

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fachgebiet Proteinchemie

## **Synthese und Charakterisierung eines synthetischen Antikörpers**

**Manuel Breh**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Bernhard Rieger

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Christian F. W. Becker, Universität Wien  
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Sattler

Die Dissertation wurde am 26. Januar 2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19. März 2012 angenommen.

1. Einleitung.....	1
1.1 Übersicht.....	1
1.2 EGFR als molekulares Ziel von Tumorthérapien.....	2
1.3 Monoklonale Antikörper gegen EGFR.....	4
1.4 Alternative Antikörper-basierte Strategien.....	6
1.5 Der synthetische Antikörper.....	8
1.6 Ziele der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Chemikalien.....	13
2.2 Instrumentation.....	13
2.3 Lösungen und Puffer.....	15
2.4 Chemische Methoden.....	16
2.4.1 Festphasensynthese von Peptiden.....	16
2.4.2 Acetylierung von Peptiden.....	18
2.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Peptiden.....	18
2.4.4 Oximligation von Peptiden.....	19
2.4.5 Aufreinigung von Peptiden.....	20
2.4.6 Qualitätsanalyse von Peptiden.....	20
2.5 Zellbiologische Methoden.....	21
2.5.1 Kultivierung humaner Tumorzellen.....	21
2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung.....	22
2.5.3 Isolation neutrophiler Granulozyten.....	23
2.5.4 Chemotaxis von Immunzellen (Transwell).....	23
2.5.5 Isolation von Makrophagen.....	24
2.5.6 Chemotaxis von Immunzellen (Scratch).....	25
2.5.7 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung.....	27
2.5.8 Stabilität des SAB in Blutserum.....	27
2.6 Biophysikalische Methoden.....	28
2.6.1 Dynamische und Statische Lichtstreuung.....	28
2.6.2 Oberflächenplasmonenresonanz.....	28
2.7 Proteinchemische Methoden.....	29
2.7.1 Löslichkeit von Peptiden.....	29
2.7.2 Langzeitstabilität des SAB.....	30
2.7.3 Endotoxingehalt von Peptiden.....	30

2.8 Pharmakologische Methoden.....	31
2.8.1 Toxizität des SAB und maximal tolerierte Anwendungsdosis.....	31
2.8.2 SAB-induzierte Immunantwort.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1 Festphasensynthese des SAB.....	33
3.1.1 Fluoreszenzmarkierung von Peptiden.....	40
3.2 Konvergente Synthese des SAB.....	42
3.3 Endotoxingehalt der synthetisierten Peptide.....	46
3.4 Löslichkeit der synthetisierten Peptide.....	47
3.5 Dispersität des SAB.....	51
3.6 Stabilität des SAB in Blutserum.....	53
3.7 Temperatur- und Langzeitstabilität des SAB.....	56
3.8 Verfügbarkeit von SAB-Peptiden als Marker und ihre Mitogenität.....	60
3.9 Affinitätsbestimmung von SAB-Peptiden zu EGFR.....	63
3.10 Chemotaktische Potenz des SAB bei Immunzellen.....	66
3.11 Chemotaktische Potenz des SAB in der Tumor- und Immunzellen- Cokultur.....	68
3.12 Bindungsmuster des SAB an Tumorzelllinien.....	70
3.13 Toxizität des SAB <i>in vivo</i> .....	74
3.14 SAB-induzierte Immunantwort.....	77
4. Diskussion.....	80
4.1 Synthese des SAB.....	80
4.2 Stabilität des SAB.....	82
4.3 Bindungseigenschaften des SAB.....	83
4.4 Chemotaktische Potenz des SAB.....	86
4.5 Verträglichkeit des SAB <i>in vivo</i> .....	88
5. Zusammenfassung.....	90
5.1 Summary.....	91
6. Literatur.....	92
7. Anhang.....	101

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase
Ang2	Angiopoietin-2
Anti-F4/80	Antikörper gegen Makrophagen
AOAc	Aminoxyacetat
AS	Aminosäure(n)
AST	Aspartat-Aminotransferase
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
BSA	Rinderserumalbumin
CCL2	siehe <i>MCP-1</i>
CCR-2/4	Rezeptoren für <i>CCL2</i>
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMAP	Dimethylaminophenol
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor (-Rezeptor)
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
eq	Äquivalent(e)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	Familie der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
FAM	Carboxyfluorescein
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung

## Abkürzungsverzeichnis

---

FCS	fötales Kalbsserum
fM, fMet	Formyl-Methionin
fMLF	immunogenes Peptid mit C-terminalem Phenylalanin, welches in der Literatur oft als fMLP bezeichnet wird
fMLP	siehe <i>fMLF</i>
Fmoc	Fluorenylmethyloxycarbonyl
FPR	Formyl-Peptid-Rezeptor
GMP	Gute Herstellungspraxis
Gdn-HCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGFR	Hepatozyten Wachstumsfaktor-Rezeptor
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
hTf	humanes Transferrin
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ivDde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl
$K_D$	Dissoziationskonstante
kD	Kilodalton
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M	relative Molekülmasse
$M_{calc}$	berechnete Molekülmasse, monoisotopisch verteilt
$M_{obs}$	beobachtete / gemessene Molekülmasse
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBHA	Methylbenzhydrylamin
MCP-1	Monozytäres Chemotaktisches Protein-1
Min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MTD	maximal tolerierte Dosis
Mtt	Methyltrityl

## Abkürzungsverzeichnis

---

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEAS	Nicht-essentielle Aminosäure(n)
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OD	Optische Dichte
Ox-AOAc	N-terminal mit Aminoxyacetat modifiziertes Peptid zur Oximligation
Ox-Pyr	N-terminal mit Pyruvat modifiziertes Peptid zur Oximligation
PAM	Phenylacetamidomethyl
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEG <sub>3</sub> , PEG <sub>27</sub>	Fmoc-NH-(PEG) <sub>3</sub> -OH, Fmoc-NH-(PEG) <sub>27</sub> -OH
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
P/S	Penicillin/Streptomycin
R <sub>h</sub>	hydrodynamischer Radius
Rink	4-(2',4'-Dimethoxyphenylhydroxymethyl-phenoxy)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
SAB	synthetischer Antikörper
scFv	Einkettige variable Antikörper (-Fragmente)
sdAB	Einzeldomänen-Antikörper
Sek	Sekunde(n)
SLS	Statische Lichtstreuung
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
Std	Stunde(n)
SYN-B1	EGFR-Binderpeptid mit der Sequenz YHWYGYTPQNVI
tBu	tert-Butyl
t <sub>R</sub>	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl

## Abkürzungsverzeichnis

---

VEGF(R)	Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (-Rezeptor)
Wang	p-Alkoxybenzyl-alkohol
Xan	Xanthenyl
2-Br-Z	2-Bromo-Benzyloxycarbonyl
3-Bom	3-Benzyloxymethyl
$\epsilon$	Molarer Absorptionskoeffizient
$\rho$	Dichte
$\lambda_{\text{abs}}$	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{\text{em}}$	Emissionswellenlänge
$\lambda_{\text{ex}}$	Anregungswellenlänge
$\emptyset$	Durchmesser

### Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierten Aminosäuren

Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutamat	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

# 1. Einleitung

## 1.1 Übersicht

Als zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt<sup>1</sup>) und weltweit auftretende Herausforderung stellen Tumorerkrankungen seit Jahren einen besonderen Forschungsschwerpunkt dar. Während etwa Herz-Kreislaufkrankungen im Zuge regelmäßiger Untersuchungen zuverlässig erkannt und behandelt werden können, ist bei Tumoren nicht nur die frühe Diagnose anspruchsvoll. Dieselbe Tumorart kann von Mensch zu Mensch unterschiedliche Ausprägungen haben, beispielsweise aufgrund individueller Mutationen an proliferationsfördernden Rezeptorproteinen wie EGFR (Yamazaki et al., 1988), und lässt daher keine Routinebehandlung zu.

Die Komplexität einer Krebserkrankung verlangt einen kombinatorischen Heilungsansatz. Während zunächst eine weitgehende Reduktion des Tumors angestrebt wird, etwa mittels einer Resektion oder, insbesondere bei schwer zugänglichen bzw. komplex operablen Geweben wie Gehirntumoren, einer radiotherapeutischen Behandlung. Die im Erfolgsfall signifikante Größenminderung des Tumors bedeutet nicht notwendigerweise eine vollständige Entfernung, weshalb ein potentiell Rezidiv zu verhindern ist. Zu diesem Zweck wird mit chemotherapeutischen Behandlungen fortgefahren, welche ein breites Spektrum an Wirksubstanzen und -mechanismen beinhalten. Sie bedingen mehr oder weniger umfangreiche Kollateralschäden an gesundem Gewebe.

Zytostatika wie Alkylantien, Platinanaloga und Taxane werden routiniert eingesetzt und zielen auf Tumorzellen ab, indem sie deren erhöhte Stoffwechsel- und Proliferationsrate ausnutzen, welche im Zuge letaler DNA-Manipulation wie etwa Doppelstrangbrüchen oder Quervernetzungen zum Erliegen kommt (z. B. Cyclophosphamid; Brock, 1958). Antiangiogenetika lassen sich einsetzen, da ein Tumor oft überproportionalen Zugang zu Nährstoffen über Blutgefäße benötigt und die für gerichtete Angiogenese nötigen Botenstoffe wie etwa der Wachstumsfaktor VEGF so an ihrer Ausbreitung gehindert werden. Dabei stellt der monoklonale Antikörper Bevacizumab mit VEGF-bindender Funktion eine spezifische Zielerkennung dar (Willet et al., 2004).

---

<sup>1</sup> <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/C>

Aufgrund der schädigenden Wirkung etablierter Zytostatika gegenüber gesundem Gewebe ist die Forschung bemüht, spezifische Eigenschaften von Tumorzellen als Therapieansatz nutzbar zu machen. Die Inhibition des Empfangs und der Weiterleitung von Wachstumsstimuli wurde und wird als vielversprechend angesehen, etwa beim Signalnetzwerk um den Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR, einem Mitglied der Wachstumsfaktor-Rezeptor-Familie ErbB. Der Vorteil und gleichzeitig die Herausforderung bei derartig molekularen Therapiezielen bestehen darin, dass ein zelluläres Signalnetzwerk hochkomplex ist und somit möglicherweise tumorspezifisch einzigartig. Eine Kombination an gerichteter Wachstumsinhibition kann demnach Schäden an gesundem Umgebungsgewebe verringern. Ferner werden Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie EGFR in vielen soliden Tumoren überexprimiert sowie in erhöhter Anzahl auf der Zelloberfläche präsentiert (Salomon et al., 1995) und bieten daher ein spezifisches Angriffsziel.

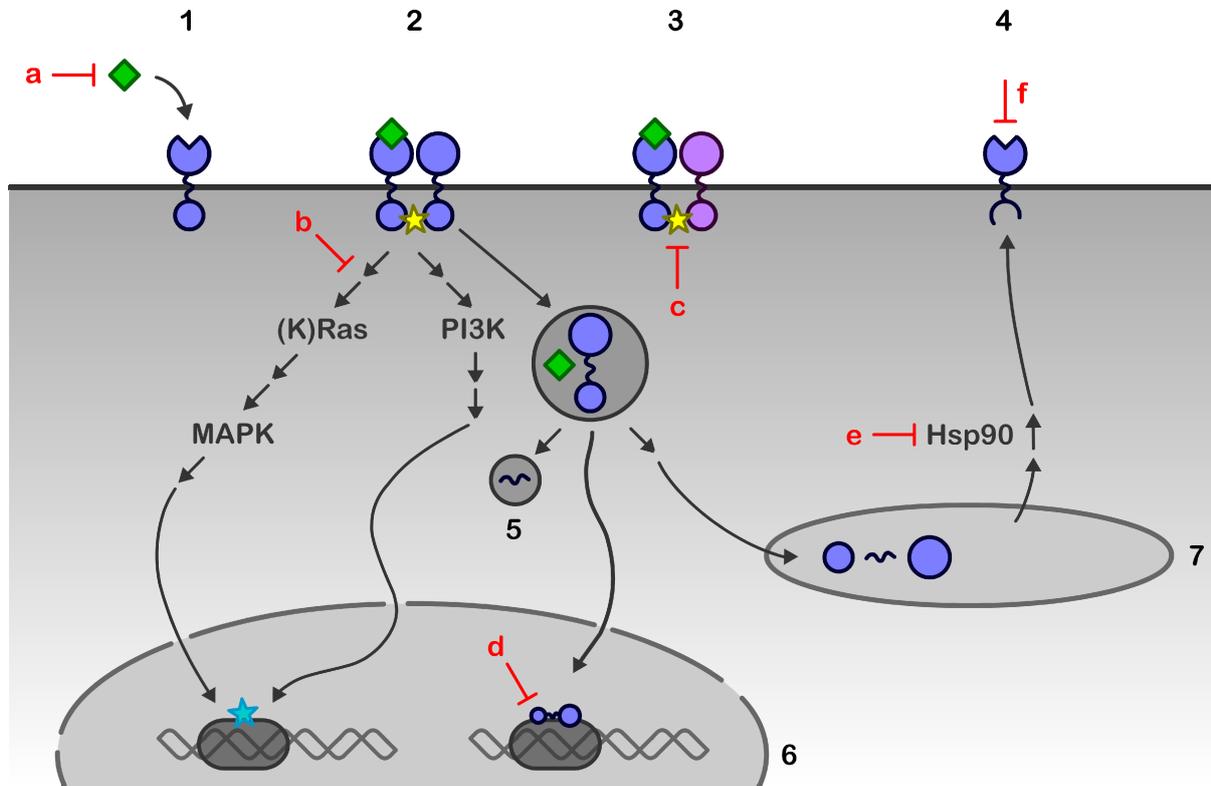
### **1.2 EGFR als molekulares Ziel von Tumorthapien**

Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor ist seit etwa 1970 Ziel möglicher Tumorthapien. Der membranständige EGFR ist bei einer Gesamtgröße von 170 kDa (Cohen et al., 1982) mit extrazellulär anteilig 40 kDa stark glykosyliert (Soderquist et al., 1984). Über einen seiner Liganden, den Epidermalen Wachstumsfaktor EGF, wurde der Rezeptor erstmals indirekt identifiziert (Cohen, 1965), später direkt nachgewiesen (O'Keefe et al., 1974) und schließlich vollständig sequenziert (Ullrich et al., 1984). Als G-Protein-gekoppelter Rezeptor zeichnet er sich strukturell u. a. durch eine transmembrane  $\alpha$ -Helix, zwei cysteinreiche extrazelluläre Abschnitte sowie intrinsische Kinasefunktionalität aus (Michal, 1999), welche nach Aktivierung durch einen externen Stimulus zum Tragen kommt und mitogen wirkt (Ushiro et al., 1980).

Der Anteil des EGFR am proliferativen Signalnetzwerk der Zelle ist sehr komplex (Abb. 1). Das Protein ist Bindestelle für extrazelluläre, mitogene Signale wie EGF oder TGF- $\alpha$  (Roberts et al., 1980), welche es nach Dimerisierung zytosolisch weiterleitet. Es kann auch Heterodimerisierung innerhalb der ErbB-Familie, welcher EGFR angehört, stattfinden (Yarden et al., 2001). Die Folge ist Zellproliferation, indiziert durch erhöhten Import von Metaboliten wie Zucker oder Ionen (Barnes et al., 1976; Smith et al., 1978), Erhöhung der glykolytischen Aktivität (Diamond et al., 1978) sowie DNA, RNA- und Proteinsynthese (Hollenberg et al., 1973; Hooper et al., 1967). Nach Aktivierung wird das Rezeptordimer mitsamt Ligand endozytotisch internalisiert und aufbereitet in die Zellmembran rekonstituiert

## 1. Einleitung

oder lysosomal degradiert (Scaltriti et al., 2006). Alternativ kann es nach der Internalisierung im Zellinneren freigesetzt werden und als monomere Einheit im Zellkern mitogen aktiv sein (Lin et al., 2001). Ein gebundener Wachstumsfaktor wie EGF kann ebenfalls nach Co-Internalisierung intrazellulär proliferationsfördernd wirken (Maxfield et al., 1978).



**Abb. 1:** Ausschnitt aus dem EGFR-Signalnetzwerk und mögliche Inhibitionsansätze. Nach Bindung eines Liganden wie EGF (grün, 1) homo- (2) oder heterodimerisiert EGFR (3) mit ErbB-Rezeptoren. Die Kinasefunktion (gelb) initiiert die zytosolische Signalkaskade über (K)Ras, PI3K und andere Proteine, was über DNA-Synthese (6) letztendlich zur Zellproliferation führt. Dimerisierter EGFR wird mit Ligand internalisiert und lysosomal degradiert (5) oder via ER und Golgi aufbereitet (7) und in die Membran rekonstituiert (4). Alternativ fungieren er oder der Ligand als Transkriptionsfaktor (6). Das Signalnetzwerk wird beispielsweise über Ligandenkomplexierung (a), Signalkaskaden- (b), Kinase- (c), Transkriptions- sowie Translations- (d), Transport- bzw. Maturierungsinhibition (e) und Blockierung der Liganden-Bindestelle am EGFR (f) manipuliert. Modifiziert nach Yarden et al., 2001 und Scaltriti et al., 2006.

Signalfunktionen des EGFR können von anderen Rezeptorproteinen übernommen werden, mehrere Wachstumsfaktoren die Zellproliferation beeinflussen (Yokio et al., 2005) oder Rezeptoren infolge einer Mutation konstitutiv aktiv sein (Nishikawa et al., 1994). Ferner unterliegen Proteine als komplexe molekulare Ziele in Tumoren allgemein einer hohen Mutationsrate. Dies macht die Entwicklung gerichteter Therapeutika sehr anspruchsvoll. Es

bestehen etwa aufgrund von kombinatorischen oder alternativen Signalwegen verschiedene Angriffsziele, welche im Optimalfall gleichzeitig und spezifisch erreicht werden müssen. So erzielte man mit kleinen organischen Molekülen wie Erlotinib die Inhibition der zytosolischen Kinaseaktivität des EGF-Rezeptors (Pollack et al., 1999) oder verringerte die Bindung von Wachstumsfaktoren über Konkurrenz mit einem monoklonalen Antikörper wie Cetuximab (Goldstein et al., 1995). Eine Blockierung mehrerer Signalschaltstellen war jedoch effektiver und nachhaltiger, beispielsweise die gleichzeitige Inhibition der Kinasefunktion zweier ErbB-Rezeptoren (Schütze et al., 2007). Die eingesetzten Wirkstoffe banden dabei irreversibel an die Kinasedomäne der jeweiligen Rezeptoren.

Die funktionelle Inhibition weiterer Komponenten der Signalkaskade ist wichtig, um zu verhindern, dass ein blockiertes oder vermindertes EGFR-Signal etwa durch alternative Signalwege der ErbB-Familie kompensiert wird. Ein Ziel kann der potentielle Heterodimerisierungs-Partner ErbB-2 sein, welcher durch Herceptin inhibiert wird (Baselga et al., 1998) und sonst einen stark proliferationsfördernden Signalkomplex mit aktiviertem EGFR bilden kann (Lenferink et al., 1998). Das Transportssystem für unreife ErbB-Proteine vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat bis zur Zellmembran hin kann durch Rezeptor-affine Antikörper-Fragmente (scFv) beeinträchtigt werden, indem diese ErbB via C-terminaler Blockade am Verlassen des ER hindern (Beerli et al., 1994). Chaperone wie Hsp90, welche unvollständig gefalteten EGFR zur Zellmembran eskortieren und stabilisieren, können etwa durch Geldanamycin in ihrer Aktivität inhibiert werden (Whitesell et al., 1994).

### **1.3 Monoklonale Antikörper gegen EGFR**

Gegen definierte molekulare Ziele wie Signalrezeptoren sind monoklonale Antikörper hochspezifisch und, seit diese den humanen Antikörpern zur besseren Immuntoleranz angepasst werden können („humanisierter Antikörper“; Queen et al., 1989), in den Fokus pharmazeutischer Anwendung gerückt. So wurde im Zuge der EHEC-Epidemie in Deutschland 2011 bei einer der Folgeerkrankungen, dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom HUS, eine erfolgreiche Therapie mit Eculizumab erreicht (Lapeyraque et al., 2011). Dabei blockiert der monoklonale Antikörper das Wirken des Komplementsystems, indem er eines der Effektorproteine (C5) komplexiert und so eine potentiell in HUS resultierende, fatale Immunreaktion verhindert (Hillmen et al., 2006).

Eine Blockade der EGFR-Bindestelle für Wachstumsfaktoren mit Cetuximab, einem verbreitet angewendeten monoklonalen Antikörper gegen EGFR, wurde in klinischen Studien

sowohl erfolgreich (Robert et al., 2001) als auch mit geringer Wirkung im Vergleich zu etablierter Chemotherapie getestet (Thienelt et al., 2005; Martinelli et al., 2009). Dabei war die Art der Kombinationstherapie, hier die positiv indizierte begleitende Bestrahlung bzw. die weniger förderliche Gabe von Zytostatika wie Paclitaxel, erfolgsentscheidend. Aufgrund der Tatsache, dass Tumorzellen genetisch instabil sind, wurden bei den Studien Behandlungsresistenzen festgestellt, welche auf Mutationen an der EGFR-Signalkaskade beteiligter Proteine wie K-ras, PI3K oder auch EGFR selbst beruhen (Saridaki et al., 2010). Intrazellulär proliferationsaktiver EGFR, etwa als Transkriptionsfaktor („nuklearer EGFR“), lieferte einen weiteren Grund für Behandlungsresistenz (Li et al., 2009).

Die Humanisierung aus tierischen Organismen gewonnener Antikörper war ein Meilenstein hinsichtlich deren therapeutischer Einsatzmöglichkeiten. Dabei werden die Genregionen der Antigen-bindenden Determinanten in einem humanen Immunglobulin-Expressionsvektor gegen das tierische Äquivalent ausgetauscht, welches zuvor für ein molekulares Ziel als hochaffin identifiziert wurde (Winter et al., 1991). Die Immunogenität des resultierenden Antikörpers ist stark, jedoch nicht unbedingt ausreichend vermindert. Weiterhin vorhandene, tierische Strukturelemente und allgemein unvermeidbare Immunreaktionen gegenüber körperfremden Proteinen einer gewissen Größe können die Verwendbarkeit zumindest einschränken (Schellekens, 2002). Eine Immunantwort im Sinne Antikörper-vermittelter Zelltoxizität ist wiederum als notwendig für einen Therapieerfolg festgestellt worden (Ianello et al., 2005). Ohne die Konjugation mit weiteren funktionellen Domänen ist es nur auf diese Weise möglich, beispielsweise nach Erkennung malignen Gewebes durch den Antikörper die Zerstörung des Tumors zu initiieren.

Faktoren wie Degradation oder geringe Gewebepenetranz können die (Bio-) Verfügbarkeit am Therapieziel und Applikationsmöglichkeiten von Antikörpern *in situ* beeinträchtigen (Beckman et al., 2007). Finanziell stellt der Weg vom ersten Vorläufer bis hin zur Produktion des finalen Antikörpers im Industriemaßstab einen immensen Kostenfaktor dar, welcher auf die eigentliche Therapie mit etwa 5.000 Euro pro Behandlungszyklus umgelegt wird (Process<sup>2</sup>). Eine „übliche“ Darmkrebstherapie verursacht hinsichtlich des Antikörpers mit zwölf Behandlungszyklen folglich über 60.000 Euro Kosten.

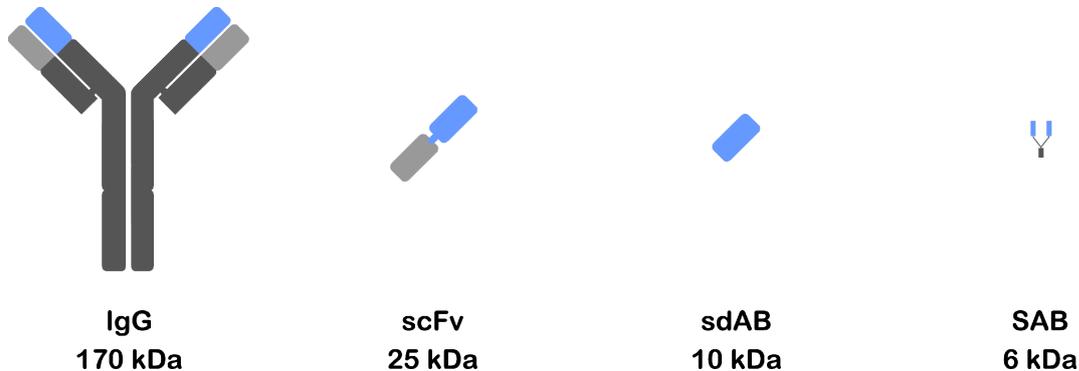
---

<sup>2</sup> <http://www.process.vogel.de/index.cfm?pid=2995&title=Cetuximab>

## **1.4 Alternative Antikörper-basierte Strategien**

Basierend auf den Erfolgen monoklonaler Antikörpertherapien werden etwa mit CovX-Antikörpern, Antikörperfragmenten, Toxin-konjugierten Diabodies sowie Hai- und Kamel-Antikörper-Abkömmlingen neue, flexible Alternativen verfolgt. Sie können Vorteile bieten wie einfachere, günstigere Generierung und Produktion, geringe Immunogenität, erhöhte Stabilität und somit nachhaltige Wirksamkeit im Organismus des Empfängers.

Die Molekülgröße der Wirksubstanzen ist dabei sehr unterschiedlich. Während CovX-Antikörper auf einem IgG-Grundgerüst aufbauen und ein diesem ähnliches Molekulargewicht aufweisen (ab 170 kDa), zeigen einzelkettige Antikörperfragmente (scFv) mit etwa 25 kDa eine deutliche Größenreduktion. Über den vom Hai oder Kamel abgeleiteten Einzeldomänen-Antikörper (sdAB, ab 10 kDa) bis hin zum synthetischen Antikörper dieser Arbeit (SAB, ca. 6 kDa; s. Kap. 1.5) wird schließlich ein 25-fach geringeres Molekulargewicht im Vergleich zu IgG erreicht (Abb. 2). Die Vor- und Nachteile hohen Molekulargewichts und komplexer Struktur bzw. geringer Größe und relativ einfachen Aufbaus sollen nachfolgend erläutert werden.



**Abb. 2:** Schematischer Größenvergleich zwischen einem IgG-Antikörper (ca. 170 kDa) und davon abgeleiteten Molekülen, dem CovX-Antikörper (vgl. IgG), dem einzelkettigen Antikörperfragment (scFv, ca. 25 kDa), dem aus Organismen wie z. B. Hai oder Kamel abgeleiteten Einzeldomänen-Antikörper sdAB (etwa 10 kDa) und dem synthetischen Antikörper SAB (ca. 6 kDa).

CovX-Antikörper bestehen aus einem IgG-basierten Antikörper, dessen zwei Antigen-bindende Regionen mit zwei untereinander identischen (monovalenter CovX-AK) oder verschiedenen (bivalenter CovX-AK) synthetischen Peptiden konjugiert sind (CovX<sup>3</sup>). Ein

---

<sup>3</sup> <http://www.covx.com>

Peptid kann hochaffin an ein molekulares Ziel binden und hat insbesondere als bivalenter CovX-Antikörper das Potential, mehrere molekulare Ziele effektiv anzusteuern, besitzt allein jedoch eine Peptid-typische, relativ geringe Halbwertszeit im Empfängerorganismus. Via Konjugation eines Peptids mit einem relativ langlebigen Antikörper wird die Bioverfügbarkeit erhöht, während der synthetische Zugang zu Binderpeptiden die zügige Generierung zahlreicher Wirkstoffkandidaten ermöglicht. Dabei sind Binderpeptide relativ kurze Peptide, welche im Optimalfall ein molekulares Ziel wie einen Wachstumsfaktor-Rezeptor hochspezifisch erkennen. Die einfache Konjugation eines solchen Binders mit stets identischem IgG-Grundgerüst führt zügig zu fertigen CovX-Antikörpern. So befindet sich etwa ein gleichzeitig VEGF- und Ang2-bindender, bivalenter CovX-Antikörper als Wachstumsinhibitor von Tumoren nach ersten Erfolgen in klinischen Phase I Studien (Doppalapudi et al., 2010).

Antikörper werden, nicht zuletzt aufgrund starker Homologie zu menschlichen Immunglobulinen, routinemäßig aus Organismen wie Maus oder Kaninchen gewonnen und anschließend etwa im Zuge einer Humanisierung zu Wirkstoffkandidaten entwickelt. Organismen wie Hai, Lama oder Kamel sind als Antikörper-Donoren relativ gering erforscht und bieten eine interessante Basis für die Entwicklung alternativer Therapeutika. Bei vergleichbarem Wirkpotential ist strukturell bedingt die Herstellung und Modifikation der abgeleiteten Einzeldomänen-Antikörper einfacher durchzuführen sowie ferner deren Stabilität deutlich erhöht. Gleichzeitig sind die grundlegenden Prinzipien der Antikörper-Generierung mit beispielsweise Diversifikation via Hypermutation dem humanen Mechanismus vergleichbar und lassen ein analoges Wirkprinzip erwarten (Zhu et al., 2011). Hai- oder auch Kamel- und Lama-Antikörper weisen eine Struktur geringerer Komplexität auf. Bestehend aus ausschließlich schweren Ketten (Flajnik et al., 2011), sind sie sehr stabil gegenüber extremen pH-Werten, könnten beispielsweise das saure Magenmilieu tolerieren und folglich einfache orale Wirkstoffapplikation ermöglichen. Gleichzeitig zeigen sie aufgrund ihrer relativ zu IgG reduzierten Größe bessere pharmakokinetische Eigenschaften (News Medical<sup>4</sup>). Diese „neuartigen“ Antikörper stehen zwar am Anfang ihrer Erforschung für potentielle pharmazeutische Anwendungen (Barelle et al., 2009), jedoch sind Forschungsergebnisse wie hochaffine Lama-sdABs gegen *Staphylococcus aureus* Erkrankungen (Enterotoxin B; Graef et al., 2011) ebenso vielversprechend wie die Neutralisierung toxischer Effekte von

---

<sup>4</sup> <http://www.news-medical.net/news/2008/10/14/42002.aspx>

Schlangenbissen mit Kamel-Antikörpern bei deutlich geringerer Dosis im Vergleich zu kommerziellen Antidotem (Cook et al., 2010).

Antikörperfragmente wie Fab-Antikörper oder einzelkettige Antikörper aus den variablen Fab-Bereichen (scFv) stellen einen weiteren Ansatz dar. Sie besitzen keine immunstimulatorische Fc-Domäne, die Halbwertszeit im Organismus ist Größenbedingtd reduziert und erfordert ggf. mehrere Behandlungen. Dennoch macht etwa der fehlende immunogene Charakter diese Antikörper als diagnostische Werkzeuge attraktiv, beispielsweise in Konjugation mit einem Radioisotop (Arcitumomab; Hansen et al., 1990). Aufgrund der relativ geringen Größe diffundieren die Moleküle schnell, was zur Erhöhung der unmittelbaren Verfügbarkeit und dem Einsatz als schnell wirksames Antidot führen kann. So neutralisiert beispielsweise der Fab-Antikörper CroFab® effektiv Schlangentoxin über Komplexierung mit diesem und beschleunigt dadurch die Ausscheidung des Gifts (Seger et al., 2005).

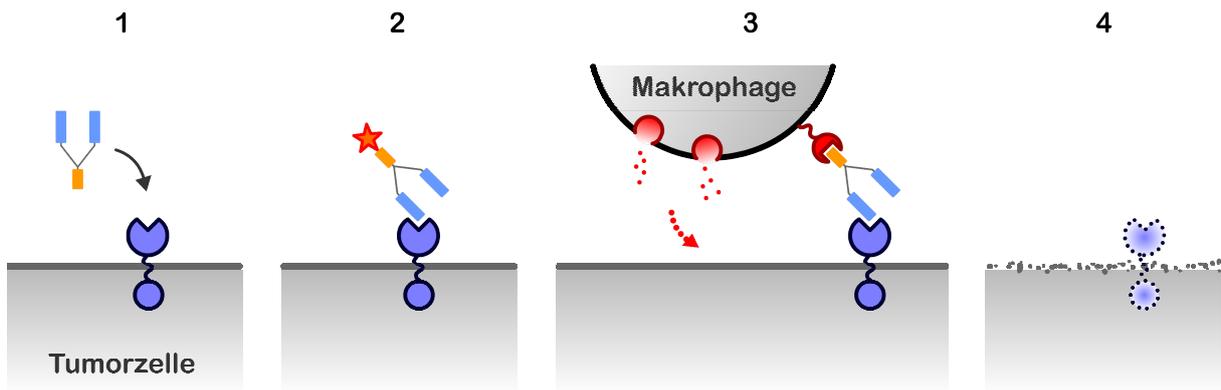
Diabodies sind den scFv-Antikörpern ähnlich und bieten vor allem therapeutisches Potential, indem sie schnell und kostengünstig aus herkömmlichen Expressionsorganismen wie *E. coli* erhalten und beispielsweise mit gekoppelten Zytostatika wie Auristatin als Wirkstoff gegen CD30-exprimierende Tumore eingesetzt werden können (Kim et al., 2008). Unter der Voraussetzung, dass ein tumorspezifisches Antigen wie CD30 gezielt angesprochen wird, kann der Einsatz von Zytostatika im Zuge verminderter Schädigung umliegenden, gesunden Gewebes sicherer werden.

Die erläuterten wirksamkeitsfördernden Eigenschaften von Antikörpern und ihren Derivaten - beispielsweise hohe Spezifität, Stabilität, Bioverfügbarkeit und schnelle Herstellung - sollen im Konzept des synthetischen Antikörpers vereint werden.

### **1.5 Der synthetische Antikörper**

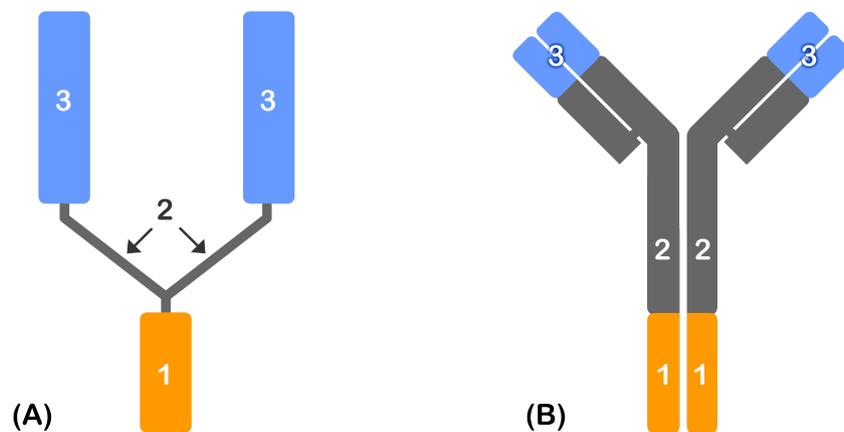
In dieser Arbeit wird der neuartige Ansatz verfolgt, mittels eines relativ kleinen Moleküls auf Peptidbasis selektiv solide Tumorzellen zu markieren und somit diese zuvor immunevasiven Zellen für das körpereigene Immunsystem wieder angreifbar zu machen. Nach Erkennung einer kurzen peptidischen Signalsequenz erfolgt die Phagozytose der Tumorzellen (Abb. 3).

Das Konzept des synthetischen Antikörpers (SAB) zeigt dabei die grundlegenden funktionellen Eigenschaften der Fc- und Fab-Domänen monoklonaler Antikörper mit Antigen-Bindung und Antikörper-Erkennung durch das Immunsystem bei gleichzeitig deutlich reduzierter Molekülgröße gegenüber IgG (mehr als 25-fach).



**Abb. 3:** Schema der Wirkweise des synthetischen Antikörpers. SAB bindet an EGFR einer Tumorzelle (1). Die freie fMLF-Sequenz des SAB wirkt als chemotaktisches Signal auf Zellen des Immunsystems (2) und rekrutiert z. B. Makrophagen. Diese binden über den FP-Rezeptor die Signalsequenz, werden so aktiviert und setzen zytotoxische Stoffe frei (3), welche die Tumorzelle zerstören (4).

Die Effektorfunktion der Fc-Domäne wird von der bakteriellen Peptidsequenz fMLF übernommen, welche aufgrund ihres Ursprungs immunogen ist (Boxer et al., 1979). Der Antigen-bindenden Fab-Domäne entspricht ein EGFR-affines Peptid mit der Sequenz YHWYGYTPQNVI („SYN-B1“; Li et al., 2005). Ein polymerer PEG-Linker soll der IgG-Konformation ähnliche Flexibilität bieten (Abb. 4).



**Abb. 4:** Schema des synthetischen Antikörpers SAB (A) und Vergleich mit einem monoklonalen Antikörper (B). Die Effektorfunktion der Fc-Domäne des monoklonalen Antikörpers (1) stellt das Peptid mit der Sequenz fMLF dar, der Antigen-bindenden Fab-Domäne des monoklonalen Antikörpers (3) entspricht ein EGFR-affines Peptid mit der Sequenz YHWYGYTPQNVI („SYN-B1“). Ein PEG-Linker (2) verbindet die funktionellen Peptide und soll u. a. eine der Proteinkonformation des monoklonalen Antikörpers ähnliche Flexibilität bieten.

Die Molekülgröße, analog zu kleineren Peptiden allgemein, bedingt geringe Immunogenität und hohe Gewebepenetranz relativ zu IgG-Antikörpern. Eine lokale Applikation, etwa per Injektion, ist somit denkbar und erhöht potentiell die nachhaltige Wirksamkeit der Substanz, indem eine Zirkulation des Therapeutikums außerhalb des Zielorgans und damit beschleunigte Degradation sowie Ausscheidung durch die Nieren verringert wird. Ferner lässt sich die Toxizität relativ kurzer Peptide beispielsweise in geeigneten (Tumor-)Zellmodellen gut testen und kontrollieren. Ein vollständig synthetischer Zugang zum Wirkstoffkandidaten liefert das Potential, zeitnah molekulare Modifikationen vorzunehmen, etwa um die biologische Stabilität zu verbessern oder an Mutationen des Zielproteins zu adaptieren. Folglich können Entwicklungs-, Produktions- und konsequenterweise Therapiekosten eingespart werden. Ein Übertrag des Grundkonzepts auf andere molekulare (Krankheits-) Ziele ist überdies gegeben.

Makrophagen sind als Zellen des Immunsystems in der Lage, andere Zellen zu zerstören, indem sie nach Stimulation zytotoxische Stoffe sekretieren (Adams et al., 1983). Dies kann beispielsweise durch bakterielle Peptidsequenzen ausgelöst werden. Nachdem Schiffmann et al. 1975 zeigten, dass die Peptidsequenzen fML und fMF die gerichtete Migration von Zellen des Immunsystems wie Neutrophilen und Monozyten beeinflussen können, wurde darauf ein chemotaktischer Effekt der Peptidsequenz fMLF gegenüber Leukozyten allgemein unter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) festgestellt (Boxer et al., 1979; Sodhi et al., 2002). Snyderman et al. zeigten 1976 die Ausschüttung zytotoxischer Stoffe wie ROS und Lysozym bei fMLF-exponierten Makrophagen, identifizierten 1980 einen entsprechenden fMLF-Rezeptor (FPR) und fanden eine korrespondierende Affinität des fMLF-Peptids von etwa 20 nM (1984). Obrist et al. (1983) verfolgten den Ansatz, monoklonale Antikörper zusätzlich mit der fMLF-Sequenz auszustatten und so durch Bindung an Tumorzellen und gleichzeitige Exposition des pro-chemotaktischen Peptids Makrophagen zum Tumor zu dirigieren. Das Konjugat war bei einer Konzentration von 300 - 900 µg/ml (1 - 2 µM) maximal effektiv und erzielte eine Verdopplung der Makrophagenkonzentration im behandelten Gewebe sowie Abnahme des Tumorgewichts (Obrist und Sandberg, 1983). Eine ausreichende Anzahl Makrophagen im Verhältnis zur Tumorgröße ist dabei Voraussetzung (Adams et al., 1979). In einer erfolgreichen klinischen Phase I Studie (Obrist et al, 1991) konnte gezeigt werden, dass die fMLF-Sequenz im menschlichen Organismus gut toleriert wird. Diese Ergebnisse waren in der vorliegenden Arbeit dafür ausschlaggebend, die Effektorfunktion des SAB mit fMLF als immunogener Signalsequenz zu belegen.

Die Literatur beschreibt diverse Peptide, welche spezifisch an Rezeptorproteine binden, die bei soliden Tumorarten vermehrt exprimiert werden. So wurde mithilfe der Phage-Display-Methodik ein HGFR, ErbB-2-, VEGFR-, und VEGFR-3-affines Peptid identifiziert (Zhao et al., 2007; Karasseva et al., 2002; El-Mousawi et al., 2003; Qin et al., 2007). Auf gleiche Weise erkannten Li et al. 2005 das Peptid mit der Sequenz YHWYGYTPQNVI („12mer“) als EGFR-Binder mit einer Affinität von 22 nM. Diese Sequenz wurde aufgrund der niedrigen und zudem fMLF-ähnlichen Dissoziationskonstanten (vgl. 20 nM) als EGFR-bindende Domäne ausgesucht, um vergleichbare Effizienz hinsichtlich Tumormarkierung und immunsystematischer Erkennung zu gewährleisten. In Analogie zum monoklonalen Antikörper soll ein zweifaches Vorhandensein der Sequenz pro SAB eine hohe Avidität liefern. Ein derartiger Effekt wurde für Integrin-bindende Konstrukte gezeigt (Ye et al., 2005). Durch Austausch des Binderpeptids gegen für andere molekulare Ziele hochaffine Peptide ist u. U. ein Übertrag des SAB-Konzepts auf andere Erkrankungen möglich.

