziell erworben. Die Synthese erfolgte wie in Abschnitt 1.2 beschrieben. Auch die erzielten Partikelparameter waren wie erwartet mit den Synthesen des natürlich vorkommenden Zinnchlorids vergleichbar. Als Stabilisierungspolymer wurde ausschließlich CMD verwendet, da die Ergebnisse der AK-Kopplung mit diesem sich als optimaler erwiesen. Die Partikel wurden ohne AK-Kopplung zu dem Kooperationspartner geschickt, um die Isotopenreinheit im CyTOF zu zeigen. Sowohl die Sn-117 als auch die Sn-118 konnten mit einer hohen Reinheit im CyTOF nachgewiesen werden.

Anschließend wurden verschiedene AK's zur Konjugation verwendet, unter anderem: CD8, CD20, CD3, CD4, HLADR, CD16 und CD3. Als Beispiel sind im Folgenden SnS-118 Partikel, konjugiert mit CD4 und CD8 dargestellt, welche positive Ergebnisse im CyTOF zeigten.

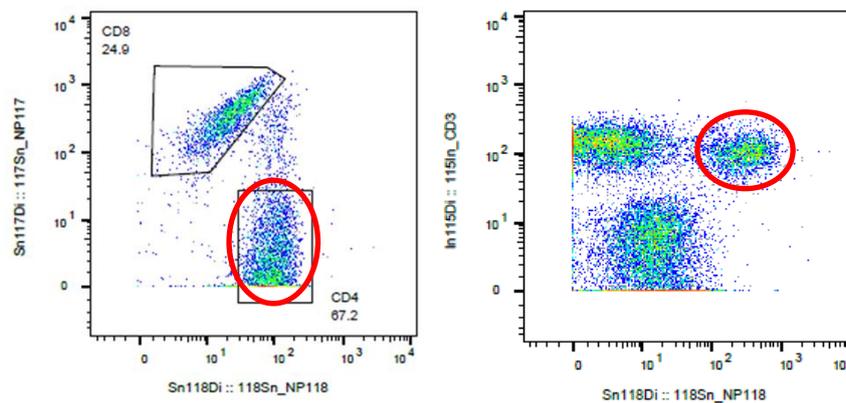


Abb. 16: Ergebnisse der CyTOF-Messung von verschiedenen SnS-118 Partikeln konjugiert mit CD4 (links) und CD8 (rechts), die Population der AK-spezifischen SnS-Partikel ist rot markiert.

Da neben der direkten Kopplung an die COOH-Gruppen der SnS-Partikel noch eine weitere Kopplungsstrategie getestet werden sollte, wurde die Partikeloberfläche mittels HSTU/DIPEA mit Neutravidin funktionalisiert. Die anschließende Bildung der AK-Konjugate erfolgt analog zu der unter AP 1.2 skizzierten Farbreaktion aus Abb. 14, da Neutravidin sehr spezifisch an Biotin binden kann. Benutzt man nun biotinierte Antikörper, können mit den Neutravidin-funktionalisierten Partikeln relativ einfach spezifische Konjugate gebildet werden.

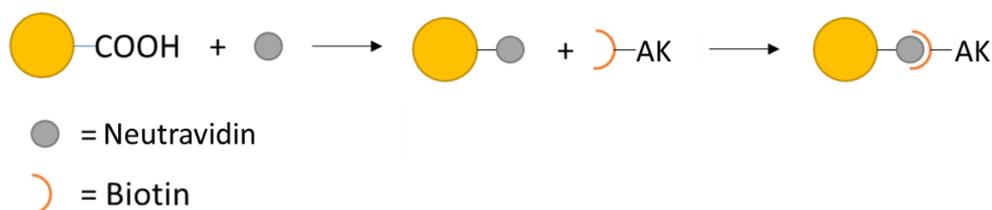


Abb. 17: Schema der Neutravidin/Biotin Kopplungschemie

Auch hier wurden verschiedene biotinylierte AK's vom Projektpartner DRFZ bereitgestellt bzw. kommerziell erworben. Es wurden mehrere Konjugaten hergestellt und am CyTOF vermessen. Im Folgenden sind spezifische CD4 und CD8 Konjugate mit SnS-117 dargestellt.

