

Identifizierung kreuzreaktiver Peptidmimotope der therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Cord Hartmann
aus Bückeberg

Frankfurt 2009
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB 14) der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Prof. Dr. Winfried Wels

Datum der Disputation: 26.05.2009

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe, und dass keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die hier aufgeführten verwendet worden sind. Die Arbeit hat in gleicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Frankfurt am Main, Februar 2009

Cord Hartmann

Cord Hartmann

Zusammenfassung

Tumoren epithelialen Ursprungs weisen häufig eine vermehrte Expression und/oder Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) auf. Durch die übermäßig starke bzw. permanente Vermittlung von Überlebens- und Proliferationssignalen an die betroffene Zelle trägt dies direkt zum Vorschreiten der Tumorerkrankung bei. Für eine Reihe von Tumorentitäten ist bekannt, dass eine abnorme Expression von EGFR mit einer schlechteren Prognose für den Krankheitsverlauf und die mittlere Überlebenszeit betroffener Krebspatienten korreliert. Begleitend zur systemischen Chemotherapie solcher Tumoren wird eine gerichtete Therapie zur Eindämmung der EGFR-vermittelten Signaltransduktion durch den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) oder EGFR-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAb) erzielt. Bei der therapeutischen Anwendung monoklonaler anti-EGFR Antikörper wurden in einigen Fällen lediglich milde Nebenwirkungen wie z.B. Hautausschläge beobachtet, wobei das Auftreten dieser Effekte mit dem Therapieerfolg korrelierte. Eine Reihe von monoklonalen Antikörpern, die gegen ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen gerichtet sind, sind mittlerweile zur Tumorthherapie zugelassen, darunter der chimäre anti-EGFR Antikörper Cetuximab (Erbix[®], ImClone/BMS/Merck) zur Behandlung von metastasierenden Kolonkarzinomen sowie Karzinomen des Kopf- und Halsbereichs, der humane anti-EGFR Antikörper Panitumumab (Vectibix[®], Amgen) bei metastasierenden Kolonkarzinomen, und der humanisierte anti-ErbB2 Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®], Genentech/Roche) bei Brustkrebs. Weitere Antikörper befinden sich derzeit in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Entwicklung, darunter der humanisierte anti-EGFR Antikörper Matuzumab (Merck/Takeda). Klinische Daten zeigen, dass Patienten mit EGFR positiven Tumoren, die gegenüber etablierter Chemotherapie resistent sind, von der Behandlung mit anti-EGFR Antikörpern profitieren. Durch aktivierte EGF-Rezeptoren induzierte mitogene Signale werden vermindert bzw. blockiert, indem die Antikörper mit hoher Affinität an ErbB Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und die Ligandenbindung bzw. die Dimerisierung verhindern, die zur Bildung aktivierter Rezeptor Dimere nötig ist. Auf diese Weise wird die mitogene Signalübertragung aktivierter ErbB-Rezeptor Dimere verhindert und die Proliferation der Tumorzelle wird verlangsamt oder kommt zum Stillstand. Es gibt Hinweise, dass darüber hinaus sekundäre Effektormechanismen des Immunsystems wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) oder die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) gegen Antikörper-markierte Tumorzellen die anti-tumorale Wirksamkeit dieser Antikörper noch verstärken. Die lebensverlängernde Wirkung der Behandlung mit diesen Antikörpern ist ein Beispiel für die erfolgreiche Anwendung einer zielgerichteten Krebstherapie durch passive Immuntherapie.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die genauen Bindungsstellen der therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab noch unbekannt. Die Kenntnis der Lage der Epitope auf dem EGFR Molekül könnte wichtige Hinweise zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen dieser Antikörper liefern und Ansätze zur weiteren Optimierung dieser Therapeutika aufzeigen. Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass Cetuximab und Matuzumab Epitope auf dem EGFR erkennen, die eine intakte

Raumstruktur des Rezeptors voraussetzen. Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden, ferner konnte die Lage der Epitope auf die EGFR Ektodomäne III/L2 eingegrenzt werden. Da sowohl Cetuximab als auch Matuzumab nicht-lineare, konformationelle Epitope erkennen, wurde eine Variante der Phage Display Methode zur Identifizierung von Peptiden gewählt, die mit den hypervariablen Regionen (CDR) dieser Antikörper interagieren, welche die Bindungsspezifität der Antikörper vermitteln. Ziel dieser Experimente war die Identifizierung von Peptiden, welche die konformationellen Epitope von Cetuximab bzw. Matuzumab in linearer bzw. zyklisch restringierter Form nachbilden. Die Aminosäuresequenzen solcher sogenannter Mimotope könnten zur Identifizierung entsprechender Oberflächenstrukturen am EGFR Molekül herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden aus kommerziell erhältlichen Bibliotheken genetisch modifizierter M13 Bakteriophagen, die randomisierte lineare bzw. zyklische Peptide als N-terminale Fusion am Oberflächenprotein pIII exponieren (M13KE), unter Anwendung der „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Methode Peptide angereichert, die von Cetuximab bzw. Matuzumab erkannt werden.

Zur Anreicherung von M13KE Bakteriophagen mit CDR-spezifischen Fusionspeptiden mittels DIP wurde zunächst ein „single-chain“ Antikörperfragment aus der cDNA von Matuzumab konstruiert und in den bakteriellen Expressionsvektor pIB-Tx kloniert. Mit dem resultierenden Konstrukt pIB-Tx-scFv(E72K) bzw. dem bereits vorhandenen analogen Konstrukt pIB-Tx-scFv(225), welches das „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab enthält, wurden *E. coli* HB101 Bakterien transformiert, um die bakterielle Oberflächenexpression dieser Antikörperfragmente zum Einsatz in DIP Experimenten zu erreichen. In alternierenden positiven und negativen Selektionsrunden wurden unter Einsatz dieser scFv-exprimierenden *E. coli* HB101 Bakterien in Biopanning Experimenten Phagen mit solchen Fusionspeptiden angereichert, die selektiv an die „single-chain“ Antikörperfragmente von Cetuximab bzw. Matuzumab binden. Phagen ELISA Experimente mit M13KE Einzelklonen zeigten, dass aus allen eingesetzten Bibliotheken Phagen mit Fusionspeptiden isoliert werden konnten, die an den jeweiligen parentalen Antikörper des zur Selektion eingesetzten „single-chain“ Antikörperfragmentes binden. Ein Teil der Phagenklone wies eine zumindest partielle Kreuzreaktivität zu dem entsprechenden anderen anti-EGFR Antikörper auf, obwohl sie auf Bindung an diesen nicht selektioniert worden waren. Die Sequenzanalyse der Fusionspeptide lieferte keine gemeinsame Consensus Sequenz, es konnten jedoch kurze, gemeinsame Sequenzmotive identifiziert werden. In MTT-Zytotoxizitätsassays wurden diese Klone als mögliche Konkurrenten der Bindung des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA in MTT-Zytotoxizitätsassays eingesetzt. Ein Teil der selektionierten Fusionspeptide war in der Lage, die Bindung der aus dem „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab scFv(225) bestehenden Zellbindungsdomäne des Immuntoxins scFv(225)-ETA an EGFR exprimierende Zellen zu kompetieren. Auch für einige Fusionspeptide, die zunächst nur auf Bindung an Matuzumab selektioniert worden waren, wurde dies beobachtet. Peptide, welche die Bindung des Immuntoxins an EGFR kompetieren, weisen in ihren pIII-Fusionspeptiden laut Sequenzanalyse die gemeinsamen Sequenzmotive KTL bzw. YPLG auf.

Nach einem Abgleich der Sequenzen der kompetierenden, kreuzreaktiven Peptide mit KTL bzw. YPLG Motiven wurden zwei Peptide ausgewählt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. In MTT-Zytotoxizitätsassays wurde zunächst bestätigt, dass die synthetischen Peptide in der Lage sind, durch Konkurrenz spezifisch die Bindung des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA und dessen zytotoxische Wirkung auf EGFR exprimierende Zellen zu verhindern. Kaninchenserum und aus diesen affinitätsgereinigte anti-Peptid Antikörper zeigten in ELISA Experimenten konzentrationsabhängige Bindung an die immobilisierten synthetischen Peptide. Die Bindung der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab an die synthetischen Peptide konnte ebenfalls bestätigt werden. In einer Reihe von Experimenten wurde untersucht, ob die Immunisierung mit potentiellen Mimotopen der anti-EGFR Antikörper eine endogene humorale Immunantwort gegen den humanen EGFR bewirkt hatte. Die Bindung der affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper an den Rezeptor auf der Oberfläche EGFR-exprimierender Tumorzellen wurde zunächst in Durchflusszytometrie (FACS) Experimenten analysiert. Für die gereinigten anti-Peptid Antikörper wurde spezifische Bindung an murine Renca-lacZ/EGFR Zellen sowie an humane A431 Vulvakarzinomzellen detektiert, die den humanen EGFR auf der Oberfläche exprimieren. Die Bindung an A431 konnte durch Vorinkubation der Antikörper mit einem Überschuss der entsprechenden synthetischen Peptide vollständig verhindert werden. In einer weiteren Serie von FACS Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Antikörper Cetuximab und Matuzumab an EGFR durch eine Vorinkubation von Renca-lacZ/EGFR Zellen mit den gereinigten anti-Peptid Antikörpern deutlich reduziert werden konnte. Dies ist ein Beweis für die Fähigkeit der in Immunisierungsexperimenten generierten anti-Peptid Antikörper, die Bindungsstellen von Cetuximab und Matuzumab am EGFR zumindest teilweise zu besetzen.