Um die funktionellen Einheiten zu einem Molekül zu verknüpfen, wurde ein PEG-Polymer gewählt (PEG<sub>27</sub>). Polyethylenglykol ist aufgrund seines inerten Charakters z. B. als Löslichkeitsvermittelndes Adjuvans oder auch als Konjugat mit dem Wirkstoff zur verlängerten Bioverfügbarkeit in pharmazeutischen Erzeugnissen etabliert (Leuner et al., 2000). Vertreter der zahlreichen Wirkstoff-PEG-Konjugate sind das Antidiabetikum Glibenclamid (Betageri et al., 1995), Erythropoese-förderndes Mircera® (Macdougall, 2005), zur Behandlung von Makula-Degeneration eingesetztes Macugen® (Evangelos et al., 2004) und das Hepatitis-Therapeutikum PegIntron® (Monkarsh et al., 1997). Das Potential von PEG, die Immunogenität eines Wirkstoffs zu senken, wurde anhand des Enzyms Catalase gezeigt, welches nach PEG-Modifikation keinen immunogenen Charakter in Mäusen aufwies. Ferner zeichnete sich das Konjugat durch erhöhte Proteasestabilität aus (Abuchowski et al., 1977). Schließlich wird die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs potentiell verbessert, da PEG Wassermoleküle effektiv zu einer voluminösen Hydrathülle koordinieren kann, so dass seine apparente Molekülgröße der eines drei- bis fünffach so schweren Proteins entspricht und eine Ausscheidung des Wirkstoffs über den Nierenweg verlangsamt wird (Veronese et al., 2005). In linearer Konformation beträgt die Länge des in dieser Arbeit eingesetzten PEG<sub>27</sub>-Polymers ca. 8 nm. Es soll so den EGFR-Bindern im SAB-Molekül Beweglichkeit ähnlich den flexiblen Fab-Regionen monoklonaler Antikörper verleihen.

### **1.6 Ziele der Arbeit**

In dieser Arbeit soll ein synthetischer Antikörper auf Peptidbasis gegen EGFR-überexprimierende, solide Tumorspezies synthetisiert und charakterisiert werden.

Zunächst ist eine robuste chemische Synthesestrategie zu entwickeln, welche auch für die Herstellung von SAB mit anderen peptidischen Bindedomänen anwendbar ist. Eine geeignete, reproduzierbare Aufreinigungsmethodik zum Erhalt hochreinen Materials soll etabliert werden, um eine umfassende Charakterisierung des Moleküls bis hin zu Wirksamkeitsnachweisen *in vivo* zu ermöglichen. Zum Zweck eines raschen Austauschs der Binderfunktion und somit einer Ausrichtung auf andere molekulare Wirkziele soll außerdem versucht werden, über niedermolekulare Modifikationen der funktionellen SAB-Domänen chemoselektive Ligationsstrategien zu erschließen.

Die eingehende Charakterisierung des synthetischen Antikörpers stellt einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit dar. Dabei soll gezeigt werden, dass die Löslichkeit des SAB geeignet ist, höchste Wirksamkeit zu ermöglichen, indem der synthetische Antikörper monomolekular und somit maximal reaktiv bzw. affin vorliegt. Die Lagerfähigkeit des SAB ist ebenso zu überprüfen wie die Stabilität unter physiologischen Bedingungen wie etwa im Blutserum.

Anhand von Chemotaxis-Experimenten ist nachzuweisen, dass die fMLF-Domäne des synthetischen Antikörpers eine dem nativen fMLF-Peptid vergleichbare Effektivität bei Immunzellen zeigt. Neben der Bestätigung, dass ein Chemogradient von SAB ähnlich wirksam dem von fMLF ist, soll im nächsten Schritt die immunogene bzw. zytotoxische Funktionalität auch nach vorheriger Bindung an solide Tumorzellen nachvollzogen werden.

Es ist wichtig zu prüfen, inwiefern der synthetische Antikörper mitogene Eigenschaften besitzt und wie lange er auf der Zelloberfläche für immunsystematische Erkennung verfügbar bleibt.

Die Bestimmung der Affinität des bis dahin entwickelten SAB-Moleküls soll, auch hinsichtlich des potentiellen Anteils Peptid-typischer, unspezifischer Bindung, erfolgen.

Im tierischen Organismus sind Untersuchungen dahingehend beabsichtigt, welche Konzentrationen an synthetischem Antikörper toleriert werden und ob toxische Effekte zu verzeichnen sind. Schließlich soll die Wirksamkeit des SAB anhand eines Tiermodells mit solidem Tumortransplantat getestet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden in p. a. Qualität verwendet und, sofern nicht anders angegeben, über nachfolgende Firmen bezogen: Bachem (Weil am Rhein, Deutschland), Biochrom (Berlin, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Biosolve (Valkenswaard, Niederlande), J. T. Baker (Groß-Gerau, Deutschland), Iris Biotech (Marktredwitz, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Neolab (Heidelberg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) und VWR (Darmstadt, Deutschland).

Fmoc-NH-(PEG)<sub>27</sub>-OH stammte von Polypure (Oslo, Norwegen). Berry & Associates (Dexter, USA) lieferten Fluorescein-Derivate.

Polymorphprep<sup>TM</sup> wurde von Axis Shield (Oslo, Norwegen), Ficoll-Paque Plus von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) erhalten. Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung humaner Zellkultur-Aliquots stammten von Nunc (Schwerte, Deutschland). Ein Mycoplasmen-Testkit wurde bei Lonza (Köln, Deutschland) erworben.

Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen wurden von Jackson ImmunoResearch (Sekundäntikörper gegen Kaninchen / Maus; Amsterdam, Niederlande), Cell Signaling Technology (Primäntikörper gegen p-ERK, aus Kaninchen; Beverly, USA) und Merck (Primäntikörper gegen EGFR, aus Maus; Darmstadt, Deutschland) erstanden.

Haltbare Zellpräparationen auf Mikroskopiegläsern wurden mittels Polysciences Aqua Poly/Mount erzielt (Eppelheim, Deutschland).

### 2.2 Instrumentation

Die Peptidabspaltung vom Harz nach Boc-Synthese wurde in einer HF-beständigen Apparatur aus Teflon von Peptide Institute durchgeführt (Minoh, Japan).

Zum Einengen von Probenvolumina und Entfernen von Lösungsmitteln wurde eine Thermo Fisher / Savant Speedvac Plus SC110A (Schwerte, Deutschland), ein Büchi Rotavapor R-114 (Essen, Deutschland) und das Gefriertrocknungssystem Christ Alpha 2-4 LD (Osterode am Harz, Deutschland) verwendet.

## 2. Material und Methoden

---

Für HPLC-Anwendungen kamen Beckman System Gold (Krefeld, Deutschland) und Varian Pro Star Anlagen (Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz, unter Benutzung von Grace Vydac (Worms, Deutschland) und MZ Analysentechnik RP-Säulen (Mainz, Deutschland) sowie Puffer A und B als mobiler Phase.

Die Aufnahme von MALDI-Massenspektren erfolgte mittels eines Bruker Daltonics Ultraflex TOF/TOF (Bremen, Deutschland), ESI- und LC-Massenspektren wurden unter Zuhilfenahme eines Thermo Fisher LCQ Fleet erhalten (Schwerte, Deutschland). Dabei wurden LC-MS mit einer C4-RP-Säule (Thermo Fisher) und Puffer A und B als mobiler Phase durchgeführt, deren TFA-Anteil durch Ameisensäure ersetzt war.

Absorptionsmessungen wurden an einem Thermo Fisher Electron Biomate3 (Schwerte, Deutschland) sowie Amersham Biosciences Ultrospec 2100 pro (Freiburg, Deutschland) und Fluoreszenzmessungen an einem Horiba FluoroMax 3 (Unterhaching, Deutschland) vorgenommen, jeweils unter Verwendung UV-durchlässiger Hellma Quartzküvetten (Müllheim, Deutschland).

SPR-Analysen erfolgten an einem GE Biacore X-100 (München, Deutschland) sowie die Auswertung mit der Software BiaEvaluation.

Die Messung dynamischer und statischer Lichtstreuung wurde an einem Wyatt DynaPro Nanostar vorgenommen (Dernbach, Deutschland).

Zellbiologische Arbeiten fanden unter einer Thermo Fisher HeraSafe Sterilbank statt (Schwerte, Deutschland). Zellkulturen wurden in einem Wyttec Jouan IG 150 Brutschrank gezogen (Arvore Vila do Conde, Portugal). Während der Zellhandhabung kamen sterile Einmalprodukte zum Einsatz (BD, Heidelberg, Deutschland). Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in einem Air Liquide Flüssigstickstoffbehälter (Düsseldorf, Deutschland).

Die Sterilisation von Puffern und Instrumentation wurde in einem Sanoclav LaM-3-20-MCS-J vorgenommen (Bad Überkingen-Hausen, Deutschland).

Durchlichtmikroskopie erfolgte via eines Zeiss Axiolab A1 Systems und Fluoreszenzmikroskopie mit einem Zeiss Axiovert 200 inkl. FluoArc-Einheit (Jena, Deutschland). Konfokalmikroskopische Aufnahmen wurden unter Zuhilfenahme eines Nikon Eclipse TI) mit Perfect Focus System und 60x Ölimmersionsobjektiv erzielt (Amstelveen, Niederlande).

Für Chemotaxisversuche wurden 24-Well-Transwellkammern mit Polycarbonatfiltern (5 µm Porengröße) verwendet (Corning / via Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland).

FACS-Messungen und Auswertung erfolgten mittels BD FACSCalibur Durchflusszytometer und zugehöriger Software CellQuest (Heidelberg, Deutschland).

### 2.3 Lösungen und Puffer

Puffer A:	H <sub>2</sub> O + 0,1 % TFA (v/v)
Puffer B:	ACN + 0,08 % TFA (v/v)
Puffer C:	6 M Gdn-HCl, 250 mM Tris, pH 8,2
Puffer D:	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 % Glycerin (w/w), 10 % Trehalose (w/w), 1 mM DTT, pH 7,6
Puffer E:	PBS (8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), pH 7,5
Puffer F:	20 mM Tris, pH 7,5
Puffer G:	1:1 ACN:H <sub>2</sub> O (v/v), 0,1 % TFA (v/v)
Puffer H:	1 % TIS (v/v), 1 % TFA (v/v) in DCM
Puffer I:	PBS, 0,5 % FCS (w/w)
Puffer J:	PBS, PI (40 µg/ml)
Puffer K:	PBS, 0,5 % BSA (w/w), 0,1 % Triton X-100 (w/w), pH 7,4
Puffer L:	1:1 PBS:H <sub>2</sub> O (v/v)
Puffer M:	0,5 % Trypanblau (w/w), 0,9 % NaCl (w/w) in H <sub>2</sub> O
Puffer N:	10 mM HEPES, 0,85% NaCl (w/w), pH 7,4
Puffer O:	1:1 Puffer N:H <sub>2</sub> O (v/v)
Puffer P:	10 mM HEPES, 0,83% NH <sub>4</sub> Cl (w/w), pH 7,4
Puffer Q:	50 mM NaOH, 1 M NaCl
Puffer R:	0,1 M Glycin, 0,1 M NaOH, 0,5 % Triton X-100 (v/v), pH 12,1
Puffer S:	1 M Ethanolamin-HCl, pH 8,5
Puffer T:	PBS, 10 % FCS (w/w)
Puffer U:	1:1 ACN:H <sub>2</sub> O, pH 4,5
Puffer V:	20 mM Ka-Na-Phosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), pH 7,0
Puffer W:	20 mM Ammoniumacetat (Ammoniumacetat / Essigsäure), pH 4,5
Puffer X:	6 M Gdn-HCl, pH 4,7

### 2.4 Chemische Methoden

#### 2.4.1 Festphasensynthese von Peptiden

Peptide wurden per Festphasensynthese hergestellt (nach Merrifield, 1963). Für die Boc-basierte Peptidsynthese wurde das *in situ* Neutralisations- und Aktivierungsprotokoll herangezogen (Schnölzer et al., 1992).

Folgende Boc-Aminosäuren wurden mit geschützter reaktiver Seitenkette verwendet: Asn(Xan), His(3-Bom), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Z). Zur Fmoc-basierten Peptidsynthese wurden Asn(Trt), Gln (Trt), His(Trt), Lys(Mtt), Thr(tBu) und Tyr(tBu) mit geschützter Seitenkette genutzt sowie bereits formyliertes Methionin eingesetzt. Nicht gelistete Aminosäuren kamen ohne Seitenkettenschutzgruppe zum Einsatz. Die Synthesen wurden in einem Glasgefäß mit Fritte der Porengröße 2 und Vakuumanchluss zu 0,1 - 0,2 mmol Maßstab durchgeführt. Die nachfolgenden Protokolle beschreiben exemplarisch jeweils eine 0,2 mmol Synthese.

#### Boc-Strategie

Das mit der C-terminalen Aminosäure vorbeladene PAM-Polymerharz wurde mindestens 30 Min. in DMF vorgequollen und nachfolgend zweimal 1 Min. mit 100 % TFA entschützt. Über 1 Min. intensives Waschen des Harzes mit DMF wurde TFA entfernt. Die Aktivierung von 2 mmol Aminosäure (10 eq) geschah mit 3,8 ml 0,5 M HBTU in DMF (9,52 eq) für 2 Min. und 1 ml DIEA (50 eq) für 1 Min. Mit dieser Lösung wurde das Harz 15 Min. inkubiert und währenddessen in Abständen von 5 Min. gerührt. Im Falle unvollständiger Kopplung wurden der Aktivierungs- und der Inkubationsschritt wiederholt. Arg und Thr wurden stets doppelt gekoppelt. Abschließend wurde das Harz 1 Min. intensiv mit DMF gewaschen.

Weitere Kopplungen wurden analog durchgeführt. Vor und nach Gln-Entschätzung erfolgte ein intensiver DCM-Waschschritt. Die Entschätzungs- und Kopplungseffizienz wurde anhand des Ninhydrintests kontrolliert (Kaiser et al., 1970).

Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz mit DCM, dann mit Methanol gewaschen und im Exsikkator mindestens 30 Min. getrocknet. Es folgte die Überführung in ein Teflongefäß mit Magnetrührstab und Kühlung (Methanol-Trockeneisbad) für mindestens 15 Min. Innerhalb 1 Std. erzielte man die Peptidabspaltung vom Harz mit 10 mL wasserfreiem HF und

## 2. Material und Methoden

---

0,5 ml *p*-Cresol pro Gramm Peptidharz unter langsamem Rühren bei 0 °C (Eisbad). Nachfolgend wurde HF evakuiert, das Rohpeptid in eiskaltem Diethylether präzipitiert, die resultierende Suspension abfiltriert und das zurückgebliebene Peptid nochmals mit Diethylether gewaschen. Das Rohpeptid konnte nun in Puffer G gelöst, separat aufgefangen und gefriergetrocknet werden.

### Fmoc-Strategie

Es wurden unterschiedliche Polymerharze eingesetzt und dabei jeweils mindestens 30 Min. in DMF vorgequollen.

Mit der C-terminalen Aminosäure vorbeladenes Wang-Harz wurde nachfolgend 3 und 7 Min. mit 20 % Piperidin in DMF entschützt. Über 1 Min. intensives Waschen des Harzes mit DMF wurde Piperidin entfernt. Die Aktivierung von 0,5 mmol Aminosäure (2,5 eq) erfolgte mit 0,9 ml 0,5 M HBTU in DMF (2,38 eq) für 2 Min. und 0,5 ml DIEA (50 eq) für 1 Min. Mit dieser Lösung wurde das Harz anschließend 30 Min. inkubiert und währenddessen in Abständen von 5 Min. gerührt. Im Falle unvollständiger Kopplung wurden der Aktivierungs- und der Inkubationsschritt wiederholt. Abschließend wurde das Harz 1 Min. intensiv mit DMF gewaschen.

Weitere Kopplungen wurden nach der beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die Kopplung amino- und carboxyfunktionalisierten PEGs (Fmoc-NH-(PEG)<sub>27</sub>-OH) wurde analog durchgeführt, die Kopplungsdauer betrug abweichend 4 Stunden. Die Entschützungs- und Kopplungseffizienz wurde anhand des Ninhydrintests kontrolliert. Testabspaltungen des bis dahin synthetisierten Peptids vom Harz wurden vor chemisch anspruchsvollen, arbeits- sowie kostenintensiven Schritten wie später beschrieben durchgeführt. Zwischenzeitlich ggf. notwendige, selektive Entfernung der Mtt-Seitenschutzgruppen wurde in DCM mit Puffer H durchgeführt (Aletras et al., 1995), per Absorptionmessung bei 470 nm auf ihre Vollständigkeit überprüft und das Harz anschließend wieder 15 Min. in DMF quellen gelassen.

Unbeladenes Wang-Harz wurde mit 1,25 g Fmoc-Lys(Mtt)-OH (10 eq) und 2,6 mg DMAP (0,1 eq) in DMF für 60 Min. versetzt. Dabei erfolgte zuvor die Aktivierung der Aminosäure in 30 Min. mit 156 µl DIC (5 eq) in trockenem DCM bei 0 °C (Eisbad). Es wurde kontinuierlich gerührt, unter moderatem Wasserausschluss gearbeitet (CaCl<sub>2</sub>-gefülltes Trockenrohr) und das Lösungsmittel abschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Der Beladungsgrad des Harzes

wurde über Fmoc-Absorption bei 304 nm verfolgt (Gude et al., 2003). Weitere Kopplungen wurden analog zur beschriebenen Aminosäurekopplung an vorbeladenes Harz durchgeführt. An unbeladenes Rink-MBHA-Harz wurden Aminosäuren sowohl bei Initial- als auch Folgekopplung nach der Chemie zur Aminosäurekopplung an vorbeladenes Harz angeknüpft. Nach beendeter Synthese wurde das Peptidharz mit DCM, dann mit Methanol gewaschen und im Exsikkator mindestens 30 Min. getrocknet. Es folgte die Überführung in ein TFA-resistentes, verschließbares Plastikgefäß. Innerhalb 3 Std. erzielte man die Peptidabspaltung vom Harz mit 20 ml TFA und zusätzlich je 2,5 % (v/v) TIS, H<sub>2</sub>O und DMS pro Gramm Peptidharz unter langsamem Invertieren. Nachfolgend wurde das Gemisch dreimal mit dem dreifachen TFA-Volumen eiskalten Diethylethers versetzt, invertiert und 5 Min. auf Eis belassen. Das so präzipitierte Rohpeptid wurde bis zur Pelletbildung zentrifugiert (meist 5 Min., 3.500 g) und der Überstand dekantiert. Das Rohprodukt konnte nun in Puffer G gelöst, nach Zentrifugation (5 Min., 3.500 g) als Überstand abgenommen und gefriergetrocknet werden.

### **2.4.2 Acetylierung von Peptiden**

Mit Hilfe der Fmoc-Strategie hergestellte Peptide wurden teils als an freier Aminogruppe acetylierte Versionen hergestellt (Levvy et al., 1959).

Im Falle einer freien Aminofunktion erfolgte die Acetylierung einer 0,2 mmol Synthese mit 189 µl Essigsäureanhydrid und 340 µl DIEA (entspricht je 10 eq) in 30 Min. Die Vollständigkeit wurde per Kaisertest überprüft und der Acetylierungsschritt ggf. wiederholt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz und nachfolgende Aufarbeitung wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben vorgenommen.

### **2.4.3 Fluoreszenzmarkierung von Peptiden**

Mit Hilfe der Fmoc-Strategie hergestellte Peptide wurden teils als an freier Aminogruppe fluoreszenzmarkierte Versionen hergestellt. Die Markierung erfolgte mit Carboxyfluorescein-NHS. Um N-terminales Methionin zu markieren, wurde von dem sonst verwendeten fMet auf Met gewechselt.

Im Falle einer freien Aminofunktion erfolgte die Fluoreszenzmarkierung einer 0,2 mmol Peptidsynthese mit 0,2 mmol Carboxyfluorescein-NHS (1 eq) in minimalem DMF-Volumen

mit 10 % (v/v) DIEA über Nacht. Die Abspaltung des Peptids vom Harz und nachfolgende Aufarbeitung wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben vorgenommen.

### **2.4.4 Oximligation von Peptiden**

Zur Verknüpfung zweier Peptide zu einer funktionellen Einheit wurde die Oxim-Ligationsstrategie herangezogen. Dabei wurde, wie im nachfolgenden Abschnitt für jeweils 0,2 mmol Synthesen beschrieben, zunächst ein Peptid N-terminal mit Pyruvat („Ox-Pyr“) und ein Peptid N-terminal mit Aminoxyessigsäure („Ox-AOAc“) modifiziert (Vilaseca et al., 1993).

Zur Ligation wurde Ox-Pyr mit 2,5 eq Ox-AOAc und 100 mM Anilin (nach Dirksen et al., 2008) für 72 Stunden versetzt. Die Konzentration der Reaktanden betrug je mind. 7 mM. Als Reaktionspuffer wurden drei Systeme nach Dirksen et al. (2008) ausgewählt und aus Löslichkeitsgründen hinsichtlich des Salzgehalts reduziert angesetzt (Puffer U, V, W). Der pH-Wert wurde während der Reaktionszeit regelmäßig überprüft und ggf. mit TFA (Puffer U), Stammlösungen der Puffersalze  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Puffer V) oder Essigsäure (Puffer W) auf die anfänglichen Bedingungen eingestellt. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 2, 8, 24$  und 72 Stunden wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung entnommen, 1:10 mit HCCA-Matrix verdünnt und ein MALDI-MS aufgenommen.

### **N-terminale Peptidmodifikation mit Pyruvat**

Nach Fmoc-basierter Herstellung unmodifizierten Peptids wurden 112  $\mu\text{l}$  Pyruvat sowie 116 mg NHS (jeweils 5 eq) für 10 Min. vermischt gelassen und dann in 2 ml trockenem DCM unter Vortexen gelöst. Auf Eis wurden für 30 Min. 230  $\mu\text{l}$  DIC (7,5 eq) zugegeben und die Lösung anschließend für 20 Min. auf das zuvor DCM-gelagerte Peptidharz gegeben. Die Pyruvatkopplung wurde bis zum negativen Kaisertest wiederholt. Die Abspaltung des modifizierten Peptids Ox-Pyr vom Harz und die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 2.4.1 beschrieben.

### **N-terminale Peptidmodifikation mit Aminoxyacetat**

Nach Boc-basierter Herstellung unmodifizierten Peptids wurde 0,5 mmol Boc-AOAc mit 0,5 mmol NHS und 0,5 mmol DIC (jeweils 2,5 eq) für 30 Min. in 2 ml DMF aktiviert.

Anschließend wurde die Lösung für 30 Min. auf das Peptidharz gegeben. Die AOAc-Kopplung wurde bis zum negativen Kaisertest wiederholt. Zur Vermeidung von Carbonyladdukten während der Abspaltung des Peptids Ox-AOAc vom Harz wurde zusätzlich 1 mmol ungeschütztes AOAc (5 eq) zugegeben. Die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde wie in Kap. 2.4.1 beschrieben vorgenommen. Aufarbeitung und Reinigung des Rohpeptids erfolgten mit frisch angesetzten, entgasten Puffern.

### **2.4.5 Aufreinigung von Peptiden**

Die Reinigung des Rohpeptids oder des Ligationsprodukts erfolgte via RP-HPLC, C4- und C18-Säulen (250 x 10 mm und 250 x 22 mm; jeweils 300 Å Poren- und 5 µm Partikeldurchmesser), Puffer A und B als mobiler Phase und bei konstanten Flussraten von 3-10 ml/Min. Die Substanz wurde vor Säulenapplikation in Puffer C gelöst und in geringer Menge (< 1 mg) auf ihre etwaige Retentionszeit eingegrenzt. Dies geschah über einen Gradienten von 5 - 65 % Puffer B in A in 30 Min. auf der Säule, welche auch für die nachfolgende Aufreinigung gewählt wurde. Entsprechend dem Testlauf angepasste Gradienten waren Grundlage der anschließenden Aufreinigungsmethode. Mittels ESI- oder MALDI-MS charakterisierte Elutionsfraktionen wurden im Fall hoher Reinheit vereinigt, gefriergetrocknet und final per RP-HPLC (C4-Säule, 150 x 4,6 mm; Poren- und Partikelgröße s. o.) und ESI-, LC- oder MALDI-MS charakterisiert.

### **2.4.6 Qualitätsanalyse von Peptiden**

Proben für ESI- und LC-MS waren entsprechend dem bei der Aufreinigung anliegenden Gradienten von Puffer A / B gelöst, während gefriergetrocknete Peptide in Puffer G gelöst wurden. Die Konzentration betrug etwa 1 mg/mL. Messungen erfolgten im Positiv-Modus.

Für MALDI-MS-Analysen wurde 1 µl in Puffer A / B oder G vorliegender Proben mit gleichem Volumen an Matrix (HCCA, gesättigte Lösung in Puffer G) vermischt und zum vollständigen Auskristallisieren auf eine MALDI-Analyseplatte aufgetragen. Messungen erfolgten im Linear/Positiv-Modus.

Vor der experimentellen Verwendung wurde eine Stammlösung des jeweiligen Peptids hergestellt und ihre Konzentration per Absorptionsmessung bestimmt (Anhang, Tab. 1).

### 2.5 Zellbiologische Methoden

#### 2.5.1 Kultivierung humaner Tumorzellen

Es wurden humane Zelllinien solider Tumore verwendet, welche EGFR exprimieren. A431 war eine Hautkrebs-Linie mit etwa 30-facher EGFR-Überexpression (Haigler et al., 1978; Zelllinie von DSMZ, Braunschweig, Deutschland). HT29 war eine Darmkrebs-, A549 eine Adenokarzinom- (jeweils Dr. Mathias Gehrman, Klinikum rechts der Isar, München), LXFA-629 (Oncotest, Freiburg, Deutschland) eine Lungenkrebs- sowie MCF-7 eine Brustkrebs-Linie mit jeweils einfachem EGFR-Anteil. MCF7-EGFR war eine transfizierte Brustkrebs-Linie mit etwa 2-facher EGFR-Überexpression (MCF7-Linien von Dr. Marjo de Graauw, Universiteit Leiden, Niederlande; Quantifizierung des EGFR-Anteils über Westernblot; Auswertung mit ImageJ, National Institutes of Health, USA). Die Zusammensetzung der jeweiligen Kulturmedien ist am Ende dieses Abschnitts gelistet (Tab. 1). Unter der Voraussetzung eines negativen Mycoplasmentests wurden sämtliche Linien bis Passage 10 in Kryoröhrchen zu 2-4 Mio. Zellen in max. 1,5 ml Medium mit 20 % Serum und 10 % DMSO (je v/v) in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Zellkultur wurde ein Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 10 ml Medium mit 20 % Serum (v/v) aufgenommen. Es erfolgte die Zentrifugation für 3 Min. bei 300 g, Absaugen des Überstands und die Resuspension zu Einzelzellen in 7 ml Medium. Die Suspension wurde in Zellkulturflaschen mit Filterverschluss ausgesät (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; hier 25 cm<sup>2</sup>) und in einem feuchtigkeitsgesättigten Inkubator bei 37 °C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach einem Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 7 ml frisches ersetzt. Der Serumanteil betrug von nun an 10 % (v/v).

Die Zellkultur wurde alle 24 - 48 Stunden im Mikroskop kontrolliert und bei max. 90 % Konfluenz zu 1 Mio. (25 cm<sup>2</sup>-Flaschen) bzw. 2,5 Mio. Zellen (75 cm<sup>2</sup>-Flaschen) neu ausgesät. Dazu wurde jeweils nach mehrmaligem Schwenken der Kulturflasche das Medium entfernt und einmal mit Puffer E gewaschen. Über 5-minütige Zugabe von Trypsinlösung wurde ein Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erreicht. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen, zu Einzelzellen resuspendiert und für 3 Min. bei 300 g pelletiert. Nach Abnehmen des Überstands erfolgte die Resuspension zu Einzelzellen in 1 ml Medium, wovon 10 µl abgenommen, mit 10 µl Puffer M versetzt und unmittelbar in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert wurden. Es wurden 4 Großquadrate ausgezählt, gemittelt und über

## 2. Material und Methoden

---

Multiplikation mit dem Faktor 2 (Verdünnung mit Puffer M) sowie 10.000 (interner Zählkammerfaktor) die Zellzahl pro ml berechnet. In Experimenten kamen Zellen der Passagen 3 - 25 zum Einsatz.

Zelllinie	Kulturmedium
A431, A549, MCF7-Linien	RPMI-1640 mit Gln, 10 % FCS
LXFA-629	RPMI-1640 mit Gln, 10 % FCS, 20 mM HEPES
HT29	Mc Coy's, 10 % FCS, 200 mM Gln, 1 % P/S

**Tab. 1:** Zusammensetzung der Kulturmedien für humane Zelllinien solider Tumore. Alle Prozentangaben in Volumenprozent.

### **2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung**

MCF7- bzw. MCF7-EGFR-Kulturen wurden in 24-Well-Platten zu 30.000 Zellen ausgesät (500 µl Gesamtvolumen, Normalmedium). Auf dem Boden jeder Kammer befand sich ein rundes Deckglas (Quarzglas). In etwa 72 Std. wurde 50-60 % Konfluenz erreicht und auf Medium mit 1 % FCS (Magermedium) gewechselt. Nach Inkubation über Nacht wurde zu den Zeitpunkten  $t = 5$  Min. sowie 1, 2 und 16 Std. in Magermedium gelöste Testsubstanz (Peptid) zugegeben. Als Positivkontrolle diente eine analoge Behandlung mit EGF (50 ng/ml Endkonzentration). Nach Beendigung der Exposition erfolgte die Zellhandhabung auf Eis.

Der Überstand wurde abgesaugt, einmal mit Puffer E gewaschen, für 10 Min. eine gepufferte Formaldehydlösung (4 % v/v) zugegeben und zwei weitere Male mit Puffer E gewaschen. Es erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindestellen mit Puffer K für 30 Min.

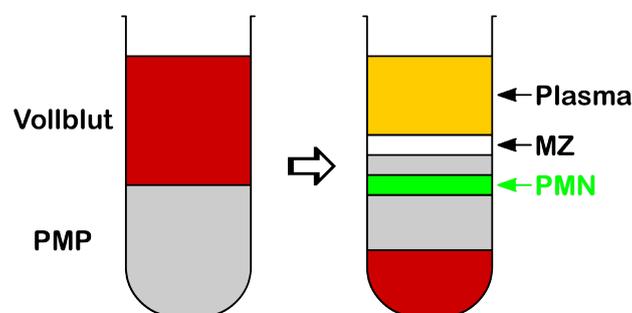
In Puffer X gelöster Primärantikörper wurde über Nacht bei 4 °C zugegeben. Es kamen je Kammer 100 µl monoklonaler Antikörper gegen phosphorylierten EGFR in 1:500-Verdünnung sowie gegen EGFR in 1:250-Verdünnung zum Einsatz.

Nach dreimaligem Waschen und Blockieren mit Puffer K für jeweils 10 Min. bei sanftem Schütteln wurde mit 100 µl sekundärem Antikörper 60 Min. bei 25 °C inkubiert (jeweils 1:1000-Verdünnung). Nach erneutem Blockieren (zweimal, Puffer K) und Waschen (einmal, Puffer E) wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Aqua Poly/Mount auf einen Objektträger mikroskopierfertig aufgebracht. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -20 °C.

### **2.5.3 Isolation neutrophiler Granulozyten**

Neutrophile Granulozyten wurden aus menschlichem Vollblut unter Ausnutzung einer isoosmotischen Dichtebarrriere durch Polysaccharide isoliert (Polymorphprep<sup>TM</sup>,  $\rho = 1,113 \text{ g/ml}$ ; nach Bøyum, 1968 und Ferrante et al., 1980). Dazu wurden 20 ml Blut mit 2 mM EDTA als Antikoagulanzen versetzt, in einem sterilen 50 ml Plastikgefäß langsam auf 20 ml Polymorphprep geschichtet und zentrifugiert (30 Min., 500 g, 20 °C). Der Rotor wurde ohne Bremse auslaufen gelassen.

Von der erzielten Separierung (Abb. 5) wurden die oberen drei Schichten abgezogen und verworfen (Plasma, Mononukleare Zellen, Polymorphprep Zwischenschicht). Die darunter liegende Schicht Polymorphonuklearer Zellen wurde in ein steriles 15 ml Plastikgefäß überführt, mit gleichem Volumen Puffer O versetzt und zentrifugiert (10 Min., 400 g, 20 °C). Um restliche Erythrozytenkontamination zu entfernen, wurde das Zellpellet vorsichtig in 3 ml Puffer P resuspendiert, für 7 Min. bei 37 °C inkubiert und abschließend zentrifugiert (10 Min., 400 g, 20 °C). Entsprechend den Volumen- und Zellzahl-Anforderungen im späteren Experiment erfolgte die vorsichtige Resuspension in Kulturmedium (RPMI-1640, 10 % FCS, (v/v)).

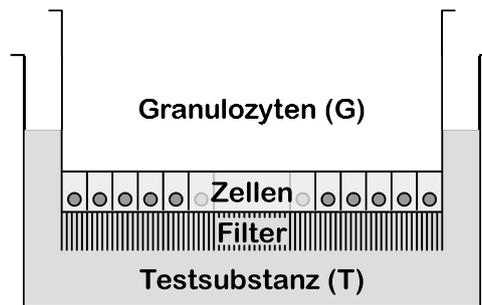


**Abb. 5:** Schema der Isolierung von Granulozyten unter Verwendung von Polymorphprep<sup>TM</sup> (PMP). Nach Zentrifugation (rechts) enthielt die grün markierte Bande Polymorphonukleare Zellen (PMN). Plasma, Mononukleare Zellen (MZ) und eine PMP-Zwischenschicht wurden verworfen, um PMN zur weiteren Aufarbeitung abnehmen zu können.

### **2.5.4 Chemotaxis von Immunzellen (Transwell)**

Zur Überprüfung der chemotaktischen Aktivität einer Testsubstanz (Peptid) mit fMLF-Motiv fand ein Transwell-Migrationsversuch Anwendung (nach Boyden, 1962). Die Wirksamkeit der Substanz wurde an Polymorphonuklearen Zellen (Granulozyten), aufgrund des hohen Blutanteils hier neutrophilen Granulozyten, nachvollzogen. Diese können ebenfalls wie

Makrophagen fMLF über den FP-Rezeptor binden und so einen Chemogradienten des Peptids erkennen.



**Abb. 6:** Schema der Transwell Kulturkammer. Nach Ausbildung eines Chemogradienten von T wanderten Granulozyten im Fall positiver Chemotaxis aus Kompartiment G über die Filterbarriere nach T.

In jeweils dreifachem Ansatz wurde in einer Transwell-Kulturkammer auf Seite T eine feste Konzentration der Tests substanz (Peptid) angelegt. Innerhalb 30 Min. wurde die Ausbildung eines Konzentrationsgradienten ermöglicht. Auf der durch Filter (5  $\mu$ M Porengröße) separierten Gegenseite G wurden 0,2 Mio. Granulozyten für 30 Min. zugesetzt und anschließend die innerhalb dieser Zeit über die Filterbarriere auf Seite T migrierten Zellen ausgezählt (Abb. 6).

### **2.5.5 Isolation von Makrophagen**

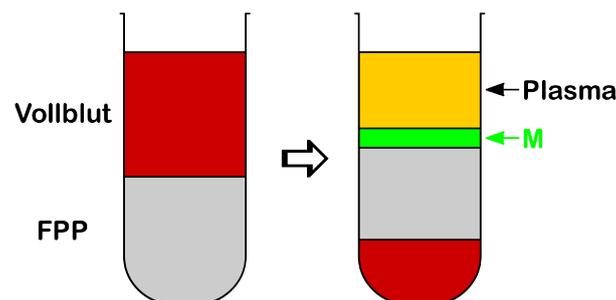
Die Isolation von Makrophagen beruhte auf einem ähnlichen Protokoll wie in Kap. 2.5.3, jedoch wurde Ficoll-Paque Plus zur Auftrennung der Blutbestandteile eingesetzt. 60 ml humanen Vollbluts wurden mit 2 mM EDTA als Antikoagulanzen versetzt und dann mit 60 ml Puffer E (hier stets ohne Kalzium und Magnesium; auf 37 °C vorgewärmt) gemischt. Die Suspension wurde in 20 ml Aliquots auf je 20 ml Ficoll-Paque Plus geschichtet und zentrifugiert (30 Min., 500 g, 20 °C). Der Rotor wurde ohne Bremse auslaufen gelassen. Von der erzielten Trennung (Abb. 7) wurde die oberste Plasmaschicht mit Thrombozyten verworfen und die darunter liegende Leukozytenschicht in ein steriles 50 ml Plastikgefäß überführt.

In das Gefäß wurde zuvor das zweifache Leukozytenvolumen Puffer E gegeben. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt (10 Min., 400 g, 20 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet vorsichtig in 20 ml Normalmedium resuspendiert (RPMI-

## 2. Material und Methoden

---

1640, 10 % FCS (v/v), 1 % L-Gln (w/w), 1 % P/S (v/v), 1 % NEAS (w/w)) und erneut zentrifugiert (10 Min., 400 g, 20 °C). Nach Aufnahme des Zellpellets in 5 ml Normalmedium wurde die Suspension in zwei Kulturschalen (Ø 14,5 cm) mit je 40 ml Normalmedium überführt. Nach 48 Std. wurden die aufschwimmenden T-Lymphozyten abgesaugt und die adhärenen Makrophagen mit 10 ml Puffer E sowie anschließend 10 ml Magermedium (vgl. Normalmedium, jedoch nur 0,5 % FCS (v/v)) gewaschen. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber gelöst, in 5 ml Normalmedium aufgenommen und zu 50.000 Zellen in der Co-Kultivierung eingesetzt.



**Abb. 7:** Schema der Isolierung von Makrophagen unter Verwendung von Ficoll-Paque Plus (FPP). Nach Zentrifugation (rechts) enthielt die grün markierte Bande Makrophagen (M). Die Plasmaschicht wurde verworfen, um M zur weiteren Aufarbeitung abnehmen zu können.

### 2.5.6 Chemotaxis von Immunzellen (Scratch)

Zur Überprüfung der chemotaktischen Aktivität einer Testsubstanz mit fMLF-Motiv und EGFR-Bindedomäne (SAB-Peptide) nach Bindung an Krebszellen wurde ein Scratch-Migrationsversuch zu Rate gezogen. Abweichend vom standardisierten Scratchassay (Liang et al., 2007) wurden Makrophagen- und Tumorzellkulturen separiert co-kultiviert, so dass keine Tumorzellen zu Versuchsbeginn mechanisch zerstört wurden. Makrophagen wurden im Vergleich zu Kap. 2.5.3 nicht direkt für Experimente eingesetzt, sondern nach der Gewinnung zunächst vergleichbar einer soliden Tumorzelllinie kultiviert.

Das Peptid MCP-1 (99 AS; Uniprot<sup>5</sup>) aktiviert Chemotaxis bei Makrophagen über entsprechende Rezeptoren (CC-Rezeptoren / CCRs; Charo et al., 1994), ist kommerziell erhältlich und wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Diverse Zelltypen im menschlichen Organismus exprimieren CCRs (Salcedo et al., 2000), darunter auch Tumorzellen wie MCF-7

---

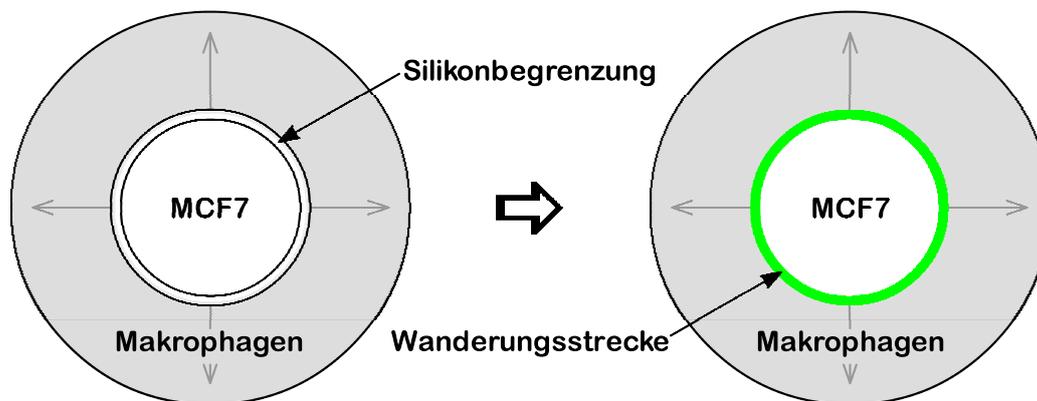
<sup>5</sup> <http://www.uniprot.org/uniprot/P13500>

## 2. Material und Methoden

---

(Youngs et al., 1997), zeigen jedoch im Vergleich zu Makrophagen keine signifikante Migrationsantwort.

Es kamen 24 Std. alte Zellen zum Einsatz. MCF7-Zellen wurden zu je 0,2 Mio. in einer ringförmigen Silikonbegrenzung (flexiPERM, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland; Ø 2 cm) innerhalb einer Kulturschale (Ø 10 cm) kultiviert. Es wurde zuvor ein Koordinatenkreuz gezeichnet, so dass später in 4 Vektoren die Wanderungstrecke bestimmt werden konnte. Außerhalb der Silikonbegrenzung wurden Makrophagen bis zu einer Zelldichte von 3,5 Mio. co-kultiviert (Abb. 8).



**Abb. 8:** Schema des Scratch-Migrationsversuchs. Nach Exposition der MCF7-Zellen gegenüber SAB-Peptiden wurde die Silikonbegrenzung entfernt und die Wanderung co-kultivierter Makrophagen ermöglicht.