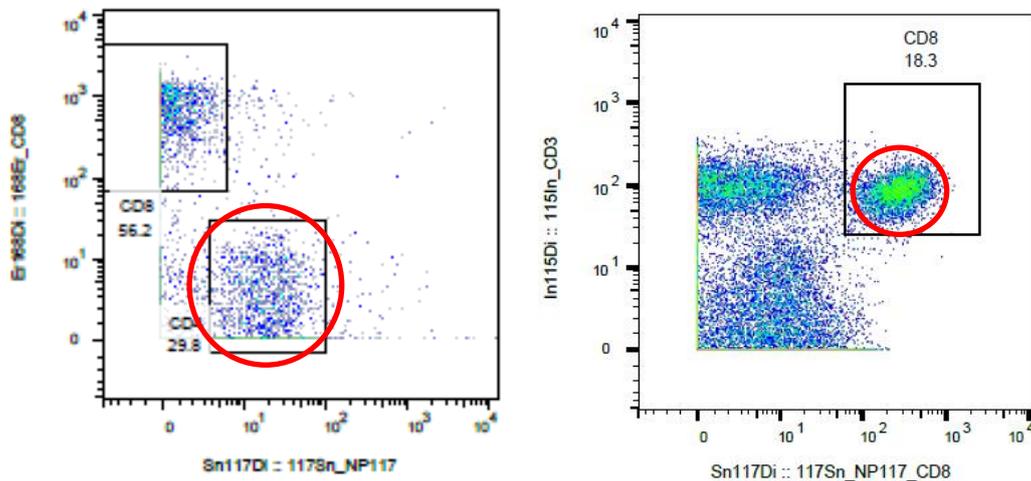


Abb. 18: Ergebnisse der CyTOF-Messung von verschiedenen SnS-117 Partikeln konjugiert mit CD4 (links) und CD8 (rechts) über Neutravidin/Biotin-Kopplung, die Population der AK-spezifischen SnS-Partikel ist rot markiert.

Die Ergebnisse aus 1.3 zeigen, dass ein Barcoding mit den SnS Nanopartikeln theoretisch möglich ist, da erstens SnS Partikel isotonenrein hergestellt werden können und zweitens unterschiedliche AK's an die Partikel gekoppelt werden können. Somit sind verschiedene Kombinationen von NP's/AK's möglich. Eine genauere Auswertung der CyTOF Ergebnisse wurde vom Projektpartner DRFZ vorgenommen.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass neben der Etablierung einer GdVO₄ - und SnS – Synthese auch die Kopplung von spezifischen Antikörpern, mit unterschiedlichen Kopplungsstrategien, möglich war. Damit konnten alle AP's des Kooperationsprojektes erfüllt werden. Nichtsdestotrotz war die Kopplung nicht mit allen AK's möglich bzw. zeigten kein spezifisches Signal im CyTOF. Da alle Kopplungsstrategien universell einsetzbar sein sollten und vor allem die Neutravidin/Biotin – Kopplung sehr spezifisch sein sollte, gibt es hier noch Forschungs- und Optimierungsbedarf.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Positionen des zahlenmäßigen Nachweises befinden sich im Anhang.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Ziel des Projektes war die Generierung und Entwicklung innovativer Reagenzien für die Massenzytometrie (CyTOF) für Anwendungen in der Gesundheitsforschung. Für das Erreichen dieser Ziele erfolgte die initiale Entwicklung der neuartigen Reagenzien in engem Zusammenspiel von DRFZ und nanoPET. Alle Arbeiten wurden in Absprache mit den Projektpartnern und im Einklang mit dem zuvor erstellten Arbeitsplan durchgeführt.

Um dieses Konzept zu verwirklichen wurde das Projekt so konzipiert, dass der massenzytometrische und Zell-basierete Teil von dem Projektpartner DRFZ bearbeitet wurde, der chemische Teil von nanoPET.

Die Arbeiten bei nanoPET umfassten die chemisch-nanotechnologische Entwicklung der neuen Reagenzien für die Massenzytometrie, die Funktionalisierung der Nanopartikel für die Antikörper-Konjugation und ihre eingehende physikochemische Charakterisierung, um die Eignung für die Massenzytometrie sicherzustellen. Hierfür waren intensive Arbeiten im Syntheselabor notwendig, da die Synthese aller für das Projekt benötigten Partikelsysteme erst etabliert werden musste. Auch eine umfassende physikochemische Charakterisierung war in dem Zusammenhang erforderlich, was auch die Auftragsmessungen außer Haus mit einschließt, da nicht alle Analysemethoden bei nanoPET zur Verfügung standen. Reproduzierbarkeit und Langzeitstabilität der Partikelsysteme standen für eine potenzielle Produktentwicklung zusätzlich im Fokus der Arbeiten.

Neben der reinen Synthesechemie war die Etablierung der Antikörper-Konjugation ein weiteres wichtiges Arbeitsziel. Auch wenn für die Kopplung der Antikörper etablierte Kopplungschemie verwendet wurde, ist die Kombination mit einem neuen Partikelsystem meist mit unvorhersehbaren Fragestellungen behaftet. Auch hier war ein überdurchschnittlicher Arbeitsaufwand notwendig, um die gewünschten Ziele zu erreichen.