Diese Beobachtungen zeigen, dass durch Immunisierung mit den hier ausgewählten synthetischen Peptiden in Versuchstieren die Bildung von Antikörpern mit ähnlichen Eigenschaften wie Cetuximab bzw. Matuzumab und somit eine endogene Immunantwort gegen den humanen EGFR ausgelöst werden konnte. In Immunfluoreszenz Experimenten wurde die Bindung der anti-Peptid Antikörper an Renca-lacZ/EGFR Zellen erneut überprüft und mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) visualisiert. In diesen Experimenten wurde für gereinigte anti-Peptid Antikörper (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) Bindung an die Zelloberfläche bzw. membran nahe intrazelluläre Strukturen beobachtet, die der Lokalisierung der Bindungssignale der parallel getesteten anti-EGFR Antikörper Cetuximab, Matuzumab und dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 entsprach. Die Bindung der anti-Peptid Antikörper konnte durch Zugabe eines Überschusses der jeweiligen synthetischen Peptide verhindert werden. In einer weiteren Serie von Immunfluoreszenz Experimenten wurde der humane EGFR auf Renca-lacZ/EGFR Zellen gleichzeitig mit anti-KTL bzw. anti-YPLG Peptid Antikörpern aus Kaninchen sowie dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 detektiert. Durch eine Überlagerung der Signale konnte eindeutig eine Kolo-kalisation nachgewiesen werden. Dies ist ein Beweis dafür, dass es sich bei der Bindung der anti-Peptid Antikörper an die Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR um Bindung an den humanen EGFR handelt. In Lysaten von EGFR exprimierenden Zelllinien konnte mit gereinigten anti-Peptid Antikörpern

ein Protein detektiert werden, dessen Größe dem humanen EGFR entspricht. Die durch Stimulation des humanen EGFR mit dem natürlichen Peptidliganden EGF hervorgerufene Autophosphorylierung des Rezeptors in A431 Zellen konnte durch Zugabe von anti-Peptid Antikörpern teilweise inhibiert werden, allerdings nicht in dem gleichen Ausmaß, wie dies für die als Positivkontrollen eingesetzten anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab beobachtet wurde. In MTT-Zytotoxizitätsassays konnte darüber hinaus eine teilweise Kompetition der Bindung des rekombinanten Toxins TGF α -ETA an EGFR-exprimierende A431 Zellen, und somit eine teilweise Kompetition des natürlichen Peptidliganden TGF α an EGFR durch Vorinkubation mit anti-Peptid Antikörpern nachgewiesen werden. Zur näherungsweisen Quantifizierung der Affinitäten der anti-Peptid Antikörper und der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab für die synthetischen Peptide (KTL Motiv und YPLG Motiv) bzw. für die gereinigte extrazelluläre Domäne des humanen EGFR (sEGFR) wurden ELISA Bindungstests durchgeführt. Die aus den Bindungskurven berechneten Affinitätswerte zeigen, dass die anti-Peptid Antikörper an sEGFR im nanomolaren Bereich binden und damit ca. 200-fach niedrigere Affinitäten für den Rezeptor besitzen als die affinitätsoptimierten anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab. Die Affinitäten der anti-Peptid Antikörper für die synthetischen Peptide liegen ebenfalls im nanomolaren Bereich, während Cetuximab und Matuzumab lediglich mikromolare Affinitäten für die Peptide besitzen.

Durch „Epitope Mapping“ *in silico* vorhergesagte mögliche Oberflächenstrukturen auf EGFR, welche die Peptidmimotope mit KTL bzw. YPLG Motiven nachbilden, sind direkt benachbart zu den mittlerweile publizierten Bindungsstellen von Matuzumab und Cetuximab bzw. EGF in der Ektodomäne III/L2 von EGFR (Li *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2008) und zeigten im Falle des Peptides mit KTL Motiv Übereinstimmungen mit Teilen beider Epitope. Möglicherweise ist dieses Peptid in der Lage, alternative Strukturen mit KTL bzw. KTI Motiven an der Oberfläche von EGFR nachzubilden, die Gemeinsamkeiten mit beiden Epitopen von Cetuximab bzw. Matuzumab besitzen und daher von beiden Antikörpern erkannt werden können. Eine endgültige Klärung der Bindung der hier identifizierten Peptide an Cetuximab bzw. Matuzumab bzw. der Bindung der anti-Peptid Antikörper an EGFR könnte in nachfolgenden Untersuchungen mittels Röntgenkristallographie bzw. NMR strukturell aufgeklärt werden – die hierzu nötigen Peptide bzw. Proteine liegen bereits in gereinigter Form vor. Eine Optimierung der hier identifizierten Mimotope zur Steigerung der Affinitäten der induzierten anti-Peptid Antikörper für EGFR könnte zur Entwicklung von Vakzinen führen, die eine Alternative zur wiederholten, kostenintensiven passiven Immunisierung von Patienten mit EGFR-exprimierenden Tumoren mit monoklonalen Antikörpern darstellen könnte.

Inhaltsverzeichnis

	Deckblatt	
	Eidesstattliche Erklärung	
	Zusammenfassung	
	Inhaltsverzeichnis	
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	
		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Entstehung und Eigenschaften von Tumoren / Therapie von Krebserkrankungen	1
1.1.1	Klassische Therapiestrategien	2
1.1.2	Neue und experimentelle Therapiestrategien	3
1.2	ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen als Zielstrukturen in der gerichteten Tumorthherapie	4
1.3	Struktur und Mechanismus der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR)	8
1.4	Strategien zur Inhibierung der ErbB Signaltransduktion	12
1.4.1	Tyrosinkinase-Inhibitoren	12
1.4.2	Monoklonale Antikörper	15
1.5	Anwendung der Phage Display Methode zur Identifizierung von Mimotopen	21
1.5.1	Phage Display	21
1.5.2	Der Bakteriophage M13	23
1.5.3	Delayed Infectivity Panning (DIP)	25
1.6	Ziel dieser Arbeit	26
2	MATERIAL UND METHODEN	28
2.1	Material	28
2.1.1	Chemikalien / Reagenzien / Verbrauchsmaterialien	28
2.1.2	Antikörper	29
2.1.3	Plasmide	30
2.1.4	Oligonukleotid-Primer	31
2.1.5	Bakterienstämme	32
2.1.6	Bakteriophagen	33
2.1.7	Zelllinien	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien	35
2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	35
2.2.3	Amplifikation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> Bakterien	36

2.2.4	Bestimmung von DNA- bzw. Protein-Konzentrationen	36
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.2.6	Restriktionsverdau von DNA	37
2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	37
2.2.8	Gelelektrophorese	38
2.2.9	Immundetektion von Proteinen (Western blot)	39
2.2.10	Kultivierung von Säugerzelllinien	40
2.2.11	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen	40
2.2.12	Konstruktion des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) aus der cDNA von Matuzumab	40
2.2.13	Nachweis der Expression von Proteinen auf der Oberfläche von <i>E. coli</i> Bakterien (Spun Cell ELISA)	42
2.2.14	Delayed Infectivity Panning (DIP)	43
2.2.15	Titerbestimmung von M13 Bakteriophagen	44
2.2.16	Phagen ELISA	45
2.2.17	MTT-Zytotoxizitätsassay	46
2.2.18	Immunisierungsexperimente in Kaninchen	46
2.2.19	Peptid ELISA	47
2.2.20	Nachweis von EGFR auf Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)	47
2.2.21	Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	48
2.2.22	Detektion von EGFR durch anti-Peptid Antikörper in Lysaten von Tumorzellen (Western blot)	49
2.2.23	Kompetition der Stimulation von EGFR durch den natürlichen Liganden EGF (Western blot)	49
2.2.24	Sättigungs-ELISA zur Bestimmung der Affinitäten gereinigter anti-Peptid Antikörper	50
2.2.25	Epitopvorhersage (Epitope Mapping) <i>in silico</i>	51
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Ausgangsposition und Fragestellung	52
3.2	Cetuximab und Matuzumab erkennen konformationelle EGFR Epitope	54
3.2.1	Detektion von EGFR in Lysaten von Tumorzellen	54
3.2.2	Sequenz- und Strukturvergleich von anti-EGFR „single-chain“ Antikörperfragmenten	56
3.2.3	Cetuximab und Matuzumab binden an die Ektodomäne III/L2 von EGFR	59
3.3	Experimentelle Strategie und Herstellung der benötigten Konstrukte	62
3.3.1	Strategie zur Aufklärung der Epitope von Cetuximab und Matuzumab	62
3.3.2	Ableitung eines „single-chain“ Antikörperfragmentes von Matuzumab aus cDNA – Konstruktion des Expressionsvektors pIB-Tx-scFv(E72K)	64