Bei Erreichen von 90 % Konfluenz wurden die MCF7-Zellen zweimal mit Magermedium gewaschen und nachfolgend mit einer definierten Konzentration Testsubstanz bzw. Positivkontrolle (10 ng/ml MCP-1) und Negativkontrolle (Puffer I) für 60 Min. versetzt. Alle Zusätze waren in RPMI-1640-Medium mit 1 % P/S (v/v) gelöst. Anschließend wurde das Medium beider Zellkulturen abgesaugt, zweimal mit Magermedium gewaschen und die Zellen für 60 Min. im Inkubator ruhen gelassen. Nach Entfernung der Silikonringe wurde für 16 Std. die freie Wanderung der Makrophagen erlaubt. Die zurückgelegte, gerichtete Wegstrecke in Richtung Tumorzellen wurde mittels Millimeterpapier auf der Petrischale vermessen; dabei wurde die mit der Positivkontrolle erzielte Wanderungstrecke als 100 % angenommen.

### **2.5.7 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung**

Zu untersuchende Zellen wurden bis 70 % Konfluenz gezogen. Nach Ernte wurde die Zellen zu 0,5 Mio. Zellen aliquotiert, 5 Min. bei 300 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 5 ml Puffer E gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in minimal handhabbarem Volumen Puffer I aufgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Zu Beginn eines FACS-Experiments wurde die jeweilige Testsubstanz (Peptid) in minimal handhabbarem Volumen Puffer I gelöst, zum Zellaliquot zugegeben, per Pipette gründlich verteilt und der Zeitpunkt  $t_0$  gesetzt. Die Inkubation erfolgte 2 Std. bei 4 °C. Je Ansatz wurde mit einem Endvolumen von 100 µl gearbeitet. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 5 ml Puffer I gewaschen, zentrifugiert, in 1 ml Puffer J resuspendiert und unmittelbar vermessen (je 10.000 Zellen).

Zur Überprüfung des EGFR-Anteils der jeweiligen Zelllinie wurde ein Aliquot Zellen mit 100 µl in Puffer T 1:100 (v/v) verdünntem Primärantikörper gegen EGFR (Maus) versetzt, nach 30 Min. mit 5 ml Puffer T gewaschen und zentrifugiert. Mit 100 µl 1:10 verdünntem, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 30 Min. versetzt, wurde erneut mit Puffer T gewaschen und in 1 ml Puffer J resuspendierte Zellen vermessen. Als Negativkontrolle wurde ein isotyper Mausantikörper analog verwendet.

### **2.5.8 Stabilität von SAB in Blutserum**

Tierseren wurden verwendungsfertig erworben (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und Humanserum aus frischem Vollblut gewonnen (Klinikum rechts der Isar, München). Dazu wurde das Blut zentrifugiert (10 Min., 750 g, 20 °C) und der gelbbraune, klare Überstand (Serum) unmittelbar eingesetzt oder bis zur Verwendung schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für den Stabilitätstest wurden 800 µl Serum und 100 µl Testsubstanz (Peptid, etwa 0,5 mM Endkonzentration) eingesetzt, so dass ausreichend intensive Absorptionssignale bei der HPLC-Analyse gewährleistet waren. Jeder Ansatz wurde im Triplikat durchgeführt. Das Serum wurde auf 37 °C temperiert, mit Testsubstanz und Standard versetzt und der Zeitpunkt  $t_0$  gesetzt. Zu den Zeitpunkten  $t = 0, 10, 20, 30, 60, 120$  Min. wurden nach dreimaligem, kurzem Vortexen je 150 µl entnommen und in einer Vivaspin 500 Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgröße 10 kDa; Sartorius, Göttingen, Deutschland) 15 Min. bei 15.000 g filtriert. Das Filtrat wurde aufbewahrt und der Filtrerrückstand wie folgt aufgearbeitet.

Nach Bestimmung des Rückstandsvolumens wurde dieses in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, ein identisches Volumen 95 % (v/v) Ethanol zugegeben, kurz gevortext und 5 Min. bei 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals nach gleicher Prozedur mit Ethanol gefällt. Abschließend wurde wiederum das Überstandsvolumen bestimmt und in höchstmöglichem Volumen 1:1 (v/v) mit dem Filtrat vereinigt.

20 µl der aufgearbeiteten Probe wurden per RP-HPLC mit einem Gradienten von 5-65 % Puffer B in A in 60 Min. auf einer analytischen C4-Säule aufgetrennt. Anschließend wurden die Restmengen aller Proben t = 0 - 120 Min. vereinigt, gefriergetrocknet, in 50 µl Puffer G gelöst und per LC-MS analysiert. Das Integral der Peptid-bedingten Absorption wurde ausgewertet, wobei t<sub>0</sub> gleich 100 % gesetzt wurde.

## **2.6 Biophysikalische Methoden**

### **2.6.1 Dynamische und Statische Lichtstreuung**

Mittels dynamischer und statischer Lichtstreuung wurden die synthetisierten Peptide SAB-Y1 und SAB-Y1-ac auf ihr etwaiges Molekulargewicht und monodisperses bzw. -meres Vorkommen hin untersucht.

Dabei wurden die Peptide zu je 2 mg/ml in H<sub>2</sub>O rückstandsfrei gelöst, über eine Polyethersulfon-Membran mit 0,2 µm Porengröße gefiltert, per Absorption die Konzentration überprüft und anschließend die Lichtstreuungsmessung gestartet. Bei 25 °C temperiert wurden je Probe mind. 20 valide Einzelmessungen im 90° Winkel durchgeführt. Es wurde der Brechungsindex von Wasser angenommen (1,33). Die Auswertung erfolgte automatisch durch die geräteseitige Software. Nach Abschluss der Messungen wurde die jeweilige Probe zentrifugiert (5 Min., 16.000 g) und im Überstand die Peptidkonzentration bestimmt.

### **2.6.2 Oberflächenplasmonenresonanz**

Die Affinität einer Testsubstanz (Peptid) wurde per SPR bestimmt. Dazu wurde gemäß nachstehendem Protokoll EGFR auf einem funktionalisierten Goldchip immobilisiert und dem Binder in Doppelbestimmung (niedrigste > höchste, höchste > niedrigste) exponiert.

Zunächst wurde ein blanker Goldchip auf Raumtemperatur erwärmt, mit 100 % EtOH vorsichtig gewaschen und nachfolgend lichtgeschützt mit der Funktionalisierungslösung

(600 µl 95 % 11-Mercaptoundecansäure (10 mM), 300 µl 97 % 11-Mercapto-1-undecanol (10 mM), 100 µl 11-Amino-1-undecanethiol-HCl (10 mM), 9 ml 100 % EtOH) für 12 Std. inkubiert. Der funktionalisierte Chip trug nun eine Beladung mit den funktionellen Gruppen COOH:OH:NH<sub>2</sub> im Verhältnis 6:3:1, wurde erneut mit 100 % EtOH gewaschen, auf den Plastikträger geklebt und im SPR-Gerät installiert. Ein analog behandelte Chip, beladen mit humanem Transferrin (hTf), wurde als Referenz eingesetzt. Nachfolgende Schritte wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, bei 25 °C temperiert und 5 µl/Min. Flussrate ausgeführt.

Die Beladung der Chips erfolgte in Puffer L. Je Chipkanal wurde zweimal 5 µl Puffer Q injiziert, einmal 5 µl Puffer R und wiederum einmal 5 µl Puffer Q gefolgt von 5 µl Puffer R. Die Aminogruppen des Chips wurde jeweils über 35 µl 0,2 M EDC/NHS aktiviert und 30 Sek. nach Abklingen des Signals mit 100 µl hTf (12,5 mg/ml in Puffer L) oder EGFR (3 mg/ml verdünnt in Puffer L) bei 2 µl/Min. Flussrate beladen. Restliche reaktive Aminogruppen wurden mittels Injektion von 40 µl Puffer S blockiert. 100 Sek. nach Abklingen des Signals wurde über Injektion von 5 µl Waschlösung die Beladung des Chips beendet.

SPR-Affinitätsmessungen wurden in Puffer M bei sonst unveränderten Bedingungen durchgeführt. Der jeweilige Chip wurde nach jeder Testsubstanz zweimal mit Puffer Q und einmal mit Puffer R regeneriert. Eine Messung erfolgte mit 100 µl Testsubstanz über 20 Min.

## **2.7 Proteinchemische Methoden**

### **2.7.1 Löslichkeit von Peptiden**

Die Löslichkeit der Peptide SAB-Y1 und SAB-Y1-ac wurde in Dreifachbestimmung in reinem Wasser sowie den Puffern PBS und Tris getestet.

Dabei wurde das Peptid zu 2 mg/ml in Puffer G gelöst, die Konzentration per Absorptionsmessung sichergestellt, und jeweils 30 µl aliquotiert. Somit waren für Absorptionsmessungen verlässliche Werte im Bereich 0,1 - 0,8 zu erwarten. Die Aliquots wurden schockgefroren, gefrieretrocknet und nachfolgend mit dem zu testenden Puffer versetzt. Löste sich das Peptid nicht spontan vollständig, wurde bis zu 15 Min. gevortext. Falls nötig, wurde in dieser Zeit auf 37 °C temperiert. Anschließend wurde die Probe 5 Min. bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand im Absorptionsspektrometer vermessen. Die

Probe wurde schockgefroren, gefriergetrocknet und erneut über gleichvolumige Zugabe an H<sub>2</sub>O gelöst. Als Kontrolle diente Lösen, Gefrieretrocknen und erneutes Lösen in Puffer G.

### **2.7.2 Langzeitstabilität des SAB**

In einer 2-monatigen Studie wurde überprüft, ob die Peptide SAB-Y1 und SAB-Y1-ac in gelöster Form stabil lagerbar sind und darüber hinaus nicht signifikant an den Wänden von Aufbewahrungsgefäßen haften.

Dabei wurde Peptid zu 2 mg/ml in Wasser gelöst, per Absorption die Konzentration vermessen, und jeweils ein Volumen von 30 µl in ein verschraubbares Glasröhrchen, Eppendorf bzw. Eppendorf LoBind<sup>®</sup> Reaktionsgefäß überführt. Als Lagerbedingungen wurde Raumtemperatur, Raumtemperatur lichtgeschützt und Kühlschrank lichtgeschützt (4 °C) jeweils in Triplikaten getestet. Zur Simulation späterer Anwendungsbedingungen mit kontaminationsarmer Materialentnahme via steriler Einmalspritze und mit Septum verschlossenem Aufbewahrungsgefäß wurden die Proben jeweils mit sterilen Pipettenspitzen unter der rauschenden Flamme eines Bunsenbrenners entnommen.

Zu den Zeitpunkten t = 0, 2, 4 und 8 Wochen wurde je 1 µl für MALDI-MS entnommen sowie aus Zeitgründen lediglich im Duplikat 2 µl für die RP-HPLC-Analyse (analytische C4-Säule, Gradient 5-65 % B in A in 30 Min.). Zum Abschluss t = 8 Wochen wurde zudem jeweils ein LC-MS aufgenommen. Vor Probenentnahme wurde dreimal kurz zentrifugiert und gevortext, um eventuelles Kondenswasser mit der restlichen Probe zu vereinen und somit Probenverdünnung bzw. -ungleichverteilung zu verhindern.

### **2.7.3 Endotoxingehalt von Peptiden**

Um sicherzustellen, dass in Tierstudien keine Toxizitätseffekte von der Synthese- und Aufreinigungsprozedur für zuvor hergestellte Peptide herrühren, wurde deren Endotoxinanteil überprüft.

Das jeweilige Peptid wurde sowohl in kommerziellen, gering-endotoxinhaltigen Lösungen solvatisiert (PBS, H<sub>2</sub>O) als auch in entsprechenden Lösungen aus eigenem Ansatz sowie mit autoklavierten oder sterilfiltrierten Versionen der eigenen Lösungen. Der Endotoxintest

basierte auf dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test; Lonza<sup>6</sup>), welcher die durch Endotoxine ausgelöste Gerinnung der Blutzellen (Amöbozyten) im LAL kolorimetrisch nachweist, und wurde nach Anleitung des Herstellers unverändert durchgeführt. Bei Absorptionen oberhalb 0,8 wurde von der jeweiligen Probe eine Verdünnung mit dem verwendeten Lösungsmittel erstellt, so dass der tatsächliche Endotoxingehalt anhand der über *E. coli* Endotoxinstandards erstellten Kalibrierkurve verlässlich extrapoliert werden konnte.

## 2.8 Pharmakologische Methoden

### 2.8.1 Toxizität des SAB und maximal tolerierte Anwendungsdosis

Die Unbedenklichkeit bzw. Toxizität des synthetischen Antikörpers *in vivo* sowie ggf. die maximal tolerierten Dosis (MTD), bei welcher kontinuierliche Behandlung möglich wäre, wurde zunächst im Versuchsmodell der Maus überprüft. Ausführend war die Oncotest GmbH (Freiburg, Deutschland). Es wurde sowohl mit gesunden als auch mit tumortragenden Tieren getestet. Letztere sind im Regelfall anfälliger für eventuelle toxische Nebenwirkungen einer Testsubstanz und wurden daher für die Tiergruppe ohne (Kontrolle) sowie mit höchster SAB-Dosierung (160 µg/Maus/Tag) gewählt.

Es kamen weibliche, immundefiziente, homozygote Nacktmäuse ab einem Alter von fünf Wochen zum Einsatz (Charles River, Wilmington, USA<sup>7</sup>), welche zuvor mindestens einwöchig unter Quarantäne gesetzt wurden. Sämtliche Experimente wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Der Hälfte der Population wurde eine EGFR-positive kolorektale Tumormlinie menschlichen Ursprungs xenotransplantiert. Ab Erreichen stabilen Wachstums unterhalb der Passage P30 sowie einer Tumorgöße zwischen 50 und 250 mm<sup>3</sup> wurden die Individuen für Experimente bereitgestellt. Die Tiere wurden während des Experiments kontinuierlich beobachtet und auf ihr Körpergewicht sowie Tumolvolumen untersucht.

Als klinischer Parameter wurde festgelegt, dass weniger als 10 % des ursprünglichen Tumolvolumens (Versuchsbeginn  $t_0$ ) vollständige Remission, 10 - 50 % partielle Remission,

---

<sup>6</sup> [http://www.lonzabio.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_QCL-1000\\_Product\\_Insert.pdf](http://www.lonzabio.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_QCL-1000_Product_Insert.pdf)

<sup>7</sup> <http://www.criver.com/EN-US/PRODSERV/BYTYPE/RESMODOVER/RESMOD/Pages/NuNuNudeMouse.aspx>

50 - 75 % geringfügige Remission, 75 - 125 % keine Remission und über 125 % Progression des Tumorwachstums bedeutet.

Der innerhalb dieser Arbeit identifizierte Wirkstoffkandidat SAB-Y1-ac wurde über bis zu zwei Wochen in den Dosierungen 0, 10, 80 und 160 µg/Maus/Tag zu 200 µl je Tier eingesetzt. Die Verabreichung geschah intravenös in Abständen von zwei Tagen. Es wurde in Triplikaten je Dosis gearbeitet. Zum Abschluss des Experiments erfolgte die Einschläferung der Tiere und anschließende Entnahme von Serums- sowie Gewebeproben (Leber; Tumor, falls vorhanden) nach der finalen Dosis. Bei jeder Population wurde je nach Materialverfügbarkeit mindestens in Duplikaten, sonst in Triplikaten gearbeitet. Gewebeproben wurden in 10 % gepufferter Formalinlösung für max. 24 Std. fixiert, nachfolgend in 70 % Ethanol für max. 7 Tage gelagert, dehydriert und in Paraffin zu Analysezwecken eingefasst. Alternativ wurden Proben in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

### **2.8.2 SAB-induzierte Immunantwort**

Die in Kap. 2.8.1 final entnommenen Serums- und Gewebeproben wurden von PD Dr. Frank Tacke (Uniklinikum Aachen, Deutschland) analysiert. Es wurde somit klinisch-chemisch kontrolliert, ob eine Makrophagenaktivierung im Zuge der SAB-Gabe erfolgt war.

Als Prüfparameter dienten Alanin-Aminotransferase-Aktivität (ALT), Aspartat-Aminotransferase-Aktivität (AST), Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH), Bilirubin- sowie Zytokin-Konzentration (Interleukin 6, IL-6; Interleukin 1β, IL-1β; Tumor-Nekrose-Faktor α, TNF-α). Im Leber- und Tumorgewebe wurden jeweils RNA-Expression sowie Proteinkonzentrationen von IL-6, IL-1β und TNF-α mittels ELISA bzw. Echtzeit-PCR bestimmt. Alle Parameter wurden quantitativ ausgewertet. Referenzwerte waren gegeben (Charles River<sup>8,9</sup>).

---

<sup>8</sup> [http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm\\_rm\\_r\\_NUNU\\_mouse\\_biochemistry\\_2008.pdf](http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_NUNU_mouse_biochemistry_2008.pdf)

<sup>9</sup> [http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm\\_rm\\_r\\_NUNU\\_mouse\\_hematology\\_2008.pdf](http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_NUNU_mouse_hematology_2008.pdf)

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Festphasensynthese des SAB

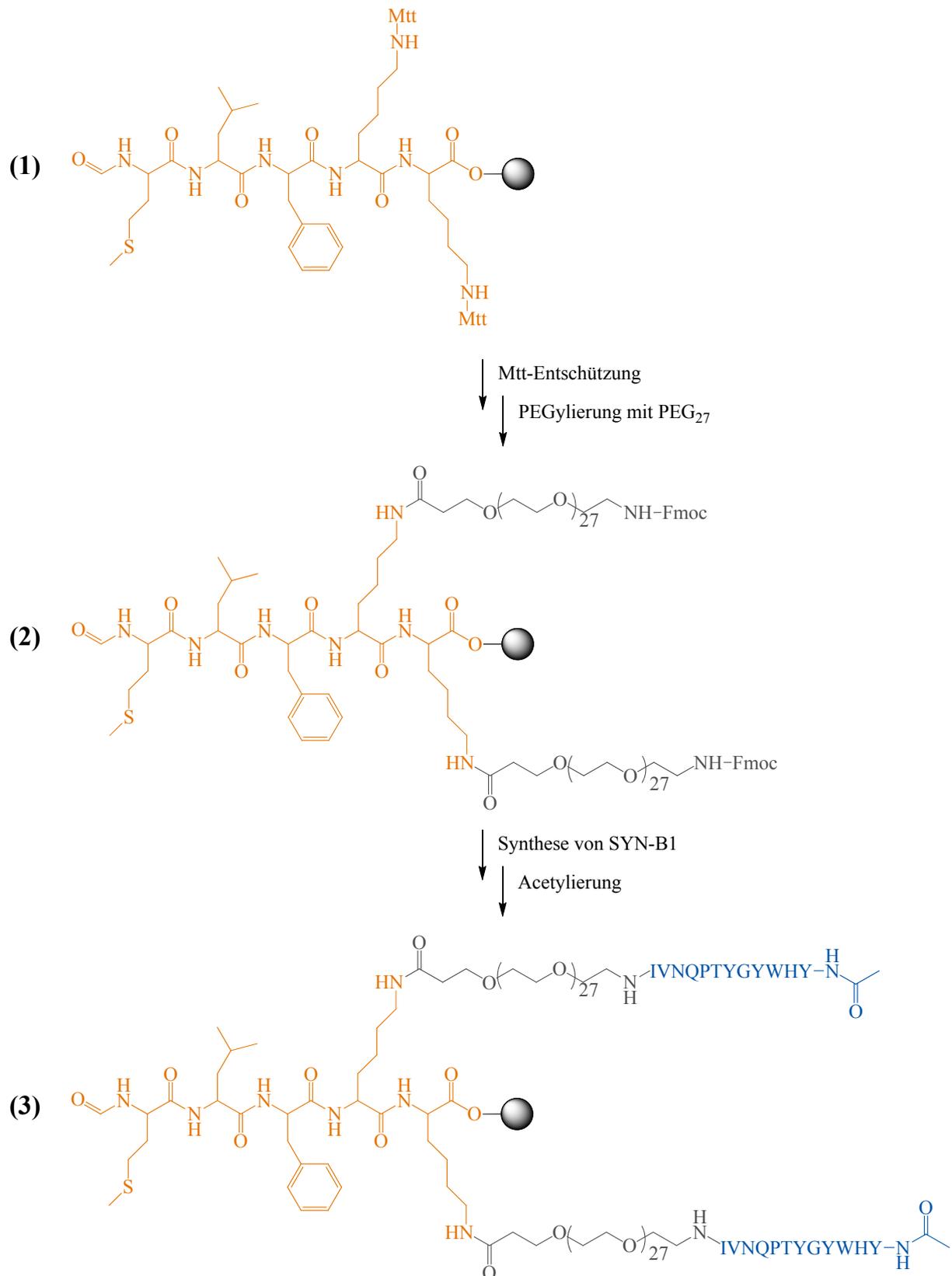
Zur Herstellung des synthetischen Antikörpers SAB (SAB-Y1) wurde eine Synthesestrategie entwickelt, welche geringe Modifikationen der funktionellen Peptide fMLF und SYN-B1 verlangte und deren volle Aktivität in Form des SAB-Moleküls erwarten ließ. Dabei erfolgte der Molekülaufbau in drei Sequenzen, welcher nachfolgend für SAB-Y1-ac beschrieben ist.

Die Synthese des Effektorpeptids fMLFKK bot mit C-terminal zwei zusätzlichen Lysinen die Möglichkeit, über deren  $\epsilon$ -Aminogruppen die Synthese fortzuführen. Der immunogene Abschnitt fMLF blieb dabei funktionell unverändert (Abb. 9, 1). Die nachfolgende Kopplung von Fmoc-NH-(PEG)<sub>27</sub>-OH an die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysine war aufgrund der Amino- und Carboxyfunktionalisierung des PEG analog zur Kopplung von Aminosäuren durchzuführen (Abb. 9, 2) und erlaubte in einer dritten Sequenz die parallele Fortführung der Synthese mit dem EGFR-Binderpeptid YHWYGYTPQNV (,,SYN-B1“), sowie im Falle von SAB-Y1-ac eine abschließende Acetylierung der beiden freien N-Termini (Abb. 9, 3).

Außer der Dissoziationskonstanten war die genaue Interaktionsweise von SYN-B1 mit EGFR nicht bekannt (Li et al., 2005), ferner wurde das im Zuge der Phage-Display-Methodik identifizierte Peptid laut Hersteller (New England Biolabs<sup>10</sup>) als „Loop“, also C- und N-terminal an die Phagenhülle gebunden, präsentiert. Demnach war nicht zu beurteilen, ob die C- oder N-terminale Aminosäure interaktionsbestimmend ist. Von Li et al. (2005) wurde sowohl mit blockiertem C- als auch N-Terminus hohe Aktivität festgestellt, so dass unter der Annahme einer hauptsächlich Seitenketten-basierten Interaktion von Peptid und Rezeptorprotein die aliphatischen Aminosäure Ile an PEG<sub>27</sub> angeknüpft wurde. SYN-B1 behielt infolge dessen seine ursprüngliche Orientierung mit C-terminalem Ile. Die ggf. löslichkeits- und interaktionsfördernden Eigenschaften der Tyrosin-Seitenkette (Wasserstoffbrückenbildung, Kation- $\pi$ -Wechselwirkungen des Aromatsystems mit positiv geladenen Arginin-Seitenketten u. a.) war als relativ bewegliche, N-terminale Aminosäure gegeben.

---

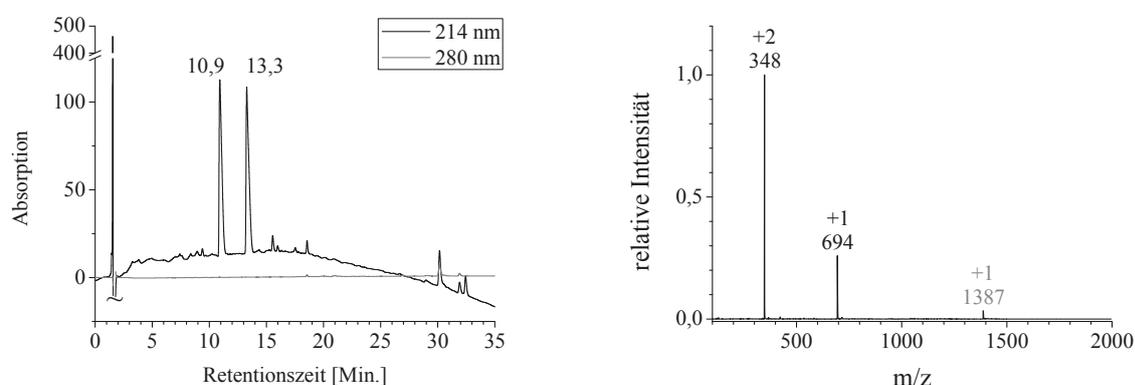
<sup>10</sup> <http://www.neb.com/nebecomm/products/producte8110.asp>



**Abb. 9:** Syntheschema von SAB-Y1-ac. Nach Synthese des fMLFK-Peptids (1 bzw. orange) erfolgte die Kopplung von Fmoc-NH-(PEG)<sub>27</sub>-OH an die ε-Aminogruppe der Lysine (2 bzw. grau) sowie anschließend die parallele Synthese der EGFR-Binder SYN-B1 und abschließende Acetylierung der freien Aminogruppen (3 bzw. blau).

### 3. Ergebnisse

Die Beladung des Wang-Harzes wurde über anschließende Fmoc-Abspaltung überprüft und ging nahezu quantitativ vonstatten. Die im Weiteren verwendete Kopplungschemie ließ keine Nebenreaktionen aufgrund freier Bindestellen am Harz erwarten. Die Synthese von fMLFKK erzielte ein hochreines Produkt mit  $M_{\text{obs}} = 694$  Da bei Retentionszeiten von 10,9 und 13,3 Min. (Abb. 10). Die gefundene Produktmasse stimmte jeweils mit der theoretisch berechneten  $M_{\text{calc}} = 694$  Da sehr gut überein. Zweifach protonierte Spezies wurden mit  $M_{\text{obs}} = 348$  Da und Dimere mit  $M_{\text{obs}} = 1387$  Da beobachtet. Das Isotopenmuster belegte die ein- und zweifach protonierte Produktspezies, weshalb das Dimer als MS-Artefakt im Zuge hoher Probenkonzentration angesehen wurde. Konsequente Schutzgruppenchemie und das Fehlen freier reaktiver Gruppen am Molekül ermöglichten überdies keine Dimerisierung.



**Abb. 10:** LC-MS-Analyse des Rohpeptids fMLFKK. Das LC-Chromatogramm zeigt links die Elution der Syntheseprodukte mit  $t_R = 10,9$  und  $13,3$  Min. Die den Retentionszeiten zugehörigen Massenspektren waren qualitativ sehr ähnlich und lieferten eine Produktmasse von je  $694$  Da. Ein Massenspektrum ist rechts beispielhaft für  $t_R = 10,9$  Min. gezeigt.

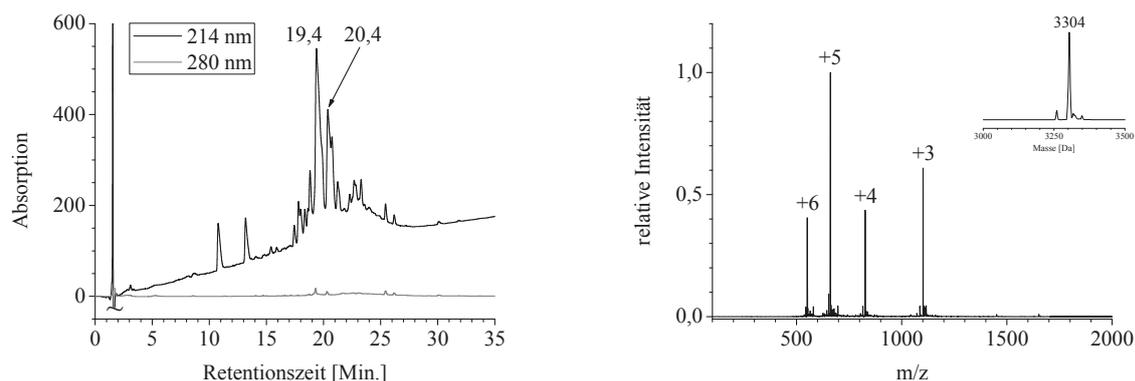
Nach der Kopplung von fMet wurde im LC-Chromatogramm erstmals eine Separierung in zwei massenidentische Peaks beobachtet. Demnach bildete sich hier ein diastereomeres Gemisch im Verhältnis von etwa 1:1, welches über die verwendete C4-RP-Säule aufgetrennt werden konnte. Die Verwendung von L-fMet-Bausteinen anderer Hersteller, um unzureichende Enantiomerenreinheit auszuschließen, führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Diastereomeres fMLFKK war in Chemotaxis-Versuchen voll aktiv (Kap. 3.10, 3.11) und für SAB erfolgte größtenbedingt keine diastereomere Separierung, weshalb die zeitsparende Kopplung kommerziellen fMet beibehalten wurde. Manuelle Formylierung von Met nach Abschluss der MLFKK-Synthese resultierte in eine uniforme Peptidspezies (Fachgebiet Proteinchemie, Prof. Becker, Karine Farbiarz; unveröffentlichte Daten). fMet war oxidationsanfällig, sofern das Peptidharz während der Synthese- und Waschvorgänge nicht

vorsichtig getrocknet wurde. Die Zugabe von DMS als Reduktionsmittel (Shechter et al., 1986) während der Abspaltung des Peptides vom Harz machte das Problem vernachlässigbar und erzielte stets vollständig reduziert vorliegendes fMet.

Um zunächst fMLFKK nebenproduktfrei zu synthetisieren und anschließend SAB über die  $\epsilon$ -Aminofunktion der Lysine weiter aufzubauen, wurde die Mtt-Schutzgruppe gewählt. Diese war pseudo-orthogonal schwach sauer abspaltbar und der Erfolg der Entschützung spektrometrisch nachvollziehbar. Eine ebenfalls pseudo-orthogonale Schutzgruppenstrategie mit ivDde und schwach basischen Abspaltbedingungen (3 % Hydrazin) wurde verworfen, da ivDde unter diesen Gegebenheiten, vermutlich aufgrund sterischer Unzugänglichkeit der recht großen Schutzgruppe nahe des Harzlinkers, nicht vollständig entfernt werden konnte.

Die Entfernung von Mtt verlangte saure Bedingungen, weshalb das Lösungsmittel von DMF auf DCM gewechselt wurde. Nach Abschluss der Entschützung und Rückkehr zu DMF verliefen erste Versuche zur Parallelkopplung eines PEG<sub>27</sub>-Bausteins je Lysin nicht quantitativ. Aufgrund der vorherigen Handhabung des Peptidharzes in DCM sollten dessen ggf. nachhaltig veränderte Quell- und Konformationseigenschaften als Ursache schlechter Effizienz ausgeschlossen werden. Daher wurde das Harz nach Mtt-Entschützung mit 600 ml Puffer H in DCM zunächst 15 Min. in DMF quellen gelassen und dann die PEG<sub>27</sub>-Kopplung über bis zu 4 Std. vorgenommen. Der hohen Viskosität der PEG<sub>27</sub>-Reaktionslösung und damit potentiell verbundenen, langsamen Kopplungsrate wurde begegnet, indem die Reaktionszeit ausgedehnt (über Nacht) sowie die Lösung temperiert wurde (37 °C). Es konnte keine Verbesserung erreicht werden, so dass eine 4-stündige Kopplungsdauer als das optimale Verhältnis aus Zeit und Kopplungseffizienz angenommen wurde. Eine Doppelkopplung von PEG<sub>27</sub> führte zu fast quantitativer Fmoc-Entschützung des während des ersten Kopplungszyklus' angeknüpften PEG<sub>27</sub>, somit zu PEG<sub>27</sub>-Addukten (Dimere) und wurde als Strategie verworfen.

Die PEG<sub>27</sub>-Kopplung erzielte nach 4 Std. zwei Produkte mit jeweils  $M_{\text{obs}} = 3304$  Da bei Retentionszeiten von 19,4 und 20,4 Min. (Abb. 11, fMLFKK-2PEG). Zur Verbesserung von LC-Auftrennung und MS-Ionisierung wurde Fmoc vor der Analyse entfernt. Die gefundene Produktmasse stimmte mit der über Dekonvolution des Ionisierungsmusters berechneten (3304 Da) sehr gut überein. Visuell war eine deutliche Volumenvergrößerung sowie Orange-Braun-Färbung des Peptidharzes auffällig.



**Abb. 11:** LC-MS-Analyse des Rohpeptids fMLFKK-2PEG. Das LC-Chromatogramm zeigt links die Elution der Syntheseprodukte mit  $t_R = 19,4$  und  $20,4$  Min. Die den Retentionszeiten zugehörigen Massenspektren waren qualitativ sehr ähnlich und lieferten eine Produktmasse von je 3304 Da. Ein Massenspektrum ist rechts beispielhaft für  $t_R = 19,4$  Min. gezeigt.

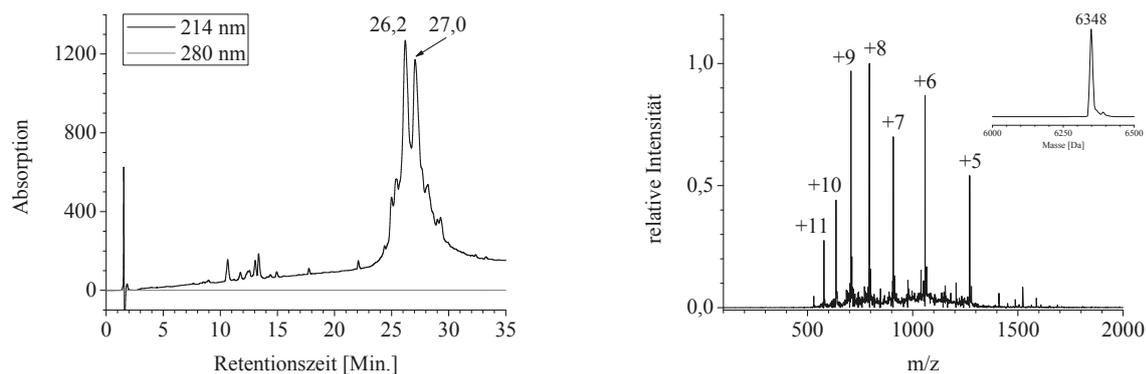
Die Synthesefortführung mit dem Aufbau des Peptids SYN-B1 an jeder der zwei PEG<sub>27</sub>-Bindestellen gestaltete sich problemlos. Zunächst wurden im Zuge der unvollständigen PEG<sub>27</sub>-Kopplung freie Aminogruppen mittels Acetylierung abgesättigt („Capping“), um diese Abbruchprodukte während der späteren Aufreinigung des Rohpeptids leichter abtrennen zu können. Der Schritt wurde verworfen, da keine nützlichen Retentionszeitunterschiede zwischen den (Abbruch-) Produkten resultierten. Somit führte die Kopplung von SYN-B1 zu SAB-Y1 und zwei Abbruchprodukten: fMLFKK mit je einem PEG<sub>27</sub>- und SYN-B1-Element (SAB-Y1- $\Delta$ 1) sowie fMLFKK mit zwei SYN-B1-Komponenten (SAB-Y1- $\Delta$ 2, Tab. 2).

SAB-Y1	SAB-Y1- $\Delta$ 1	SAB-Y1- $\Delta$ 2
fMLFKK     PEG <sub>27</sub>     SYN-B1	fMLFKK     SYN-B1 PEG <sub>27</sub>   SYN-B1	fMLFKK     SYN-B1 SYN-B1

**Tab. 2:** Schema der SAB-Y1-Syntheseprodukte. Für SAB-Y1-ac ist SYN-B1 jeweils N-terminal acetyliert (SAB-Y1-ac, SAB-Y1- $\Delta$ 1-ac, SAB-Y1- $\Delta$ 2-ac).

Nach abschließender Fmoc-Entschützung wurden zwei Produkte mit jeweils  $M_{\text{obs}} = 6348$  Da bei Retentionszeiten von 26,2 und 27,0 Min. erzielt (Abb. 12). Dabei war die diastereomere Trennung ausschließlich bei der LC-MS-Analyse im Zuge geringer Probenmenge und hochauflösender C4-RP-Säule möglich. Die gefundene Produktmasse stimmte mit der berechneten Masse von 6348 Da sehr gut überein.

### 3. Ergebnisse

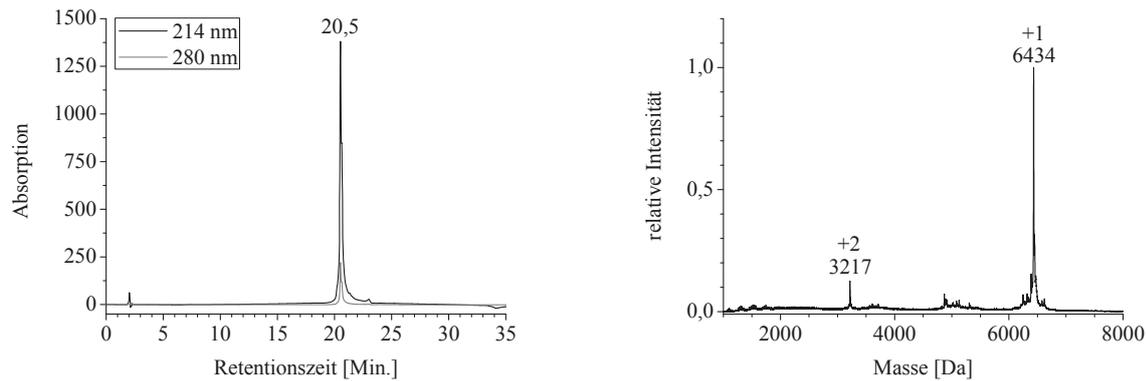


**Abb. 12:** LC-MS-Analyse des Rohpeptids SAB-Y1. Das LC-Chromatogramm zeigt links die Elution der Syntheseprodukte mit  $t_R = 26,2$  und  $27,0$  Min. Die den Retentionszeiten zugehörigen Massenspektren waren qualitativ sehr ähnlich und lieferten eine Produktmasse von je 6348 Da. Ein Massenspektrum ist rechts beispielhaft für  $t_R = 26,2$  Min. gezeigt.

Eine spätere Acetylierung von SAB-Y1 verlief quantitativ innerhalb von 30 Min. (Kaisertest) und lieferte das Zielprodukt SAB-Y1-ac. Nach Abspaltung des Peptids vom Harz wurden 340 mg Rohpeptid erhalten. Diese Ausbeute von etwa 25 % im Bezug auf den Synthesemaßstab wurde in Puffer C gelöst, filtriert und zu jeweils 100 mg auf eine semipräparative C4-RP-Säule (250 x 22 mm) appliziert. Bei einer Flussrate von 10 ml/Min. wurde über einen Gradienten von 35 - 45 % Puffer B in A in 60 Min. die erste Aufreinigung erzielt. Im Zuge einer Fraktionssammlung alle 30 Sek. konnte keine hochreine Fraktion erhalten werden. Nachhaltige Verunreinigungen waren SAB-Y1- $\Delta$ 1-ac und SAB-Y1- $\Delta$ 2-ac, auch bei Nutzung von lediglich 10 % der maximalen Säulenkapazität mit 20 mg Rohpeptid. Die gemäß MALDI-MS saubersten Fraktionen wurden vereint, gefriergetrocknet und wiederum in Puffer C gelöst. Es folgten zwei weitere Aufreinigungen über 60 Min., nun jeweils mit einer kleineren, semipräparativen C4-RP-Säule (250 x 10 mm), 3 ml/Min. Flussrate, einem Gradienten von 38 - 45 % Puffer B in A und Fraktionssammlung alle 10 Sek.

Mit einer Gesamtausbeute von ca. 1 % im Bezug auf den Synthesemaßstab konnte das Zielprodukt SAB-Y1-ac nach drei Reinigungsschritten hochrein erhalten werden. Die beobachtete Masse  $M_{\text{obs}} = 6344$  Da stimmte sehr gut mit der kalkulierten  $M_{\text{calc}} = 6432$  Da überein. Die Retentionszeit betrug 20,5 Min. (Abb. 13). Der PEG<sub>27</sub>-Anteil bestimmte signifikant die Retentionszeit von SAB, so dass eine diastereomere Separierung (vgl. Abb. 12, LC-MS mit hochauflösender Säule) aufgrund des relativ geringen Größenanteils von fMLFKK am Gesamtkonstrukt weder im analytischen noch im semipräparativen Maßstab erzielt werden konnte.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 13:** HPLC-Analyse (links) und MALDI-MS-Analyse (rechts) des aufgereinigten Peptids SAB-Y1-ac. Es eluierte mit der Retentionszeit 20,5 Min. und besaß eine Masse von 6434 Da.

Eine potentiell zeitsparende, direkte Aufreinigung nach Fällung in Puffer G resolubilisierten Rohpeptids wurde verworfen. Während die Auftrennung akzeptabel war, eluierte das Peptid überwiegend im Injektionspeak, was vermutlich der guten Löslichkeit des Peptids in Puffer G geschuldet war. Ein weiterer Aufreinigungsversuch in Puffer X, einer Puffersalz-freien Variante von Puffer C mit leicht saurem pH (4,7) erzielte schlechte Auftrennung und wurde ebenfalls verworfen. Eine polare, hydrophile Säulenphase (HILIC), um ein höher aufgelöstes Trennprofil des relativ hydrophilen SAB-Y1-ac und seiner Abbruchprodukte zu erzielen, wurde getestet und lieferte ebenfalls mangelhafte Separierung der Syntheseprodukte.

Eine Übersicht aller synthetisierten Peptide dieser Arbeit ist in Tab. 3 aufgeführt sowie weitere Details im Anhang (Tab. 1 - 3). SAB-Y1 musste zunächst via semipräparativer C4- und anschließend zweimaliger C18-RP-HPLC (250 x 10 mm) isoliert werden. SYN-B1 konnte über einmalige, semipräparative C4-RP-HPLC (250 x 22 mm) aufgereinigt werden. SYN-B1-AOAc wurde als Rohpeptid eingesetzt (siehe Kap. 3.2). Synthese und Aufreinigung der fluoreszenzmarkierten Peptide (FAM-) werden im nachfolgenden Abschnitt gesondert erläutert.

