



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Repurposing ubiquitination for innovative antibody conjugation

Hebieshy, A.F. el

Citation

Hebieshy, A. F. el. (2025, October 16). *Repurposing ubiquitination for innovative antibody conjugation*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4273517>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4273517>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Nederlandse samenvatting
Curriculum Vitae
Publications
Portfolio
Acknowledgements

A



Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift richt zich op de ontwikkeling en verbetering van antilichaam-conjugatie technologieën.

Antilichaam-conjugatie technologieën zijn essentieel voor het maken van antilichaam-gebaseerde diagnostische en onderzoeks gereedschap en voor het maken van antilichaam conjugaten voor therapeutische toepassingen. Deze technologieën omvatten een reeks van fluorescent gelabelde antilichamen voor beeldvorming tot bispecifieke antilichamen voor dubbele antigeendoelwitten en antilichaam-drug conjugaten (ADC's) voor de gerichte aflevering van cytotoxische middelen. De huidige strategieën voor antilichaamconjugatie kampen echter met uitdagingen zoals inefficiëntie en heterogeniteit, die de stabiliteit, farmacokinetiek, toxiciteitsprofielen en batchconsistentie aanzienlijk kunnen beïnvloeden. Ook gezien de toenemende belangstelling voor multispecifieke antilichaam complexen, is er een dringende behoefte aan verbeteringen in conjugatietechnieken. Dit proefschrift heeft tot doel covalente, site-specifieke conjugatietechnologieën te ontwikkelen en te optimaliseren om de efficiëntie, reproduceerbaarheid en functionele prestaties van antilichaamconjugaten te verbeteren. Het onderzoek verkent bovendien de toepassing van synthetische peptidechemie om de huidige beperkingen te overwinnen, wat leidt tot een betere controle over conjugatieplaatsen, verbeterde reproduceerbaarheid en verbeterde functionele prestaties.

Hoofdstuk 2 introduceert 'ubi-tagging', een innovatief platform dat de site-specifieke en efficiënte enzymatische processen van ubiquitinatie gebruikt. Deze techniek maakt gebruik van ubiquitine als een conjugatietag, die is gefuseerd aan antilichamen of antilichaamfragmenten om fluorescente labels aan antilichamen te hechten of voor het multimeriseren van antilichamen. De veelzijdigheid van deze methode en de rol van ubiquitine in cellulaire signaalroutes voor proteasome-gemedieerde degradatie benadrukken de potentieel revolutionaire toepassingen van deze techniek.

Hoofdstuk 3 bouwt voort op de ubi-tagging technologie door deze toe te passen op het genereren van antilichaam-gebaseerde DC-gerichte vaccijns. Deze benadering gebruikt ubi-tagging voor het conjugeren van chemisch gesynthetiseerde Ub-OTI peptides aan DC-targeting anti-DEC205 Fab-Ub, en demonstreert de superieure effectiviteit van ubi-tag gebaseerde conjugaten vergeleken met traditionele sortagging-technieken in zowel in vitro als in vivo toepassingen.

Hoofdstuk 4 test de toepasbaarheid van ubi-tagging op kleinere antilichaamfragmenten zoals nanobodies, en demonstreert hun functionaliteit in de context van gerichte vaccinatie aan menselijke DC's in vitro. Dit hoofdstuk toont ook de verbeterde oplosbaarheid en stabiliteit van ubi-tag gefuseerde eiwitten aan, wat suggereert dat ubi-tagging de oplosbaarheid van hydrofobe antigenen kan verbeteren.

Hoofdstuk 5 presenteert de totale chemische synthese van een 123 aminozuren

tellend nanobody dat GFP herkent. Dit nanobody, gemodificeerd met een propargyl functionaliteit voor on-demand functionalisatie, toont de homogeniteit en gedefinieerde kwaliteit die de voorbereiding van nanobody-drug conjugaat en multimeren kan vergemakkelijken.

De innovaties gepresenteerd in dit proefschrift benadrukken het belang van geavanceerde conjugatietechnologieën binnen de biomedische wetenschappen. De nieuwe methoden, zoals ubi-tagging, bieden substantiële vooruitgang in de precisie en efficiëntie waarmee antilichaamconjugaten geproduceerd kunnen worden. Deze technologieën beloven aanzienlijke verbeteringen voor zowel fundamenteel onderzoek als klinische toepassingen en openen nieuwe deuren naar de ontwikkeling van multispecifieke en multifunctionele antilichaamconjugaten.