3.3.3	Expression von „single-chain“ Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von <i>E. coli</i> Bakterien	65
3.4	Selektion von anti-EGFR Antikörper-spezifischen Fusionspeptiden aus M13KE Phagenbibliotheken	67
3.4.1	Delayed Infectivity Panning (DIP) – Phage Display Biopanning Experimente	67
3.4.2	Überprüfung der Bindungsspezifität der Fusionspeptide DIP-selektionierter Phagenklone	70
3.4.3	Sequenzanalyse der Fusionspeptide der getesteten Phagenklone	73
3.5	Kompetitionsstudien zur Bestätigung der Bindungsspezifität selektionierter Peptide	75
3.5.1	Untersuchungen zur Antikörper-Kompetition mittels ELISA	75
3.5.2	Untersuchungen zur Immuntoxin-Kompetition mittels MTT-Zytotoxizitätsassays	76
3.6	Zusammenfassung der Abschnitte 3.1 bis 3.5	80
3.7	Charakterisierung der Immunantwort gegen KTL Motiv und YPLG Motiv enthaltende Peptide	82
3.7.1	Immunisierung von Kaninchen mit KTL Motiv und YPLG Motiv enthaltenden Peptiden	82
3.7.2	Kompetition von Immuntoxinen durch synthetische Peptide	83
3.7.3	Bindung von Antikörpern aus Kaninchenseren, gereinigten anti-Peptid Antikörpern und Cetuximab und Matuzumab an synthetische Peptide mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv	85
3.8	Bindung von anti-Peptid Antikörpern an EGFR	88
3.8.1	Analyse der Bindung von anti-Peptid Antikörpern an EGFR auf Tumorzellen (FACS)	88
3.8.2	Visualisierung der Antikörperbindung in Immunfluoreszenz Experimenten (CLSM)	92
3.8.3	Detektion von EGFR durch anti-Peptid Antikörper in Lysaten von Tumorzellen	99
3.8.4	Kompetition der Bindung natürlicher EGFR-Liganden durch anti-Peptid Antikörper	100
3.8.5	Bestimmung der Bindungsaffinitäten von anti-Peptid Antikörpern (Sättigungs-ELISA)	105
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	108
4	DISKUSSION	111
4.1	Ausgangssituation und Zielsetzung	111
4.2	Selektion von spezifisch mit Cetuximab bzw. Matuzumab interagierenden Peptiden	112
4.3	Kristallstrukturen der Epitope von Cetuximab und Matuzumab / „Epitope Mapping“ von anti-Peptid Antikörpern <i>in silico</i>	117
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	123
5	LITERATUR	
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
	ANHANG	
	Danksagung / Veröffentlichungen / Lebenslauf	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1-1	Die Proteinfamilie der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen mit ihren jeweiligen Liganden	5
Abb. 1-2	Das Signalnetzwerk der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen	6
Abb. 1-4	Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR	9
Abb. 1-5	Ligandeninduzierte Aktivierung von EGFR (Röntgenkristallstruktur)	10
Abb. 1-6	Ligandeninduzierte Aktivierung von EGFR (schematisch)	11
Abb. 1-7	Der Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (Tarceva) in der ATP-Bindungstasche der EGFR Kinasedomäne	13
Abb. 1-8	ErbB Tyrosinkinase-Inhibitoren	14
Abb. 1-10	Monoklonale Antikörper zur Tumorthherapie (Auswahl)	16
Abb. 1-11	Schematische Darstellung der möglichen Immunreaktionen gegen Antikörper-markierte Tumorzellen	17
Abb. 1-12	Röntgenkristallstrukturen der Fab-Fragmente monoklonaler anti-ErbB Antikörper im Komplex mit dem Rezeptor	19
Abb. 1-14	Lebenszyklus des Bakteriophagen M13 (schematische Darstellung)	24
Abb. 3-1	Die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab erkennen konformationelle Epitope	55
Abb. 3-2	Vergleichende Anordnung der Aminosäure-Sequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper Cetuximab, Matuzumab und 14E1 anti-EGFR	57
Abb. 3-3	Absolute und prozentuale Sequenzhomologien der Aminosäure-Sequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper Cetuximab, Matuzumab und 14E1 anti-EGFR	58
Abb. 3-4	Räumliche Modelle der Fv-Fragmente von Cetuximab, Matuzumab und 14E1 anti-EGFR sowie FRP5 anti-ErbB2	59
Abb. 3-5	Bakterielle Oberflächenexpression der Ektodomäne III/L2 von EGFR	60
Abb. 3-6	Cetuximab und Matuzumab binden an die Ektodomäne III/L2 von EGFR (Spun Cell ELISA)	61
Abb. 3-7	Bakterielle Oberflächenexpression von „single-chain“ Antikörperfragmenten zur Verwendung in DIP Experimenten	63
Abb. 3-8	Ableitung des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) von Matuzumab aus cDNA	65
Abb. 3-9	Oberflächenexpression von anti-EGFR scFv nach IPTG-Induktion auf <i>E. coli</i> HB101 Bakterien (Spun Cell ELISA)	66
Abb. 3-10	M13KE Phage Display Phagenbibliotheken (New England Biolabs)	67
Abb. 3-11	„Delayed Infectivity Panning“ (DIP) – Positivselektion	68
Abb. 3-12	„Delayed Infectivity Panning“ (DIP) – Negativselektion	69
Abb. 3-13	Verlauf des Phagentiters in den positiven Selektionsrunden von DIP Experimenten	70
Abb. 3-14	Phagen ELISA Bindungstest von M13KE Phagenklonen an immobilisierte Antikörper (schematisch)	71

Abb. 3-15	Phagen ELISA Bindungstest von M13KE Phagenklonen aus DIP Experimenten mit scFv(225) als Zielstruktur	72
Abb. 3-16	Phagen ELISA Bindungstest von M13KE Phagenklonen aus DIP Experimenten mit scFv(E72K) als Zielstruktur	72
Abb. 3-18	ELISA zur Untersuchung der Kompetition von anti-EGFR Antikörpern durch selektiv bindende M13KE Phagenklone bzw. Peptide (schematisch)	75
Abb. 3-19	MTT-Zytotoxizitätsassay zur Untersuchung der Kompetition von anti-EGFR Antikörpern durch selektiv bindende M13KE Phagenklone bzw. Peptide (schematisch)	77
Abb. 3-20	MTT-Zytotoxizitätsassay von Renca-lacZ/EGFR Zellen, die mit dem Immuntoxin scFv(225)-ETA behandelt wurden – Test von selektionierten M13KE Phagenklonen als Kompetitoren	78
Abb. 3-21	MTT-Zytotoxizitätsassay von Renca-lacZ/ErbB2 Zellen, die mit dem Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA behandelt wurden – Test von selektionierten M13KE Phagenklonen als Kompetitoren	79
Abb. 3-22	Auswahl von synthetischen Peptiden zur Immunisierung von Kaninchen	82
Abb. 3-23	Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden (schematisch)	83
Abb. 3-24	Kompetition der Immunttoxine scFv(225)-ETA bzw. scFv(FRP5)-ETA durch synthetische Peptide (MTT-Zytotoxizitätsassay)	84
Abb. 3-25	ELISA Bindungstest von anti-Peptid Antikörpern und anti-EGFR Antikörpern an immobilisierte synthetische Peptide	85
Abb. 3-26	ELISA Bindungstest von anti-KTL Peptid Serum mit immobilisierten synthetischen Peptiden	87
Abb. 3-27	ELISA Bindungstest von anti-YPLG Peptid Serum mit immobilisierten synthetischen Peptiden	87
Abb. 3-28	Bindungsanalyse von anti-Peptid Antikörpern und monoklonalen anti-EGFR Antikörpern mittels Durchflusszytometrie (schematisch)	88
Abb. 3-29	Selektive Bindung von Cetuximab und Matuzumab anti-EGFR sowie der anti-Peptid Antikörper an EGFR-exprimierende Renca-lacZ/EGFR Zellen (FACS)	89
Abb. 3-30	Kompetition der Bindung von Cetuximab und Matuzumab an EGFR durch Vorinkubation der Zielzellen mit anti-Peptid Antikörpern (FACS)	90
Abb. 3-31	Bindung von anti-Peptid Antikörpern an A431 Vulvakarzinomzellen und Kompetition mit synthetischen Peptiden (FACS)	91
Abb. 3-32	Detektion des humanen EGFR an der Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR Zellen mit anti-EGFR Antikörpern (CLSM)	93
Abb. 3-33	Detektion des humanen EGFR an der Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR Zellen mit anti-Peptid Antikörpern (CLSM)	94
Abb. 3-34	Lokalisation des mit KTL Motiv anti-Peptid Antikörpern nachgewiesenen Signals in mehreren überlagerten Zellebenen (CLSM)	95
Abb. 3-35	Kolokalisation nach Bindung an Renca-lacZ/EGFR Zellen von anti-KTL Peptid Antikörpern	

	mit dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 (CLSM)	97
Abb. 3-36	Kolokalisation nach Bindung an Renca-lacZ/EGFR Zellen von anti-YPLG Peptid Antikörpern mit dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 (CLSM)	98
Abb. 3-37	Detektion von EGFR mit anti-Peptid Antikörpern in Tumorzelllysaten	99
Abb. 3-38	Kompetition der EGF-induzierten Phosphorylierung von EGFR durch anti-Peptid Antikörper bzw. anti-EGFR Antikörper (I)	101
Abb. 3-39	Kompetition der EGF-induzierten Phosphorylierung von EGFR durch anti-Peptid Antikörper bzw. anti-EGFR Antikörper (II)	102
Abb. 3-40	Blockade der Zellbindung und Zytotoxizität des rekombinanten Toxins TGF α -ETA durch anti-Peptid Antikörper	104
Abb. 3-41	Bindungskurven für anti-Peptid Antikörper und die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab nach Bindung an immobilisierte synthetische Peptide	105
Abb. 3-42	Bindungskurven für anti-Peptid Antikörper und die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab nach Bindung an die immobilisierte EGFR Ektodomäne (sEGFR)	106
Abb. 4-1	Räumliche Lage der Ektodomäne III/L2 in der extrazellulären Domäne von EGFR	118
Abb. 4-2	Ko-Kristallstrukturen der Fab-Fragmente von Cetuximab und Matuzumab mit der EGFR Ektodomäne III/L2	118
Abb. 4-3	Cetuximab und Matuzumab erkennen konformationelle Epitope in der EGFR Ektodomäne III/L2	119
Abb. 4-4	„Epitope Mapping“ alternativer Bindungsstellen von anti-KTL Peptid Antikörpern (Auswahl)	120
Abb. 4-5	„Epitope Mapping“ alternativer Bindungsstellen von anti-YPLG Peptid Antikörpern (Auswahl)	121
Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1-3	Dysregulation von ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen und deren Liganden bei verschiedenen Tumorentitäten	7 / 8
Tab. 1-9	Indikationen und Zulassungsdaten von ErbB Tyrosinkinase-Inhibitoren	15
Tab. 1-13	Indikationen und Zulassungsdaten monoklonaler Antikörper zur Tumorthherapie	21
Tab. 3-17	Sequenzanalyse der pIII-Fusionspeptide von mit den Antikörpern Cetuximab und Matuzumab anti-EGFR interagierenden M13KE Phagenklonen (Auswahl)	74
Tab. 3-43	Quantifizierung der Affinitäten (K_D Werte) von anti-Peptid Antikörpern und monoklonalen anti-EGFR Antikörpern für synthetische Peptide und für die EGFR Ektodomäne (sEGFR)	107

1. Einleitung

1.1 Entstehung und Eigenschaften von Tumoren / Therapie von Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stellen nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in den westlichen Industrienationen nach den kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Allein im Jahre 2005 erlagen weltweit 7,6 Millionen einem Krebsleiden (<http://www.who.int/cancer/>). In Deutschland starben im gleichen Jahr 224.000 Menschen aufgrund einer Krebserkrankung (26,6%). Mehr als 70% aller krebsbedingten Todesfälle weltweit wurden in Entwicklungs- und Schwellenländern registriert, in denen die verfügbaren Ressourcen zur Prävention, Diagnose und Behandlung von Tumorerkrankungen begrenzt oder nicht vorhanden sind. Diese Zahlen verdeutlichen die Notwendigkeit zur Prävention sowie der Verbesserung bestehender und der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten von Tumorerkrankungen.