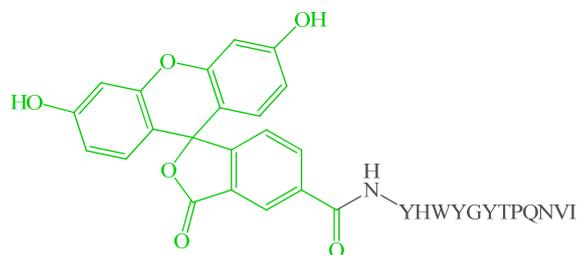
Bezeichnung	Struktur / Schema	Masse	Ausbeute
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1	H-YHWYGYTPQNVI-(PEG) <sub>3</sub> -K-NH   FAM	2273 Da	27 %
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1-ac	ac-YHWYGYTPQNVI-(PEG) <sub>3</sub> -K-NH   FAM	2316 Da	5 %
FAM-SAB-Y1-ac	FAM-MLFKK-OH    PEG27    SYN-B1-ac	6762 Da	0,2 %
FAM-SYN-B1	FAM-YHWYGYTPQNVI-OH	1899 Da	46 %
SAB-Y1	fMLFKK-OH    PEG27    SYN-B1	6348 Da	1 %
SAB-Y1-ac	fMLFKK-OH    PEG27    SYN-B1-ac	6432 Da	1 %
SYN-B1	H-YHWYGYTPQNVI-OH	1541 Da	62 %
SYN-B1-AOAc („Ox-AOAc“)	AOAc-YHWYGYTPQNVI-OH	1612 Da	nicht aufgereinigt

**Tab. 3:** Übersicht aller synthetisierten Peptide.

### 3.1.1 Fluoreszenzmarkierung von Peptiden

Einige der Peptide aus Tab. 3 wurden auch als fluoreszenzmarkierte Varianten hergestellt, um Bindungsmuster und Affinitäten dieser Peptide an kultivierten Tumorzellen nachzuvollziehen. Dabei war das Ziel, möglichst geringfügige Modifikationen am Peptid vorzunehmen, welche das Anbringen eines Fluoreszenzfarbstoffs ermöglichten. So sollte die ursprüngliche Funktionalität wenig beeinträchtigt werden. Mit Carboxyfluorescein wurde ein von Zellkulturen gut tolerierter Farbstoff gewählt, welcher via freier Aminogruppe am Peptid über NHS-Chemie angebracht werden konnte (Abb. 14). Zur Fluoreszenzmarkierung von SAB mit gleicher Chemie wurde fMet gegen Met ausgetauscht, da die fMLF-Funktion für die

Bindungstests an EGFR von Tumorzellen (Kap. 3.12) nicht relevant war und erwartet wurde, dass der Farbstoff durch die räumliche Abtrennung die Interaktionsfähigkeit nicht behindert.



**Abb. 14:** Fluoreszenzmarkierung von Peptiden (hier: SYN-B1; grau) mit Carboxyfluorescein („FAM“; grün). Schematisch ist hier das Produkt FAM-SYN-B1 gezeigt.

Über Fmoc-Synthese wurde das jeweilige Peptid analog zu Kap. 2.4.1 bzw. 3.1 erhalten und nach abschließender Fmoc-Entfernung N-terminal mit Fluorescein markiert (z. B. FAM-SYN-B1; Kap. 2.4.3).

Bei zusätzlicher Acetylierung an einer weiteren freien Aminogruppe (z. B. FAM-KPEG<sub>3</sub>SYN-B1-ac) war der Zeitpunkt der Fluoreszenzmarkierung für hohe Ausbeuten ausschlaggebend. Die Acetylierung wurde zuerst durchgeführt, da der peptidische N-Terminus Fmoc- sowie das C-terminale Lys an seiner  $\epsilon$ -Aminogruppe Mtt-geschützt war und basenkatalysierte Fmoc-Entschützung gekoppeltes FAM sonst teilweise entfernte. Die Kopplung des relativ zu PEG<sub>27</sub> deutlich kürzeren Polymers Fmoc-NH(PEG)<sub>3</sub>-OH verlief nahezu quantitativ und wies auf einen im Vergleich zu PEG<sub>27</sub> sterisch günstigeren Zugang des niedermolekularen Polymers zur  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys hin.

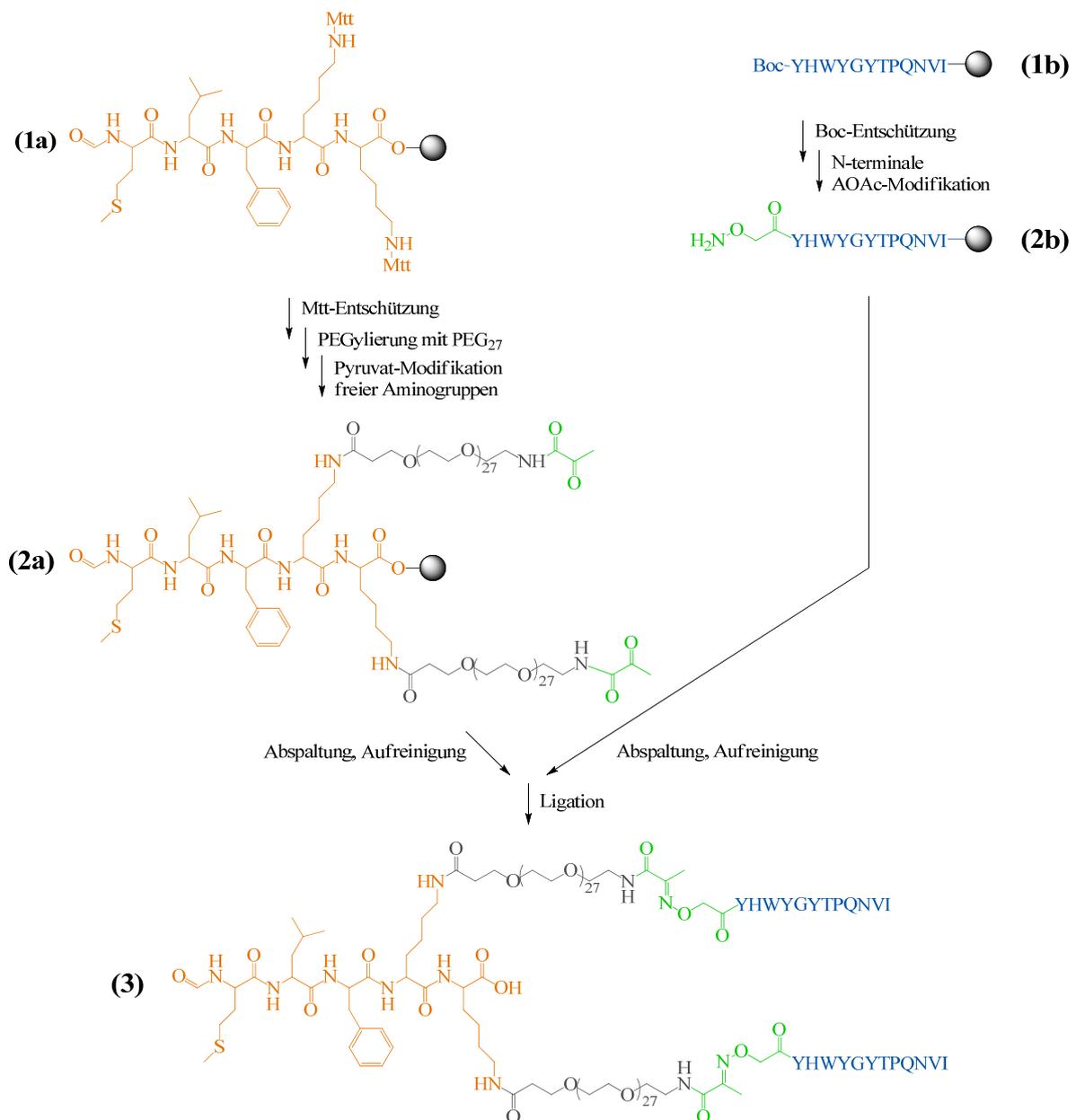
Zur Markierung von SAB-Y1-ac wurde mit Boc-Met-OH eine pseudo-orthogonale Schutzgruppenchemie verwendet, um zu vermeiden, dass erst aufwändigere Modifikationen an fMLF die FAM-Kopplung ermöglichen. Boc konnte mit 50 % TFA in DCM (v/v) in zweimal 5 Min. entschützt werden. Beurteilt anhand der erhaltenen Rohproduktmenge, wurden dabei keine signifikanten Mengen Peptid vom Wang-Harz abgespalten.

Die FAM-Markierung verlief bei linearen Peptiden mit gutem Erfolg und lieferte Ausbeuten von 27 - 46 % reinen Peptids im Bezug auf den Synthesemaßstab. Acetylierte Peptide zeigten eine schlechte Auftrennung der markierten und unmarkierten Fraktionen per RP-HPLC und erzielten deutlich reduzierte Ausbeuten von 0,2 - 5 %. In Anbetracht der ebenfalls geringen Materialmenge an SAB-Y1-ac nach Aufreinigung (1 %; Kap. 3.1) war eine Ausbeute von 0,2 % im Bezug auf den Synthesemaßstab von FAM-SAB-Y1-ac nachvollziehbar.

### 3. Ergebnisse

Fluoreszenzmarkierte FAM-KPEG-Peptide benötigten jeweils zweifache, FAM-SAB-Y1-ac vierfache semipräparative C4-RP-Reinigung (250 x 22 mm). FAM-SYN-B1 konnten über einmalige, semipräparative C4-RP-HPLC aufgereinigt werden (s. Anhang, Tab. 1 - 3).

#### 3.2 Konvergente Synthese des SAB



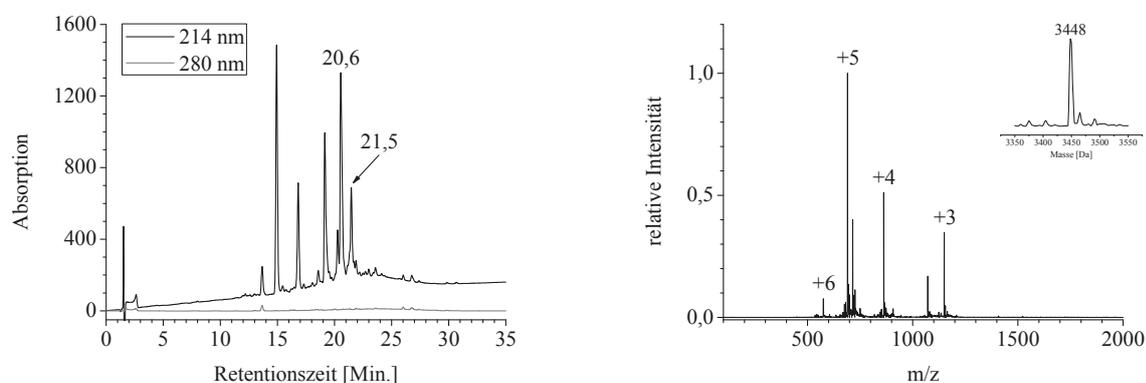
**Abb. 15:** Schema einer konvergenten Synthese von SAB-Y1-kon. Ausgehend von der SAB-Totalsynthese (Abb. 9) wird das Grundgerüst aus der fMLFKK-Sequenz und den zwei PEG<sub>27</sub>-Linkern mit Pyruvat (Ox-Pyr, 1a - 2a), der Ligationspartner SYN-B1 mit Aminoxyessigsäure modifiziert (Ox-AOAc, 1b - 2b). Unter Bildung eines Oxims (3, grün) reagieren die zwei Bausteine zu SAB-Y1-kon (3). Im Vergleich mit SAB-Y1 war SYN-B1 im Molekül SAB-Y1-kon sequenzinvertiert angebracht.

### 3. Ergebnisse

Die beschriebene Totalsynthese des SAB (Abb. 9) verlangt eine vollständige Planung der Peptidsequenzen und ihrer Position im SAB-Molekül. Ein nachträglicher Austausch von Aminosäuren bedeutet die Notwendigkeit einer *de novo* Synthese der SAB-Derivats.

Im Gegensatz dazu bieten konvergente Synthesestrategien, z. B. mit Hilfe der Oximligation, eine Möglichkeit, SAB aus sinnvoll gewählten Bausteinen zu generieren, welche bereits aufgereinigt zügig zum fertigen Molekül kombiniert werden können. Die zur Oximligation der SAB-Bausteine notwendigen Modifikationen sind sowohl relativ niedermolekular als auch nach erfolgreicher Ligation inert und lassen keine signifikante Beeinträchtigung der ursprünglichen Funktionalität erwarten.

Die Strategie zur konvergenten Synthese von SAB-Y1 via Oximligation sah vor, zum Erreichen orthogonaler Reaktivität zunächst ein Grundgerüst aus der immunogenen fMLFKK-Sequenz und den zwei PEG<sub>27</sub>-Linkern N-terminal mit Pyruvat zu modifizieren (Ox-Pyr; Abb. 15, 1a - 2a). Der Ligationspartner SYN-B1 wurde mit Aminoxyessigsäure modifiziert (Ox-AOAc; Abb. 15, 1b - 2b) und enthielt infolgedessen ein starkes Nucleophil, so dass beide Bausteine via Oxim selektiv und schnell miteinander zu SAB-Y1-kon verbunden werden konnten (Abb. 15, 3). Dabei war SYN-B1 in SAB-Y1-kon verglichen mit SAB-Y1 sequenzinvertiert angebracht.

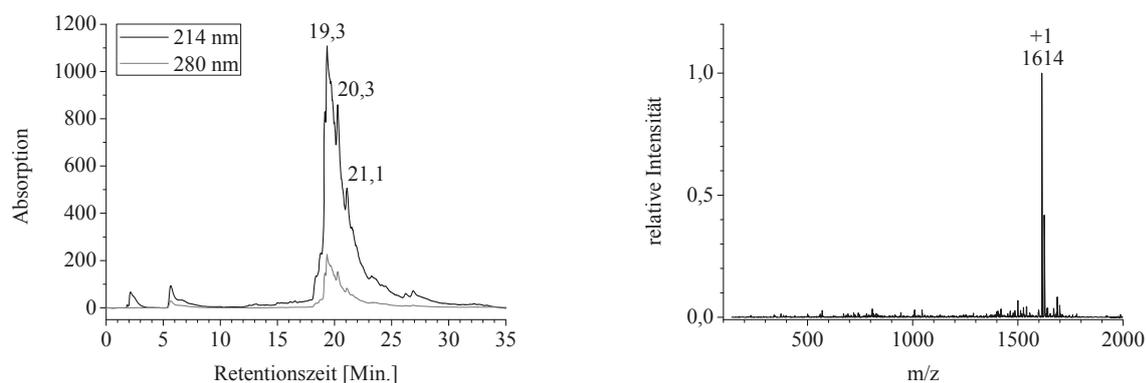


**Abb. 16:** LC-MS-Analyse des Rohpeptids Ox-Pyr. Das LC-Chromatogramm zeigt links die Elution der Syntheseprodukte mit  $t_R = 20,6$  und  $21,5$  Min. Die den Retentionszeiten zugehörigen Massenspektren waren qualitativ sehr ähnlich und lieferten eine Produktmasse von je 3448 Da. Ein Massenspektrum ist rechts beispielhaft für  $t_R = 20,6$  Min. gezeigt.

Die N-terminale Pyruvat- (Ox-Pyr) bzw. Aminoxyessigsäure-Modifikation (Ox-AOAc) musste jeweils dreifach durchgeführt werden. Für Ox-Pyr konnte keine quantitative Modifikation via Festphasensynthese erreicht werden. Ein Reaktionsansatz mit 50 mM Ox-Pyr in Lösung sowie darüber hinaus unveränderten Reaktanden und Bedingungen erzielte

keine Verbesserung. Die Masse von  $M_{\text{obs}} = 3448$  Da bei einer Retentionszeit von 20,6 und 21,5 Min. stimmte unter der Annahme eines Natriumaddukts (+ 23 Da) von Ox-Pyr sehr gut mit der berechneten  $M_{\text{calc}} = 3423$  Da überein (Abb. 16). Weitere lokale Absorptionsmaxima wurden durch Abbruchprodukte im Zuge unvollständiger PEG-Kopplung verursacht (vgl. Kap. 3.1).

Das Zielprodukt wurde nach der Abspaltung auch in der Etherphase identifiziert. Hier wurden flüchtige Lösungsmittel der Abspaltungs- und Aufarbeitungsschritte per Rotationsverdampfer und der unerwünschte Rückstand von wenigen Millilitern TFA nach Zugabe von Puffer G per Gefriertrocknung entfernt. Das hochviskose, dunkelbraune Rohpeptid jeder Phase konnte in Puffer C gelöst werden. Aufreinigungsversuche mit C4- und C18-RP-Säulen sowie Puffer A und B als mobiler Phase ließen auch bei sehr flachen Elutionsgradienten keine Isolation reinen Ox-Pyr zu. Es wurde erwartet, dass trotz mangelhafter Reinheit eine Oximreaktion möglich ist, also grundlegende Funktionalität gezeigt werden kann. Daher wurde unaufgereinigtes Ox-Pyr zu Ligationstests eingesetzt.



**Abb. 17:** HPLC- und ESI-MS-Analyse des Rohpeptids Ox-AOAc. Das HPLC-Chromatogramm zeigt links die Elution des Syntheseprodukts mit  $t_R = 19,3$  Min. Das dieser Retentionszeit zugehörige Massenspektrum lieferte eine Produktmasse von 1614 Da. Die weiter verzeichneten Retentionszeiten stellten *p*-Cresol- ( $t_R = 20,3$  Min.) und Carbonyladdukte ( $t_R = 21,1$  Min.) von Ox-AOAc dar.

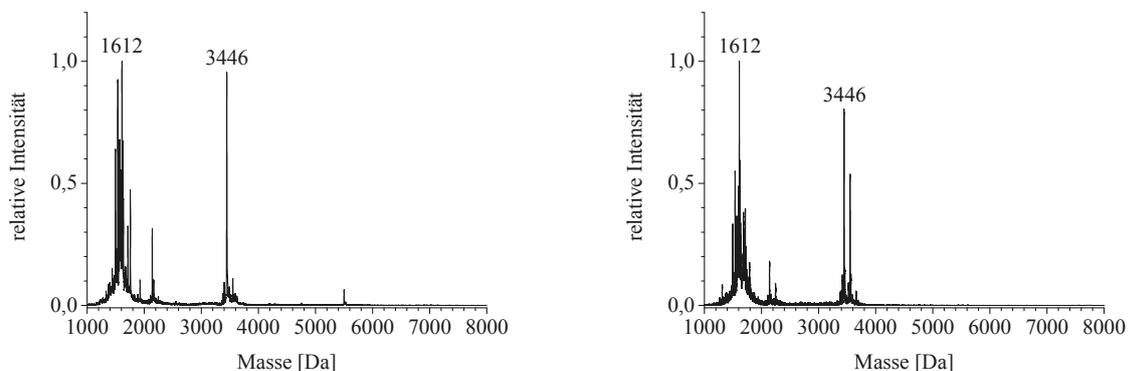
Ox-AOAc konnte quantitativ modifiziert werden. Die Masse von  $M_{\text{obs}} = 1614$  Da bei einer Retentionszeit von 19,3 Min. stimmte sehr gut mit der berechneten  $M_{\text{calc}} = 1614$  Da überein (Abb. 17). Der im Gegensatz zum eindeutigen Massenspektrum breite Produktpeak im HPLC-Chromatogramm war Carbonyladdukten aufgrund der verwendeten HPLC-Puffer A und B (Retentionszeit 20,3 Min.) sowie *p*-Cresol-Addukten geschuldet (Retentionszeit 21,1 Min.). Ox-AOAc wurde sehr rein als Rohpeptid erhalten und direkt für Ligationsexperimente

### 3. Ergebnisse

eingesetzt, da Carbonyladdukte trotz frischer und entgaster Puffer keine Aufreinigung über die Qualität des Rohprodukts hinaus zuließen und nicht zu erwarten war, dass reaktionsunfähiges Ox-AOAc den Ligationvorgang beeinträchtigte.

Die Oxim-Ligationsansätze verlangten als Basis ein Carbonyl-freies Puffersystem, um das volle Reaktionspotential von Ox-AOAc zu gewährleisten. Die Verwendung kommerziellen, hochreinen Wassers ließ noch nach mehreren Stunden den Nachweis ausschließlich adduktfreien Peptids zu und wurde als notwendiger Standard für Oxim-Ligationsansätze angenommen. In den Ligation-Testansätzen mit den Puffern U, V und W (Ligation U, V, W) löste sich unaufgereinigtes Ox-Pyr vollständig zu 120 mg/ml (35 mM), während Ox-AOAc-Rohpeptid in Puffer U quantitativ, in den Puffern V und W jedoch nur unvollständig gelöst werden konnte. Die Reaktionen in V und W mussten daher um den Faktor 5 verdünnt werden. Die pH-Werte der Ansätze blieben über den Versuchszeitraum konstant.

Leicht saures Reaktionsmilieu mit etwa pH 4,5 ist Voraussetzung für eine zügige Oximbildung. Dies führte zur Auswahl von Puffer U und W. Dirksen et al. (2008) erzielten jedoch auch unter physiologischem pH 7,0 gute Ligationserfolge, weshalb Puffer V mit einem solchen pH getestet wurde, etwa falls aus Löslichkeitsgründen der peptidischen Reaktanden ein solches Milieu notwendig ist.



**Abb. 18:** MALDI-MS des Ligationansatzes U zum Zeitpunkt  $t_0$  (links) und nach Abschluss der Reaktion (rechts). Die Masse 1612 Da entsprach unreaktiertem Ox-AOAc, die Masse 3446 Da unreaktiertem Ox-Pyr.

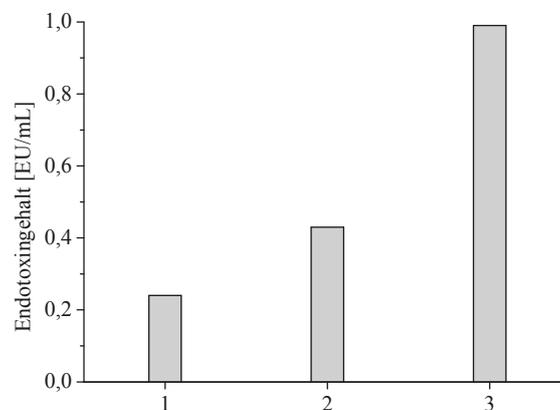
Nach bis zu 72 Std. Reaktionszeit war in allen Ansätzen jeweils unreaktiertes Edukt und kein Produkt nachweisbar (Abb. 18, rechts). Da insbesondere in Gegenwart des Ligationmediators Anilin (Dirksen et al., 2008) von einer messbaren Produktbildung innerhalb weniger Stunden auszugehen war, wurde für weitere 24 Stunden versucht, durch Erwärmen auf 37 °C und

Ansäuern der Ansätze U und W auf pH 4,0 die Ligation der Edukte zu begünstigen, indem sich Ox-Pyr unter diesen Bedingungen möglicherweise vollständig zugänglich für Ox-AOAc „entfalten“ könnte. Dennoch konnte nach bis zu 24 Stunden in keinem Ansatz Produkt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Messungen im Positiv- und Negativmodus der MALDI-MS ließen weiterhin keinen entsprechenden Nachweis zu. Die aufgenommenen Massenspektren aller Zeitpunkte ähnelten qualitativ der Analyse zum Zeitpunkt  $t_0$ . (Abb. 18, links).

### 3.3 Endotoxingehalt der synthetisierten Peptide

Endotoxine als bakterielle (Zellwand-)Bestandteile können Proteinen und Peptiden anhaften. Im Falle von SAB birgt eine solche Kontamination für den Zielorganismus die Gefahr, eine starke Immunantwort bis hin zum Schock auszulösen. Wenngleich eine GMP-konforme SAB-Produktion in nicht spezialisierten Laboren unmöglich ist, so sollte sichergestellt werden, dass in ersten Tierversuchen einzusetzende SAB-Peptide keine inakzeptabel hohe Endotoxinbelastung aufweisen.



**Abb. 19:** Bestimmung des Endotoxingehalts von im eigenen Labor hergestellten Puffern, autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O (0,24 EU/ml; 1), autoklaviertem PBS (0,43 EU/ml; 2) und sterilfiltriertem PBS (0,99 EU/ml; 3). Negativkontrolle, SAB-Y1-ac Rohprodukt und SAB-Y1-ac nach Aufreinigung in jeweils kommerziellem Puffer L lagen unterhalb des Detektionslimits von 0,1 EU/ml.

Die Bestimmung des Endotoxingehalts lieferte Werte unterhalb des Detektionslimits von 0,1 EU/ml für SAB-Y1-ac, welches in kommerziellem Puffer L mit explizit geringem Endotoxingehalt gelöst war. Das Ergebnis wurde durch einen Dienstleister bestätigt (BSL Bioservice, Planegg, Deutschland). Somit wurde gezeigt, dass SAB trotz nicht GMP-

konformer Synthese und Aufreinigung mit zunächst ausreichender Reinheit erhalten werden konnte.

Puffer L wurde auch mit Labormitteln selbst hergestellt und lieferte dort einen relativ hohen Endotoxingehalt von ca. 1 EU/ml (Abb. 19, Punkt 3) sowie nach einmaliger Autoklavierprozedur Werte zwischen 0,2 - 0,4 EU/ml (Punkt 2). Sterilfiltrierte, laborseitig hergestellte Puffer lieferten ebenso Werte von ca. 1 EU/ml. Aus Material- und Kostengründen konnten hier nur Orientierungswerte durch Einfachbestimmung erhalten werden.

Somit waren im eigenen Labor hergestellte Puffer endotoxinbelastet und ungeeignet zum Lösen und Applizieren von SAB. Voraussetzung für die komplikationsfreie Anwendung von SAB war die Verwendung kommerziellen, endotoxinarmen Lösungsmittels.

#### **3.4 Löslichkeit der synthetisierten Peptide**

Die gute und vollständige Löslichkeit eines Peptids ist Voraussetzung für seine potentiell maximale Interaktion mit einem molekularen Partner. Unvollständige Löslichkeit setzt die Effizienz der Interaktion mangels Verfügbarkeit herab, etwa indem ein Peptid als Aggregat aus der Lösung ausfällt. In kleineren, weiterhin löslichen Clustern können zumindest wichtige interaktionsbestimmende Gruppen blockiert sein, beispielsweise H-Brücken-koordinierende Seitenketten. In beiden Fällen wäre die Wirksamkeit einer Substanz wie SAB aufgrund seiner unbekannt effektiven Konzentration nicht nachzuvollziehen. Die gute Löslichkeit von SAB-Peptiden in für spätere Experimente geeigneten Puffersystemen musste daher gewährleistet sein, um diesen Faktor als Grund für ggf. abweichende Reaktivität auszuschließen.

Die einfache Verwendbarkeit würde gefördert, wenn eine SAB-Stammlösung mit dem im jeweiligen Experiment geforderten Puffer verdünnt werden könnte, ohne dass etwa ein Pufferwechsel notwendig wäre, welcher wiederum Materialeinbußen bedingen würde. Daher wurde zunächst versucht, die SAB-Peptide in reinem Wasser vollständig zu lösen. Um ggf. spätere experimentelle Anforderungen zu testen, wurden nachfolgend Verdünnungen mit den einfachen, verbreitet angewendeten und relativ physiologischen Salzpuffern PBS und Tris vorgenommen.

Dies gestaltete sich im Fall von SAB-Y1 problemlos, da eine unmittelbare, vollständige Wasserlöslichkeit und komplikationsfreie Verdünnung in besagten Salzpuffern gegeben war. Die Löslichkeit war für sämtliche Versuche in dieser Arbeit ausreichend und betrug mehr als

6 mg/ml (> 1 mM). Weitere Peptide konnten ebenfalls gut in einem der drei Puffersysteme Wasser, PBS (Puffer E) oder Tris (Puffer F) gelöst werden (Tab. 4).

Bezeichnung	System	Löslichkeit
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1	Puffer F	1 mg/ml (ca. 0,5 mM)
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1-ac	Puffer F	1 mg/ml (ca. 0,5 mM)
FAM-SAB-Y1-ac	H <sub>2</sub> O, Puffer F	1 mg/ml (ca. 0,2 mM)
FAM-SYN-B1	0,5x Puffer D	2 mg/ml (ca. 1,0 mM)
SAB-Y1	H <sub>2</sub> O	6 mg/ml (ca. 1,0 mM)
SAB-Y1-ac	H <sub>2</sub> O, Puffer F	2,5 mg/ml (ca. 0,4 mM)
SYN-B1	H <sub>2</sub> O, Puffer E	1,5 mg/ml (ca. 1 mM)
SYN-B1-AOAc	H <sub>2</sub> O	1,5 mg/ml (ca. 1 mM)

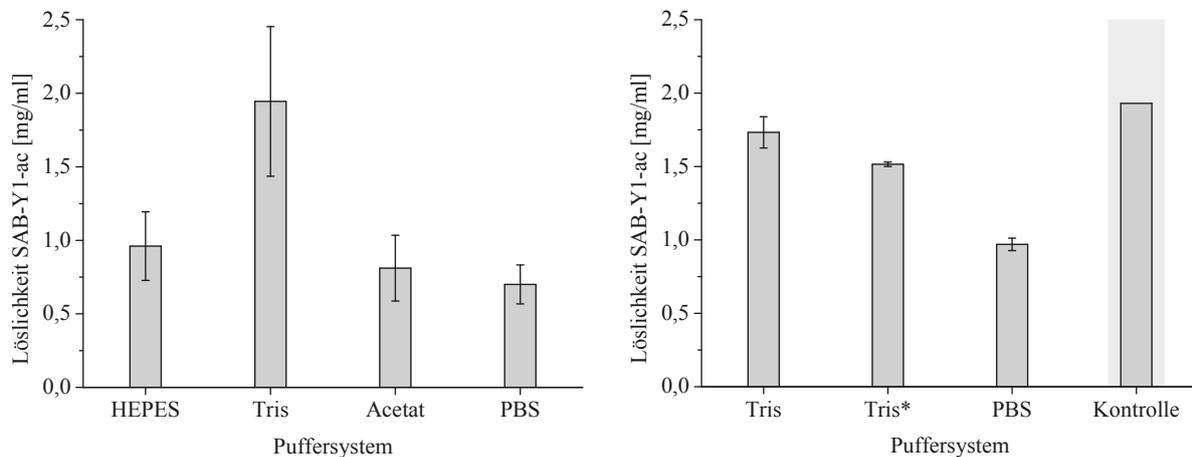
**Tab. 4:** Löslichkeit von SAB-Peptiden und -Komponenten.

Eine detaillierte Untersuchung war für SAB-Y1-ac notwendig, da die Acetylierung der zwei terminalen Aminogruppen offenbar eine signifikante Veränderung der Löslichkeitseigenschaften verursachte. Das Peptid konnte ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml in keinem der drei Puffersysteme spontan, vollständig und reproduzierbar gelöst werden. Steigender Salzgehalt wurde in ersten Tests als besonders problematisch identifiziert. Unter dem Aspekt einer möglichen Formulierung für pharmazeutische Verwendung war neben der Etablierung eines verlässlichen Puffersystems für höchstmögliche Löslichkeit außerdem das Ziel, eine anwenderfreundliche Darreichungsform zu liefern, etwa als Lyophilisat zusammen mit Puffersalz. Somit würde die Zugabe reinen Wassers ohne die Notwendigkeit erneuter Konzentrationsüberprüfung oder gar weiterer Aufarbeitungsschritte ein applikationsfähiges Produkt ergeben.

Ein erster Test mit organismisch gut tolerierten, gebräuchlichen, schwach gepufferten Systemen (20 mM HEPES, Tris, Natriumacetat; 0,5-fach PBS) zeigte, dass Tris die Löslichkeit des Peptids SAB-Y1-ac mit bis zu 2,5 mg/ml am effektivsten fördert (Abb. 20, links). Die Puffer wurden dabei mit weitgehend physiologischem pH eingesetzt (pH 7,5 - 8,5; außer Natriumacetat: pH 4,5). Gebräuchliche und organismisch gut tolerierte

### 3. Ergebnisse

Formulierungsadjuvantien (Prof. Dr. Andreas Zimmer<sup>11</sup>) wie Zucker (hier: Saccharose, 0 - 200 mM) und Zuckeralkohole (hier: D-Mannitol, 0 - 200 mM) zeigten keinen Einfluss. Alkoholische Zusätze wie etwa Glycerin oder Glycole wurden zu diesem Zeitpunkt nicht weiter verfolgt, um Zellkultur-basierte Experimente nicht zu verfälschen.



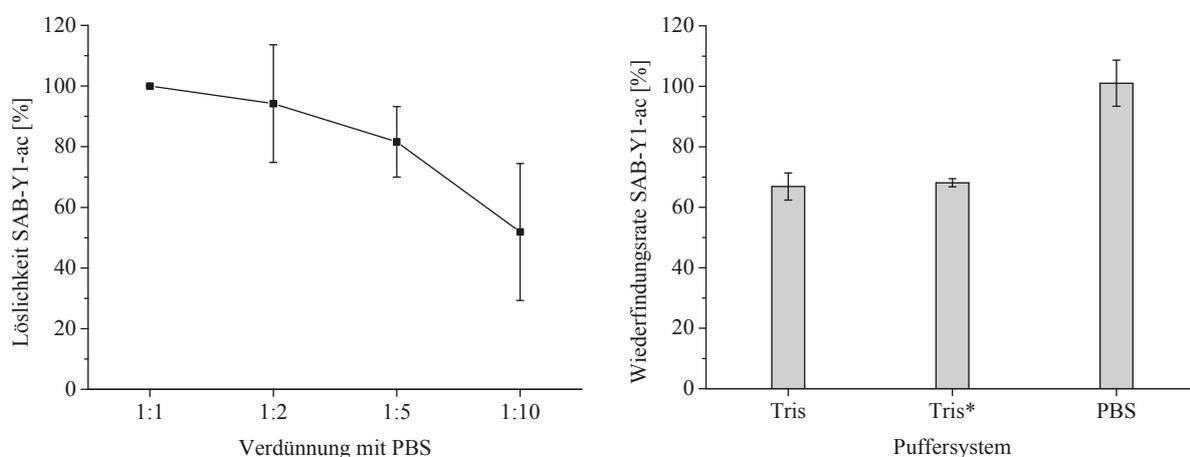
**Abb. 20:** *Testung verschiedener Puffer zum Lösen von SAB-Y1-ac. Preliminär wurde mit geringem Salzgehalt (20 mM; PBS: 0,5-fach) bei relativ neutralem pH 7,5 (außer Acetat: pH 4,5; Tris: pH 8,5) getestet (links). Je Puffersystem wurden gleichzeitig Saccharose- und D-Mannitol (je 0 - 200 mM) als potentiell zusätzlich löslichkeitsvermittelnde Substanzen überprüft. Diese zeigten keinen Einfluss. SAB-Y1-ac löste sich in Tris mit gemittelt 2,0 mg/ml höchstmöglich. Detaillierte Untersuchungen (rechts) zeigten eine reproduzierbare Löslichkeit von ca. 1,7 mg/ml. Wärme- oder Ultraschallbehandlung (Tris\*) war nicht löslichkeitsfördernd. PBS lieferte deutlich geringere Löslichkeit. Als Kontrolle wurde das Peptid in Puffer G gelöst, in welchem SAB-Y1-ac während Synthese und Aufreinigung maximale Löslichkeit zeigte.*

Eine detaillierte Testung zeigte, dass SAB-Y1-ac reproduzierbar zu ca. 1,7 mg/ml in Tris gelöst werden kann (Abb. 20, rechts). Dabei wurde der pH-Wert auf 7,5 reduziert, um relativ physiologische Bedingungen zu leisten. Eine Wärme- (37 °C, 15 Min.) oder Ultraschallbehandlung (15 Min.) war nicht löslichkeitsfördernd. PBS erzielte mit 1 mg/ml die geringste Löslichkeit. Als Kontrolle fungierte Puffer G, welcher ein sehr gutes Lösungsmittel für Peptide ist und während Synthese bzw. Aufreinigung von SAB-Y1-ac verwendet wurde. Nach Aliquotierung, Gefriertrocknung und Resolubilisierung der Testansätze lieferte ausschließlich Puffer D die Ausgangskonzentration. Zusammen mit den preliminären Tests konnte eine maximale Löslichkeit von SAB-Y1-ac in Tris von 1,7 - 2,5 mg/ml bzw. 0,4 mM (Messfehler berücksichtigt) erwartet werden. Der Konzentrationsbereich war für

<sup>11</sup> [http://www.uni-graz.ac.at/pharmazie/pharmtech/docs/zimmer\\_7.pdf](http://www.uni-graz.ac.at/pharmazie/pharmtech/docs/zimmer_7.pdf)

### 3. Ergebnisse

nachfolgende Experimente ausreichend. Die Salzkonzentration war hinsichtlich der Löslichkeit ausschlaggebend, da PBS als Puffersystem mit dem höchsten Salzgehalt (> 100 mM) die niedrigste Löslichkeit lieferte. Die Art des verwendeten Salzes war möglicherweise ebenfalls von Bedeutung, da in den ersten Versuchen Puffer mit jeweils gleich hohem Salzgehalt (HEPES, Tris, jeweils 20 mM) etwa 1 bzw. 2 mg/ml Peptid lösten. Wenngleich PBS als ungeeignetes Puffersystem zum Erreichen einer hohen Konzentration an SAB-Y1-ac identifiziert wurde, so stellt es die physiologischste Lösung für eine potentielle Anwendung in Organismen wie Mensch oder auch Maus dar, welche für erste Tierversuche mit SAB ausgewählt wurde. In Tierexperimenten eingesetzte Konzentrationen wurden deutlich unter der Löslichkeitsgrenze von SAB-Y1-ac in Tris geplant. Aus dem Grund wurde überprüft, ob eine in Tris-Puffer angesetzte Stammlösung mit PBS verdünnt werden konnte. Das Experiment zeigte, dass dies mit einer Wiederfindungsrate von 30 - 80 % bei 1:10-Verdünnung sehr kritisch zu beurteilen war (Abb. 21, links). Unter der Voraussetzung einer Konzentrationsbestimmung vor jeder Anwendung via Absorptionsmessung konnte so gelöstes Peptid lediglich für erste Experimente eingesetzt werden.



**Abb. 21:** Verdünnung in Tris gelösten SAB-Y1-ac mit PBS (links). PBS verringert die Menge gelösten Peptids auf 30 - 80 % bei 1:10-Verdünnung. Die Wiederfindungsrate gelösten SAB-Y1-ac nach Gefriertrocknung im jeweiligen Puffersystem und Resolubilisierung über Zugabe von Wasser war für PBS quantitativ (rechts). Das Peptid wurde dazu im jeweiligen Puffersystem maximal löslich konzentriert eingesetzt.

Es wurde schließlich untersucht, inwiefern die Ausgangskonzentration von SAB-Y1-ac nach vollständigem Lösen im jeweiligen Puffer, anschließender Gefriertrocknung und erneutem Lösen über Wasserzugabe messbar war. Im Erfolgsfall könnte das Puffersystem eine benutzerfreundliche Anwendung ermöglichen, indem die Substanz, zuvor mitsamt

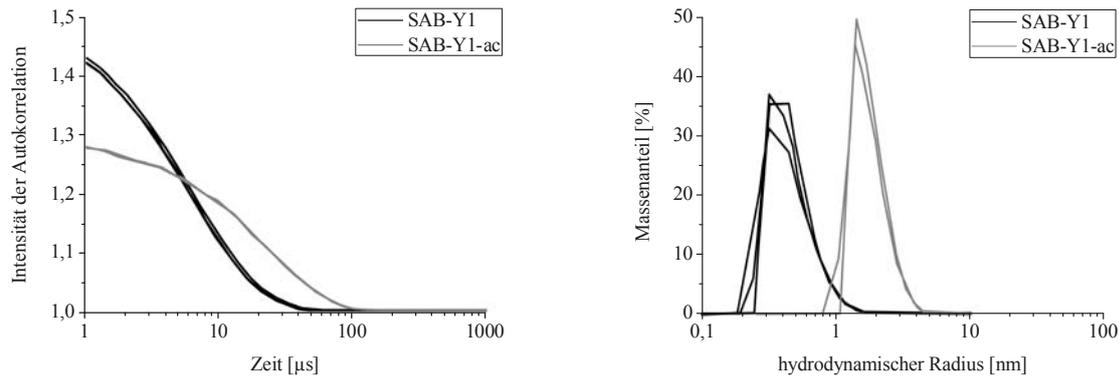
löslichkeitsförderndem Salz getrocknet, lediglich durch Wasserzugabe wieder vollständig gelöst wird. Es wurde festgestellt, dass bei einer Wiederaufnahme in Wasser nach im jeweiligen Puffersystem maximal gelöster Peptidmenge, PBS eine zuverlässige Wiederfindungsrate von ca. 100 % lieferte (Abb. 21, rechts). Eine Wiederfindungsrate von nur etwa 70 % beim Tris-System ließ vermuten, dass trotz hoher initialer Löslichkeit gefriergetrocknetes Peptidsalz keine volle Lösungsmittelinteraktion zuließ oder auch starke Anhaftung an die Gefäßwände ein Problem darstellte. Die Überprüfung der tatsächlichen Peptidkonzentration vor jedem Experiment war hier folglich unerlässlich.