Der Einsatz der Personalmittel und anderer Mittel war für den positiven Abschluss des Projektes notwendig und angemessen und ist somit Grundlage für eine mögliche, zukünftige Verwertung.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplanes

Für nanoPET eröffnet sich die einzigartige Perspektive, mit vorhandener Expertise und mit Hilfe des Wissens und der Erfahrung der DRFZ CyTOF-Plattform, eine schnelle und von Beginn an anwendungsbezogene Entwicklung neuartiger CyTOF-Reagenzien im Interesse der Gesundheitsforschung zu realisieren, und damit gleichermaßen einen neuen Markt zu erschließen. Am Ende des F&E Vorhabens sollen erste Anwendungsbeispiele im Bereich von B-Zell-CyTOF-Analysen vorliegen. Die angestrebten hochsensitiven NP-basierten Assays und die Konjugation von Antikörpern mit neuen Metallen basieren auf chemischen Kopplungsprinzipien, die weitgehend universell, für fast alle Antikörper, anwendbar sind. Nachdem die Kopplungsprotokolle etabliert sind, können diese perspektivisch auf viele analytische Antikörper übertragen und die nanopartikelären Reagenzien nach Projektende bis zur Marktreife weiterentwickelt werden. Die hier zu entwickelnden Reagenzien werden sich deutlich von den verfügbaren Produkten durch Alleinstellungsmerkmale bzgl. ihrer Güte und anderen Eigenschaften abgrenzen, was das Anbieten exklusiver Produkte im lukrativen Höchstpreissegment erlauben würde. Da dies Verbrauchsmaterialien sind, gehen wir davon aus, dass

der Umsatz von nanoPET mit den entsprechenden Reagenzien infolge ihrer anvisierten Vermarktung mit dem stetig wachsenden Markt für Zytometrie einhergehen wird. Bevor eine solche Vermarktung von neuen Reagenzien erfolgen kann, müssen wissenschaftlich gesehen nach Projektende einige Punkte adressiert werden. Wie unter Punkt 1. gezeigt, war die Herstellung von spezifischen CyTOF-Reagenzien möglich, jedoch nicht mit allen Antikörpern. Diese Diskrepanz muss nach Projektende mit weiteren Experimenten untersucht werden. Wenn diese Versuche positiv abgeschlossen werden, kann eine potenzielle Vermarktung neuer CyTOF-Reagenzien erfolgen. Nach erfolgreichem Abschluss der wissenschaftlichen Arbeiten liegt dann mindestens ein neuartiges Reagenz für die Massenzytometrie vor. Die projektgebundene Ergebnisverwertung wird dem kommerziellen, aber auch dem hohen akademischen Interesse Rechnung tragen. nanoPET wird, geregelt durch den Kooperationsvertrag, gemeinsam mit dem DRFZ nach Abschluss des Projekts mittelfristig eine qualifizierte und effiziente Verwertung entlang der Wertschöpfungskette anstreben. Wenn eine Patentierung der Ergebnisse einen erheblichen Mehrwert garantiert, wird auch dies angestrebt. Abweichend vom Verwertungsplan aus der Antragsstellung wird die potenzielle Vermarktung neuer Reagenzien nicht direkt im Anschluss des Projektes erfolgen, sondern wird sich durch die noch durchzuführenden Versuche verschieben, geplant ist dies 2026.

Wissenschaftlich werden die Ergebnisse auf mehreren Ebenen nutzbringend und wegweisend sein – sowohl in der Chemie der NP-Synthese und Optimierung als auch in der Zytometrie und B-Zell-Immunologie. Die Fortsetzung dieser Forschungen wird ggf. von beide Partnern gemeinsam oder separat im Rahmen von z.B. DFG oder BMBF-geförderten Projekten erfolgen.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Während des Vorhabens gab es Entwicklung bei der Vermarktung von Antikörperkonjugationskits von verschiedenen KMU's, die für CyTOF Assays geeignet sind. Diese wiesen allerdings gegenüber den bestehenden Fluidigm-Produkten keine hier relevanten besonderen Merkmale auf, d.h. sind weder besonders für high sensitivity Detektion geeignet, noch erschließen sie zusätzliche Messkanäle oder Barcoding Optionen. Fluidigm selbst machte auch Fortschritte in der Reagenzienentwicklung (Labeling kits für Cadmiumisotope), aber nicht mit einem nanopartikulären Ansatz. Auch die Weiterentwicklung der Hardware stand eher im Vordergrund.

Da unser Ansatz auf bisher nicht genutzten Kanälen und auf nanopartikulären Reagenzien basierte, gab es keine weiteren FE-Ergebnisse von Seiten Dritter, die für die Durchführung des Vorhabens relevant waren.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Arbeiten des Projektes wurden bereits auf dem Mass Cytometry User Forum in Berlin vorgestellt. Wissenschaftliche Artikel in hochrangigen Zeitschriften werden unter Berücksichtigung der Sicherung möglicher Schutzrechte durchgeführt und sind z.Zt. in Planung.