In einem gesunden, mehrzelligen Organismus unterliegt jede einzelne Zelle einer strikten Kontrolle bezüglich ihrer Vermehrung und ihrer Funktion, um das Überleben des Gesamtorganismus sicherzustellen. Die Spezialisierung einzelner Zellen auf ihre jeweilige Funktion gründet sich auf ein spezifisches Genexpressionsmuster, bei dem nur bestimmte Gene in dem Maße exprimiert werden, wie es für die spezielle Funktion der betreffenden Zelle notwendig ist. Die durch Aufnahme von Karzinogenen, Strahlungsexposition, onkogene Viren oder erblich bedingte Faktoren ausgelöste Entstehung und Entwicklung von Tumoren geht mit tiefgreifenden Veränderungen der Genexpression körpereigener Zellen einher, die sich den populationsbeschränkenden Kontrollmechanismen der Zellteilung entziehen und sich nahezu ungehindert vermehren (Hanahan und Weinberg, 2000). Häufig wird in Tumorzellen eine übermäßig starke Expression von Genen beobachtet, die für Proteine kodieren, die an mitotischen Prozessen oder an Mechanismen beteiligt sind, die das Zellwachstum und die Zellteilung fördern oder diese regulieren. Ferner entwickeln Tumorzellen eine Unempfindlichkeit gegenüber apoptotischen Stimuli, die normalerweise dafür sorgen, dass defekte oder überzählige Zellen über die Mechanismen des programmierten Zelltodes – der Apoptose – ihre eigene geordnete Selbstzerstörung initiieren (Wyllie *et al.*, 1980).

Im frühen Stadium einer Krebserkrankung vermehren sich einzelne Zellen unkontrolliert zu einem Zellverband. Dieses Stadium wird als Hyperplasie bezeichnet. Die starke Teilungsaktivität kann zu unvollständigen mitotischen Prozessen führen, in denen ganze Teile von Chromosomen nicht getreu an die Tochterzellen weitergegeben werden. So können tiefgreifende funktionelle Veränderungen in den entstehenden Zellen auftreten, die – sofern sie überlebensfähig sind – eine ganze Reihe umfangreicher Modifikationen in ihrem Genexpressionsmuster erfahren. Der weitgehende Verlust ihrer physiologischen Funktionen führt zur Entstehung und Vermehrung von Zellen, die dem Organismus keinen Nutzen bringen, sich jedoch immer weiter teilen. In diesem Stadium, der so genannten Dysplasie, wird der

entstehende Zellverband als benigner (gutartiger) Tumor bezeichnet, der operativ entfernt werden kann, sofern er frühzeitig diagnostiziert wird.

Tumorzellen sezernieren im fortgeschrittenen Stadium der Krebserkrankung chemische Botenstoffe, welche die Angiogenese, die Neubildung von Blutgefäßen, fördern, und somit die Versorgung der für das schnelle Wachstum des Tumors nötigen Mengen an Nährstoffen sicherstellen (Folkman *et al.*, 2001). Schnell wachsende Tumoren infiltrieren und verdrängen gesundes Gewebe und können es derart stark schädigen, dass es zum Versagen der umliegenden Organe kommen kann. In fortgeschrittenen Stadien einer Krebserkrankung kann die Metastasierung einsetzen, bei der einzelne Tumorzellen durch Sezernierung von Proteasen ihre Verankerung im Zellverband lösen, epitheliale und endotheliale Zellschichten durchdringen und sich z.B. über die Blutgefäße im Körper verteilen. Infiltrierende Tumorzellen können an anderer Stelle des Organismus die Bildung sekundärer Tumoren, so genannter Metastasen, initiieren. Zellverbände, aus denen sich solche metastasierenden Zellen lösen, werden als maligne (bösartige) Tumoren bezeichnet. In diesem Stadium der Krebserkrankung ist eine vollständige operative Entfernung der Tumoren häufig nicht mehr möglich, da die in der Blutbahn zirkulierenden metastasierenden Zellen bei einer Operation nicht vollständig entfernt werden können und sich an anderer Stelle im Körper bereits nach kurzer Zeit neue Metastasen bilden (Hanahan und Weinberg, 2000).

1.1.1 Klassische Therapiestrategien

In klassischen chemotherapeutischen Ansätzen ist das Ziel eine möglichst vollständige Abtötung der nach einer operativen Entfernung von Tumoren im Körper des Patienten verbliebenen Tumorzellen. Häufig wird versucht, dies durch eine systemische Applikation einer Kombination zytotoxischer und zytostatischer Substanzen zu erreichen (Mutschler *et al.*, 2001). Ein weiteres klassisches Mittel zur Abtötung von Tumorzellen ist die Radiotherapie, in der die verbliebenen Zellen im Bereich des entfernten Tumors DNA-schädigender Strahlung ausgesetzt werden. Nachteil dieser Behandlungsmethoden ist eine unspezifische Schädigung aller stark replizierenden Zellen, also auch gesunden Körpergewebes. Je nach Art, Dosis und Dauer der Therapie können für den Patienten unangenehme Nebenwirkungen (z.B. Übelkeit, Schmerzen, Haarausfall) auftreten. Eine aggressive Chemotherapie kann aufgrund ihrer Toxizität für gesunde Körperzellen jedoch auch schwere Nebenwirkungen auslösen, die sogar zum Tod des Patienten führen können. Dies macht deutlich, dass es das Hauptanliegen der Krebsforschung sein muß, alternative Behandlungsmethoden zu entwickeln, die bei einer deutlichen Reduzierung von Nebenwirkungen eine effizientere, zielgenaue Zerstörung der Tumorzellen ermöglichen. Eine gerichtete Tumortherapie, die bei möglichst geringer Schädigung gesunden Gewebes die Tumorzellen restlos abtötet, ist das Ziel der modernen Krebsforschung.

1.1.2 Neue und experimentelle Therapiestrategien

Um die mitunter schweren Nebenwirkungen zu vermeiden, die eine Behandlung mit systemisch wirkenden Chemotherapeutika häufig verursacht, werden bei der Entwicklung moderner Wirkstoffe neueste Erkenntnisse der zell- und molekularbiologischen Forschung einbezogen, um eine zielgerichtete Therapie der transformierten Zellen zu ermöglichen. Moderne Arzneimittelentwicklung sowie die Nutzung gentechnischer Methoden in der Krebsforschung und die Erkenntnis der Bedeutung immunologischer Prozesse bei der Abstoßung von Tumoren haben zu einer Vielzahl neuer Therapieansätze geführt. Beispielsweise kann die überlebens- und wachstumsfördernde Signalübertragung aktivierter Rezeptor-Tyrosinkinasen, die auf Tumorzellen epithelialen Ursprungs häufig überexprimiert sind (siehe 1.2 und 1.3), durch den Einsatz von niedermolekularen Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI; siehe 1.4.1) oder von monoklonalen Antikörpern (mAb; siehe 1.4.2) gehemmt werden. Die Zulassung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Glivec[®], Novartis) zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML; Druker, 2008) sowie die Zulassung des gegen die tumorassoziierte Tyrosinkinase ErbB2 gerichteten monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin[®], Roche; Olver, 2008) waren Meilensteine in der Entwicklung dieser beiden Klassen von Tumorthapeutika. Große Fortschritte konnten in der klinischen Anwendung von Antikörpern erzielt werden, die zum Abfangen von Liganden oder zur Blockade ihrer Bindung an Rezeptormoleküle in der Lage sind, deren Bindung andernfalls direkt überlebens- und wachstumsfördernde Signale an die Zielzelle auslösen würde. Auf diese Weise kann das Tumorzellwachstum oder die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) im Bereich des Tumors unterdrückt werden, und diese Therapeutika stellen eine auf immunologischen Prinzipien basierende und hochspezifische Möglichkeit zur Inhibition des Tumorwachstums dar. Ferner können durch Nutzung der hoch spezifischen Bindung von Immunglobulinen (Antikörpern) an eine Zielstruktur (Antigen) Fusionsproteine konstruiert werden, die zytotoxische Effektorfunktionen, wie z.B. bakterielle Toxine (Pastan und FitzGerald, 1991; Wels *et al.*, 1996; Azemar *et al.*, 2000), zytotoxische Chemotherapeutika oder DNA-schädigende Radioisotope gezielt zu Tumorzellen dirigieren, um diese abzutöten (Mutschler *et al.*, 2001). Einen wichtigen Ansatzpunkt stellt das gezielte Auslösen des programmierten Zelltods selektiv in Tumorzellen dar, die grundsätzlich zu dieser Art der Selbstzerstörung befähigt sind, sich jedoch den natürlichen Kontrollmechanismen der Apoptose entziehen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Trotz großer Fortschritte auf diesen Gebieten der Krebsforschung in den letzten Jahren bleibt das grundsätzliche Problem bestehen, eine absolut spezifische Zielstruktur zu identifizieren, so dass durch die Anwendung zielgerichteter Therapeutika keine gesunden Körperzellen des Patienten bei der Behandlung Schaden nehmen. Zwar sind solche absolut tumorspezifischen Antigene für einige Tumorentitäten identifiziert worden wie z.B. eine konstitutiv aktive Deletionsvariante des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR (EGFRvIII: V6G; Δ 7-273), die in Glioblastomen nachgewiesen wurde (Sugawa *et al.*, 1990; Moscatello *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 2001), für den weitaus größeren Teil von

Tumorerkrankungen sind solche Strukturen jedoch bislang nicht bekannt. Die Tatsache, dass Tumorzellen sich von körpereigenen Zellen ableiten und daher ähnliche oder identische Oberflächenstrukturen wie diejenigen Körperzellen besitzen, aus denen sie durch Transformation hervorgegangen sind, macht die Schwierigkeit deutlich, für alle Tumorentitäten eine geeignete tumorzellenspezifische Zielstruktur für eine gerichtete Tumorthherapie zu finden. Bei der Nutzung einer nicht absolut tumorspezifischen Zielstruktur ist eine im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich erhöhte Expression auf der Tumorzelloberfläche ebenso Voraussetzung, wie die Abwesenheit wichtiger oder gar lebenswichtiger physiologischer Funktionen des genutzten Antigens, die nach einem Abtöten der exprimierenden Zielzelle nicht kompensiert werden könnten und dadurch zu Nebenwirkungen führen würden. Die Familie der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen erfüllt diese Voraussetzungen, da die physiologischen Funktionen dieser Proteine im wesentlichen während der Embryonalentwicklung, der Entwicklung der weiblichen Brust während einer Schwangerschaft und bei Wundheilungsprozessen von Bedeutung sind (Danielsen und Maihle, 2002; Werner und Grose, 2003). Diese tumorassoziierten Oberflächenmoleküle werden bereits seit einigen Jahren erfolgreich als Zielstrukturen für gerichtete Tumorthapien genutzt (siehe 1.2).