Insbesondere ausgehend von der geringen Löslichkeit des SAB-Y1-ac in PBS und der starken Konzentrationsminderung bei Verdünnung mit selbigem Puffer wurde gefolgert, dass das molekulare SAB-Design problematisch hinsichtlich einer guten Löslichkeit in Gegenwart von Salzen oder möglicherweise Elektrolyten allgemein war und unter Aufrechterhaltung der Wirksamkeit löslichkeitsfördernde Modifikationen zu leisten waren.

#### **3.5 Dispersität des SAB**

Auch eine gute Löslichkeit wie etwa von SAB-Y1 in Wasser mit 6 mg/ml gibt keinen Aufschluss darüber, ob die Moleküle monomer vorliegen. Um theoretisch maximale Interaktion zwischen SAB und seinen molekularen Zielen zu ermöglichen, müssen daran beteiligte SAB-Strukturen, etwa zur H-Brücken-Bildung, frei verfügbar und zugänglich sein. Dies setzt ein monodispers-monomeres Vorkommen von SAB in Lösung voraus, was mittels Lichtstreuung überprüft werden kann. Dabei liefert die Kombination von dynamischer und statischer Lichtstreuung sowohl Daten zur Monodispersität als auch, via Molekulargewichtsbestimmung, zum monomeren Vorkommen der peptidischen Spezies.

Es wurden unterschiedliche hydrodynamische Radien und Molekulargewichte für SAB-Y1 und SAB-Y1-ac bestimmt. SAB-Y1-ac war mit  $R_h = 2$  nm deutlich größer als für SAB-Y1 mit 0,6 (Abb. 22) und resultierte mit kombinierten SLS-Messungen in ein apparentes Gewicht von  $4778 \pm 102$  Da für SAB-Y1 und  $9880 \pm 3$  Da für SAB-Y1-ac.



**Abb. 22:** Bestimmung des hydrodynamischen Radius von SAB-Y1 und SAB-Y1-ac per DLS. Hoch reproduzierbare Autokorrelationsfunktionen liefern einen  $R_h$  von etwa 0,6 nm für SAB-Y1 und von 2,0 nm für SAB-Y1-ac.

Die Annahme einer veränderten Viskosität oder eines erhöhten Brechungsindex aufgrund des PEG-Anteils (VCH-Online<sup>12</sup>) beeinflusste die Messwerte geringfügig. SAB-Y1-ac besitzt keine Aminosäuren (z. B. Cys) oder andere Modifikationen, welche Multimerbildung explizit begünstigen. Es wurde unterhalb der Löslichkeitsgrenze gemessen sowie nach Abschluss des Experiments die Probe zentrifugiert und ihre unveränderte Konzentration sichergestellt. Da der hydrodynamische Radius für SAB-Y1-ac mehr als dreifach höher war als für SAB-Y1, wurde es für wahrscheinlich gehalten, dass sich die PEG-Linker nur bei SAB-Y1-ac in Kombination mit N-terminal acetylierten SYN-B1 relativ linearisiert „entfalteten“ sowie mit einer entsprechenden Hydrathülle umgeben konnten (Branca et al., 2003), und dies zu den gemessenen Phänomenen führte. Die Koordination einer Hydrathülle durch PEG, welche das apparent drei- bis fünffache PEG-Molekulargewicht umfassen kann (Veronese et al., 2005), lässt eine gute Einordnung der gemessenen Werte zu, welcher demnach für SAB-Y1-ac zwischen ca. 6000 - 20000 Da betragen kann. Die freien Aminotermini im Falle von SAB-Y1 hingegen begünstigten z. B. über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem C-Terminus möglicherweise eine kompakte, „knäuelartige“ Struktur des PEG, indiziert durch den kleinen hydrodynamischen Radius relativ zu SAB-Y1-ac und auch das geringere apparente Molekulargewicht. Darüber hinaus nimmt die Methodik der Lichtstreuung ein globuläres Molekül an, was weder bei vollständig entfaltetem SAB-Y1-ac noch hochkompaktem SAB-Y1 zutraf und signifikante Abweichungen bedingen konnte.

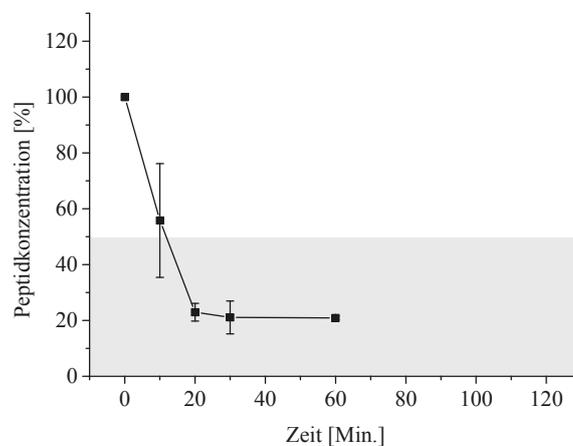
<sup>12</sup> [http://www.vch-online.de/index.php?option=com\\_content&task=view&id=38](http://www.vch-online.de/index.php?option=com_content&task=view&id=38)

### 3.6 Stabilität des SAB in Blutserum

Peptide bleiben in einem Organismus nur eine begrenzte Zeit in ihrer ursprünglichen Form erhalten. Proteasen, Ausscheidung über die Nieren, weitgehend irreversible, teils unspezifische Bindung an Zellen, Proteine und andere Faktoren verringern so die Bioverfügbarkeit peptidischer Wirkstoffe. Um abschätzen zu können, innerhalb welchen Zeitrahmens diese Vorgänge stattfinden, wurde die Stabilität von SAB-Peptiden in Blutseren von Maus, Kaninchen, Rind und Mensch getestet.

Während der Versuche wurden zu festgelegten Zeitpunkten Serumproben entnommen und aufgearbeitet. Die erfolgreiche Extraktion z. B. kleiner organischer Moleküle aus Blutserum mit relativ polaren Lösungsmitteln wurde zuvor gezeigt (Fällung mit Acetonitril; Olah et al., 1997) und für SAB abgewandelt, da über Acetonitril (100 %) nur SAB-Y1 quantitativ extrahiert werden konnte, nicht jedoch SAB-Y1-ac. Möglicherweise wurden Serumproteine zusammen mit SAB-Y1-ac effizient präzipitiert. Die ethanolische Extraktion (95 %) bot den Vorteil, größere Peptide, Proteine oder auch Fette auszufällen bzw. abzutrennen, während der jeweilige SAB vollständig und in Lösung erhalten werden konnte.

Über Ultrafiltration der Serumproben wurde SAB bereits teilweise abgetrennt. Der Flüssigkeitsrückstand im Filter wurde anschließend zweimal mit Ethanol extrahiert. Dabei zeigte sich weißlich-gelatinöser Ausfall, welcher vorwiegend niedermolekularen Proteinen unterhalb der Ausschlussgröße der Filtrationseinheit von 10 kDa zugeschrieben wurde. Der Überstand tierischer Blutseren war nach abschließender Zentrifugation klar und farblos. Beim Test von SAB-Peptiden in Humanserum war eine Braunfärbung festzustellen.

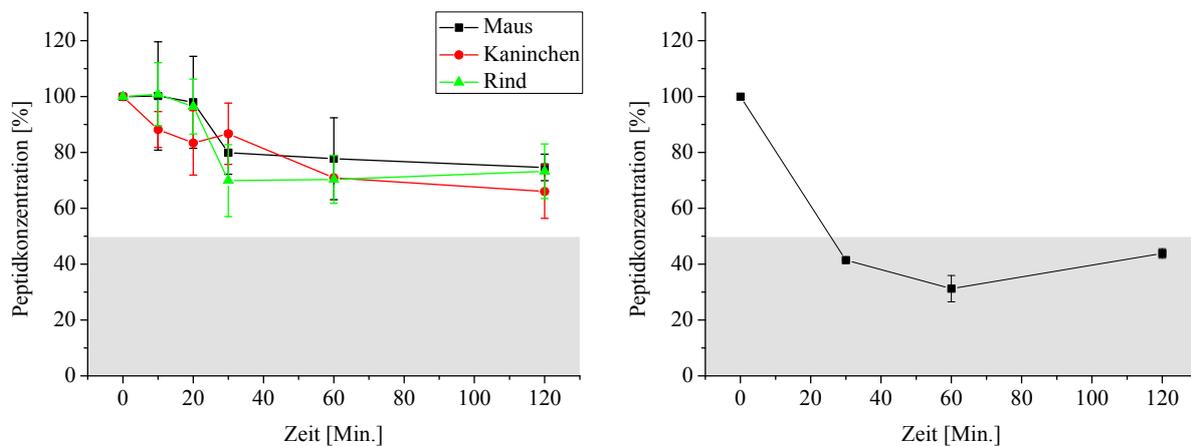


**Abb. 23:** Stabilität von SAB-Y1 im Blutserum der Maus. Die Halbwertszeit-Grenze ist grau hinterlegt und wurde nach etwa 10 Min. erreicht.

### 3. Ergebnisse

Eine erste Analyse von SAB-Y1 in Mausserum ergab eine Halbwertszeit von etwa 10 Min. (Abb. 23), weshalb eine Modifikation des SAB-Peptids zur Erhöhung der Serumstabilität als wichtig angesehen wurde. Um die Eigenschaften des Moleküls möglichst geringfügig zu verändern und potentielle Probleme im Zuge der Einführung größerer Modifikationen zu vermeiden, wurde die Acetylierung der zwei freien Aminotermini gewählt. Diese Modifikation fiel hinsichtlich des zusätzlichen Molekulargewichts gering aus, war sterisch anspruchslos, als stabilitätsfördernd bekannt (Brinckerhoff et al., 1999) sowie einfach und quantitativ durchzuführen (Kap. 3.1). Der nun als SAB-Y1-ac bezeichnete synthetische Antikörper wurde nachfolgend detailliert getestet.

SAB-Y1-ac erzielte in Humanserum eine erhöhte Stabilität mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Min. (Abb. 24, rechts), während in den drei Tierseren von Maus, Kaninchen und Rind mit einer Halbwertszeit außerhalb des aufgezeichneten zweistündigen Fensters noch deutlich höhere Werte erreicht wurden (Abb. 24, links). Die in Tierseren trotz Bestimmung im Triplikat höhere Wiederfindungsrate von SAB-Y1-ac nach 120 Min. im Vergleich zu  $t = 60$  Min. zeigte die Fehlermarge der Methodik.



**Abb. 24:** Stabilität von SAB-Y1-ac in den Blutseren von Maus, Kaninchen und Rind (links) sowie im humanen Blutserum (rechts). Die Halbwertszeit-Grenze ist grau hinterlegt und wurde im Humanserum nach etwa 20 Min. erreicht, während sie bei sämtlichen Tierseren außerhalb des zweistündigen Aufzeichnungsfensters lag.

Die Tierseren wurden abweichend vom Humanserum nicht aus frischem Vollblut aufgearbeitet und zeitnah verwendet, sondern waren kommerziell erhältliche, tiefgefrorene Produkte. Trotz fehlender Kennzeichnung konnte eine Vorbehandlung (Filtration o. a.) nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte bedingen, dass die Seren hinsichtlich der ursprünglichen Zusammensetzung verändert waren oder auch der Gefrierprozess Stabilitätsfaktoren wie die

Proteaseaktivität beeinflusste. Dem widerspricht jedoch die Tatsache, dass SAB-Y1 im Mausserum rasch abgebaut wurde (Abb. 23).

Es gelang nicht, eine einheitliche Methode für die Aufarbeitung der Seren dahingehend zu etablieren, dass SAB-Y1 auch im Humanserum hätte getestet werden können. Die Analysenlösung eluierte nach verwendeter Methode unvollständig von der RP-HPLC-Säule und verlangte gründliche Waschvorgänge zwischen einzelnen Analysen. Es konnten somit keine auswertbaren Daten erhalten werden. Für SAB-Y1-ac mussten die Aufzeichnungspunkte bereits verringert werden, damit der Säule anhaftende Probe nicht signifikant das Ergebnis beeinflusste. Vermutlich war die gewählte Extraktionsmethode für frisch aufgearbeitetes, unfiltriertes Humanserum unzureichend, um unerwünschte Bestandteile abzutrennen. Die anhand der erhaltenen Daten dennoch erhöhte Stabilität von SAB-Y1-ac gegenüber SAB-Y1 wurde zum Anlass genommen, weiterführende Experimente vorwiegend mit SAB-Y1-ac als Wirkstoffkandidat vorzunehmen.

Im Zuge einer Aufkonzentration aller Proben ( $t_0 - t_{120}$ ) eines Serumdonsors konnten per LC-MS-Analyse lediglich schwache Hinweise auf proteolytischen Abbau von SAB-Y1-ac erhalten werden (fMLF; um einen SYN-B1 verkürztes SAB). Ionisierungsmuster waren mehrdeutig oder zeigten qualitativ schlechte Spektren. Eine entsprechend spekulative Übersicht ist in Tab. 5 gezeigt.

Serumdonor	Masse	Mögliche Zuordnung
Maus, Kaninchen, Rind	437 Da	fMLF ( $M_{\text{calc}} = 437 \text{ Da}$ )
Maus, Kaninchen, Rind	4871 Da	SAB-Y1-ac - 1x SYN-B1 ( $M_{\text{calc}} = 4868 \text{ Da}$ )

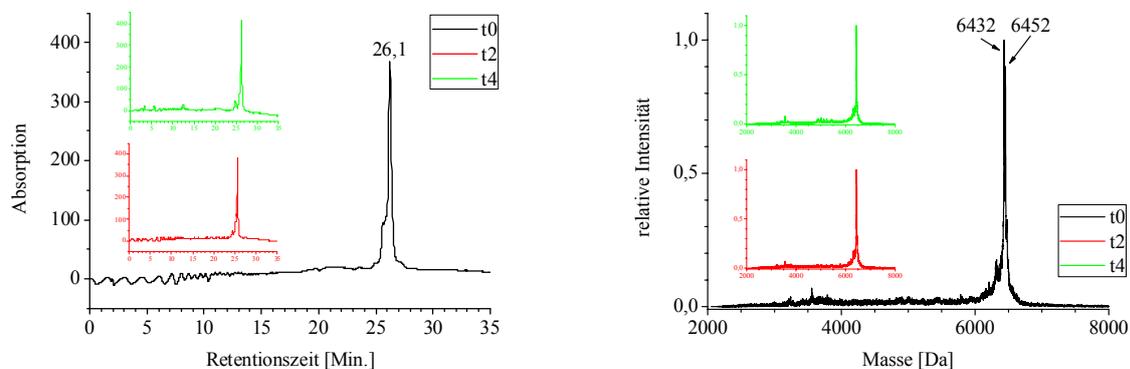
**Tab. 5:** Potentielle Degradationsprodukte von SAB-Y1-ac nach Serumexposition und Aufarbeitung.

Da alle Syntheseabschnitte des SAB per HPLC detektiert und massenspektrometrisch analysiert werden konnten (Kap. 3.1), wurde die LC-MS-Analyse jedoch als prinzipiell geeignete Nachweismethode für eventuelle Degradationsprodukte angenommen. Aufgrund des fehlenden, eindeutigen Nachweises von Abbauprodukten wurde gemutmaßt, dass (unspezifische) Bindung des Peptids an Komponenten des Serums zumindest ein weiterer Grund für die sinkende Verfügbarkeit war.

### 3.7 Temperatur- und Langzeitstabilität des SAB

Die Darreichung einer Substanz in gelöster Form zur pharmazeutischen Verwendung bietet den Vorteil, dass sie direkt oder zumindest einfach verwendet werden kann. Dabei muss sichergestellt sein, dass die Substanz in ihrer ursprünglichen Qualität erhalten bleibt, und nicht etwa Kontamination, Degradation, Adsorption an das Aufbewahrungsgefäß oder anderweitig bedingte Konzentrationsverringerung die Verwendbarkeit einschränken. Temperatursensitivität kann die Substanz etwa hinsichtlich der Verwendung im Organismus beeinträchtigen, indem die Bioverfügbarkeit durch Aggregatbildung gesenkt wird.

Um eine tendenzielle Aussage dahingehend für SAB-Y1-ac treffen zu können, wurde das in Wasser gelöste Peptid unter verschiedenen Temperatur- und Lichtbedingungen (Kühlschrank, 4 °C (1); Raumtemperatur, lichtgeschützt (2); Raumtemperatur (3)) ebenso getestet wie in unterschiedlichen Aufbewahrungsgefäßen (Glas (a), Plastik (b), absorptionsminimiertes Eppendorf LoBind® Plastik (c)). Eine HPLC-Analyse zu den Zeitpunkten  $t = 0, 2, 4$  und 8 Wochen ermöglichte die Quantifizierung des SAB-Y1-ac und eventueller Degradationsprodukte. Die MALDI-MS-Methodik erlaubte eine Beurteilung der SAB-Qualität im Vergleich zum Versuchstart  $t_0$  sowie die Identifikation von Abbauprodukten.

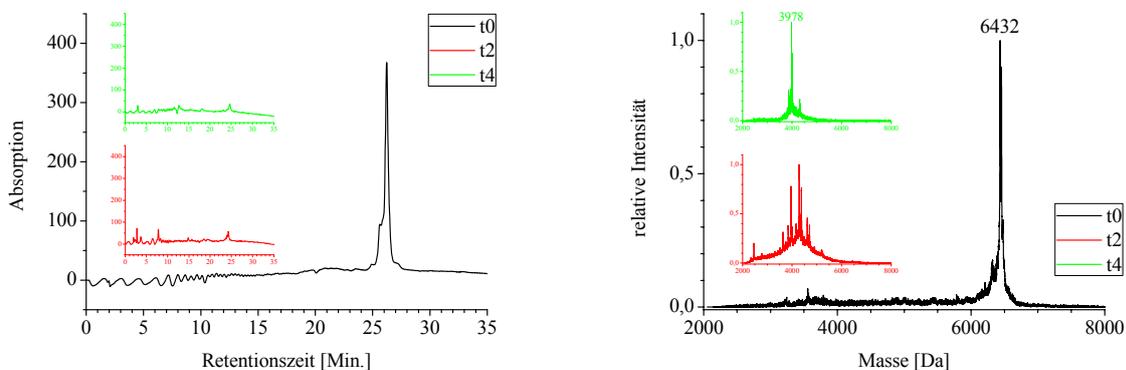


**Abb. 25:** Stabilität von SAB-Y1-ac bei Aufbewahrung unter Kühlung (hier beispielhaft Bedingung 1a). Die korrespondierenden HPLC-Chromatogramme (links) waren ebenso wie die Qualität der MALDI-Spektren (rechts) untereinander vergleichbar: SAB-Y1-ac zeigte eine Retentionszeit von etwa 26,1 Min. und mit  $M_{obs} = 6432$  Da seine ursprüngliche sowie mit  $M_{obs} = 6452$  Da seine an fMet oxidierte Masse.

Die Probenaufbewahrung unter Kühlung (1) zeigte in allen Gefäßen (1a, 1b, 1c) bis zum Versuchsende nach 8 Wochen keine detektierbare Degradation des SAB-Y1-ac. Sowohl die Absorptionsintensität für SAB-Y1-ac bei einer Retentionszeit von etwa 26,1 Min. blieb über

### 3. Ergebnisse

die ersten 4 Wochen konstant als auch die Qualität der MALDI-Spektren (Abb. 25). Das abschließende LC-MS nach 8 Wochen bestätigte die bisherigen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung deckte sich mit der Erwartung, dass bei Kühlung über die Zeit eingeschleppte, etwaige bakterielle Kontaminationen und Proteasen attenuierte oder keine Funktionalität zeigen. In mindestens einer Probe aus 1a - c wurde SAB mit teilweise oxidiertem fMet gefunden. Da die apparente SAB-Oxidation zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten nicht in stets den gleichen Proben auftrat, wurde ein Artefakt im Zuge der Probenvorbereitung für die MS-Analysen als Grund angenommen. Eine Aufbewahrung gelösten SABs unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur (2a - c) lieferte mit (1a - c) vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

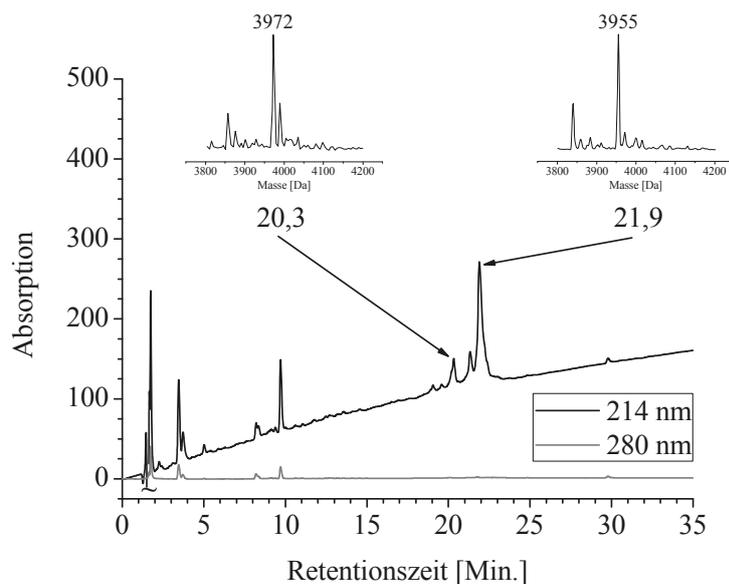


**Abb. 26:** Degradation von SAB-Y1-ac bei lichtexponierter Aufbewahrung (Raumtemperatur, Bedingung 3b). In zwei Proben wurde ab 2 Wochen Lagerzeit Degradation von SAB (6432 Da) zu einer Masse von 3958 Da (MALDI-MS, rechts) mit einer Retentionszeit von etwa 25 Min. (HPLC, links) festgestellt.

SAB wurde bei lichtexponierter, untemperierter Aufbewahrung im Plastikgefäß (3b) ab 2 Wochen Lagerzeit in zwei Fällen zu einer Masse von 3958 Da degradiert (Abb. 26). Ein abschließendes LC-MS dieser Proben nach 8 Wochen führte zur Identifikation von SAB-Y1-ac $\Delta$ 3, welches um insgesamt ein vollständiges und ein 6 AS N-terminal verkürztes SYN-B1-ac-Peptid degradiert wurde (Abb. 27).

Die für SAB-Y1-ac $\Delta$ 3 berechnete Restmasse  $M_{\text{calc}} = 3956$  Da stimmte sehr gut mit der gemessenen von  $M_{\text{obs}} = 3958$  Da überein. Ein MALDI-MS bestätigte das Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Mit  $M_{\text{obs}} = 3972$  Da wurde außerdem an fMet oxidiertes SAB-Y1-ac $\Delta$ 3 identifiziert, welches analog zu vorherigen Messergebnissen jedoch auch ein MS-Artefakt sein konnte. Aufgrund unzureichender Materialmenge konnte zum Zeitpunkt der erstmalig entdeckten potentiellen Degradation (t2) kein detailliertes LC- sondern lediglich ein MALDI-

MS aufgezeichnet werden, welches im Vergleich zu darauffolgend gemessenen MALDI-MS auch Signale ober- und unterhalb von 3958 Da aufwies. Dies deutete auf einen möglicherweise sukzessiven, eher unspezifischen Abbauprozess hin, welcher bei Erreichen des PEG-Linkers aufgrund fehlender Erkennungssequenz für Peptidasen stoppte. Es bleibt jedoch zu beachten, dass zum Abschluss des Experiments alle potentiell degradierten Proben ausschließlich die diskutierten Massen 3958 und 3972 Da aufwiesen, was diese als Hauptabbauprodukt festlegte.



**Abb. 27:** LC-MS unter Bedingung (3) aufbewahrten SAB-Y1-ac nach 8 Wochen. Degradiertes SAB-Y1-ac $\Delta$ 3 eluiert mit  $M_{obs} = 3972$  Da bei 20,3 Min. und  $M_{obs} = 3958$  Da bei 21,9 Min.

Eine spezifische Degradation von SAB war alternativ oder zusätzlich denkbar. Im Falle einer bakteriellen Probenkontamination könnten Endoproteasen wie etwa Sortase (Cossart et al., 2000) zwischen Gly und Thr selektiv gespalten und zu um 6 Aminosäuren N-terminal verkürztem SYN-B1-ac geführt haben. Davon ausgehend wurde die Degradation von SAB möglicherweise von eher unspezifischen bakterielle Exoproteasen sukzessive fortgeführt, bis ab Erreichen eines PEG<sub>27</sub>-Linkers keine Erkennung durch Proteasen mehr möglich war. Ein Vergleich mit den vermuteten Abbauprodukten von SAB nach Serumexposition (Kap. 3.6) war negativ.

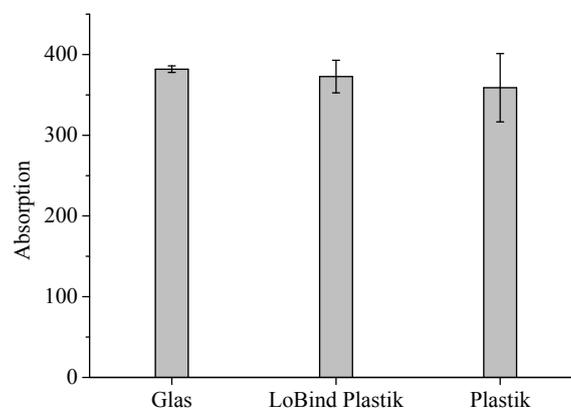
Die gegenüber dem zu  $t_0$  eingesetzten SAB-Y1-ac geringfügig veränderte Retentionszeit (etwa 25 - 26 Min.) des Hauptprodukts war begründbar mit der Aufreinigungsproblematik von SAB-Peptiden (Kap. 3.1). Ab Kopplung eines PEG<sub>27</sub>-Linkers an das SAB-Grundgerüst-

Peptid fMLFKK erfolgte keine signifikante Veränderung der Retentionszeit, was die Separierung SABs von Abbruchprodukten aufwändig machte.

Abweichend waren bei Raumtemperatur (3) in Glas- und LoBind-Plastik-Gefäßen aufbewahrte Proben (3a, 3c) nicht derart kontaminiert, dass dadurch SAB-Y1-ac messbar abgebaut wurde. Im Fall der Glasgefäße wurde vermutet, dass die vorhandene Gummidichtung den Schutz vor Kontaminationen erhöhte. Trotz Dreifachbestimmung und paralleler Handhabung unter vergleichbaren Bedingungen konnte aber auch eine zufällige Kontamination der Probe von (3b) nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere aufgrund der bis auf die Oberflächenbeschichtung identischen Beschaffenheit der Plastikgefäße (luftdichter Verschluss, steril) wäre die materielle Beschaffenheit des Aufbewahrungsgefäßes als irrelevant anzusehen.

Die unspezifische Anhaftung von Proteinen und Peptiden an die Oberfläche ihrer Aufbewahrungsgefäße aus Plastik oder Glas ist ein allgemein bekanntes Problem (Goebel-Stengel et al., 2011). SAB-Y1-ac war, möglicherweise aufgrund des hohen, löslichkeitsvermittelnden PEG-Anteils, davon nur schwach betroffen. Unter der Voraussetzung einer kontaminationsfreien Probe sowie eines sauberen Massenspektrums war die Peptidkonzentration in wenigstens einer Probe je Gefäßtyp unverändert (Abb. 28, beispielhaft gezeigt für 2 Wochen Aufbewahrungsdauer). Dabei wurden separate Konzentrationsbestimmungen von SAB per Absorptionsmessung des Überstands durchgeführt, nachdem mögliche Präzipitate abzentrifugiert worden waren.

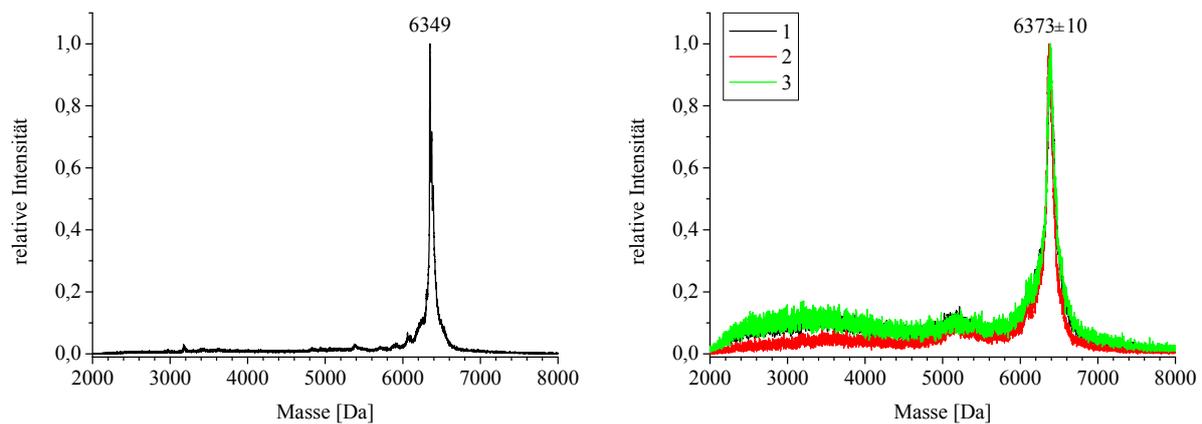
Mit einem sehr geringen Fehler lieferten die verwendeten Glasgefäße die höchste Reproduzierbarkeit und wurden als optimale Aufbewahrungsgefäße für SAB-Y1-ac identifiziert.



**Abb. 28:** Konzentration von SAB-Y1-ac bei Aufbewahrung im Glas-, Plastik- und adsorptionsminimiertem LoBind-Plastik-Gefäß nach 2 Wochen. Analysiert per HPLC.

### 3. Ergebnisse

In vorläufigen Experimenten mit SAB-Y1 in Glasgefäßen konnte die Ausgangsmasse (6348 Da) nach bis zu einem Jahr, wenngleich mit oxidiertem Methionin (+ 18 Da), nachgewiesen werden (Abb. 29,  $M_{\text{obs}} = 6373 \pm 10$  Da) und lässt unter Optimalbedingungen lange Lagerzeiten von SAB-Molekülen in gelöster Form erwarten. Dies bleibt detailliert aufzuklären.

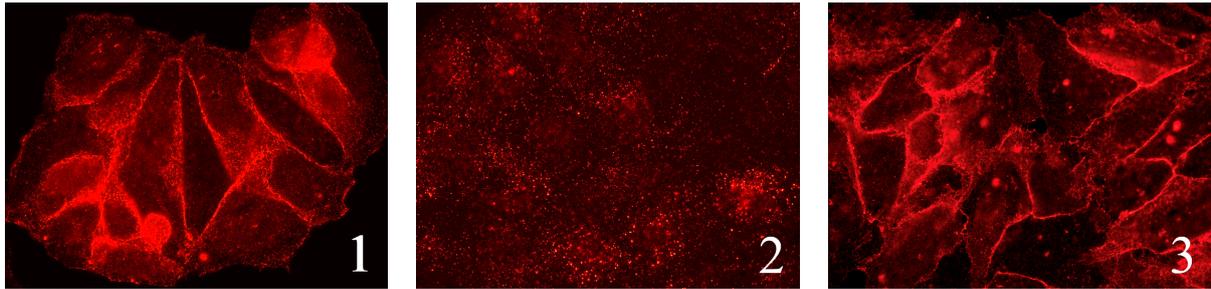


**Abb. 29:** Stabilität von SAB-Y1 unter Aufbewahrung im Glasgefäß bei Raumtemperatur (1), lichtgeschützter Aufbewahrung bei Raumtemperatur (2) und Aufbewahrung im Kühlschrank (3) über 1 Jahr (rechts). Das Ausgangsspektrum zum Zeitpunkt  $t_0$  ist links gezeigt. Analysen per MALDI-MS.

### 3.8 Verfügbarkeit von SAB-Peptiden als Marker und ihre Mitogenität

Der EGF-Rezeptor wird nach Bindung des natürlichen Liganden EGF und dadurch bedingter Aktivierung innerhalb weniger Minuten internalisiert. Um bestmögliche Wirksamkeit des SAB zu gewährleisten, wäre es von Vorteil, wenn das Molekül langsam oder gar nicht internalisiert würde und somit auf der Zelloberfläche als Erkennungssequenz für das Immunsystem verfügbar bliebe (Molekularmarker). Solange der SAB gegen solide Tumore eingesetzt wird, wäre eine Stimulation des Zellwachstums (mitogene Aktivität) ähnlich den natürlich vorkommenden Wachstumsfaktoren überdies nicht wünschenswert.

In Abb. 30 ist anhand deutlich erkennbarer Zellabgrenzungen gezeigt, dass ohne externen Stimulus der überwiegende Anteil an EGFR in MCF7-Zellen membranständig lokalisiert war (1). Nach Zugabe des Wachstumsfaktors erfolgte erwartungsgemäß die unmittelbare Delokalisation des EGFR von der Zellmembran (Haigler et al., 1978). 16 Std. später waren anhand der EGFR-Immunfärbung keine Zellabgrenzungen mehr erkennbar (2).

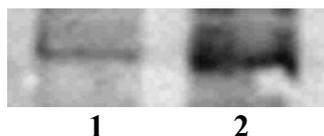


**Abb. 30:** EGFR-Immunfärbung von MCF7-Zellen nach 16-stündiger Stimulation mit EGF (2) und SAB-Y1 (3). Die Aufnahme (1) zeigt  $t_0$ . EGFR war dort überwiegend membranständig lokalisiert und bedingte gut erkennbare Zellabgrenzungen. Nach Stimulation mit EGF wurde der Rezeptor endozytiert, weshalb seine Immunfärbung keine Zellgrenzen nachvollziehen ließ. Die Zugabe von SAB-Y1 hatte keinen EGF-ähnlichen Effekt und ähnelte (1).

Nach Zugabe des EGFR-Binders (SYN-B1) sowie SAB-Y1 konnte innerhalb von 16 Std. und bis 5  $\mu$ M Endkonzentration kein vergleichbares Ergebnis erhalten werden (Abb. 30, 3). Die Zellgrenzen waren gut erkennbar und entsprechen etwa dem Zeitpunkt  $t_0$ . Die Integrität der Zellmembran schien nach 16 Std. beeinträchtigt, was aufgrund analogen Verhaltens nicht-exponierter MCF7-Zellen den andauernden Magermedium-Bedingungen von beinahe 48 Std. zugeordnet wurde.

Nach diesen Experimenten war zu zeigen, dass SAB-Y1 spezifisch an EGFR bindet. Unter der Voraussetzung könnte zusammen mit Abb. 30 (3) geschlussfolgert werden, dass SAB nach Rezeptorbindung nicht internalisiert wird, demnach keine mitogenen Eigenschaften besitzt und so die Grundvoraussetzungen erfüllt, ein ausreichend großes Zeitfenster zur Immunsystem-seitigen Erkennung des Molekularmarkers zu ermöglichen.

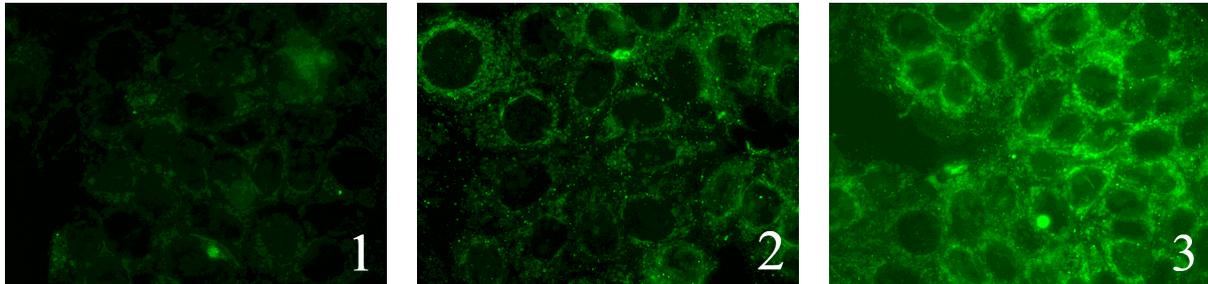
Um einen ersten Hinweis zu liefern, dass der SAB weitgehend spezifisch an den Rezeptor auf Zelloberflächen bindet, wurde seine EGFR-bindende Domäne, fluoreszenzmarkiertes SYN-B1 (FAM-SYN-B1), mit MCF7-Zellen in Wildtyp- und EGFR-überexprimierender Variante (MCF7, MCF7-EGFR) getestet. Gemäß Westernblot exprimierte MCF7-EGFR den Rezeptor zum Zeitpunkt des Experiments um den Faktor 1,8 höher als die Wildtyp-Linie (Abb. 31).



**Abb. 31:** Überprüfung der EGFR-Expression per Westernblot mit Lysaten der Zelllinien MCF7 (1) und MCF7-EGFR (2). Die Quantifizierung ergab eine 1,8-fache Überexpression von EGFR in der Zelllinie MCF7-EGFR gegenüber der Wildtyp-Linie. Daten von Dr. Marjo de Graauw, Universiteit Leiden, Niederlande.

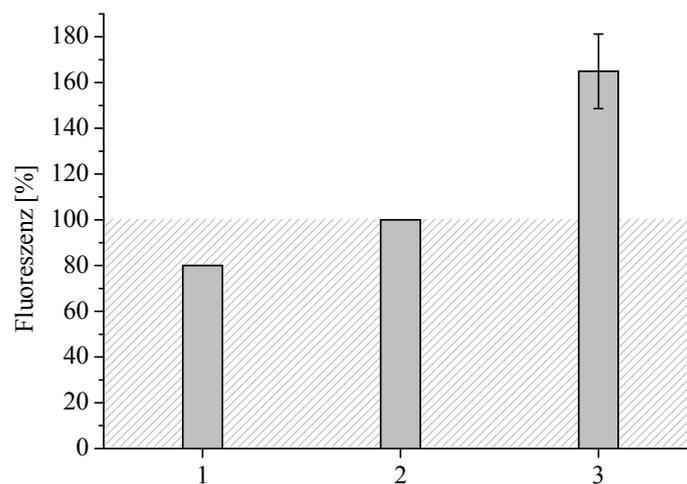
### 3. Ergebnisse

Bei konfokalmikroskopischer Untersuchung zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen MCF7- und MCF7-EGFR-Zellen nach Inkubation mit FAM-SYN-B1. Bei vergleichbarer Vitalität wiesen die EGFR-überexprimierenden Zellen deutlich höhere Fluoreszenz auf (Abb. 32).



**Abb. 32:** Fluoreszenz von MCF7- (2) und MCF7-EGFR-Zellen (3) nach 1-stündiger Inkubation mit FAM-SYN-B1. Die EGFR-überexprimierenden Zellen zeigten deutlich höhere Fluoreszenz. Aufnahme (1) zeigt die Negativkontrolle mit unmarkiertem SYN-B1.

Nach Bereinigung um den Anteil der Hintergrundfluoreszenz mit einer Vergleichsprobe, welcher unmarkiertes SYN-B1 zugegeben wurde, konnte die Zellfluoreszenz von MCF7-EGFR mit bis zu 180 % gegenüber der Wildtyp-Linie quantifiziert werden (Abb. 33). Das Ergebnis war kongruent mit der EGFR-Quantifizierung via Westernblot und lieferte einen Hinweis auf spezifische Bindung von SYN-B1 an den EGF-Rezeptor.



**Abb. 33:** Fluoreszenzvergleich von MCF7-Zelllinien nach 1-stündiger FAM-SYN-B1-Exposition. Unmarkiertes SYN-B1 diente als Negativkontrolle (1). Die MCF7-Wildtyp-Fluoreszenz wurde mit 100 % angenommen (2 bzw. graue Schraffierung). Dazu erzielte MCF7-EGFR bis zu 180 % der Wildtyp-Fluoreszenz (3).

Um genau festzustellen, ob SYN-B1 im SAB-Y1- bzw. SAB-Y1-ac-Konstrukt spezifisch an EGFR bindet, wurden nachfolgend SPR-Messungen mit isoliertem Vollängen-Rezeptor durchgeführt, welcher zudem vollständig posttranslational modifiziert war. Ferner sollte so die Austauschrate ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) von SAB bestimmt werden, um die Verfügbarkeitsdauer des synthetischen Antikörpers als Marker zu bestimmen.

### 3.9 Affinitätsbestimmung von SAB-Peptiden zu EGFR

Die Affinität des EGFR-Binders SYN-B1 wurde mit einer Dissoziationskonstanten von etwa 20 nM bestimmt (Li et al., 2005). Während dieser Wert am isolierten System und mittels hochsensitiver Isotopenmarkierung erhalten wurde, war eine allgemein geringere Affinität zu erwarten, je mehr eine Methode der Situation *in vivo* entsprach (z. B. FACS mit lebenden Zellen). Dies ist unspezifischer Bindung an Blutbestandteile und Zelloberflächen, Degradation, Beeinflussung durch Elektrolyte im Organismus und anderen Faktoren geschuldet. Eine  $K_D$ -Bestimmung per SPR kann einen Orientierungswert etwa zwischen der Situation *in vitro* und *in vivo* bieten, da der Anteil unspezifischer Bindung ansatzweise mit untersucht werden kann. Zu dem Zweck wurde hier sowohl Albumin (BSA) als auch Transferrin (hTf) auf einem Referenzchip gemessen, jeweils analog zum EGFR-beladenen Sensorchip.

Während Albumin eine verbreitete Methode ist, die bestimmten Affinitäten um den Faktor unspezifischer Bindung zu bereinigen (vgl. auch Blotting-Technik; Candor Bioscience<sup>13</sup>), musste für SAB-Y1-ac auf Transferrin gewechselt werden, da die unspezifische Bindung an den Albumin-beladenen Chip zu stark war und die Daten nicht auswertbar machte. Transferrin konnte aufgrund verminderter unspezifischer Bindung genauere Hinweise zur Affinität des Peptids liefern.

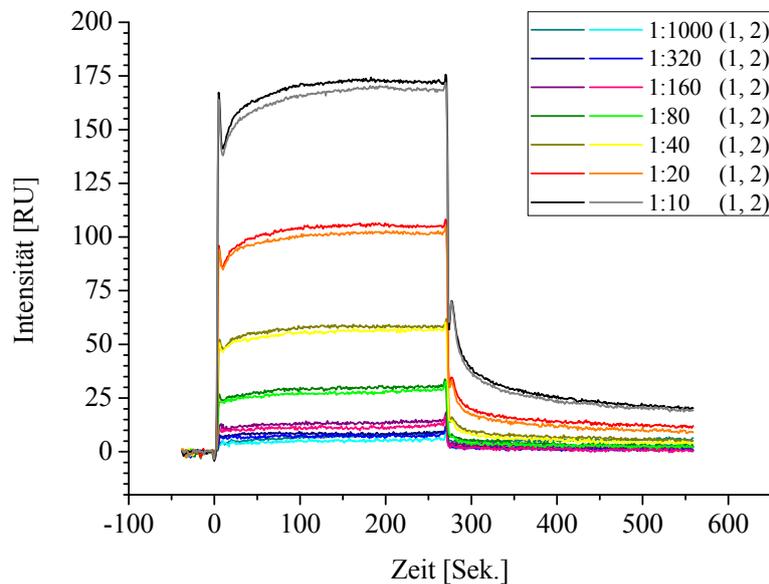
Um weiterhin unspezifische Bindung zu vermeiden, wurde der Chip manuell chemisch modifiziert, da geeignete kommerzielle Chips eine Zuckerpolymer-schicht tragen („Hydrogel“), welche insbesondere mit stark glykosilierten Proteinen wie EGFR unerwünscht wechselwirken und etwa die gleichmäßige Ausrichtung und Exposition des Proteins beeinflussen kann. Aufgrund der im Bereich der EGFR-EGF-Interaktion cysteinreichen Rezeptordomäne (Kumagai et al., 2003) lieferte Laufpuffer ohne Reduktionsmittel nicht

---

<sup>13</sup> <http://www.candor-bioscience.de/de/produkte/bsa-block/bsa-block.php>

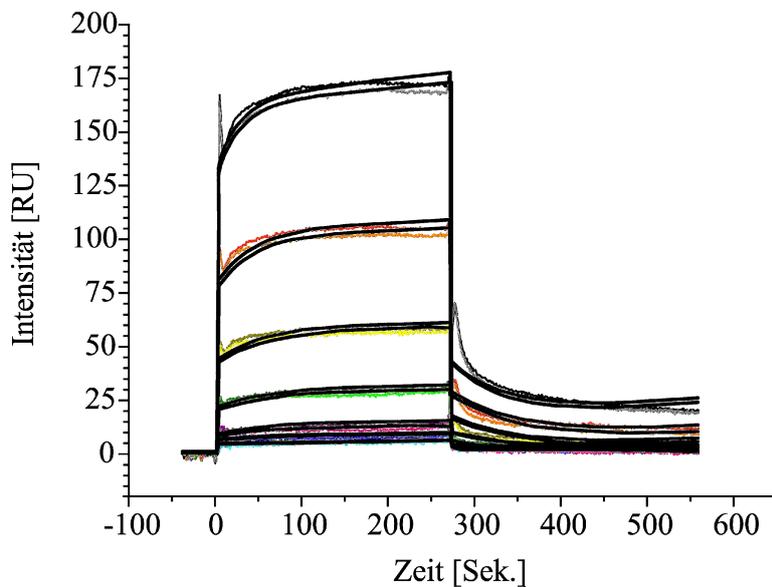
### 3. Ergebnisse

reproduzierbare Messungen, weshalb die nachfolgenden Experimente mit DTT-Zusatz durchgeführt wurden.



**Abb. 34:** Bestimmung der Dissoziationskonstanten von SAB-Y1-ac mittels SPR.

Für SAB-Y1-ac konnten anschließend sehr gut reproduzierbare Messungen erhalten werden (Abb. 34).

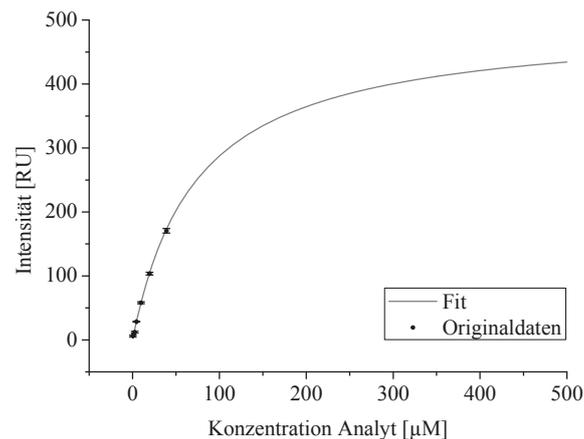


**Abb. 35:** Auswertung der SPR-Messungen mit geräteseitiger Software. Der akzeptable Fit lieferte eine  $K_D$  von  $24 \pm 1 \mu\text{M}$  sowie  $k_{on} = 605 \pm 16 \text{ M}^{-1} \text{ Sek}^{-1}$  und  $k_{off} = 0,01 \text{ Sek}^{-1}$ .

### 3. Ergebnisse

Über die SPR-seitige Software, welche die gesamte Bindungscharakteristik mit einbezog ( $k_{on}$ ,  $k_{off}$  etc.), wurde ein akzeptabler Fit bei Annahme eines 1:1-Bindungsmodus erreicht (Abb. 35), welcher eine  $K_D$  von  $24 \pm 1 \mu\text{M}$  lieferte. Ferner wurde  $k_{on}$  mit  $605 \pm 16 \text{ M}^{-1} \text{ Sek}^{-1}$  und  $k_{off}$  mit  $0,01 \pm 0,0001 \text{ Sek}^{-1}$  berechnet. Im Vergleich mit IgG-abgeleiteten Antikörpern oder auch scFvs ist die Dissoziationsrate von SAB sehr ähnlich (vgl.  $k_{off} = 0,005 - 0,01 \text{ s}^{-1}$ ; Townsend et al., 2006).

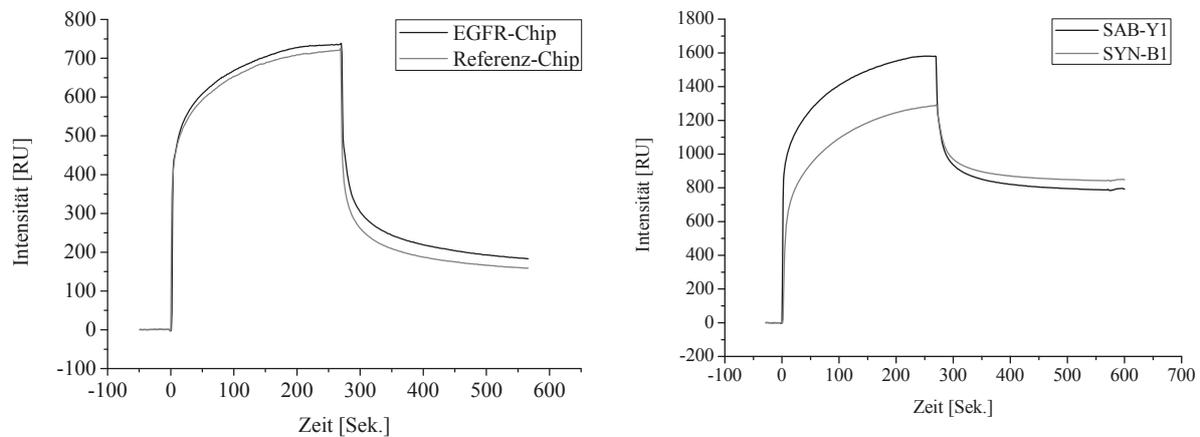
Die eigenhändige Auswertung anhand von SPR-Signalintensitäten lieferte eine  $K_D$  von  $74 \pm 10 \mu\text{M}$  (Abb. 36). Die grafische Auftragung zeigt zudem, dass die beim Versuch verwendeten Konzentrationen weit von der Sättigung entfernt waren und liefern somit die Erklärung dafür, dass der softwareseitige Fit (Abb. 35) nicht perfekt war. Aus Löslichkeitsgründen im Laufpuffer konnte nicht mit höheren SAB-Konzentrationen gearbeitet werden. Die Affinität für SAB-Y1-ac lag selbst im Falle ungenauer Fitberechnungen mit  $24 - 84 \mu\text{M}$  deutlich über der für SYN-B1 von Li et al. (2005) bestimmten von  $20 \text{ nM}$ .



**Abb. 36:** Bestimmung der Dissoziationskonstanten von SAB-Y1-ac anhand der Auswertung der Signalintensitäten von Abb. 34. Es wurde eine  $K_D$  von  $74 \pm 10 \mu\text{M}$  festgestellt.

Für SAB-Y1 konnte auch mit hTf keine Affinität bestimmt werden, da die Anbindung an das Referenzprotein vergleichbar war. Der unreferenzierte Direktvergleich einer identischen Konzentration von SAB-Y1 und SYN-B1 zeigte, dass das kurze Peptid, insbesondere unter dem Gesichtspunkt deutlich reduzierten Molekulargewichts (etwa  $1,5 \text{ kDa}$  vs.  $6,5 \text{ kDa}$ ), stärker band. Jedoch ist die Dissoziation ebenso signifikant unvollständig und erreichte nicht weniger als etwa  $60 - 70 \%$  des Ausgangswerts, was auf unspezifische Bindung an EGFR, etwa über den Glykosilierungsanteil, oder auch Aggregationstendenz von SAB-Y1 bzw. SYN-B1 schließen ließ (Abb. 37). PEG-bedingte unspezifische Bindung konnte nicht detektiert werden und schloss das Polymer zumindest als direkten Grund für geminderte

spezifische Affinität aus. Eine unzureichende Exposition des EGFR-Binders aufgrund nicht-linearer PEG-Konfiguration konnte hingegen nicht ausgeschlossen werden.



**Abb. 37:** Bestimmungsversuch der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) per SPR: Vergleich der Bindung von SAB-Y1 an Referenz- und EGFR-Chip (links) und Affinitätsvergleich von SYN-B1 und SAB-Y1 (rechts). Die Konzentration der Analyten war jeweils identisch (1:10-Verdünnung). Die Messungen wurden nicht um den Anteil unspezifischer Bindung bereinigt.

Für auswertbare SPR-Messungen von SAB-Y1-ac musste das System optimiert und der Referenzchip mit Transferrin statt Albumin beladen werden. Die unspezifische Bindung an den Referenzchip war dennoch inakzeptabel hoch für exzellente Daten und machte Messungen mit SAB-Y1 und SYN-B1 unter den getesteten Bedingungen nicht möglich. Dies zeigte insgesamt an, dass das Design von SYN-B1 und SAB-Peptiden hinsichtlich geringer unspezifischer Bindung optimiert werden musste.

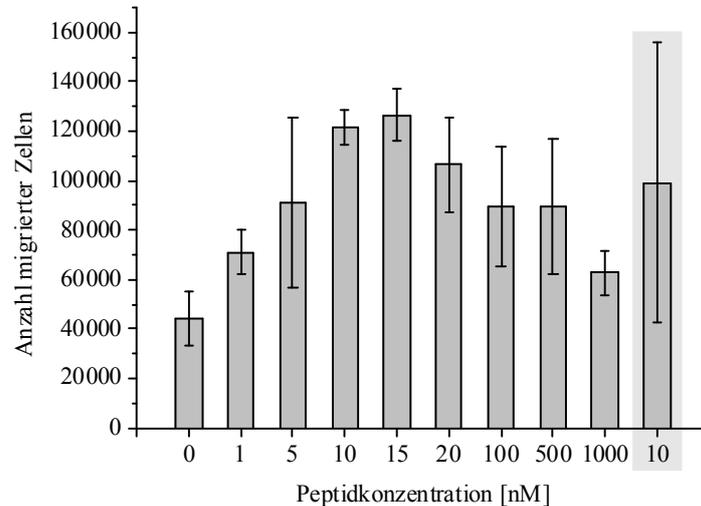
### 3.10 Chemotaktische Potenz des SAB bei Immunzellen

Das Peptid fMLF ist bakteriellen Ursprungs und daher in Organismen wie dem Menschen immunogen. Es wurde mitsamt seiner Funktion erstmals von Boxer et al. (1979) beschrieben. Dabei bindet es mit hoher Affinität von etwa 20 nM (Snyderman et al., 1984) an Immunzellen wie beispielsweise neutrophilen Granulozyten, welche zur Erkennung geeignete FPR-Rezeptoren (FPR) auf ihrer Zelloberfläche aufweisen.

fMLF wurde für SAB um zwei Lysinreste erweitert (fMLFKK), um den synthetischen Antikörper mit zusätzlichen Eigenschaften ausstatten zu können (Kap. 1.5). Der SAB besaß deutlich höheres Molekulargewicht, weitere funktionelle Peptide sowie die Moleküldynamik beeinflussende PEG-Linker. Derartige Faktoren konnten die ursprüngliche Mobilität,

### 3. Ergebnisse

Verfügbar- und Zugänglichkeit von fMLF zu immunsystematischen FPRs verändern. Es war daher wichtig zu überprüfen, ob die chemotaktische Potenz von fMLF auch im Verband als SAB vergleichbare Effektorfunktion zeigte.



**Abb. 38:** Bestimmung der chemotaktischen Aktivität von SAB-Y1 bei neutrophilen Granulozyten. Der grau hinterlegte Datensatz stellt die Positivkontrolle mit fMLF-Peptid dar, in welchem Fall gemittelt 100.000 Zellen durch die trennende Membran migrierten. Bei gleicher Konzentration stimulierte fMLF im Verband als SAB-Y1 mit etwa 120.000 Zellen eine deutlichere positiv-chemotaktische Antwort sowie bei etwa 15 nM die höchstmögliche. Ab 100 nM und höher ist SAB-Y1 geringer chemotaktisch aktiv als die Positivkontrolle.

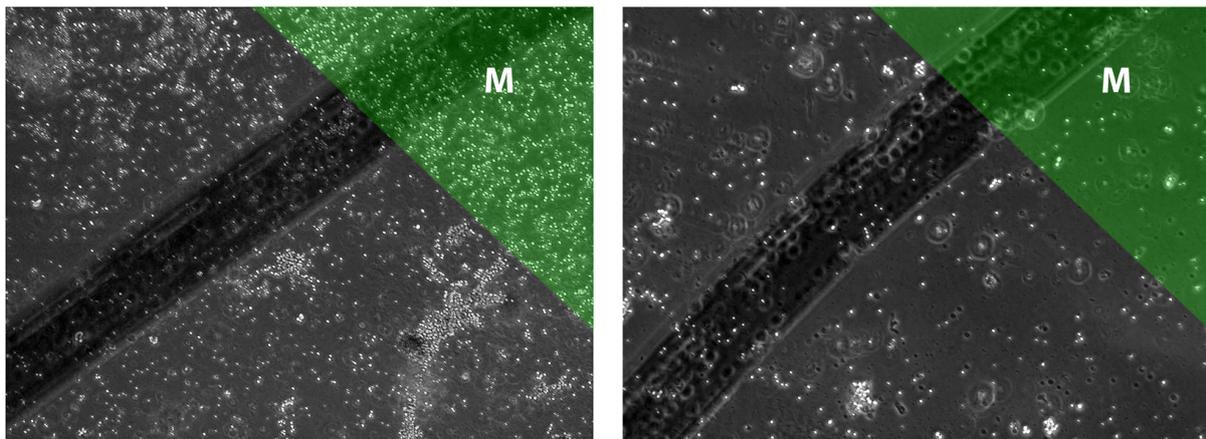
Der von der Boydenkammer-Methode abgeleitete Transwell-Versuch erlaubte die Wanderung von Granulozyten über eine feinporige Filtermembran. Diese wurde geringfügig überquert, wenn kein chemotaktischer Stimulus auf der Gegenseite vorhanden war. Die Positivkontrolle mit 10 nM fMLF stimulierte eine positiv-chemotaktische Antwort mit gemittelt 100.000 migrierten Zellen. Dabei war die Standardabweichung sehr hoch. Bei gleicher Konzentration war fMLF im SAB-Y1-Molekül mit im Mittel 120.000 gewanderten Zellen chemotaktisch 20% aktiver. SAB-Y1 wirkte bei 15 nM maximal chemotaktisch und erzielte dabei Wanderungsraten der Immunzellen von knapp 30 % über dem Mittel der Positivkontrolle fMLF (Abb. 38). Es wurde vermutet, dass der PEG-Anteil des SAB, welcher eine hohe Löslichkeit bewirkte (Kap. 3.4), für eine höhere Gesamtmobilität des Moleküls und folglich schnellere Bereitstellung des Chemogradienten sorgte. Überdies könnte die Interaktion von fMLF mit immunsystematischen FPRs im Zuge der Molekülgröße des SAB stabiler oder auch längerfristig sein und so stärkere Aktivierung erreichen.

Bei Konzentrationen zwischen etwa 10 - 100 nM SAB-Y1 war der synthetische Antikörper mindestens mit der Positivkontrolle vergleichbar positiv-chemotaktisch aktiv. Ab 100 nM

wurde eine stetige Abnahme der chemotaktischen Potenz festgestellt, welche sowohl auf eine Sättigung der FP-Rezeptoren als auch eine Desensitivierung der Granulozyten hindeutete. Es war daher wichtig zu beachten, dass eine zu hohe Dosis von SAB während einer potentiellen späteren Therapie zu verminderter Immunstimulation führen könnte.

#### 3.11 Chemotaktische Potenz von SAB in der Tumor- und Immunzellen-Cokultur

Ausgehend von der gezeigten, mit fMLF mindestens vergleichbaren chemotaktischen Aktivität der SAB-Effektorfunktion gegenüber Immunzellen war die theoretische spätere Situation einer immunogenen Tumormarkierung mit SAB *in vitro* zu untersuchen. Es sollte gezeigt werden, dass SAB zunächst über die EGFR-affine Funktion an Tumorzellen derart binden kann, dass FPR-tragende Zellen des Immunsystems über fMLF-Erkennung aktiviert werden und beispielsweise Botenstoffe aussenden (Zytokine u. a.) oder auch direkte, antitumorale Aktivität über die Ausschüttung zytotoxischer Stoffe (ROS u. a.) zeigen.



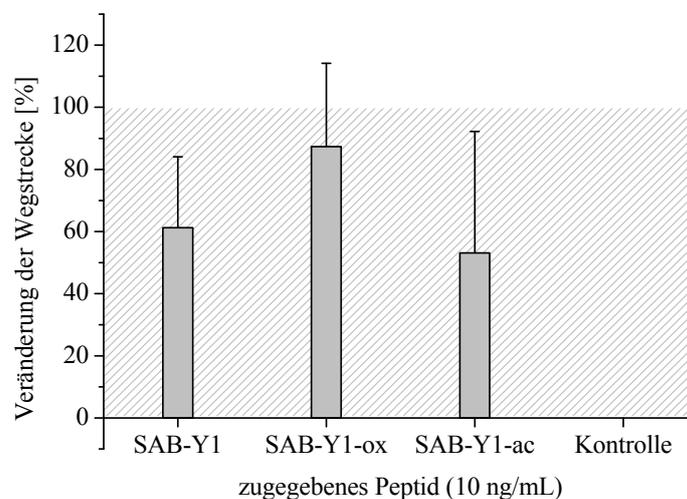
**Abb. 39:** Wanderung von Makrophagen. Zu Beginn der Co-Kultur war die Abgrenzung zu den Tumorzellen sehr definiert (links, grüner Bereich M). Die Zellgrenze löste sich nach Entfernung des Silikonrings auf (rechts). Bei SAB-vorinkubierten Tumorzellen wurde die Zellgrenze innerhalb von 16 Std. deutlich gerichtet, bei der Negativkontrolle mit BSA-haltigem Medium ungerichtet diffus (nicht gezeigt).

Es wurden Makrophagen, welche auf fMLF-Stimulus reagieren konnten, räumlich getrennt mit MCF7-Tumorzellen co-kultiviert. Mit SAB vorinkubierte Tumorzellen wurden nach Entfernung überschüssigen Materials in ungehinderte Co-Kultur mit den Makrophagen gebracht, indem der Silikonring entfernt wurde. Dabei war zunächst eine scharfe Abgrenzung der Makrophagen sichtbar (Abb. 39, links), welche sich anschließend auflöste (Abb. 39,

### 3. Ergebnisse

rechts). Dies geschah bei BSA-haltiger Mediumzugabe (Negativkontrolle) ungerichtet diffus, im Falle mit SAB vorinkubierter Tumorzellen jedoch gerichtet (nicht gezeigt).

MCP-1 wird von immunsystematischen und auch vielen anderen Körperzellen sekretiert und wirkt stark chemotaktisch auf etwa Makrophagen (Kap. 2.5.6). Daher wurde dies als Positivkontrolle für gerichtete Chemotaxis und maximal zu erreichender Wert angenommen. Es konnte sowohl für SAB-Y1 als auch für SAB-Y1-ac mit bis zu 90 % eine ähnliche, gerichtet-positive chemotaktische Aktivität festgestellt werden. Signifikant höhere Aktivität bis teilweise 120 % wurde für am Met oxidiertes SAB-Y1 gefunden (Abb. 40). Die Konzentration betrug jeweils 10 ng/ml (etwa 2 nM).



**Abb. 40:** Bestimmung der chemotaktischen Aktivität von SAB-Y1-Peptiden bei Makrophagen nach Bindung an MCF7-Tumorzellen. Als Positivkontrolle diente MCP-1 (schraffierte Fläche), dessen Wert als 100 % angenommen und die für SAB erhaltenen Ergebnisse entsprechend skaliert wurde. Als (Negativ-)Kontrolle wurde BSA-haltiges Kulturmedium verwendet.

Alle SAB-Moleküle bewirkten somit in diesem Versuch messbar gerichtete Migration von Makrophagen zu entsprechend vormarkierten Tumorzellen und lieferten einen Hinweis, dass das SAB-Konzept auch *in vivo* funktionieren könnte. Die Ausschüttung zytotoxischer Stoffe wurde im Zuge vermehrt letaler Tumorzellen nicht beobachtet.

Interessant war der Vergleich, dass SPR-Messungen (Kap. 3.9) mit  $> 24 \mu\text{M}$  eine geringe Affinität von SAB-Y1-ac zu EGFR zeigte, im Scratch-Versuch jedoch eine Konzentration von 2 nM für einen gerichteten Migrationseffekt ausreichend war. Unter der Annahme zuvor ausreichender Entfernung ungebundenen SABs war möglicherweise die Absättigung der MCF7-Zelloberflächen im Zuge der Inkubationszeit von einer Stunde förderlich, um den Migrationseffekt messen zu können. Die Tatsache, dass keine zytotoxische Aktivität

feststellbar war, konnte den *in vitro*-Bedingungen geschuldet sein, jedoch auch der Dissoziationsrate und folglich ubiquitären Verteilung von SAB-Y1-ac in der Kulturschale, welche hohe Wanderungsaktivität hätte verursachen können. Die MCP-1-Positivkontrolle erreichte maximal 12 % gerichtete Chemotaxis. Davon ausgehend wurde die Potenz der SAB-Moleküle bestimmt, weshalb kritisch angemerkt werden musste, dass der Unterschied zwischen gerichteter und ungerichteter Wanderung schwer zu beurteilen war.

Ungebundener SAB wurde entfernt, bevor eine ungehinderte Wanderung der Makrophagen hin zu den Tumorzellen erlaubt war. Somit erlaubte das Experiment prinzipiell keine Aussage über die Art der immunsystematischen Aktivierung. Um einen Migrations-induzierenden Chemogradienten bereitzustellen, kam demnach SAB selbst in Frage, welcher in Ligand-Rezeptor-Manier dynamisch binden und sich lösen und so einen Gradienten ausbilden konnte. Zwar konnte in Kap. 3.8 keine mitogene Aktivität hinsichtlich einer SAB-induzierten Rezeptordelokalisation festgestellt werden, jedoch war eine Tumorzell-seitige Ausschüttung chemotaktischer Substanzen nach SAB-Bindung nicht auszuschließen.

#### **3.12 Bindungsmuster des SAB an Tumorzelllinien**

Es konnte bislang gezeigt werden, dass die EGFR-bindende Funktion des SAB, SYN-B1, im Fall der Brustkrebs-Zelllinie MCF7 spezifisch an den Rezeptor bindet (Kap. 3.8). Andererseits wurde während der SPR-basierten Affinitätsbestimmungen (Kap. 3.9) festgestellt, dass die SAB-Varianten dieser Arbeit, SAB-Y1 und SAB-Y1-ac, einen signifikanten Anteil unspezifischer Bindung aufweisen. Anhand weiterer, verschiedener Tumorzelllinien sollte nun genauer untersucht werden, ob der synthetische Antikörper überwiegend EGFR-gerichtete Bindung zeigt oder der Anteil unspezifischer Interaktionen mit Tumorzellen überwiegt.

Die EGFR-exprimierenden Zelllinien A431, A549 und HT29 wurden FAM-markierten Molekülen exponiert und nachfolgend die Fluoreszenzintensität gemessen. Dabei kam FAM-SAB-Y1-ac als potentieller Wirkstoffkandidat zum Einsatz. Unacetylierter FAM-SAB-Y1 konnte nicht mit zufriedenstellender Reinheit hergestellt werden. Um dennoch weitere Einblicke zu erhalten, wurde daher eine acetylierte und nicht acetylierte Variante des EGFR-Binders alleine getestet (FAM-KPEG<sub>3</sub>-SYN-B1, FAM-KPEG<sub>3</sub>-SYN-B1-ac). Dabei sollte der Einfluss einer Acetylierung auf die Affinität aufgeklärt werden. SAB-Y1 und SAB-Y1-ac hatten in den SPR-Messungen in Kap. 3.9 sehr unterschiedliche Anteile unspezifischer

Bindung gezeigt. Der C-Terminus der SYN-B1-Varianten war, analog zur Situation im SAB-Konstrukt, ladungsneutral gestaltet (Amid).

Bezeichnung	Struktur / Schema
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1	H-YHWYGYTPQNVI-(PEG) <sub>3</sub> -K-NH   FAM
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1-ac	ac-YHWYGYTPQNVI-(PEG) <sub>3</sub> -K-NH   FAM
FAM-SAB-Y1-ac	FAM-MLFKK-OH    PEG27    SYN-B1-ac

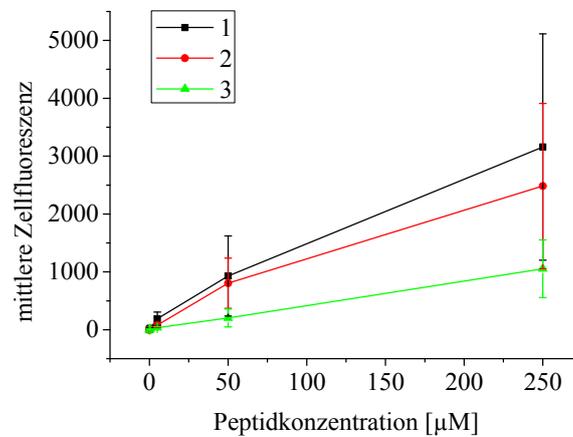
**Tab. 6:** Für FACS-Experimente eingesetzte, fluoreszenzmarkierte Peptidkonstrukte.

Schließlich wurde ein Direktvergleich gerichteter Bindung von SAB angestrebt, indem die stark EGFR-überexprimierende Zelllinie A431 mit siRNA behandelt (A431-si) und so eine Reduktion der Rezeptorexpression erreicht wurde. Im Falle signifikanter EGFR-Spezifität war somit zu erwarten, dass die Fluoreszenzintensität von A431 nach A431-si etwa um den Faktor der erreichten EGFR-Expressionsreduktion erniedrigt war.

Zunächst wurde ein Systemtest mit der zuvor etablierten MCF7-Zelllinie durchgeführt. Um gute Signalstärke sowie einfache Übertragbarkeit auf andere Zelllinien zu gewährleisten, wurde die etwas weniger robuste MCF7-EGFR-Linie verwendet. Die Zellen wurden steigenden Konzentrationen an FAM-SYN-B1 exponiert. Es sollte so festgestellt werden, ab wann das Fluoreszenzmolekül toxisch wirkt und ob eine Sättigungskurve erreicht wird, welche ferner eine Affinitätsbestimmung ermöglichen würde.

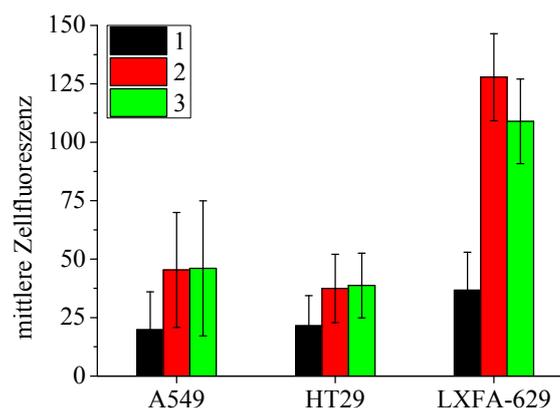
Es zeigte sich, dass die Zellen eine maximal vierstündige FAM-Exposition gut tolerierten, sofern Medium und nicht einfache Puffersysteme wie PBS verwendet wurden. Es deutete sich eine Sättigungskurve an (Abb. 41). Ab einer Endkonzentration von etwa 100 µM Testsubstanz stieg der Anteil letaler Zellen, während eine Auswertung mit guter Statistik dennoch möglich war. Es wurde jedoch eine Konzentrationsgrenze mit 100 µM angenommen, zumal spätere Experimente lediglich ein ausreichendes Fluoreszenzsignal liefern mussten. Dafür genühten Endkonzentrationen von max. 25 µM. Die nach SAB-Exposition (FAM-SAB-

Y1-ac) festgestellte Fluoreszenzintensität war gegenüber den weiteren Testpeptiden deutlich verringert.



**Abb. 41:** Systemtest mit MCF7-EGFR-Zellen. Die Zellen wurden Konzentrationen bis 250  $\mu\text{M}$  Testsubstanz exponiert. Überprüft wurde dabei FAM-SYN-B1 (1), FAM-KPEG<sub>3</sub>-SYN-B1 (2) und FAM-SAB-Y1-ac (3). Es deutete sich jeweils eine Sättigungskurve an. SAB führte zu deutlich geringeren Fluoreszenzintensitäten als 1 und 2.

Der Vergleich einer acetylierten und nicht acetylierten SYN-B1-Variante wurde anhand von drei zufällig ausgewählten Zelllinien mit EGFR-Expression durchgeführt (A549, HT29, LXFA-629) und zeigte jeweils ähnliche Intensitäten im Rahmen des Fehlers (Abb. 42, Balken 2 und 3). Dabei waren die Zelllinien zuvor jeweils 25  $\mu\text{M}$  Testsubstanz exponiert.



**Abb. 42:** Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Tumor-Zelllinien A549, HT29 und LXFA-629 nach Testsubstanz-Exposition (FAM-SAB-Y1-ac, 1 / schwarz; FAM-KPEG<sub>3</sub>-SYN-B1, 2 / rot; FAM-KPEG<sub>3</sub>-SYN-B1-ac, 3 / grün). SAB lieferte die geringste Fluoreszenzintensität und band entweder spezifischer an EGFR oder geringer affin. Zwischen der acetylierten und nicht acetylierten Form von SYN-B1 waren im Rahmen des Fehlers keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

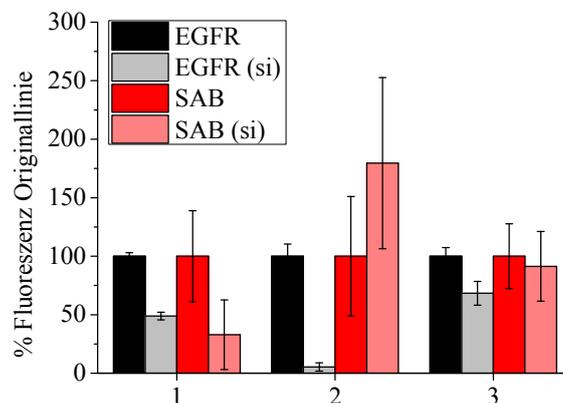
### 3. Ergebnisse

Es wurde geschlussfolgert, dass die N-terminale Acetylierung keinen signifikanten Einfluss auf das Bindungsverhalten hat. Dennoch musste bedacht werden, dass im SAB-Konstrukt auch die Konformation anderer Domänen einen Einfluss zeigen und zusammen mit einer Acetylierung zu unterschiedlichem Bindungsverhalten führen konnten (vgl. PEG-„Faltung“, Kap. 3.5).

Für alle Testsubstanzen wurden unterscheidbare Fluoreszenzsignale ab 5  $\mu\text{M}$  erhalten, was die Affinitätsdaten von 24 - 84  $\mu\text{M}$  für SAB-Y1-ac aus Kap. 3.9 unterstützte. Im Falle einer effektiven  $K_D$  im nanomolaren Bereich gemäß Li et al. (2005) wäre die Signalgrenze deutlich unterhalb 5  $\mu\text{M}$  zu erwarten gewesen.

FAM-SAB-Y1-ac lieferte in FACS-Experimenten durchweg geringere Fluoreszenzintensitäten (Abb. 42, Balken 1 schwarz). Zu diesem Zeitpunkt konnte gemutmaßt werden, dass die Affinität zu EGFR herabgesetzt war, da SYN-B1 nicht frei sondern C-terminal angeknüpft und somit dort ladungsblockiert vorlag. Alternativ könnte der Anteil unspezifischer Bindung bei SAB geringer sein, insbesondere unter Berücksichtigung der zweifach vorhandenen EGFR-Binder, welche theoretisch eine hohe Avidität gegenüber der Affinität von SYN-B1 allein liefern.

Es musste eine Reduktion der Rezeptorexpression erreicht werden, um einen Direktvergleich der Fluoreszenzintensität bei unterschiedlicher Rezeptorverfügbarkeit vornehmen zu können.



**Abb. 43:** Fluoreszenzintensitäten nach EGFR-Immunfärbung (schwarz, grau) und FAM-SAB-Y1-ac-Zugabe (rot, hellrot) bei A431-Zellen. Das ursprüngliche EGFR-Expressionslevel sowie die SAB-bedingte Fluoreszenz dieser Zelllinie wurde mit jeweils 100 % angenommen. Die SAB-bedingten Fluoreszenzintensitäten nach siRNA-Knockdown der EGFR-Expression („si“) waren bei 2 von 3 Versuchen etwa um die Knockdown-Effizienz erniedrigt.

A431-Zellen mit si-RNA-EGFR-Knockdown wurden von Dr. Viola Breyer (Fachgebiet Proteinchemie, Prof. Becker) im Triplikat hergestellt und zeigten anhand der EGFR-

Antikörpermarkierung im FACS eine Reduktion auf (1) 49, (2) 5 sowie (3) 68 % (Abb. 43). Die ebenfalls EGFR-überexprimierenden Tumorlinien HT29 sowie LXFA-629 waren nach siRNA-Behandlung letal und konnten nicht verwendet werden.

Relativ zur ursprünglichen A431 Linie war die Fluoreszenzintensität nach FAM-SAB-Y1-ac-Exposition in 2 von 3 Fällen reduziert, auf 32 % (1) sowie 91 % (3). Die Fluoreszenzreduktion nach SAB-Exposition war in (1) höher als die EGFR-Knockdown-Effizienz, während dieses Verhältnis in (3) umgekehrt war. Im Zuge der recht großen Standardabweichung der SAB-bedingten Fluoreszenzintensität deuteten die Ergebnisse insgesamt an, dass die SAB-Bindung mit dem EGFR-Expressionslevel zusammenhing, also spezifische Bindung vorlag. Dabei war die sehr heterogene Fluoreszenzverteilung nach SAB-Exposition möglicherweise der Austauschrate oder auch mäßigen Affinität von  $> 24 \mu\text{M}$  geschuldet.

Wenngleich die Zellen nach hocheffizientem EGFR-Knockdown (Abb. 43, 2) vital waren, so stellte dies möglicherweise dennoch den Grund für die unerwartet starke, SAB-bedingte Fluoreszenz nach Knockdown dar. Eine siRNA-Behandlung der Zelllinien HT29 und LXFA-629, welche EGFR relativ zu A431 nur leicht überexprimieren, resultierte in apoptotischen Zellkulturen. Somit könnte die hohe EGFR-Knockdown-Effizienz bei (2) Stress verursacht und die Aufnahme extrazellulären Materials wie SAB erleichtert haben.

#### **3.13 Toxizität des SAB *in vivo***

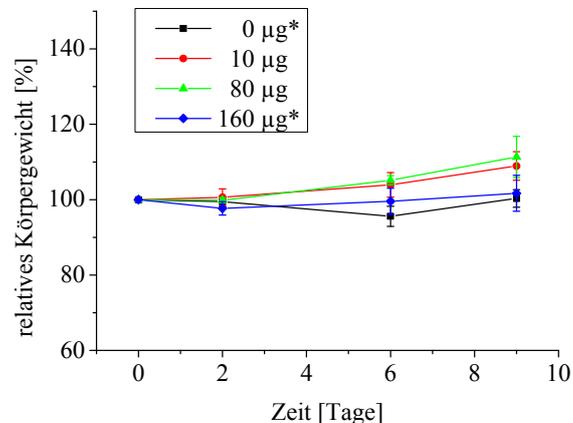
Das Einsatzziel des synthetischen Antikörpers ist der menschliche Organismus. Dabei ist es wichtig, dass er seine Wirksamkeit entfaltet und gleichzeitig geringe bis nicht vorhandene Nebenwirkungen zeigt, um eine kontinuierliche Therapie bis hin zur Heilung zu ermöglichen. Ungeachtet der beabsichtigten Funktion, können Nebenwirkungen vom synthetischen Antikörper als körperfremder Substanz ausgehen, etwa im Zuge einer SAB-induzierten Immunreaktion oder Kreuzreaktivität des SAB mit anderen molekularen Komponenten im Organismus.

Zur ersten Einschätzung potentiell toxischer Nebenwirkungen wurde das Tiermodell der Maus gewählt. Immundefiziente Nacktmäuse stellen dabei einen besonders geeigneten Organismus dar, da aufgrund fehlenden Thymus' und konsequenterweise T-Zell-Defizienz menschliche Tumore ohne Rejektionsgefahr implantiert und studiert werden können. Die Konsequenzen einer Verabreichung des SAB lassen sich umfangreich verfolgen.

### 3. Ergebnisse

Organismische Unverträglichkeit kann äußerlich durch Parameter wie apathisches Verhalten oder Hautausschlag angezeigt werden. Detailliertere Analysen ermöglichen die Bestimmung etablierter klinischer Parameter wie Alanin-Aminotransferase- (ALT), Aspartat-Aminotransferase- (AST) und Laktat-Dehydrogenase-Aktivität (LDH), welche eine Lebererkrankung infolge der SAB-Gabe anzeigen können. In dem Fall werden Mittelwerte von 51 U/l (ALT) und 119 U/l (AST) überschritten (Kap. 2.8.1). Für LDH waren vom Anbieter der Versuchstiere keine Angaben verfügbar. Allgemeine Literaturwerte liefern für Mäuse etwa 260 U/l (LDH; Nadal-Ginard, 1978). Als genaueste Referenz wurde ein Wert für Nacktmäuse von Henke et al. (2009) mit 1315 U/l angenommen.

Eine potentielle Gewichtsabnahme aufgrund körperlicher Belastung wurde ebenso verfolgt wie das Tumolvolumen. Dessen Entwicklung gab ferner Aufschluss über die Wirksamkeit des SAB. Tumortragende Tiere sind im Zuge der Belastung tendenziell anfälliger für Nebenwirkungen körperfremder Substanzen wie SAB. Aus dem Grund wurde der Kontrollpopulation, welcher kein SAB verabreicht wurde, sowie der Maximaldosis-erhaltenden Population, ein EGFR-positiver, kolorektaler Tumor menschlichen Ursprungs xenotransplantiert.



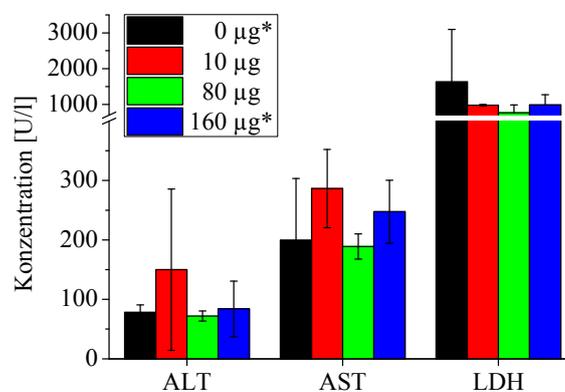
**Abb. 44:** Veränderung des relativen Körpergewichts der Mäuse bei SAB-Gabe mit den Dosierungen 0, 10, 80 und 160 µg/Maus/Tag. Tumortragende Populationen sind gekennzeichnet (\*). Im Vergleich zur Kontrolle (0 µg, schwarze Linie) sowie zum Startpunkt  $t_0$  des Experiments blieb das Gewicht bei sämtlichen Testpopulationen mit 96 - 111 % relativ konstant.