1.2 ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen als Zielstrukturen in der gerichteten Tumorthherapie

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR/ErbB/HER) ist ein membranständiges Glykoprotein aus 1186 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 170 kDa (Wells, 1999). Der Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Domäne zur Ligandenbindung und Dimerisierung, einer einzelnen membrandurchspannenden Helix, einer intrazellulären enzymatisch aktiven Kinasedomäne sowie einer regulatorischen C-terminalen Region (Burgess *et al.*, 2003). EGFR gehört zu einer Proteinfamilie von vier sequenzhomologen Typ 1 Rezeptor-Tyrosinkinasen, die als ErbB (Bezeichnung abgeleitet vom *v-erbB* Gen des Vogel-Erythroblastose-Virus) oder HER (human epidermal growth factor receptor) Rezeptoren bekannt sind (EGFR/ErbB/HER, ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3, ErbB4/HER4). Bindung von Peptidliganden mit homologen EGF Domänen an die extrazelluläre Region führt zu Konformationsänderungen der Rezeptoren und ermöglicht so die Dimerisierung dieser Proteine, wodurch die zytoplasmatische Kinasedomäne aktiviert wird (Salomon *et al.*, 1995; Yarden und Sliwkowski, 2001). Diese Liganden können gemäß ihrer Bindungsspezifitäten in zwei Gruppen eingeteilt werden: die Liganden der EGF-Familie (EGF, TGF α , Epiregulin, Betacellulin, HB-EGF, Amphiregulin) binden hauptsächlich an EGFR, während die zweite Gruppe aus den Mitgliedern der Neuregulin Wachstumsfaktor-Familie besteht und ausschließlich an ErbB3 bzw. ErbB4 bindet (Abb. 1-1).

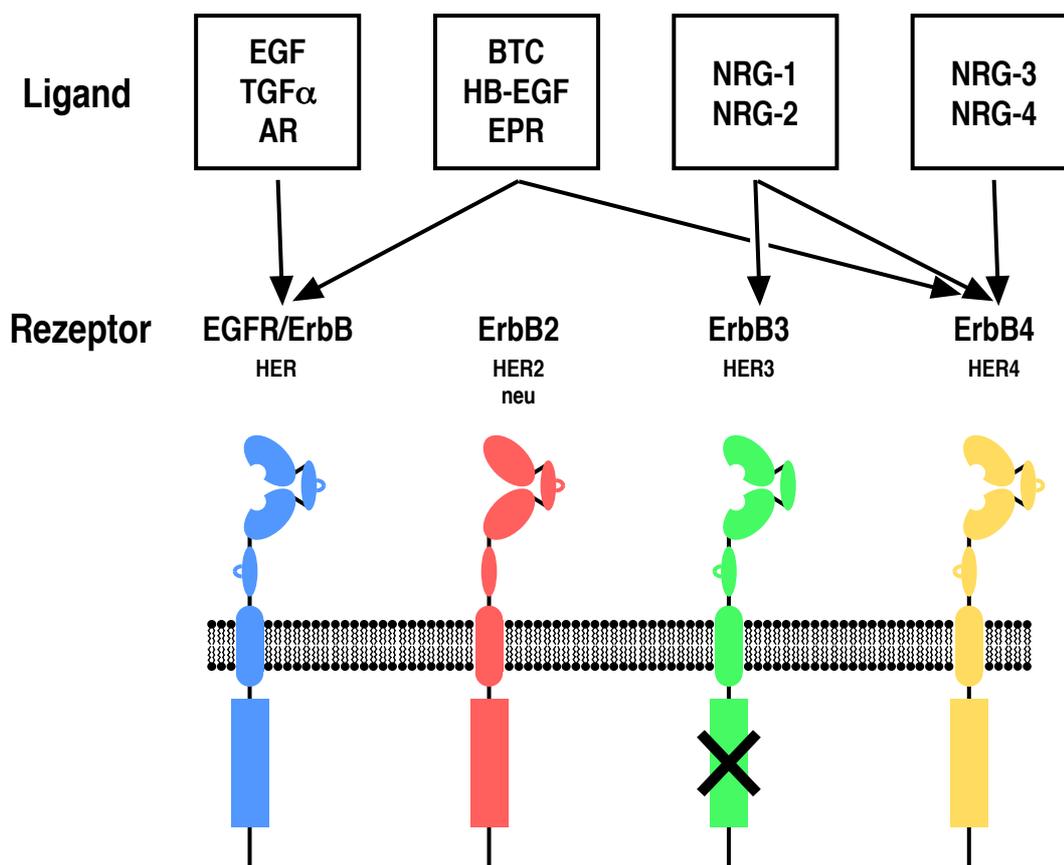


Abb. 1-1: Die Proteinfamilie der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen mit ihren jeweiligen Liganden. Für ErbB2 sind keine natürlichen Peptidliganden bekannt. Die enzymatisch inaktive zytoplasmatische Kinasedomäne von ErbB3 ist durch ein Kreuz symbolisiert. EGF = epidermaler Wachstumsfaktor; TGF α = transformierender Wachstumsfaktor α ; AR = Amphiregulin; BTC = Betacellulin; EPR = Epiregulin; HB-EGF = Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor; HER = „human epidermal growth factor receptor“; NRG = Neuregulin.

Im Gegensatz zu den übrigen Rezeptoren sind für ErbB2 keine natürlichen Peptidliganden bekannt. Dieses Molekül befindet sich vielmehr ständig in einer Konformation, wie sie die übrigen Rezeptoren erst nach Ligandenbindung aufweisen. Der ErbB2 Rezeptor stellt den bevorzugten Bindungspartner für die übrigen Mitglieder der ErbB Familie zur Bildung von Heterodimeren dar (Holbro und Hynes, 2004). Die aktivierte Kinasedomäne phosphoryliert Tyrosin-Seitenketten im regulatorischen C-Terminus der Rezeptoren, die als Andockstellen für Effektorproteine der mitogenen Signalübertragung dienen. Diese Kinasedomäne ist bei ErbB3 enzymatisch inaktiv, sie kann jedoch durch die Kinasedomäne des Bindungspartners in einem ErbB Heterodimer phosphoryliert werden und somit zur Signalweiterleitung beitragen (Carpenter *et al.*, 1987).

Aktivierte ErbB Rezeptoren lösen ein komplexes Netzwerk von intrazellulären Signalprozessen aus (Abb. 1-2), welche die Zellteilung und -differenzierung sowie die Unterdrückung der zur Apoptose nötigen Signalwege fördern (Holbro und Hynes, 2004; Hubbard und Miller, 2007; Schlessinger, 2000; Yarden und Sliwkowski, 2001).

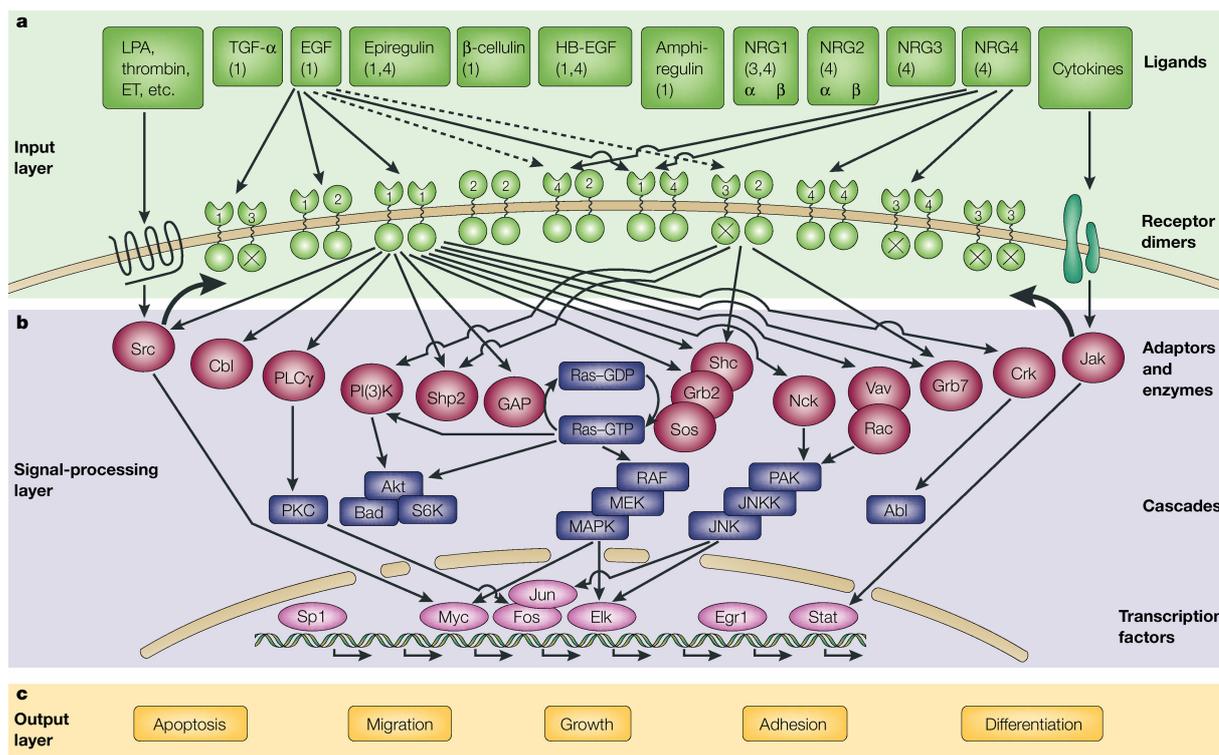


Abb. 1-2: Das Signalnetzwerk der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen. (a) Übersicht der physiologischen Liganden und der Kombinationen von Rezeptordimeren (ferner sind zwei mit dem ErbB Rezeptornetzwerk interagierende G-Protein gekoppelte Rezeptoren gezeigt). (b) Für zwei mögliche ErbB Rezeptordimere (EGFR/EGFR und ErbB2/ErbB3) sind die interagierenden, zytosmatischen Proteine und ihre Signalwege gezeigt. Im angedeuteten Zellkern sind die Transkriptionsfaktoren dargestellt, deren Aktivität am Ende der Signaltransduktion beeinflusst wird. (c) Auflistung der möglichen Auswirkungen der ErbB Signalübertragung auf die Zielzelle. Abl = proto-onkogene Tyrosinkinase; Akt = Serin/Threonin-Kinase, die das anti-apoptotische Protein Bcl-2 assoziierter Todespromotor (Bad) und die ribosomale S6 Kinase (S6K) phosphoryliert; GAP = GTPase aktivierendes Protein; HB-EGF = Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor; JAK = Janus Kinase; PKC = Protein Kinase C; PLC γ = Phospholipase C γ ; Shp2 = Src homology domain containing protein tyrosine phosphatase 2; Stat = signal transducer and activator of transcription; RAF-MEK-MAPK und PAK-JNKK-JNK = Kaskaden von Serin/Threonin-Kinasen, die die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren (aus Yarden und Sliwkowski, 2001).