Relativ zum Anfangsgewicht zeigten sämtliche SAB-erhaltenden Testpopulationen tendenziell eine leichte Gewichtszunahme auf bis zu 111 %. Dabei fiel die Zunahme für die Population der höchsten Dosierung (160 µg) am geringsten aus und ähnelte am ehesten der Kontrollpopulation, welche insgesamt konstanter dem Ausgangswert blieb (Abb. 44). Sofern

### 3. Ergebnisse

---

der Unterschied bedeutsam war, konnte dies erklärt werden, da die Populationen [0 µg] und [160 µg] ausschließlich tumortragende Tiere beinhalteten. Das Ergebnis lieferte u. a. den Grund, das Experiment nach neun Tagen vorzeitig zu beenden, da Körperfunktionsbeeinträchtigende Nebenwirkungen in deutliche Gewichtsabnahme hätte resultieren müssen. Zur Bestimmung von Entzündungsparametern der Leber (ALT, AST, LDH) wurde das Organ zwei und vier Stunden nach Versuchsende entnommen. Die Werte zeigten zwischen den Populationen keine signifikanten Unterschiede. Abb. 45 zeigt die Messergebnisse nach 4 Std. Im Fall von ALT lagen die Werte im Rahmen der Richtwerte mit Ausnahme der Population, welche eine SAB-Dosis von 10 µg/Maus/Tag erhielt. Dieser etwa doppelt so hohe Messwert war jedoch gleichzeitig mit einem erheblichen Messfehler behaftet, welcher die für die anderen Populationen erhaltenen Werte abdeckte. Die AST-Werte waren insgesamt leicht erhöht und zeigten eine ALT-vergleichbare Tendenz für die Population [10 µg], jedoch mit einem weniger signifikanten Ausreißer. Der Messfehler erstreckte sich auch hier bis in den Wertebereich der anderen Versuchsgruppen. Für LDH wurden relativ zur Kontrolle eher abnehmende Konzentrationen festgestellt. Allgemein entsprachen die LDH-Konzentrationen dem Referenzwert. Die Bilirubinkonzentration ist bei starker Leberentzündung erhöht (Med4You<sup>14</sup>) und lag hier unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 45:** Konzentration von ALT, AST und LDH nach SAB-Gabe mit den Dosierungen 0, 10, 80 und 160 µg/Maus/Tag. Bestimmt anhand von Gewebeproben der Leber, welche vier Stunden nach Versuchsende entnommen wurden. Tumortragende Populationen sind gekennzeichnet (\*).

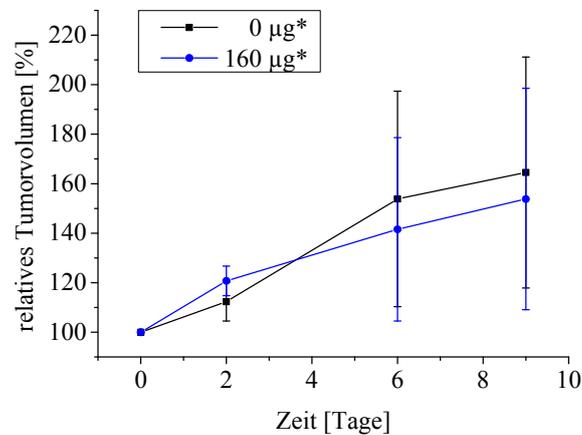
Es konnten insgesamt keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Populationen gemessen werden. Dosisabhängige Phänomene wurden somit nicht beobachtet.

---

<sup>14</sup> [http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef\\_bilirubin.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef_bilirubin.htm)

Die Analyse des Körpergewichts und der Entzündungsparameter der Leber indizierte ebenso wie die fortwährende Beobachtung des physischen Zustands der Tiere während der Versuchsdauer keine akuten Nebenwirkungen des SAB. Da somit keine maximal tolerierte Dosis ermittelt werden konnte, wurde gefolgert, dass der kontinuierliche Einsatz des Wirkstoffs weitgehend unproblematisch ist.

Eine Vermessung der Tumormasse konnte bei den Populationen [0  $\mu\text{g}$ ] und [160  $\mu\text{g}$ ] erfolgen. Nach Abschluss des Experiments hatte sich in beiden Versuchsgruppen die Tumormasse relativ zum Zeitpunkt  $t_0$  mit 154 - 164 % sehr vergleichbar vergrößert. (Abb. 46). Somit war keine deutliche Korrelation zwischen SAB-behandelter und -unbehandelter Population feststellbar.



**Abb. 46:** Veränderung der relativen Tumorgroße der Mäuse nach SAB-Gabe mit den Dosierungen 0 und 160  $\mu\text{g}$ /Maus/Tag. Tumortragende Populationen sind gekennzeichnet (\*). Die Tumorgroße nahm mit und ohne SAB-Dosis auf relativ vergleichbare 154 - 164 % der Ausgangsmasse zu.

Die Verfolgung des Tumorwachstums konnte nicht zeigen, dass eine SAB-bedingte Remission erfolgte. Gemäß der in Kap. 2.8.1 festgelegten klinischen Parametergrenzen wurde von weitgehend unbeeinflusster Progression ausgegangen. Es konnte somit bislang keine tumorgerichtete Wirksamkeit des synthetischen Antikörpers demonstriert werden, weshalb klinisch-chemische Analysen weiteren Aufschluss geben sollten.

#### 3.14 SAB-induzierte Immunantwort

In Kap. 3.13 konnte keine SAB-bedingte, signifikante Inhibition des Tumorwachstums gefolgert werden. Im Falle einer eher schwachen, jedoch vorhandenen Wirksamkeit des SAB

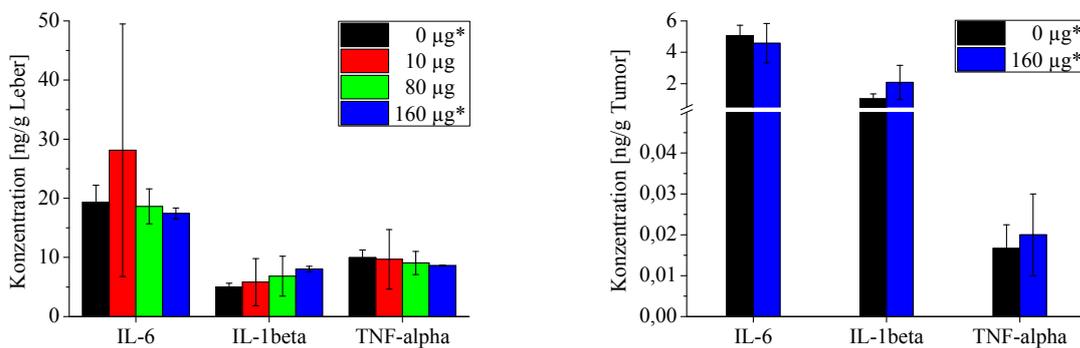
### 3. Ergebnisse

hat die Vermessung der Tumorgroße unzureichende Aussagekraft. Klinisch-chemische Analysen sollten daher nachfolgend klären, ob eine Aktivierung des Immunsystems infolge der SAB-Gabe erfolgt war.

Immunsystematische Zellen wie Makrophagen sezernieren nach Aktivierung u. a. diverse Zytokine, welche weitere Zellen rekrutieren und so die lokale Makrophagenkonzentration erhöhen sollen. Als Indikatoren für Makrophagenaktivität wurden hier Interleukine (IL-6, IL-1 $\beta$ ) und der Tumor-Nekrose-Faktor TNF- $\alpha$  ausgewählt. Die Parameter wurden sowohl anhand von Leber- als auch von Tumor-Gewebeproben per ELISA und quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt. Im Fall SAB-induzierter Makrophagenaktivierung wurden relativ zur Kontrolle erhöhte Werte erwartet.

Per ELISA zeigte sich in den Analysen der Leberproben die TNF- $\alpha$ -Konzentration relativ unbeeinflusst der SAB-Gabe (Abb. 47, links). Im Mittel war eine leichte Abnahme mit steigender SAB-Dosierung festzustellen. IL-6 verhielt sich im Rahmen des Messfehlers vergleichbar, wenngleich die Population [10  $\mu$ g] eine etwa 30 % höhere, mittlere Zytokinkonzentration aufwies. Im Zuge des erheblichen Messfehlers wurden jedoch die erhaltenen Werte der anderen Populationen abgedeckt (vgl. [10  $\mu$ g]-Population für ALT, Kap. 3.13, Abb. 45). Auch für IL-1 $\beta$  waren ausgeprägte Messfehler zu verzeichnen, innerhalb derer keine signifikanten Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen ersichtlich war. Im Mittel zeigte sich ein leichter Anstieg der Zytokinkonzentration mit erhöhter SAB-Dosis.

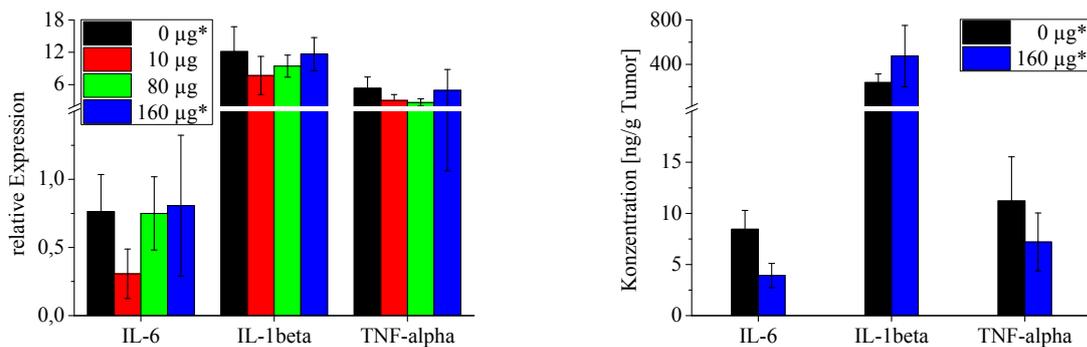
Die Zytokinkonzentration im Tumorgewebe zeigte keine eindeutig SAB-korrelierte Konzentrationsveränderung, insbesondere -erhöhung (Abb. 47, rechts).



**Abb. 47:** Konzentration der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in der Leber (links) und dem Tumorgewebe (rechts) nach SAB-Gabe mit den Dosierungen 0, 10, 80 und 160  $\mu$ g/Maus/Tag. Bestimmt per ELISA anhand von Gewebeproben, welche vier Stunden nach Versuchsende entnommen wurden. Tumortragende Populationen sind gekennzeichnet (\*).

### 3. Ergebnisse

Eine Bestimmung der Zytokinexpression per quantitativer Echtzeit-PCR für präpariertes Leber- und Tumorgewebe war aus zuvor angeführten Gründen ebenfalls nicht aussagekräftig (Abb. 48). Der IL-6-Parameter bildete für Leberanalysen eine Ausnahme (Abb. 48, links). Relativ zur Kontrolle und zu anderen Versuchsgruppen war der Wert der Population [10 µg] um mehr als 50 % vermindert.



**Abb. 48:** Konzentration der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in der Leber (links) und dem Tumorgewebe (rechts) nach SAB-Gabe mit den Dosierungen 0, 10, 80 und 160 µg/Maus/Tag. Bestimmt per quantitativer Echtzeit-PCR anhand von Gewebeprobe, welche vier Stunden nach Versuchsende entnommen wurden. Tumortragende Populationen sind gekennzeichnet (\*).

Insgesamt konnte nicht nachgewiesen werden, dass SAB-Gabe die Konzentration der gewählten Zytokine dosisabhängig oder allgemein steigerte. Da ausschließlich eine signifikante Konzentrationserhöhung auf eine erfolgte Makrophagenaktivierung schließen ließe, konnte die beabsichtigte Wirksamkeit des SAB nicht gezeigt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1 Synthese des SAB

Der synthetische Antikörper SAB konnte über drei Sequenzen in einer Fmoc-SPPS-basierten Totalsynthese aufgebaut und hochrein erhalten werden (Kap. 3.1, 3.3).

Die Herstellung der immunogenen Peptidsequenz fMLFKK verlief nahezu quantitativ, führte jedoch zu einem diastereomeren Produkt nach fMet-Kopplung. Wenngleich beide Epimere des Peptids, auch als SAB-Einheit, in den Folgeversuchen zur Ermittlung der chemotaktischen Potenz voll aktiv waren (Kap. 3.10, 3.11), so sollte zukünftig die manuelle Formylierung von Met erfolgen, um ein uniformes Produkt und zusammen mit optimierter PEG-Kopplungseffizienz einen Aufreinigungsvorteil zu erhalten. Eine relativ zügige und schonende Formylierungsmethode ist mit Ameisensäure möglich (Jung et al., 2002), welche für fMLFKK innerhalb von max. 24 Std. quantitativ und ohne Bildung von Diastereomeren verläuft (Fachgebiet Proteinchemie, Prof. Becker, Karine Farbiarz; unveröffentlichte Daten).

Die simultane Kopplung eines Fmoc-NH-(PEG)<sub>27</sub>-OH je Lys verlief mit unzureichender Effizienz, führte folglich zu Nebenprodukten und verringerte die Ausbeute. Es gelang nicht, dieser Problematik mit verlängerten Kopplungszeiten und Temperierung der Reaktionslösung zur Senkung der Viskosität erfolgreich zu begegnen. Unter der Annahme mangelhafter Zugänglichkeit zur  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysine aufgrund deren räumlicher Nähe zum polymeren Träger könnte der Ansatz verfolgt werden, an einem Boc-Harz zunächst einen Linker aufzubauen. Dieser sollte einfach, während der weiteren Peptidsynthese unreaktiv oder dauerhaft geschützt, nicht zu flexibel oder zu starr sowie gut löslich sein. Eine Sequenz von Aminosäuren mit alternierend relativ kleiner bzw. großer Seitenkette, beispielsweise zehn Glycin-Serin-Wiederholungen, wäre zweckmäßig. Nach anschließend N-terminaler Anbringung eines Wang-Linkers (Wang, 1973) könnte mit der Synthese des SAB begonnen und das Rohprodukt schließlich mit TFA sauer abgespalten werden. Unter diesen Bedingungen würde der per Boc-Chemie hergestellte, peptidische Linker am Harz verbleiben und das SAB-Rohprodukt unverändert erhalten werden.

Ferner könnte eine alternative C-terminale Aktivierung von PEG<sub>27</sub> etwa per HATU (Montalbetti et al., 2005) die Kopplungseffizienz fördern. Während das Polymer in Anlehnung an Aminosäuren Amino- und Carboxy-funktionalisiert ist, so besteht dennoch die

Möglichkeit, dass die Reaktivität während der Kopplung geringer ist als die einer Aminosäure.

Eine Abstandsvergrößerung zwischen den zwei Lys-Kopplungspartnern über wenige, relativ inerte Aminosäuren würde eine weitere Modifikation des ursprünglichen fMLF-Peptids bedeuten und müsste getestet werden, um die volle Reaktivität des resultierenden SAB-Konstrukts sicherzustellen. Jedoch bestimmt allein fMLF die Immunogenität (Boxer et al., 1979) und zwei zusätzliche C-terminale Lysine waren konsequenterweise nicht aktivitätsbeeinflussend (Kap. 3.10, 3.11), so dass eine nochmalige Sequenzverlängerung vermutlich toleriert würde. Obrist et al. (1983) ligierten fMLF erfolgreich mit einem Antikörper und zeigten gute biologische Aktivität des relativ zu SAB großen Moleküls. Die Daten legen nahe, dass lediglich die zugängliche Exposition des fMLF-Motivs von Bedeutung ist, ungeachtet C-terminal flankierender Aminosäuren.

Geringer substituiertes Harz könnte die Kopplungseffizienz, aufgrund des sterischen Anspruchs von PEG<sub>27</sub> jedoch vermutlich nur leicht, erhöhen. Im Zuge der Verwendung anderer, ebenfalls relativ polarer Lösungsmittel wie THF oder ACN bzw. eines entsprechendes Gemisches mit DMF, könnte die Konfiguration des Polymers variieren und einen besseren Zugang gewähren.

Schließlich wäre der Austausch von PEG<sub>27</sub> gegen kürzere Polymere denkbar. Die Kopplung von Fmoc-NH-(PEG)<sub>3</sub>-OH verlief in dieser Arbeit mit hoher Effizienz, könnte jedoch im entsprechend abgewandelten SAB geringere Flexibilität und, aufgrund der Größenreduktion des synthetischen Antikörpers, schnellere Ausscheidung über die Nieren und folglich geringere Bioverfügbarkeit bedingen. Polymere wie Polyphosphazene (In-Pharma<sup>15</sup>) zeigen PEG-ähnliche Eigenschaften, etwa in Hinblick auf Flexibilität, können mit definierter Größe hergestellt werden (Raab et al., 2006) und kämen als PEG-Ersatz in Betracht. Polycarboxybetain stellt als zwitterionisches Polymer eine relativ neuartige Alternative dar, wobei das Polymer vorteilhafterweise die Bindungsaffinität eines Wirkstoffs, mit dem es konjugiert wird, sehr gering beeinflusst (Keefe et al., 2011).

Die konvergente Synthese von SAB mittels Oxim-Ligationsstrategie war nicht erfolgreich (Kap. 3.2), wenngleich größere, entsprechend modifizierte Proteine und Polymere mit dieser Methodik konjugiert wurden (Kochendoerfer et al., 2003). Eine Aufreinigung der Bausteine gelang in dieser Arbeit nicht, so dass der Grundgedanke einer zeitsparenden Produktbildung

---

<sup>15</sup> <http://www.in-pharmatechnologist.com/Materials-Formulation/PEG-alternative-from-Parallel-Solutions>

aus sauberen Edukten nicht verfolgt werden konnte. Die ligationsfähige Modifikation von Peptiden und Peptidderivaten ist relativ einfach durchzuführen und führte zur Wahl der Oximchemie, war jedoch im Fall von SAB problematisch, da die Modifikation des Ligationspartners Ox-Pyr nicht quantitativ verlief. Der Grund dafür lag jedoch vermutlich in der festgestellten PEG-Kopplungs- und Konformationsproblematik (Kap. 3.1, 3.5) und war nicht der Oximchemie zuzuschreiben. Da die Fortführung der SAB-Synthese nach PEG-Kopplung problemlos war (vgl. Kap. 3.1), wurde davon ausgegangen, dass Ox-Pyr entweder ab der Gegenwart N-terminal ungeschützten PEGs, spätestens jedoch N-terminal Pyruvat-modifizierten PEGs in den gewählten Lösungsmitteln keine Konformation besaß, welche die Reaktionsseite für Ox-AOAc frei zugänglich bereithielt. Ferner konnte angenommen werden, dass Ox-AOAc aufgrund verminderter Löslichkeit in den salzhaltigen Puffern V und W dort nicht oder nur eingeschränkt als Reaktand zur Verfügung stand.

Auch bei erfolgreicher Testung alternativer Lösungs- und Reaktionssysteme scheint ein Wechsel der Ligationschemie erfolgversprechender. Insbesondere müsste der peptidische Oxim-Ligationspartner Ox-AOAc später aufwändig und kostenintensiv retroinvers aufgebaut werden, um den synthetischen Antikörper in seiner ursprünglichen Konformation weitgehend zu erhalten. Das in dieser Arbeit hergestellte Ox-AOAc diente lediglich einem Strategietest.

Eine alternative, verbreitete und effiziente Ligationsmethode ist die Azid- bzw. Alkin-Modifikation von Peptidbausteinen zur Anwendung von Click-Chemie (Franke et al., 2005). Dabei ist insbesondere das Anbringen einer Azidgruppe am Peptid relativ zur Oximstrategie aufwändig, wenngleich etabliert (Babu et al., 2005), und könnte ferner durch Anknüpfung kommerziell erhältlicher Bausteine an PEG oder die Verwendung direkt passend modifizierter Polymere vereinfacht werden.

### **4.2 Stabilität des SAB**

Das ursprüngliche Design des synthetischen Antikörpers erzielte ein stabiles Molekül dahingehend, dass hohe Löslichkeit, Monodispersität und Langzeitstabilität erreicht wurden (Kap. 3.4, 3.5, 3.7). Eine peptidtypische, geringe Halbwertszeit in Blutplasma wurde jedoch auch für das Peptid-Polymer-Konjugat SAB-Y1 identifiziert (Kap. 3.6) und verlangte eine molekulare Modifikation zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit.

Mit N-terminaler Acetylierung des SAB-Y1 zu SAB-Y1-ac wurde die Halbwertszeit in humanem Blutplasma auf 20 Min. verdoppelt, jedoch steht dieser Wert etwa weiter

stabilitätsoptimierten, zyklisierten Peptiden mit mehreren Stunden gegenüber (Gracia et al., 2009). Darüber hinaus wurde durch die Acetylierung die Löslichkeit in wässrigen (Puffer-) Systemen verringert, was für spätere Anwendungen problematisch sein könnte. Die Testung alternativer Modifikationen zur Förderung der Halbwertszeit im Zielorganismus, etwa niedermolekulare Formylierung oder auch der Einsatz von D-Aminosäuren bei Protease-anfälligen Abschnitten (Werle et al., 2006), ist unter Aufrechterhaltung der ursprünglichen Interaktionsfähigkeit sowie physikochemischer Grundeigenschaften denkbar. Die Einführung weiterer oder Abänderung funktioneller bzw. interaktionsfähiger Gruppen kann das Affinitätsverhalten des EGFR-Binderpeptids stark beeinflussen. Sollte eine solche Maßnahme dennoch notwendig sein, scheint ein auf SYN-B1-Derivate fokussierter Phagendisplay-Ansatz sinnvoll.

Eine Einführung zweier Acetylgruppen zur Steigerung der Bioverfügbarkeit setzte die Löslichkeit des synthetischen Antikörpers drastisch herab (Kap. 3.4). Auch im Zuge weiterer Ergebnisse dieser Arbeit, etwa der schlechten Wiederfindungsrate des SAB nach Verdünnung mit Salzpuffern, ist eine solvatationsorientierte Designoptimierung des synthetischen Antikörpers angezeigt. So könnte eine C-terminale Erweiterung der EGFR-Bindedomäne um wenige löslichkeitsvermittelnde Gruppen, beispielsweise kleinere Aminosäuren, förderlich sein. Dabei muss ausgeschlossen werden, dass die vorgenommene Modifikation unspezifische Interaktionen fördert, was wiederum relativ inerte, ggf. kurze Polymere wie in dieser Arbeit verwendetes PEG<sub>3</sub> attraktiv erscheinen lässt. Es konnte gezeigt werden, dass PEG auch als größeres Polymer PEG<sub>27</sub> nicht mit EGFR wechselwirkt (Kap. 3.9) und prinzipiell geeignet wäre.

Die Anbringung von mehr als zwei EGFR-Binderpeptiden im SAB-Konstrukt könnte das Löslichkeitsproblem beseitigen, da zwangsläufig weitere Linkerstrukturen notwendig wären und auch unter dem Gesichtspunkt der Löslichkeit ausgewählt werden könnten. Ein multivalenter SAB wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert.

### **4.3 Bindungseigenschaften des SAB**

Für den EGFR-Binder SYN-B1 als Bestandteil des synthetischen Antikörpers konnte in Immunfluoreszenz-Versuchen gezeigt werden, dass das Peptid seinen molekularen Interaktionspartner spezifisch erkennt, ohne dabei mitogen zu wirken (Kap. 3.8). Ausgehend von der publizierten Dissoziationskonstanten (20 nM; Li et al, 2005) wurde dabei mit einer

etwa 1000-fach gesteigerten Konzentration gearbeitet, um auch bei höherer Anwendungsdosierung proliferative Effekte am Tumorgewebe auszuschließen. Ferner konnte so der mitogene Charakter von SYN-B1 im späteren SAB-Konstrukt abgeschätzt werden, wo der doppelt vorhandene EGFR-Binder theoretisch höhere Affinität bzw. Avidität erwarten ließ. Nach abgeschlossener Entwicklung sollte ein fluoreszenzmarkierter Wirkstoffkandidat des SAB unter vergleichbaren Bedingungen mit verschiedenen, EGFR-exprimierenden Tumorkonstrukten getestet werden.

Das mitogene Potential von SYN-B1 und SAB wurde als gering eingestuft, da EGFR nach Exposition nicht internalisiert wurde (Kap. 3.8). Li et al. (2005) identifizierten und untersuchten den EGFR-Binder erstmals und berichteten gegensätzlich von einer Internalisierung des Peptids, ähnlich EGF nach Rezeptorbindung (Scaltriti et al., 2006). Es ist anzumerken, dass von der Arbeitsgruppe wichtige Kontrollen ausgelassen wurden. So wurde die Immunfärbung gegen EGFR parallel zum vermeintlichen Internalisierungsnachweis nicht geleistet, weshalb keine definitive Aussage dahingehend getroffen werden durfte, dass die Fluoreszenz innerhalb der Zelle beobachtet wurde und eine Endozytose des Rezeptors bedeutete. Die von der Arbeitsgruppe ferner ermittelte, mit 10 % gegenüber EGF (50 %) deutlich geringere Mitogenität unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, welche keine messbare Internalisierung zeigen.

Mit  $K_D = 24 - 84 \mu\text{M}$  lieferte SAB-Y1-ac eine unerwartet geringe Affinität zu EGFR (Kap. 3.9). Dabei war die Dissoziationsrate der von IgG-abgeleiteten Antikörpern ähnlich (Townsend et al., 2006) und ließ vergleichbar nachhaltige Wirksamkeit erwarten. Ausgehend von der publizierten  $K_D$  für SYN-B1 von 20 nM (Li et al., 2005) wurde insbesondere im Zuge doppelt vorhandenen EGFR-Binderpeptids im SAB-Konstrukt eine vergleichbare oder sogar verbesserte Affinität erwartet, bis hin zur Minderung peptidtypischer, unspezifischer Bindung an ubiquitär vorkommende Proteine wie Albumin oder auch Zelloberflächen. Der letzte Punkt wurde von SPR-Messungen belegt, welche zeigten, dass der Anteil unspezifischer Interaktion von SYN-B1 zu SAB-Y1-ac stark verringert war.

Li et al. (2005) führten Affinitätsbestimmungen für den EGFR-Binder SYN-B1 mittels radioaktiver Isotopenmarkierung durch und erreichten so hohe Sensitivität. Während bei zellbasierten Experimenten geringere Affinitäten zu erwarten waren als beim isolierten Rezeptor-Ligand-System, da etwa unspezifische Interaktionen die Wirksamkeit herabsetzen, so war eine mehr als 1000-fach geringere Dissoziationskonstante dennoch überraschend.

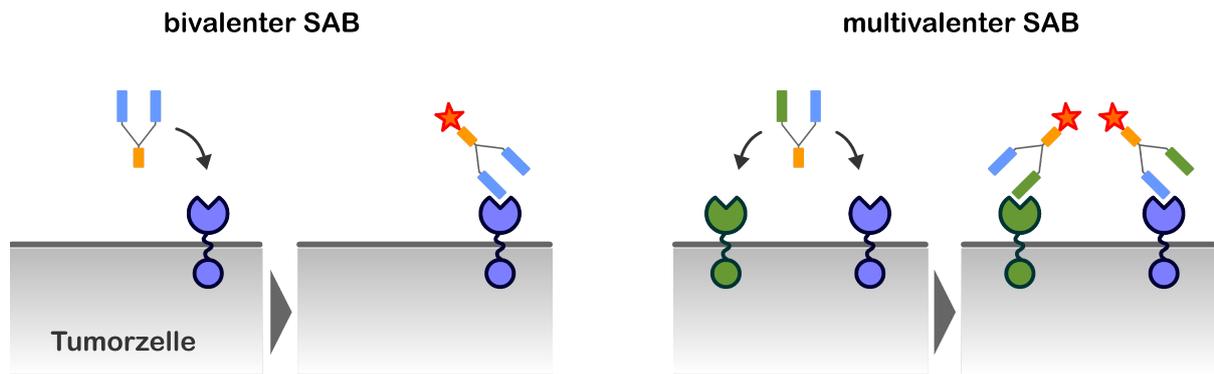
Li et al. (2005) lieferten eine rudimentäre Beschreibung des für die Phagendisplay-Methodik verwendeten EGFR und arbeiteten längerfristig unter nicht-reduzierenden Bedingungen sowie

detergenzfrei. Somit lässt sich vorsichtig vermuten, dass es sich im Gegensatz zu den Experimenten dieser Arbeit nicht um den Volllängen-Rezeptor handelte. Sollte eine rekombinant hergestellte, größenreduzierte, extrazelluläre Version verwendet worden sein, so würde etwa bei Expression via *E. coli* die umfangreiche Glykosilierung fehlen sowie ohne Reduktionsmittel eine Clusterbildung der Rezeptoren möglich sein. EGFR besitzt dazu eine extrazelluläre, Cystein-reiche Region (Kumagai et al. 2003). Es wäre demnach zu erwarten, dass SYN-B1 gegenüber EGFR voller Länge und mit vollständigen posttranslationalen Modifikationen ein anderes Bindungsverhalten zeigt. Im Gegensatz dazu gelang Li et al. (2005) ein Hinweis auf spezifische EGFR-Interaktion in Zellkultur, da unmarkierter EGF mit markiertem Binderpeptid um die Rezeptorbindung konkurrieren konnte und die Fluoreszenzintensität geringer ausfiel.

Im Gegensatz dazu zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SPR-Messungen dennoch die Problematik unspezifischer Bindung, welche im SAB-Konstrukt über Acetylierung reduziert werden konnte. Wenngleich die Sensitivität der Oberflächenplasmonenresonanz-Methodik geringer ist als die der radioaktiven Markierung, so war bei einer hohen Affinität von 20 nM (SYN-B1; Li et al., 2005) auch für SAB ein deutlicheres Signal zu erwarten. Der verwendete Wildtyp-Rezeptor wurde als direkter Grund für schlechte Messungen ausgeschlossen. Er blieb nachhaltig immobilisiert, konnte regeneriert werden und zeigte reversible Interaktion mit dem Analyt. Die Isolation des Volllängenrezeptors bedingt aufgrund extremer pH-Werte während der Aufreinigung eine geringe zytosolische Kinaseaktivität, jedoch zeigten Yarden et al. (1985), dass die extrazelluläre Bindung von EGF an derart isolierten Rezeptor unbeeinträchtigt war.

Es wurde angenommen, dass die Affinität des EGFR-Binderpeptids vom SPR-Versuchsdesign bis zur Situation im Zielorganismus geringer ausfällt, da beispielsweise proteolytischer Abbau oder auch unspezifische Bindung, etwa an Albumin wie in Kap. 3.9 gezeigt, die Verfügbarkeit verringern. Eine Optimierung des SAB-Konzepts wäre zu testen, falls der gewünschte Effekt auf zellulärer Ebene nicht ausreicht.

Von der bislang bivalenten EGFR-Bindedomäne könnte zur Multivalenz erweitert werden, so dass die Avidität deutlich erhöht und ggf. unspezifische Interaktion weiter gesenkt wird. Alternativ könnte im Zuge der Multivalenz ein zusätzliches molekulares Tumorziel angesprochen werden, vorausgesetzt, beide Rezeptoren werden auf einer Tumorzelle überexprimiert (Abb. 49).



**Abb. 49:** Schematischer Vergleich der Wirkweise eines bivalenten (links) und multivalenten SAB (rechts). Bivalenter SAB kann an einen Rezeptortypen binden und ein immunogenes Signal darstellen. Werden gleichzeitig zwei Rezeptortypen exprimiert, kann multivalenter SAB an zwei Ziele binden, in jedem der Fälle seine immunogene Potenz entfalten und somit schneller oder auch stärker wirken.

Von Zhao et al. (2007) wurde ein für HGFR hochaffines Peptid per FACS identifiziert. Eine deutliche Verschlechterung der Dissoziationskonstanten im Gegensatz zur Isotopenmarkierungsmethodik wäre hier unwahrscheinlicher und könnte somit einen guten Kandidaten für multivalenten SAB darstellen.

Einen anderen Ansatz stellt die Verwendung von Dendrimer-Strukturen dar (Mekelburger et al., 1992). Das ursprüngliche SAB-Konzept würde hier deutlich verändert, indem eine hohe Anzahl an Binderpeptiden, über vielfach verzweigte Strukturen exponiert, zu gesteigerter Avidität für ein molekulares Ziel führt (Sadler et al., 2002). Die Synthese ist zwar aufwändiger, jedoch gut etabliert. Weitere Vorteile eines solchen Wirkstoffs könnten im Zuge hohen Molekulargewichts nachhaltige Bioverfügbarkeit sein sowie hohe Löslichkeit unter der Voraussetzung entsprechend gewählter Dendrimerbausteine.

#### 4.4 Chemotaktische Potenz des SAB

Das immunogene fMLF-Peptid zeigte im SAB-Molekül hohe chemotaktische Aktivität bei Zellen des Immunsystems (Kap. 3.10). Trotz in SPR-Messungen festgestellter, geringer EGFR-Affinität war dies auch im Scratchassay-abgeleiteten Versuch zur Chemotaxis der Fall (Kap. 3.11). Die überhohe Aktivität an Met oxidierten SAB (SAB-Y1-ox) war unerwartet, da die fMLF-Sequenz nach immunsystematischer Erkennung via Oxidation inaktiviert wird und demnach geringes chemotaktisches Potential besteht (Tsan et al., 1981). Möglicherweise wirkt der Prozess der Inaktivierung über einen positiven Feedback-Mechanismus jedoch

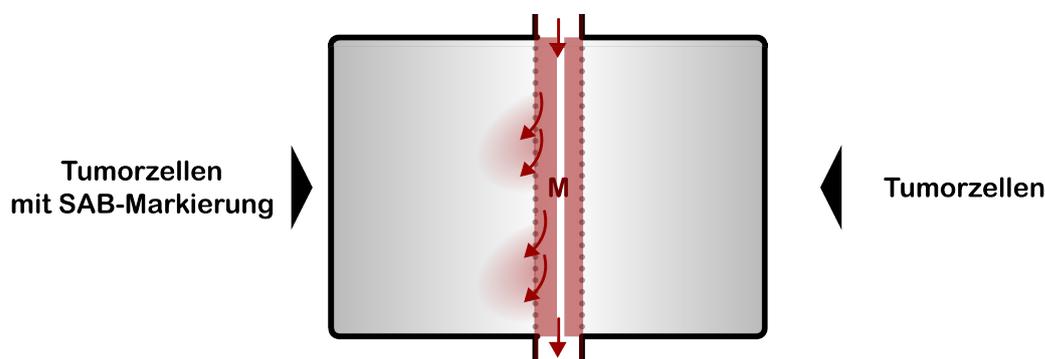
zugleich oder anfänglich inflammatorisch und löst Chemotaxis über die Zytokinausschüttung seitens der Immunzellen aus.

Es ist wichtig festzustellen, worin das chemotaktische Wirkprinzip des synthetischen Antikörpers nach Bindung an Tumorzellen besteht. Zwar ist naheliegend, dass im Zuge eines dynamischen Systems von Assoziation und Dissoziation ein Konzentrationsgradient gebildet wird. Jedoch könnte trotz nicht feststellbarer mitogener Aktivität die Tumorzell-seitige Ausschüttung von Zytokinen ebenfalls chemotaktisch wirken. In Kap. 3.11 wurde keine Zerstörung der Tumorzellen beobachtet, wie sie im Zuge SAB-bedingter fMLF-Bindung an Makrophagen und deren konsequenter Aktivierung zu erwarten war. Obrist et al. (1982) zeigten, dass ein fMLF-Antikörper-Konjugat positiv chemotaktisch wirkte, nach Bindung an Antigen-positive Tumorzellen diese zur Ausschüttung von Zytokinen stimulierte und ferner selbst den zytotoxischen Mechanismus von Makrophagen auslöste. Somit scheint es wahrscheinlich, dass Immunsystemzellen, welche auf chemotaktische Stimuli reagieren, gleichzeitig in ihrer zelltoxischen Funktionalität aktiviert werden. Interessanterweise war die optimale Wirkdosis des Konjugats von Obrist mit 2  $\mu\text{M}$  ebenfalls deutlich höher angesiedelt als die Dissoziationskonstante für fMLF sowie einen hochaffinen Antikörper erwarten ließ und kam den für SAB-Y1-ac bestimmten Werten nahe ( $K_D > 24 \mu\text{M}$ ; Kap. 3.9). Womöglich ist für eine effiziente Immunantwort auf fMLF-Präsenz im Organismus eine deutlich höhere Toleranzgrenze zu überschreiten als *in vitro*.

Die Vitalität der Tumorzellen wurde von migrierenden Makrophagen nicht beeinträchtigt und deutete darauf hin, dass die Immunzellen teilweise funktionell inaktiv waren, möglicherweise bedingt durch den vorherigen Gewinnungsprozess (Kap. 2.5.5). Darüber könnten mehrere Makrophagenpräparationen und MTT-basierte Aktivitätstests (Ferrari et al., 1990) Aufschluss geben. Weitere Einblicke würde ein Tierversuch erlauben, indem nach SAB-Applikation ein anschließendes Screening von Zytokinen, welche von z. B. Makrophagen im Zuge zytotoxischer Aktivität ausgeschüttet werden (z. B. Interleukine; Cavillon, 1994), erfolgt.

In Kap. 3.11 konnte auch mit der Positivkontrolle MCP-1 keine zu 100 % gerichtete Chemotaxis gemessen werden. Es wurde basierend auf etwa 12 % MCP-1-induzierter, gerichteter Migration das chemotaktische Potential der SAB-Moleküle abgeleitet. Eine alternative experimentelle Methodik scheint sinnvoll, welche eindeutig gerichtete und ungerichtete Migration unterscheiden kann.

So können in einer Kammer z. B. EGFR-überexprimierende Tumorzellen kultiviert werden (Ibidi<sup>16</sup>). Nach SAB-Exposition wird ein kontinuierlicher, langsamer Strom an Immunzellen mittig durchgeleitet. Es muss signifikant mehr Chemotaxis als Chemokinese erfolgen, damit Immunzellen den Strom verlassen können. Ein Filter o. ä., vergleichbar dem Transwell-Versuch (Kap. 2.5.4), muss von den Immunzellen überwunden werden und verringert die zufällige Verteilung der Immunzellen. Unbehandelte Tumorzellen fungieren als Negativkontrolle. Kontinuierliche Kameraaufzeichnungen der Kammer erlauben schließlich die Rekonstruktion, Visualisierung und Quantifizierung des Wanderungsverhaltens der Zellen (Abb. 50).



**Abb. 50:** Schematische Darstellung eines alternativen Testsystems für chemotaktisches Verhalten von Immunzellen nach Ibidi<sup>16</sup>. In zwei Kompartimenten werden Tumorzellen kultiviert. Nach SAB-Behandlung (links) wird der Makrophagenstrom (M), welcher beide Kompartimente verbindet, im Fall chemotaktischer Wirkung des SAB in das linke Kompartiment geleitet.

Die insgesamt gewonnenen Erkenntnisse *in vitro* müssen vor einer möglichen Verwendung des SAB als Therapeutikum *in vivo* validiert werden, was in ersten pharmakologischen Versuchen mit Mäusen vorgenommen wurde.

### 4.5 Verträglichkeit des SAB *in vivo*

Die gute Verträglichkeit des synthetischen Antikörpers mit geringen Nebenwirkungen ist wichtig für eine sichere Verwendung und effiziente Wirkung. Es wurde das Modell der Nacktmaus gewählt, welches sich aus mehreren Gründen besonders eignet. Einerseits lassen sich die Tiere gut auf äußerliche Veränderungen kontrollieren, etwa Hautrötungen, und somit

---

<sup>16</sup> [http://www.ibidi.com/applications/ap\\_chemotaxis.html](http://www.ibidi.com/applications/ap_chemotaxis.html)

unerwünschte Wirkungen des getesteten Therapiekandidaten bereits allgemein erkennen. Eine Xenotransplantation EGFR-positiver Tumorzellen war problemlos, da aufgrund der Immundefizienz der Mäuse keine Rejektion stattfand. Somit konnte außerdem ein erster Hinweis auf die Wirksamkeit des synthetischen Antikörpers erhofft werden, falls SAB nicht nur nebenwirkungsarm war sondern auch eine Remission des Tumors bewirkte.

Es konnte gezeigt werden, dass der synthetische Antikörper keine toxischen Nebeneffekte im Organismus hervorruft (Kap. 3.13). Dies wurde anhand der physischen Verfassung der Tiere festgestellt, welche keinen Gewichtsverlust zeigten, wie er in Stresssituationen oder bei Nebenwirkungen einer körperfremden Substanz zu erwarten war. Die analysierten Leber-Entzündungsparameter ALT, AST und LDH zeigten ebenfalls keine Hinweise auf Unverträglichkeit des SAB. Tumortragende Tiere, welche mit der maximal getesteten SAB-Dosis behandelt wurden, zeigten keine Remission des Xenotransplantats im Zuge einer Gewichtsverringerung des Tumors. Dies könnte sowohl an einer unzureichenden SAB-Markierung des Tumorgewebes liegen als auch an reduzierter Verfügbarkeit des synthetischen Antikörpers durch unspezifische Bindung (vgl. Kap. 3.9). Darüber hinaus ist es möglich, dass die Immundefizienz der eingesetzten Nacktmäuse keine Immunreaktion erlaubte. Wenngleich die Defizienz T-Zellen und somit das adaptive Immunsystem betraf, könnte genau deshalb ein bereits in Alltagssituationen stärker beanspruchtes, angeborenes Immunsystem unzureichend auf zusätzliche immunogene Stimuli reagieren.

Es stellte sich daher die Frage, ob das Tiermodell der Maus erwarten ließ, dass ein bakterielles und daher immunogenes Peptid in Darreichungsform des SAB eine Immunantwort *per se* oder nach Bindung an Tumorgewebe auslöst. Verschiedene etablierte Mausmodelle, darunter auch die Nacktmaus (Vogel et al., 1979), zeigen eine hohe Toleranz gegenüber bakteriellen Fremdstoffen wie LPS. Möglicherweise bedingte somit eine Kombination aus mäßiger EGFR-vermittelter Tumormarkierung mit synthetischem Antikörper und fehlender Reaktionsfähigkeit auf die fMLF-Sequenz ausbleibende Wirksamkeit. Obrist verwendete in seinen Experimenten zur fMLF-vermittelten Immunogenität und Zytotoxizität humane Makrophagen (z. B. Obrist et al., 1983) oder auch die des Meerschweinchens und stellte zudem fest, dass Makrophagen der Maus sowie im Mausorganismus durchgeführte Tests geringe Antwort zeigen (Syntab Therapeutics, Ute Steinbusch; persönliche Kommunikation mit Prof. Obrist). Wenngleich das Versuchsdesign aus Kap. 2.8.1 demnach geeignet war, toxische Nebeneffekte des synthetischen Antikörpers zu überprüfen, so müsste ein anderes Tiermodell, etwa das des Meerschweinchens, gewählt werden (Snyderman et al., 1984), um die Wirksamkeit des synthetischen Antikörpers *in vivo* zu belegen.

### 5. Zusammenfassung

Krebs stellt eine der Haupttodesursachen weltweit dar. Tumorspezifische Behandlungen sind in den Fokus der Forschung gerückt, um die erheblichen Nebenwirkungen etablierter Therapien zu mindern oder zu umgehen. Dabei ist der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR ein intensiv untersuchtes molekulares Therapieziel. In vielen soliden Tumorarten überexprimiert oder konstitutiv aktiv, spielt er eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Progression von Krebs. Monoklonale Antikörper und davon abgeleitete Wirksubstanzen gegen die Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren werden teilweise bereits mit Erfolg eingesetzt, zeigen jedoch auch Schwachpunkte. Spezielle, etwa lokale Anwendungen dieser Antikörper sind oft durch Faktoren wie geringe Gewebepenetranz limitiert.

In dieser Arbeit wurde ein neuartiger, flexibler synthetischer Antikörper mit zwei funktionellen Domänen auf Peptidbasis entwickelt und charakterisiert. Das vollständig durch Festphasensynthese generierte Molekül zielt darauf ab, zunächst selektiv an Tumorzellen zu binden und nachfolgend immunogene Wirkung zu entfalten, welche die Zerstörung malignen Gewebes initiiert. Der synthetische Antikörper kann monodispers, mit hoher Reinheit und in ausreichender Menge für umfangreiche *in vitro*-Untersuchungen sowie erste *in vivo*-Analysen hergestellt werden.

Nach spezifischer Tumormarkierung wird *in vitro* effizient chemotaktisches Verhalten bei Zellen des angeborenen Immunsystems stimuliert. Die Stabilität des synthetischen Antikörpers wurde über eine Peptid-typische Halbwertszeit hinaus verbessert. Das mitogene Potential ist gering und lässt zusammen mit den Bindungseigenschaften des synthetischen Antikörpers erwarten, dass das Molekül ausreichend lange zur immunsystematischen Erkennung auch im Empfängerorganismus verfügbar ist. Eine sehr gute Verträglichkeit des synthetischen Antikörpers wurde in ersten *in vivo*-Untersuchungen demonstriert.

Zusammen mit den Analysen weiterer Charakteristika, wie der Temperatur- und Langzeitstabilität, stellt die entwickelte Synthesestrategie einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung hochpotenter Krebstherapeutika dar, welche unterschiedliche Wirkspektren bieten und Nebenwirkungen konventioneller Tumorthérapien umgehen können. Darüber hinaus lässt der schnelle Austausch von Bindedomänen den Übertrag und die Anwendung des Konzepts auf andere Erkrankungen erwarten.

### 5.1 Summary

With cancer being a main cause of death worldwide, tumor-specific therapies have become a major focus. The Epidermal Growth Factor Receptor EGFR represents an interesting target for tumor-specific treatment and overexpressed or constitutively active in many types of solid cancer, this receptor plays a key role in tumor development and progression. Monoclonal antibodies and derivatives thereof directed against the family of growth factor receptors have been successfully tested. However, their range of application may be limited, for example due to insufficient tissue penetration properties.

Here, a novel and flexible synthetic antibody, comprising two functional domains on a peptidic basis, was developed and characterized. Generated by solid phase peptide synthesis, the molecule is designed to selectively bind to tumor cells and to subsequently initiate the destruction of malign tissue by triggering an immune response. Monodisperse, highly pure synthetic antibody can be obtained at sufficient amounts for extended *in vitro* studies and preliminary *in vivo* characterization.

The molecule is capable of triggering efficient chemotaxis of cells of the innate immune system towards tumor cells. Its structure was improved to exceed the typical half-life of peptides. The synthetic antibody's low mitogenic potential alongside suitable binding properties is the basis for developing effective treatments with this kind of molecule. Moreover, the synthetic antibody is well tolerated according to preliminary *in vivo* studies.

Together with other characteristics such as temperature- and long-term stability, it is demonstrated that the synthetic strategy developed here can lead to highly potent therapeutics with different therapeutic activities. A simple exchange of binding domains provides fast access to synthetic antibodies specific for other disease markers.

## 6. Literatur

- Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T., Davis, F. F. (1977). Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3582-3586.
- Adams, D. O., Snyderman, R. (1979). Do macrophages destroy nascent tumors? *J. Natl. Cancer Inst.*, **62**, 1341-1345.
- Adams, D. O., Nathan, C. F. (1983). Molecular mechanisms in tumor-cell killing by activated macrophages. *Immun. Today*, **4**, 166-170.
- Adamson, E. D., Rees, A. R. (1981). Epidermal Growth Factor Receptors. *Mol. Cell. Biochem.*, **34**, 129-152.
- Aletras, A., Barlos, K., Gatos, D., Koutsogianni, S. (1995). Preparation of the very acid-sensitive Fmoc-Lys(Mtt)-OH Application in the synthesis of side-chain to side-chain cyclic peptides and oligolysine cores suitable for the solid-phase assembly of MAPs and TASP. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **45**, 488-496.
- Avwioro, G. (2011). Histochemical Uses of Haematoxylin - A Review. *JPCS*, **1**, 24-34.
- Barelle C, Gill DS, Charlton K. (2009). Shark novel antigen receptors--the next generation of biologic therapeutics? *Adv. Exp. Med. Biol.*, **655**, 49-62.
- Barnes, D., Colowick, S. P. (1976). Stimulation of sugar uptake in cultured fibroblasts by epidermal growth factor (EGF) and EGF-binding arginine esterase. *J. Cell. Physiol.*, **89**, 633-639.
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., Mendelsohn, J. (1998). Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, **58**, 2825-2831.
- Beckman, R. A., Weiner, L. M., Davis, H. M. (2007). Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer*, **109**, 170-179.
- Beerli, R. R., Wels, W., Hynes, N. E. (1994). Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23931-23936.
- Boxer, L. A., Yoder, M., Bonsib, S., Schmidt, M., Ho, P., Jersild, R., Baehner, R. L. (1979). Effects of a chemotactic factor, N-formylmethionyl peptide, on adherence, superoxide anion generation, phagocytosis, and microtubule assembly of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **93**, 506-514.
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, **115**, 453-466.
- Bøyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, Suppl. 97, 77-89.

## 6. Literatur

---

- Branca, C., Magazù, S., Maisano, G., Migliardo, F., Migliardo, P., Romeo, G. (2002). Hydration Study of PEG/Water Mixtures by Quasi Elastic Light Scattering, Acoustic and Rheological Measurements. *J. Phys. Chem. B.*, **106**, 10272-10276.
- Brock, N. (1958). Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika. *Arzneimittelforsch.*, **8**, 1-9.
- Brinckerhoff, L. H., Kalashnikov, V. V., Thompson, L. W., Yamshchikov, G. V., Pierce, R. A., Galavotti, H. S., Engelhard, V. H., Slingluff Jr., C.L. (1999). Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines. *Int. J. Cancer*, **83**, 326-334.
- Carpenter, G., Lembach, K. J., Morrison, M. M., Cohen, S. (1975). Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4297-4304.
- Carpenter, G., Cohen, S. (1979). Epidermal Growth Factor. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 193-216.
- Carpenter, G., King, L. Jr., Cohen, S. (1979). Rapid enhancement of protein phosphorylation in A-431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4884-4891.
- Carpenter, G. (1983) The biochemistry and physiology of the receptor-kinase for epidermal growth factor. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **31**, 1-19.
- Cavaillon, J. M. (1994). Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother.*, **48**, 445-453.
- Chan, W. C., White, P. D. (2000). Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. *Oxford University Press*.
- Ciardello, F., Tortora, G. (2001). A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. Cancer Res.*, **7**, 2958-2970.
- Cohen, S. (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev Biol.*, **12**, 394-407.
- Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C., Chinkers, M. (1982). A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **257**, 1523-1531.
- Cook DA, Owen T, Wagstaff SC, Kinne J, Wernery U, Harrison RA. (2010). Analysis of camelid antibodies for antivenom development: Neutralisation of venom-induced pathology. *Toxicon*, **56**, 373-380.
- Cossart, P., Jonquière, R. (2000). Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 5013-5015.
- Das, M., Fox, C. F. (1978). Molecular mechanism of mitogen action: Processing of receptor induced by epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 2644-2648.
- Diamond, I., Legg, A., Schneider, J. A., Rozengurt, E. (1978). Glycolysis in quiescent cultures of 3T3 cells. Stimulation by serum, epidermal growth factor, and insulin in intact cells and persistence of the stimulation after cell homogenization. *J. Biol. Chem.*, **253**, 866-871.

## 6. Literatur

---

- Dirksen, A., Dawson, P. E. (2008). Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling. *Bioconjugate Chem.*, **19**, 2543-2548.
- Doppalapudi, V. R., Huang, J., Liu, D., Jin, P., Liu, B., Li, L., Desharnais, J., Hagen, C., Levin, N. J., Shields, M. J., Parish, M., Murphy, R. E., Del Rosario, J., Oates, B. D., Lai, J. Y., Matin, M. J., Ainekulu, Z., Bhat, A., Bradshaw, C. W., Woodnutt, G., Lerner, R. A., Lappe, R. W. (2010). Chemical generation of bispecific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 22611-22616.
- Ferrante, A., Thong Y. H. (1980). Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human blood by the Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Meth.*, **36**, 109-117.
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Meth.*, **131**, 165-172.
- Flajnik, M. F., Deschacht, N., Muyldermans, S. (2011). A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels? *PLoS Biol.*, **9**, e1001120.
- Franke, R., Doll, C., Eichler, J. (2005). Peptide ligation through click chemistry for the generation of assembled and scaffolded peptides. *Tetrahedron*, **46**, 4479-4482.
- Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K. (1995). Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1311-1318.
- Gracia, S. R., Gaus, K., Sewald, N. (2009). Synthesis of chemically modified bioactive peptides: recent advances, challenges and developments for medicinal chemistry. *Future Med. Chem.*, **1**, 1289-1310.
- Graef, R. R., Anderson, G. P., Doyle, K. A., Zabetakis, D., Sutton, F. N., Liu, J. L., Serrano-González, J., Goldman, E. R., Cooper, L. A. (2011). Isolation of a highly thermal stable lama single domain antibody specific for *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *BMC Biotechnol.*, **11**, 86-97.
- Gude, M., Ryf, J., White, P. D. (2003). An accurate method for the quantitation of Fmoc-derivatized solid phase supports. *Lett. Pept. Sci.*, **9**, 203-206.
- Haigler, H., Ash, J. F., Singer, S. J., Cohen, S. (1978). Visualization by fluorescence of the binding and internalization of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 3317-3321.
- Hansen, H. J., Jones, A. L., Sharkey, R. M., Grebenau, R., Blazejewski, N., Kunz, A., Buckley, M. J., Newman, E. S., Ostella, F., Goldenberg, D. M. (1990). Preclinical evaluation of an "instant" <sup>99m</sup>Tc-labeling kit for antibody imaging. *Cancer Res.*, **50**, 794-798.
- Henke, G., Lindner, L. H., Vogeser, M., Eibl, H. J., Wörner, J., Müller, A. C., Bamberg, M., Wachholz, K., Belka, C., Jendrossek, V. (2009). Pharmacokinetics and biodistribution of Erufosine in nude mice--implications for combination with radiotherapy. *Radiat. Oncol.*, **4**, 46-56.

Hillmen, P., Young, N. S., Schubert, J., Brodsky, R. A., Socié, G., Muus, P., Röth, A., Szer, J., Elebute, M. O., Nakamura, R., Browne, P., Risitano, A. M., Hill, A., Schrezenmeier, H., Fu, C. L., Maciejewski, J., Rollins, S. A., Mojciak, C. F., Rother, R. P., Luzzatto, L. (2006). The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1233-1243.

Hollenberg, M. D., Cuatrecasas, P. (1973). Epidermal growth factor: receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 2964-2968.

Hooper, J. K., Cohen, S. (1967). Epidermal growth factor. II. Increased activity of ribosomes from chick embryo epidermis for cell-free protein synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, **138**, 357-368.

Iannello, A., Ahmad, A. (2005). Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 487-499.

Jung, S. H., Ahn, J. H., Park, S. K., Choi, J.-K. (2002). Practical and Convenient Procedure for the N-Formylation of Amines Using Formic Acid. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**, 149-150.

Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D., Cook, P. I. (1970). Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598.

Karasseva, N. G., Glinsky, V. V., Chen, N. X., Komatireddy, R., Quinn, T. P. (2002). Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. *J. Protein. Chem.*, **21**, 287-296.

Keefe, A. J., Jiang, S. (2011). Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity. *Nat. Chem.*, **4**, 59-63.

Kim, K. M., McDonagh, C. F., Westendorf, L., Brown, L. L., Sussman, D., Feist, T., Lyon, R., Alley, S. C., Okeley, N. M., Zhang, X., Thompson, M. C., Stone, I., Gerber, H. P., Carter, P. J. (2008). Anti-CD30 diabody-drug conjugates with potent antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.*, **7**, 2486-2497.

Kochendoerfer, G. G., Chen S. Y., Mao, F., Cressman, S., Traviglia, S., Shao, H., Hunter, C. L., Low, D. W., Cagle, E. N., Carnevali, M., Gueriguian, V., Keogh, P. J., Porter, H., Stratton, S. M., Wiedeke, M. C., Wilken, J., Tang, J., Levy, J. J., Miranda, L. P., Crnogorac, M. M., Kalbag, S., Botti, P., Schindler-Horvat, J., Savatski, L., Adamson, J. W., Kung, A., Kent, S. B., Bradburne, J. A. (2003). Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*, **299**, 884-887.

Lapeyraque, A. L., Malina, M., Fremeaux-Bacchi, V., Boppel, T., Kirschfink, M., Oualha, M., Proulx, F., Clermont, M. J., Le Deist, F., Niaudet, P., Schaefer, F. (2011). Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS. *N. Engl. J. Med.*, **364**, 2561-2563.

Lenferink, A. E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M. L., van Vugt, M. J., Klapper, L. N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen, E. J., Yarden, Y. (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *Embo J.*, **17**, 3385-3397.

## 6. Literatur

---

- Leuner, C., Dressman, J. (2000). Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 47-60.
- Levy, G. A., McAllan, A. (1959). The N-acetylation and estimation of hexosamines. *Biochem. J.*, **73**, 127-132.
- Li, Z., Zhao, R., Wu, X., Sun, Y., Yao, M., Li, J., Xu, Y., Gu, J. (2005). Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB J.*, **19**, 1978-85.
- Liang, C. C., Park, A. Y., Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.*, **2**, 329-333.
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., Hung, M. C. (2001). Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 802-808.
- Macdougall, I. C. (2005). CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr. Hematol. Rep.*, **4**, 436-440.
- Martinelli, E., De Palma, R., Orditura, M., De Vita, F., Ciardiello, F. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, **158**, 1-9.
- Maxfield, F. R., Schlessinger, J., Shechter, Y., Pastan, I., Willingham, M.C. (1978). Collection of insulin, EGF and alpha2-macroglobulin in the same patches on the surface of cultured fibroblasts and common internalization. *Cell*, **14**, 805-810.
- Mekelburger, H. B., Jaworkek, W., Vögtle, F. (1992). Dendrimere, Arborole und Kaskadenmoleküle: Aufbruch zu neuen Materialien im Generationentakt. *Angewandte Chemie*, **104**, 1609-1614.
- Merrifield R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. 1. Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2149-2156.
- Michal, G. (1999). Biochemical Pathways. *Spektrum Akademischer Verlag*.
- Monkarsh, S. P., Ma, Y., Aglione, A., Bailon, P., Ciolek, D., DeBarbieri, B., Graves, MC., Hollfelder, K., Michel, H., Palleroni, A., Porter, J. E., Russoman, E., Roy, S., Pan, Y. C. (1997). Positional isomers of monopegylated interferon alpha-2a: isolation, characterization, and biological activity. *Anal. Biochem.*, **247**, 434-440.
- Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **61**, 10827-10852.
- Murphy, K. P. (2012). Janeway's Immunobiology. *Garland Science*.
- Nadal-Ginard, B. (1978). Regulation of Lactate Dehydrogenase Levels in the Mouse. *J. Biol. Chem.*, **253**, 170-177.

## 6. Literatur

---

- Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., Huang, H. J. (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 7727-7731.
- Obrist, R., Sandberg, A. L. (1982). In vitro effects of anti-tumor antibody-chemotactic factor complexes. *Clin. Immun. Immunoph.*, **25**, 91-102.
- Obrist, R., Reilly, R., Leavitt, T., Knapp, R. C., Bast, R. C. Jr. (1983). Monocyte chemotaxis mediated by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine conjugated with monoclonal antibodies against human ovarian carcinoma. *Int. J. Immunopharmacol.*, **5**, 307-314.
- Obrist, R., Sandberg, A. L. (1983). Enhancement of macrophage invasion of tumors by administration of chemotactic factor-antitumor antibody conjugates. *Cell Immunol.*, **81**, 169-174.
- Obrist, R. (1987). Manipulation of the intratumor infiltrate by anti-tumor antibody conjugates. *Biochim. Biophys. Acta.*, **907**, 175-190.
- Obrist, R., Schmidli, J., Müller, R., Gallati, H., Obrecht, J. P. (1991). Acute and subacute toxicity of chemotactic conjugates between monoclonal antibody and fMet-Leu-Phe in humans: a phase I clinical trial. *Cancer Immunol. Immunother.*, **32**, 406-408.
- Olah, T. V., McLoughlin, D. A., Gilbert, J. D. (1997). The Simultaneous Determination of Mixtures of Drug Candidates by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry as an In Vivo Drug Screening Procedure. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 17-23.
- Qin, X., Wan, Y., Li, M., Xue, X., Wu, S., Zhang, C., You, Y., Wang, W., Jiang, C., Liu, Y., Zhu, W., Ran, Y., Zhang, Z., Han, W., Zhang, Y. (2007). Identification of a novel peptide ligand of human vascular endothelial growth factor receptor 3 for targeted tumour diagnosis and therapy. *J. Biochem.*, **142**, 79-85.
- Queen, C., Schneider, W. P., Selick, H. E., Payne, P. W., Landolfi, N. F., Duncan, J. F., Avdalovic, N. M., Levitt, M., Junghans, R. P., Waldmann, T. A. (1989). A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 10029-33.
- Raab, M., Schick, G., Fondermann, R., Dolg, M., Henze, W., Weyand, U., Gschwind, R. M., Fischer, K., Schmidt, M. and Niecke, E. (2006). Ein PH-funktionalisiertes Polyphosphazenen: ein Makromolekül mit hochflexiblem Grundgerüst. *Angewandte Chemie*, **118**, 3154-3157.
- Robert, F., Ezekiel, M. P., Spencer, S. A., Meredith, R. F., Bonner, J. A., Khazaeli, M. B., Saleh, M. N., Carey, D., LoBuglio, A. F., Wheeler, R. H., Cooper, M. R., Waksal, H.W. (2001). Phase I study of anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab in combination with radiation therapy in patients with advanced head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, **19**, 3234-3243.
- Roberts, A. B., Lamb, L. C., Newton, D. L., Sporn, M. B., De Larco, J. E., Todaro, G. J. (1980). Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 3494-3498.

- Sadler, K., Tam, J. P. (2002). Peptide dendrimers: applications and synthesis. *J. Biotechnol.*, **90**, 195-229.
- Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., Murphy, W. J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*, **96**, 34-40.
- Saridaki, Z., Georgoulas, V., Souglakos, J. (2010). Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, **16**, 1177-1187.
- Sarin V. K., Kent S. B. H., Tam J. P., Merrifield R. B. (1981). Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analyt. Biochem.*, **117**, 147-157.
- Scaltriti, M., Baselga, J. (2006). The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.*, **12**, 5268-5272.
- Schellekens, H. (2002). Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin. Ther.*, **24**, 1720-1740.
- Schertler, G. F., Villa, C., Henderson, R. (1993). Projection structure of rhodopsin. *Nature*, **362**, 770-772.
- Schiffmann, E., Corcoran, B. A., Wahl, S. M. (1975). N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1059-1062.
- Schnölzer M., Alewood P., Jones A., Alewood D., Kent S. B. (1992). In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **40**, 180-193.
- Schütze, C., Dörfler, A., Eicheler, W., Zips, D., Hering, S., Solca, F., Baumann, M., Krause, M. (2007). Combination of EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibition by BIBW 2992 and BIBW 2669 with irradiation in FaDu human squamous cell carcinoma. *Strahlenther. Onkol.*, **183**, 256-64.
- Shechter, Y. (1986). Selective oxidation and reduction of methionine residues in peptides and proteins by oxygen exchange between sulfoxide and sulfide. *J. Biol. Chem.*, **261**, 66-70.
- Smith, J. B., Rozengurt, E. (1978). Serum stimulates the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> pump in quiescent fibroblasts by increasing Na<sup>+</sup> entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 5560-5564.
- Snyderman, R., Mergenhagen, S. E. (1976). Immunobiology of the Macrophage. Nelson, D. S. (Author), *Academic Press*, New York, 323-348.
- Snyderman, R., Pike, M. C., Edge, S., Lane, B. (1984). A chemoattractant receptor on macrophages exists in two affinity states regulated by guanine nucleotides. *J. Cell. Biol.*, **98**, 444-448.
- Soderquist, A. M., Carpenter, G. (1984). Glycosylation of the epidermal growth factor receptor in A-431 cells. The contribution of carbohydrate to receptor function. *J. Biol. Chem.*, **259**, 12586-12594.

## 6. Literatur

---

Sodhi, A., Biswas, S. K. (2002). fMLP-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **71**, 262-270.

Surshbabu, V. V., Vasanthakumar, G.-R., Patil, B. S. (2005). N $\alpha$ -Fmoc-Peptide azides: Synthesis, isolation, characterization and utility in the extension of peptide chains. *Ind. Journ. Chem.*, **44**, 1853-1858.

Thienelt, C. D., Bunn, P. A. Jr., Hanna, N., Rosenberg, A., Needle, M. N., Long, M. E., Gustafson, D. L., Kelly, K. (2005). Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **23**, 8786-8793.

Townsend, S., Finlay, W. J., Hearty, S., O'Kennedy, R. (2006). Optimizing recombinant antibody function in SPR immunosensing. The influence of antibody structural format and chip surface chemistry on assay sensitivity. *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 268-274.

Tsan, M. F., Denison, R. C. (1981). Oxidation of n-formyl methionyl chemotactic peptide by human neutrophils. *J. Immunol.*, **126**, 1387-1389.

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J. (1984). Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, **309**, 418-425.

Ushiro, H., Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8363-8365.

Veronese, F. M., Pasut, G. (2005). PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today*, **10**, 1451-1458.

Vilaseca, L. A., Rose, K., Werlen, R., Meunier, A., Offord, R. E., Nichols, C. L., Scott, W. L. (1993). Protein conjugates of defined structure: synthesis and use of a new carrier molecule. *Bioconjug. Chem.*, **4**, 515-520.

Vogel, S. N., Hansen, C. T., Rosenstreich, D. L. (1979). Characterization of a congenitally LPS-resistant, athymic mouse strain. *J. Immunol.*, **122**, 619-622.

Walker, B. A., Seiler, A. J., Owens, C. A., Hagenlocker, B. E., Ward, P. A. (1991). Absence of fMLP receptors on rat macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, **50**, 600-606.

Wang, S.-S. (1973). p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1328-1333.

Werle, M., Bernkop-Schnürch, A. (2006). Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*, **30**, 351-367.

Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E., Neckers, L. M. (1994). Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 8324-8328.

## 6. Literatur

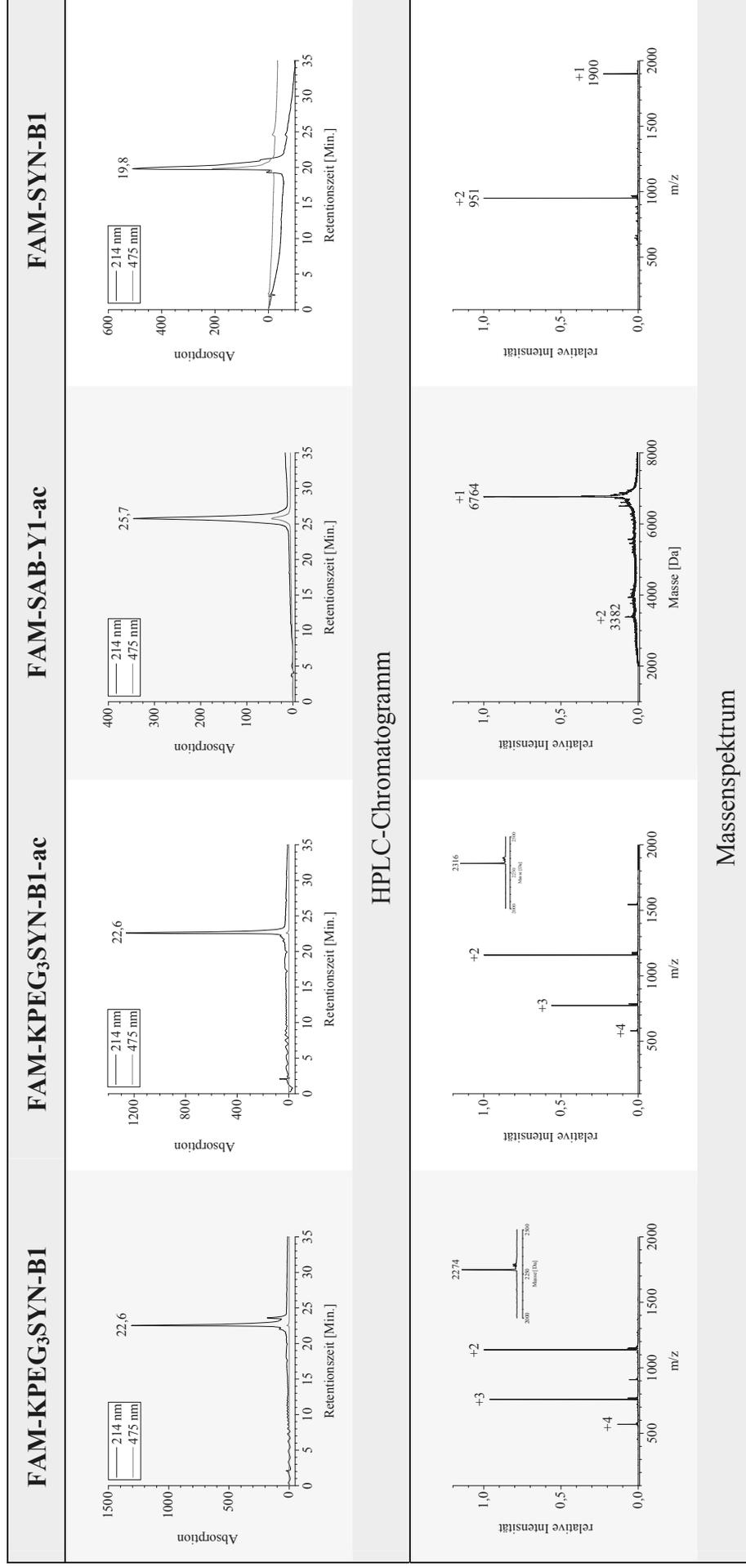
---

- Willett, C. G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D. G., Munn, L. L., Tong, R. T., Chung, D. C., Sahani, D. V., Kalva, S. P., Kozin, S. V., Mino, M., Cohen, K. S., Scadden, D. T., Hartford, A. C., Fischman, A. J., Clark, J. W., Ryan, D. P., Zhu, A. X., Blaszkowsky, L. S., Chen, H. X., Shellito, P. C., Lauwers, G. Y., Jain, R. K. (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat. Med.*, **10**, 145-147.
- Winter, G., Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, **349**, 293-299.
- Wrann, M. M., Fox, C. F. (1979). Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing human epidermoid carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.*, **254**, 8083-8086.
- Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., Shibuya, M. (1988). Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1816-1820.
- Yarden, Y., Harari, I., Schlessinger, J. (1985). Purification of an active EGF receptor kinase with monoclonal antireceptor antibodies. *J. Biol. Chem.*, **260**, 315-319.
- Yarden, Y., Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2**, 127-137.
- Ye, Y., Bloch, S., Kao, J., Achilefu, S. (2005). Multivalent carbocyanine molecular probes: synthesis and applications. *Bioconjug. Chem.*, **16**, 51-61.
- Yokoi, K., Sasaki, T., Bucana, C. D., Fan, D., Baker, C. H., Kitadai, Y., Kuwai, T., Abbruzzese, J. L., Fidler, I. J. (2005). Simultaneous Inhibition of EGFR, VEGFR and PDGFR Signaling Combined with Gemcitabine Produces Therapy of Human Pancreatic Carcinoma and Prolongs Survival in an Orthotopic Nude Mouse Model. *Cancer Res.*, **65**, 10371-10380.
- Youngs, S. J., Ali, S. A., Taub, D. D., Rees, R. C.. Chemokines induce migrational responses in human breast carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*, **71**, 257-266.
- Zhao, P., Grabinski, T., Gao, C., Skinner, R. S., Giambernardi, T., Su, Y., Hudson, E., Resau, J., Gross, M., Vande Woude, G. F., Hay, R., Cao, B. (2007). Identification of a met-binding peptide from a phage display library. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 6049-6055.
- Zhu, C., Feng, W., Weedon, J., Hua, P., Stefanov, D., Ohta, Y., Flajnik, M. F., Hsu, E. (2011). The multiple shark Ig H chain genes rearrange and hypermutate autonomously. *J. Immunol.*, **187**, 2492-2501.

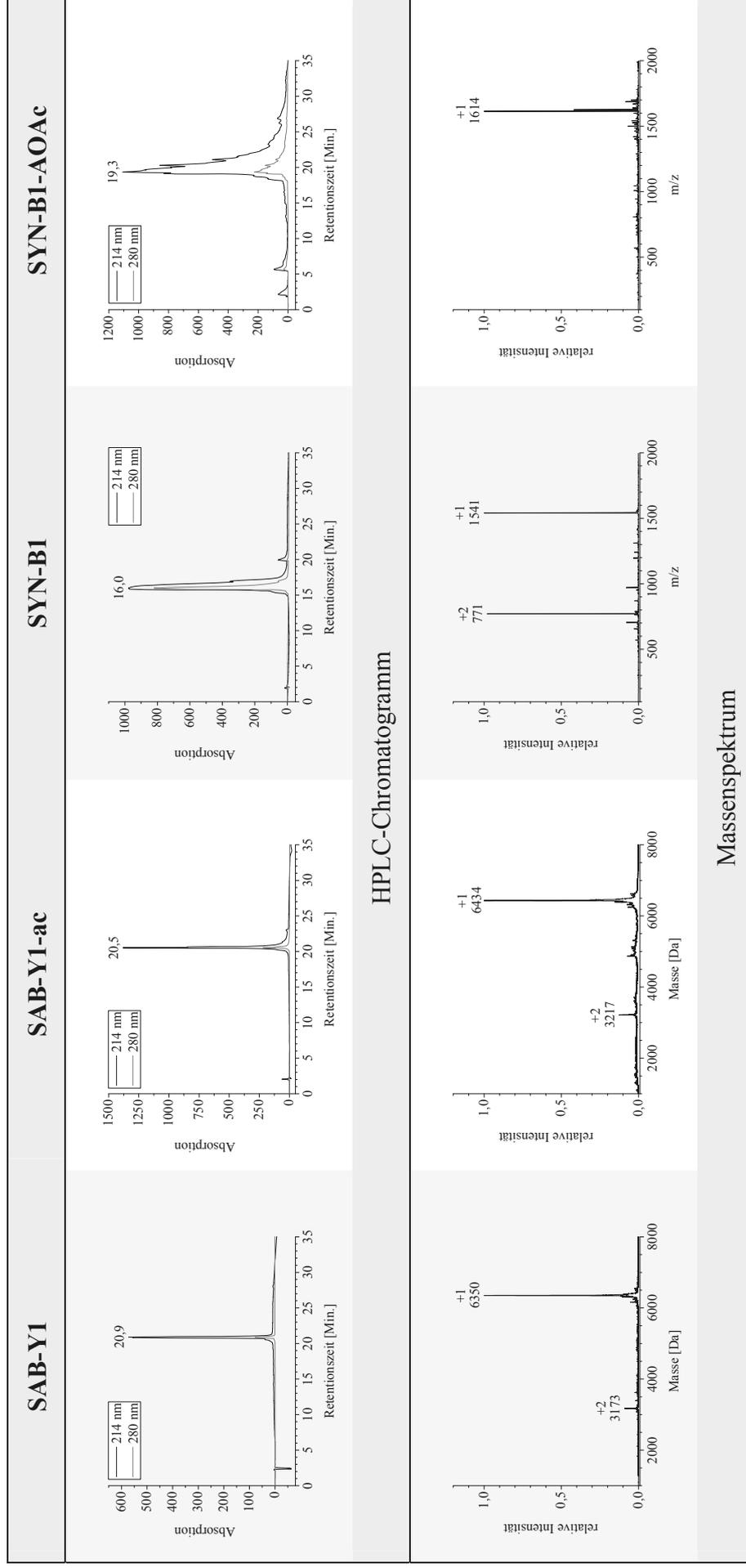
## 7. Anhang

Bezeichnung	Struktur / Schema	Masse	Ausbeute	Löslichkeit	$\epsilon$ [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1	H-YHWYGYTPQNVI-(PEG) <sub>3</sub> -K-NH   FAM	2273 Da	27 %	Puffer F; 1 mg/mL (ca. 0,5 mM)	81.000 ( $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ )
FAM-KPEG <sub>3</sub> SYN-B1-ac	ac-YHWYGYTPQNVI-(PEG) <sub>3</sub> -K-NH   FAM	2316 Da	5 %	Puffer F; 1 mg/mL (ca. 0,5 mM)	81.000 ( $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ )
FAM-SAB-Y1-ac	FAM-MLFKK-OH    PEG <sub>27</sub>    SYN-B1-ac	6762 Da	0,2 %	H <sub>2</sub> O, Puffer F; 1 mg/mL (ca. 0,2 mM)	81.000 ( $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ )
FAM-SYN-B1	FAM-YHWYGYTPQNVI-OH	1899 Da	46 %	0,5x Puffer D; 2 mg/mL (ca. 1,0 mM)	81.000 ( $\lambda_{\text{abs}} = 490 \text{ nm}$ )
SAB-Y1	fMLFKK-OH    PEG <sub>27</sub>    SYN-B1	6348 Da	1 %	H <sub>2</sub> O; 6 mg/mL (ca. 1,0 mM)	19.630 ( $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$ )
SAB-Y1-ac	fMLFKK-OH    PEG <sub>27</sub>    SYN-B1-ac	6432 Da	1 %	H <sub>2</sub> O, Puffer F; 2,5 mg/mL (ca. 0,4 mM)	19.630 ( $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$ )
SYN-B1	H-YHWYGYTPQNVI-OH	1541 Da	62 %	H <sub>2</sub> O, Puffer E; 1,5 mg/mL (ca. 1 mM)	9.815 ( $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$ )
SYN-B1-AOAc („Ox-AOAc“)	AOAc-YHWYGYTPQNVI-OH	1612 Da	nicht aufgereinigt	H <sub>2</sub> O; 1,5 mg/mL (ca. 1 mM)	9.815 ( $\lambda_{\text{abs}} = 280 \text{ nm}$ )

**Tab. 1:** Übersicht synthetisierter Peptide in alphabetischer Reihenfolge.



**Tab. 2:** Daten der Peptidsynthese in alphabetischer Reihenfolge (Teil 1).



**Tab. 3:** Daten der Peptidsynthese in alphabetischer Reihenfolge (Teil 2).

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Christian Becker bedanken, gleichermaßen für ein hochinteressantes und vielfältiges Thema, aber auch für die stete, freundliche Betreuung und Unterstützung.

Prof. Dr. Michael Sattler danke ich für die Übernahme des Koreferats. Prof. Dr. Dr. h. c. Bernhard Rieger gilt mein Dank für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Besonderer Dank geht an alle Kooperationspartner, die meiner Arbeit mit Einsatz und Fachwissen zur Seite standen: Prof. Dr. Bob van de Water und Dr. Marjo de Graauw (Center for Bio-Pharmaceutical Sciences / Division of Toxicology, Universiteit Leiden, Niederlande), Prof. Dr. Jürgen Bernhagen und Manfred Dewor (Institut und Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsklinikum Aachen), Prof. Dr. Gabriele Multhoff und Dr. Mathias Gehrman (Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Klinikum rechts der Isar, München), Prof. Dr. Peter Lupp, Dr. Alice Schlichtiger und Anita Schreiegg (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar) sowie Prof. Dr. Roger S. Goody und Sascha Genz (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund). Aus dem Fachbereich Proteinchemie danke ich Karine Farbiarz und Dr. Viola Breyer für die Aufnahme von Daten zu Kap. 3.4 und 3.13. Ute Steinbusch (Syntab Therapeutics, Aachen, Deutschland) danke ich für ihre Unterstützung im pharmakologischen Abschnitt dieser Arbeit.

Sehr gerne sage ich dem gesamten Fachbereich Proteinchemie Dank für eine wunderbare und einzigartig inspirierende Arbeitsatmosphäre. Insbesondere danken möchte ich dabei Christian für die gemeinsame Marzipan-Leidenschaft und so manche Lehrstunde in Sachen Diplomatie, Christina für 27 Krapfen und echtes Ruhrgebiet-Heimatgefühl sowie Max für effizientes Kardiotraining beim Eisfußball. Ein herzliches „Vergelt's Gott“ geht an Katja für stete Unterstützung, ihre künstlerische Ader und dafür, dass sie mit ihrem bayrischen Charme den „Sauhaufen“ wunderbar zusammengehalten hat. Lars sei gedankt für seinen väterlichen Rat, tiefgründige Diskussionen über Lebensfragen sowie die Erkenntnis, dass Fleisch ein hervorragendes Exklusivnahrungsmittel ist. Nam danke ich als unendlich hilfsbereites, molekularbiologisches Kompendium und für die Einsicht, dass ein zusätzliches „s“ so manches Wort einfach noch schöner macht. Caro sei geherzt für ihre fränkische Fröhlichkeit, Hello Kitty und die freitäglichen Vengaboys-Sessions. Karine gilt ein „Muito Obrigado“ für ihr fröhliches Gemüt, ein geduldiges Ohr auch wenn sie ein Gesprächsthema gar nicht

## Danksagung

---

interessierte und die täglich ästhetische Präsentation ihres Mittagessens. „Mille Grazie“ gehen an Claudia für einen beschwingt-italienischen Touch im Laboralltag und die Erkenntnis, dass man ohne Kaffee nur ein halber Mensch ist. Firouzeh danke ich für ihr „Allo“, anschauliche iranische Redewendungen und auf den Punkt gebrachte deutsche Emotion. Schließlich gilt mein Dank Can für die gemeinsame Leidenschaft für anspruchsvolle Kinofilme.

Von allen „Kurzarbeitern“ danke ich besonders Waldemar für die Quadrillinge, Tobi für die Vengaboys, Johannes für noch schlechteren Humor als den meinen, der 23 für die herzlichen Sticheleien, Daniel für seine Mimik und Christina für die täglichen „High Five“. Dem unermüdlichen ZMV-Team danke ich für herzliche und zuverlässige Unterstützung.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie (Prof. Dr. Johannes Buchner), des Lehrstuhls für Biophysikalische Chemie (Prof. Dr. Thomas Kiefhaber) und des Lehrstuhls für Organische Chemie 2 (Prof. Dr. Stefan Sieber) für die Möglichkeit, mannigfaltige Methoden zu benutzen, dabei besonders Christoph Kaiser, Karin Joder, Johannes Kreuzer, Susanne Hilber sowie in besonderer Meinung Kalium 23.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die ganz besondere, jahrelange Unterstützung sowie meinen treuen und langjährigen Freunden Max, Stefan, Christina, Mareike, Sarah, Vivien, Sascha und allen, die sich eine Erwähnung in diesem Abschnitt genauso verdient hätten.

## Lebenslauf

Name: Manuel Brehs  
Geburtsdatum, -ort: 02. 06. 1984, 59590 Geseke  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

1990 - 1994 St. Joseph Grundschule, 33129 Westenholz  
1994 - 2003 Gymnasium Marienschule, 59558 Lippstadt  
Juni 2003 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife (Abitur)

### Studium

10/2003 - 03/2007 Studium der Biologie, Heinrich-Heine Universität, 40225 Düsseldorf  
03/2007 - 02/2008 Diplomarbeit am Institut für Molekulare Biophysik, Forschungs-/  
Helmholtzzentrum Jülich, 52428 Jülich:  
Photorezeptor/Transducer Komplexbildung untersucht mit FRET  
Februar 2008 Erlangung des akademischen Grades eines Diplom-Biologen  
05/2008 Beginn der Doktorarbeit an der Technischen Universität München,  
Fakultät für Chemie, Fachgebiet Proteinchemie, 85748 Garching

### Publikationen

Kriegsmann, J., Brehs, M., Klare, J. P., Engelhard, M., Fitter, J. (2009). Sensory rhodopsin II/transducer complex formation in detergent and in lipid bilayers studied with FRET. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 522-531.

Lahiri, S., Brehs, M., Olschewski, D., Becker, C. F. (2011). Total chemical synthesis of an integral membrane enzyme: diacylglycerol kinase from *Escherichia coli*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 3988-3992.

Brehs, M., Bäuml, K., Becker, C. F. W. (2011). Chemical Synthesis of an Integral Membrane Enzyme - The Challenges of Diacylglycerol Kinase. *Isr. J. Chem.* **51**, 1-10.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die Arbeit wurde zuvor weder einer Prüfungskommission vorgelegt noch anderweitig vollständig oder in Auszügen veröffentlicht.

Garching, den 26. Januar 2012

---

Manuel Brehs