Expression, Aktivierung und Homöostase des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors EGFR sowie des nahe verwandten Rezeptors ErbB2 sind in einer Vielzahl von Tumoren epithelialen Ursprungs dysreguliert (Tab. 1-3; Hynes und Lane, 2005; Yarden und Sliwkowski, 2001). Auch für ErbB3 und ErbB4 sind solche Fälle bekannt (Tab. 1-3; Yarden und Sliwkowski, 2001). Eine vermehrte Expression dieser tumorassoziierten Antigene, die auto- bzw. parakrine Aktivierung durch Koexpression aktivierender Liganden sowie autokatalytisch aktive Deletionsmutanten wurden auf Tumorzellen nachgewiesen (Hynes und Lane, 2005; Yarden und Sliwkowski, 2001). Eine fehlerhafte oder ausbleibende Regulation der durch diese Rezeptoren transduzierten Wachstumssignale, durch Überexpression oder Mutation, führt zu abnormal erhöhter bzw. konstitutiver Aktivität und/oder zu vermindertem proteolytischen Abbau dieser Proteine und kann eine maligne Transformation der betroffenen Zelle verursachen (Mendelsohn und Baselga, 2006).

Dieser kausale Zusammenhang der ErbB Signalübertragung mit der malignen Transformation, die Lokalisation des Rezeptors an der Zelloberfläche und die daraus resultierende direkte Zugänglichkeit für von außen zugeführte Therapeutika, sowie die durch andere Signalwege kompensierbare physiologische Rolle des Rezeptors bei der Embryonalentwicklung sowie der Entwicklung der weiblichen Brust während der Schwangerschaft und Wundheilungsprozessen im adulten Organismus (Danielsen und Maihle, 2002; Werner und Grose, 2003) macht das Selbst-Antigen EGFR zu einem attraktiven Zielantigen für gerichtete Tumorthérapien. Zwei Molekülklassen zur Interferenz mit der ErbB Signalübertragung sind von klinischer Bedeutung: monoklonale Antikörper, die an die extrazellulären Domänen der ErbB Rezeptoren binden und die Ligandenbindung und/oder die Dimerisierung beeinflussen (siehe 1.4.1), sowie niedermolekulare Kinaseinhibitoren, welche die Aktivität der zytoplasmatischen Kinasedomäne unterbinden (siehe 1.4.2).

Rezeptor	Dysregulierung	Art des Tumors	Bemerkungen	Referenzen
EGFR	Überexpression	Kopf und Hals; Brust; Blase; Prostata; Niere; NSCLC	Bedeutsamer Indikator für das Wiederauftreten in operablen Brusttumoren; verbunden mit kürzerer krankheitsfreier Zeit und Gesamtüberlebenszeit bei fortgeschrittenem Brustkrebs; dient als prognostischer Marker für Blasen- und Prostatakrebs und NSCLC	Gorgoulis <i>et al.</i> , 1992; Irish und Bernstein, 1993
	Überexpression	Gliom	Amplifikation tritt in 40% aller Gliome auf; Überexpression korreliert mit höherem Malignitätsgrad und verringerter Überlebenszeit	Wong <i>et al.</i> , 1992
	Überexpression	Kolorektal	Amplifikation tritt in mindestens 75% aller Kolorektalkarzinome auf; gute Behandlungserfolge mit monoklonalen anti-EGFR mAbs; Resistenz gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren	Wainberg und Hecht, 2006; Wainberg und Hecht, 2007; De Castro-Carpeno <i>et al.</i> , 2008
	Mutation	Gliom; NSCLC; Ovarien; Brust	Deletion eines Teils der extrazellulären Domäne resultiert in einem konstitutiv aktiven Rezeptor	Moscattello <i>et al.</i> , 1995

Rezeptor	Dysregulierung	Art des Tumors	Bemerkungen	Referenzen
ErbB2	Überexpression	Brust; Lunge; Pankreas; Ösophagus; Endometrium; Cervix	Überexpression aufgrund von Genamplifikation in 15-30% aller invasiven duktalem Brusttumore. Überexpression korreliert mit TumorgroÙe, Streuung des Tumors in die Lymphknoten, hohem Malignitätsgrad, hohem Prozentsatz an Zellen in der S-Phase, Aneuploidie und dem Fehlen von Steroidhormon-Rezeptoren	Ross und Fletcher, 1998
ErbB3	Expression	Brust; Kolon; Magen; Prostata; andere Karzinome	Koexpression von ErbB2 mit EGFR oder ErbB3 bei Brustkrebs verbessert die Sicherheit einer Prognose	Lyne <i>et al.</i> , 1997; Naidu <i>et al.</i> , 1998; Xia <i>et al.</i> , 1999;
	Überexpression	Orales Plattenepithelkarzinom	Überexpression korreliert mit Lymphknoten-Metastasen und geringerer Überlebenszeit der Patienten	Shintani <i>et al.</i> , 1995
ErbB4	verminderte Expression	Brust; Prostata	Korreliert mit einem differenzierten Phänotyp	Kew <i>et al.</i> , 2000
	Expression	Medulloblastom	Koexpression mit ErbB2 korreliert mit schlechter Prognose für den Patienten	Gilbertson <i>et al.</i> , 1997

Tab. 1-3: Dysregulation von ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen und deren Liganden bei verschiedenen Tumorentitäten. EGFR = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; NSCLC = nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (mod. nach Yarden und Sliwkowski, 2001 und Hyland, 2003).

1.3 Struktur und Mechanismus der Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR)

Die extrazelluläre Region des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) besteht aus vier Domänen, die als Ektodomänen I bis IV bzw. L1, CR1, L2 und CR2 bezeichnet werden (Abb. 1-4). Diese Ektodomänen-Substruktur ist auch bei den übrigen Mitgliedern der ErbB Familie in analoger Weise vorhanden. Bei den Ektodomänen I/L1 und III/L2 handelt es sich um globuläre Bereiche, in denen die Kontaktstellen zu den aktivierenden Liganden liegen, die Ektodomänen II/CR1 und IV/CR2 sind reich an Cysteinen. In Abwesenheit von Ligand besteht zwischen dem Dimerisierungsarm der Ektodomäne II/CR1 und der Ektodomäne IV/CR2 eine intramolekulare Interaktion, die den Rezeptor in einem niedrigaffinen,

inaktiven Zustand hält (Abb. 1-5A; Cho und Leahy, 2002; Ferguson *et al.*, 2003). Die Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) wird durch die Bindung von Liganden der EGF-Familie (EGF, TGF α , Epiregulin, Betacellulin, HB-EGF, Amphiregulin) eingeleitet. Für EGF bzw. TGF α konnte in Kristallisationsexperimenten gezeigt werden, dass diese Liganden an die Bindungsstellen auf Ektodomäne I/L1 und III/L2 von EGFR binden. Die induzierte Konformationsänderung des Rezeptors, die die intramolekularen Interaktionen löst, ermöglicht die Bildung von EGFR Homodimeren oder von Heterodimeren bestehend aus EGFR und anderen Mitgliedern der ErbB Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen (Abb. 1-5B; Ogiso *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2002).

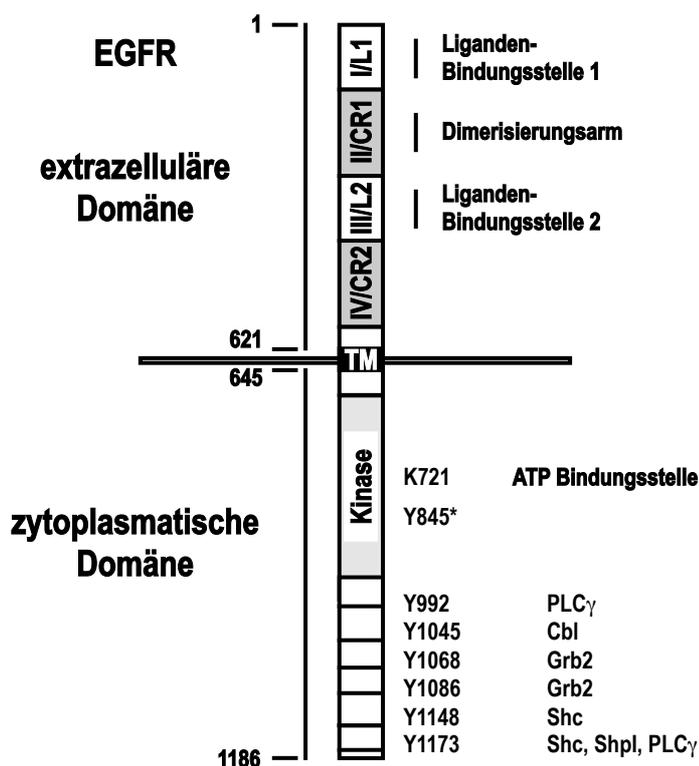


Abb. 1-4: Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor ist ein aus 1186 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa. Die extrazelluläre Domäne (EGFR AS 1-621) lässt sich in vier Subdomänen unterteilen. Bei den Ektodomänen I/L1 und III/L2 handelt es sich um globuläre Untereinheiten, in denen sich die Interaktionsoberflächen mit den aktivierenden Liganden befinden. In der Cystein-reichen Ektodomäne II/CR1 liegt der Dimerisierungsarm, der in der aktiven Rezeptor-Konformation zur Interaktion mit anderen ErbB Rezeptoren beiträgt und anderenfalls durch einen intramolekularen Kontakt zur Cystein-reichen Ektodomäne IV/CR2 den Rezeptor in einer inaktiven, autoinhibierten Konformation stabilisiert. Die Transmembranregion (TM; EGFR AS 622-644) wird durch eine einzelne, die Zellmembran durchspannende Helix gebildet. In der zyttoplasmatischen Domäne (EGFR AS 645-1186) befindet sich die enzymatisch aktive Kinasedomäne mit der ATP Bindungsstelle an Position K721 sowie dem Phosphatgruppen-Akzeptor an Position Y845. Die sechs C-terminal gelegenen Tyrosin-Seitenketten bilden die Phosphatgruppen-Akzeptoren bei der Autophosphorylierung im aktiven Rezeptor-Dimer, die mit den angegebenen zyttoplasmatischen Proteinen interagieren, die das Signal ins Zellinnere weiterleiten; mod. nach Hyland, 2003).

Hierdurch wird die intrazelluläre Kinasedomäne von EGFR aktiviert, die zur ATP-abhängigen Autophosphorylierung von (je nach Stimulus) bis zu sechs Tyrosin-Seitenketten am C-Terminus führt. Diese Phosphotyrosine dienen als Andockstellen für Komponenten der intrazellulären Signaltransduktionsmaschinerie, die Phosphotyrosin-erkennende SH2- und PTB-Domänen enthalten. Es werden mehrere unterschiedliche Signalwege aktiviert, darunter die PI3K/Akt-, ERK/MAPK-, PLC γ /PKC-, JNK- und Src-Signalwege, die das Überleben, das Wachstum und die Teilung der Zelle fördern (Abb. 1-2). Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor trägt auf diese Weise bei abnormal erhöhter Expression bzw. durch die Expression konstitutiv aktiver EGFR-Varianten an der Oberfläche von Tumorzellen kausal zur Transduktion wachstumsfördernder Signale und schließlich zur malignen Transformation bei (Mendelsohn und Baselga, 2006; Wells, 1999; Wells, 2000).

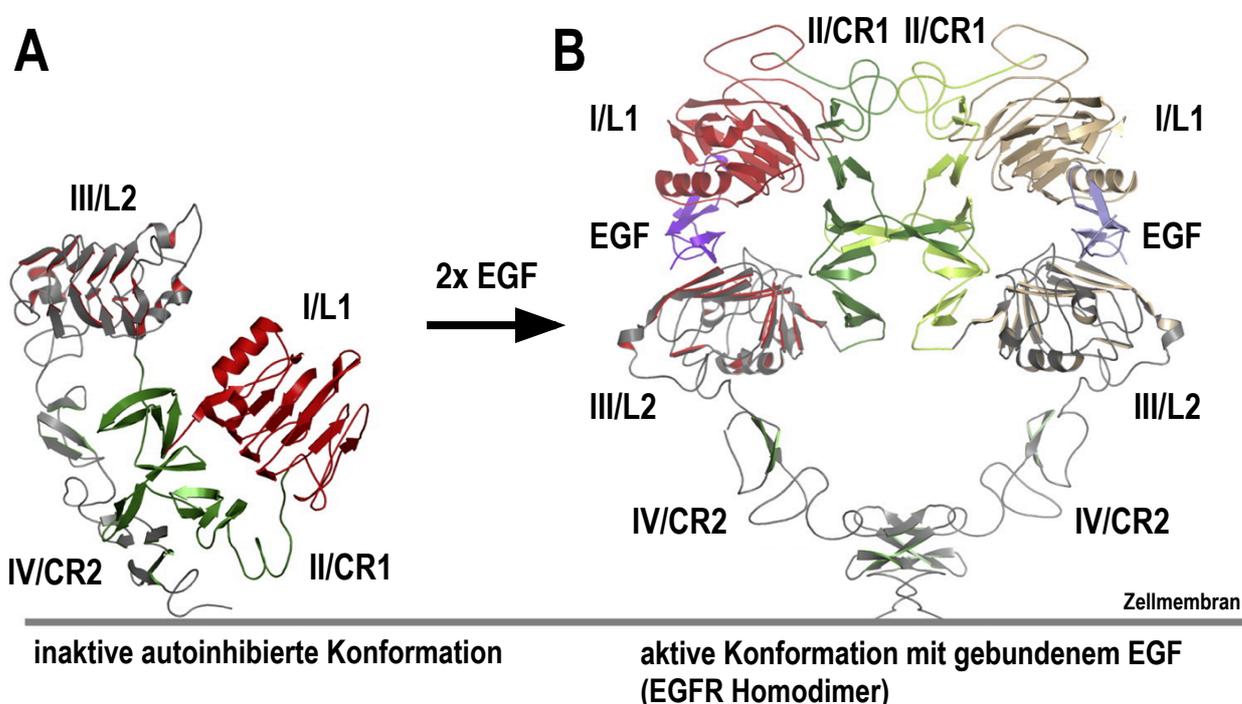


Abb. 1-5: Ligandeninduzierte Aktivierung von EGFR (Röntgenkristallstruktur). (A) In Abwesenheit von Ligand nimmt der Rezeptor eine inaktive, autoinhibierte Konformation ein. Der Dimerisierungsarm, der Bestandteil der Ektodomäne II/CR1 ist (grün), bildet eine intramolekulare Interaktion mit Ektodomäne IV/CR2 aus. Die beiden Ligandenbindungsstellen in den Ektodomänen I/L1 und III/L2 sind räumlich weit von einander entfernt. (B) Die Bindung von Liganden (gezeigt ist EGF) stabilisiert eine gestreckte, aktive Konformation des Rezeptors. Der Dimerisierungsarm steht zur Interaktion mit einem weiteren ErbB Rezeptor zur Bildung eines aktiven Dimers zur Verfügung (gezeigt ist ein Homodimer aus zwei EGFR Ektodomänen; mod. nach Schmiedel *et al.*, 2008).

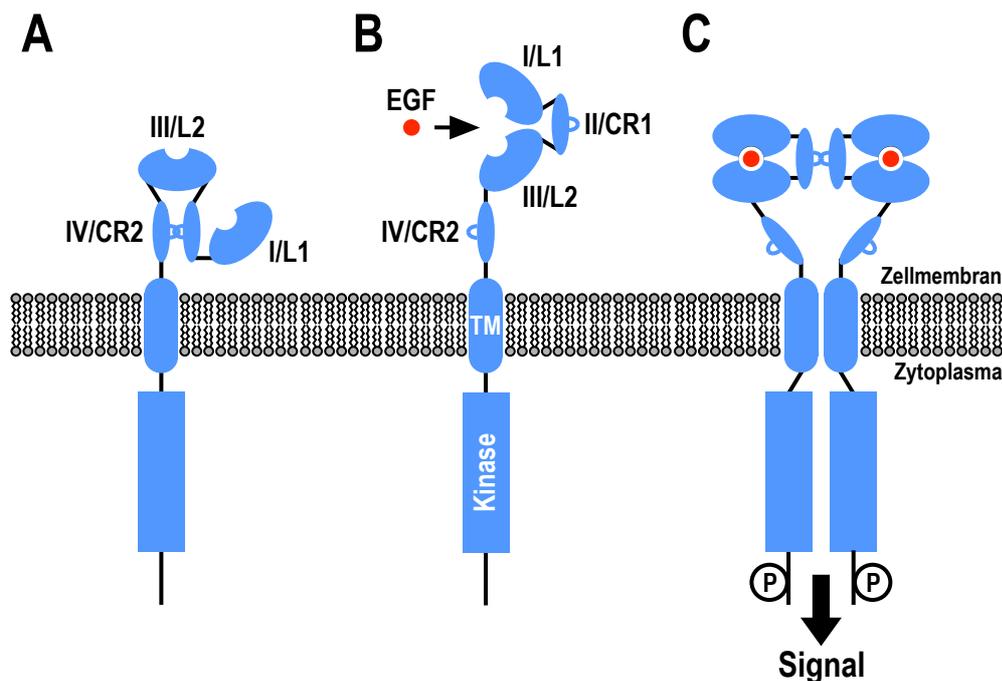


Abb. 1-6: Ligandeninduzierte Aktivierung von EGFR (schematisch). Zur Verdeutlichung der Konformationsänderungen sind die EGFR Domänen teilweise beschriftet. **(A)** Schematische Darstellung eines EGFR Monomers in der in Abb. 1-5A gezeigten Konformation mit Transmembran- (TM) und Kinasedomäne. **(B)** Schematische Darstellung eines hypothetischen Übergangszustandes nach Lösen der intramolekularen Interaktion des Dimerisierungsarms. In der gestreckten Konformation des EGFR Monomers sind die Bindungsstellen an den Ektodomänen I/L1 und III/L2 für hochaffine Liganden (z.B. EGF) zugänglich. **(C)** Schematische Darstellung der in Abb. 1-5B gezeigten Konformation des ligandengebundenen EGFR Dimers. Das aktivierte Rezeptordimer leitet nach Phosphorylierung der C-terminalen Tyrosin-Seitenketten das mitogene Signal in das Zellinnere.

In den vergangenen fünf Jahren wurden die Strukturen der ErbB Rezeptoren durch Röntgenkristallographie aufgeklärt. Die hieraus gewonnenen Daten haben zu einem tieferen Verständnis des Mechanismus der Rezeptoraktivierung geführt, der mit den bis dato bekannten experimentellen Daten z.B. aus Bindungs- und Aktivierungsstudien mit ErbB Rezeptoren in Einklang steht. Besonders wichtig sind hierbei die neu gewonnenen Erkenntnisse zur ligandeninduzierten Dimerisierung und Aktivierung von EGFR aus Kokristallisationsexperimenten der extrazellulären Domäne mit den natürlichen Liganden EGF bzw. $TGF\alpha$ (Burgess *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006).

In Abwesenheit von Ligand nimmt EGFR eine Konformation ein, in der ein großer Teil der zur Dimerisierung beitragenden Interaktionsfläche von Ektodomäne II/CR1 durch einen intramolekularen Kontakt zur membrannahen Ektodomäne IV/CR2 verborgen wird (Bouyain *et al.*, 2005; Cho und Leahy, 2002; Ferguson *et al.*, 2003). Darüber hinaus werden durch diesen intramolekularen Kontakt die beiden für die Ligandenbindung nötigen Oberflächenbereiche, die sich in Ektodomäne I/L1 und Ektodomäne III/L2 befinden, räumlich voneinander getrennt. Der Rezeptor befindet sich daher in einer für Liganden niedrig affinen, autoinhibierten Konformation (Abb. 1-5A; Abb. 1-6A). Durch die Bindung eines

Liganden kommt es zu einer dramatischen strukturellen Umlagerung der EGFR-Ektodomänen, wobei die intermolekulare Interaktion aufgelöst und der Dimerisierungsarm von Ektodomäne II/CR1 exponiert wird (Abb. 1-5B; Abb. 1-6B; Dawson *et al.*, 2005; Dawson *et al.*, 2007). Die Dimerisierung der extrazellulären Region von EGFR ist ausschließlich rezeptorgesteuert, wobei die Ektodomänen II/CR1 beider Bindungspartner die wesentlichen Interaktionen beisteuern (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002). Dieses Erkenntnis widerlegte das bis dato gültige Modell für die Aktivierung von ErbB Rezeptoren, das von einer Quervernetzung von zwei Rezeptoren über die Liganden ausging. Durch die Dimerisierung der Ektodomänen von zwei ErbB Rezeptoren gelangen die intrazellulären Regionen in räumliche Nähe zueinander, so dass die allosterische Aktivierung der Kinasedomänen erfolgen kann (Abb. 1-6C; Zhang *et al.*, 2006). Dieser Mechanismus der Aktivierung von EGFR offenbart eine Reihe von potenziellen Angriffsstellen zur Inhibition der EGFR-vermittelten mitogenen Signale, die bei einer gerichteten Tumorthherapie EGFR-exprimierender Tumoren genutzt werden können.

1.4 Strategien zur Inhibition der ErbB Signaltransduktion

Der Mechanismus der Aktivierung von ErbB Rezeptoren zeigt eine Reihe von potenziellen Interaktionspunkten auf, um an kritischen Stellen in die Aktivierung und Signaltransduktion inhibierend einzugreifen. Die Hemmung der Ligandenbindung an die Rezeptoren, die sterische Blockade der zur Dimerisierung nötigen Bereiche, das Verhindern der Bindung von ATP an die zytoplasmatische Kinasedomäne zur Unterbindung der Phosphorylierung C-terminaler Tyrosin-Seitenketten sowie die Inhibition der intrazellulären signalweiterleitenden Proteine ist denkbar. In der klinischen Entwicklung bzw. Anwendung hat sich der Einsatz monoklonaler Antikörper, die an die Ektodomäne der Rezeptoren binden, sowie die Verwendung von niedermolekularen Inhibitoren der enzymatischen Aktivität der Kinasedomäne als erfolgreich herausgestellt. Diese beiden Klassen von Inhibitoren der ErbB Signaltransduktion werden im folgenden am Beispiel von Therapeutika beschrieben, die die Aktivität von EGFR bzw. ErbB2 hemmen (siehe 1.4.1 und 1.4.2).

1.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren

Synthetische Kinase-Inhibitoren als Medikamente zum Einsatz werden systemisch appliziert und binden, nach dem Überwinden der Zellmembran, mit hoher Affinität in die ATP-Bindungstasche der zytoplasmatischen Kinasedomäne der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen (Abb. 1-7; Mendelsohn und Baselga, 2006). Dadurch wird die enzymatische Aktivität der Kinasedomäne und somit die Übertragung der γ -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxylgruppe der C-terminalen Tyrosin-Seitenketten des Rezeptormoleküls unterbunden.

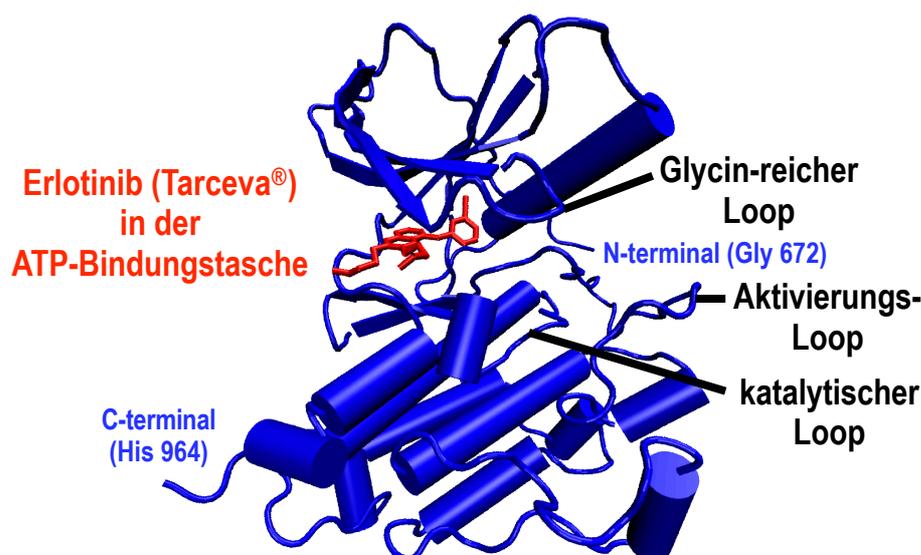


Abb. 1-7: Der Tyrosinkinase-Inhibitor Erlotinib (Tarceva®) in der ATP-Bindungstasche der EGFR Kinasedomäne. Gezeigt ist die Röntgenkristallstruktur der zytosomatischen EGFR-Kinasedomäne (AS 672-964, blau) im Komplex mit Erlotinib (rot). Der Tyrosinkinase-Inhibitor verhindert die Bindung von ATP in die Bindungstasche des enzymatisch aktiven Zentrums – daher kann ATP nicht mehr hydrolysiert und zur Phosphorylierung C-terminaler Tyrosin-Seitenketten verwendet werden (mod. nach Stamos *et al.*, 2002).

Vergleichsweise geringe Produktionskosten und hohe Bioverfügbarkeit sind Stärken dieser Therapeutika. Allerdings hat sich herausgestellt, dass die hohe Spezifität solcher Kinase-Inhibitoren für ein bestimmtes Molekül oder eine Molekülklasse häufig nicht in dem Maße gegeben ist, wie dies bei monoklonalen Antikörpern der Fall ist (Harari *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004; Imai und Takaoka, 2006). Die Beeinflussung weiterer zellulärer Signalübertragungsprozesse (Hemmung anderer zellulärer Kinasen) sowie die systemische Wirkung dieser Therapeutika auf ein breites Zellspektrum kann zu Nebenwirkungen führen. Ferner sind Fälle in der Literatur beschrieben, bei denen sich Resistenzen gegen diese Wirkstoffe zeigten oder im Laufe der Behandlung ausbildeten: Mutationen in der Kinasedomäne können die Affinität der Kinase-Inhibitoren drastisch reduzieren und den therapeutischen Effekt vermindern (Comis, 2005; Imai und Takaoka, 2006; Kobayashi *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004). Die lebensverlängernde Wirkung des Einsatzes von Kinase-Inhibitoren ist mit der von monoklonalen anti-ErbB Antikörpern vergleichbar (Comis, 2005; Harari, 2004). Diese sind jedoch in der Regel für andere Indikationen zugelassen, jeweils abhängig von der in klinischen Studien nachgewiesenen besseren Wirksamkeit der einen oder anderen Gruppe von Therapeutika (De Castro-Carpeno *et al.*, 2008).

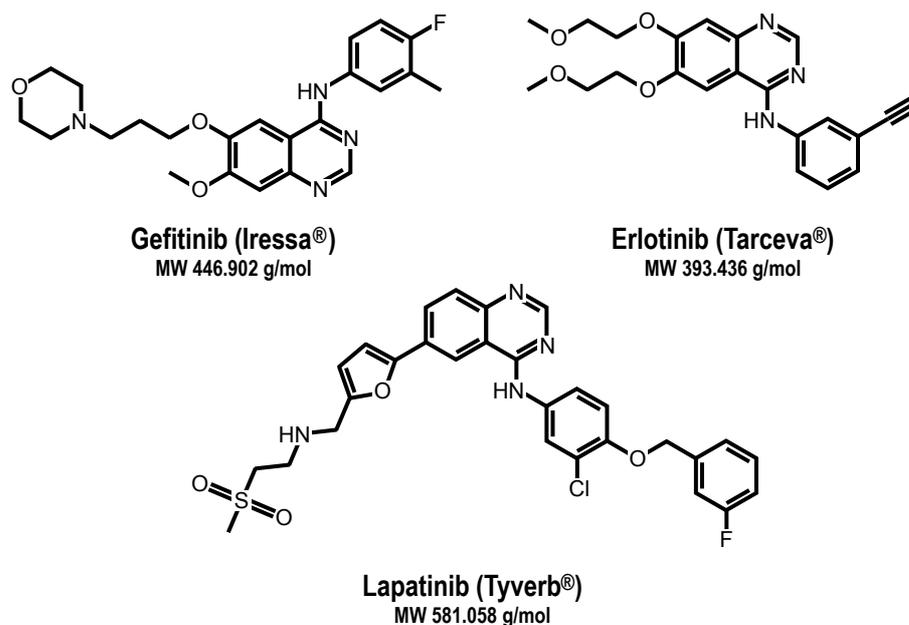


Abb. 1-8: ErbB Tyrosinkinase-Inhibitoren. Strukturformeln und Molekulargewichte der ErbB Tyrosinkinase-Inhibitoren Gefitinib (Iressa®), Erlotinib (Tarceva®) und Lapatinib (Tyverb®).

Zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC) wurde im Mai 2003 der erste EGFR-spezifische Kinaseinhibitor Gefitinib (Iressa®, AstraZeneca/Teva) von der FDA zugelassen (Abb. 1-8; Tab. 1-9; Comis, 2005). Gefitinib wurde jedoch 2004 für diese Indikation vom Markt zurückgezogen, weil eine groß angelegte Studie keinen lebensverlängernden Effekt bestätigen konnte (Pao *et al.*, 2004). Seit Juni 2005 empfiehlt die FDA, die Gabe des Medikaments im Einzelfall zu prüfen, wenn ein zuvor mit Gefitinib behandelter Patient nachweislich von der Anwendung profitiert hat. Als Alternative kann zur Behandlung von metastasierendem Lungenkrebs (Zulassung: FDA November 2004 / EMEA Juni 2005) sowie bei Pankreaskarzinomen (Zulassung: FDA November 2005 / EMEA Februar 2007) – in Kombination mit dem Nukleosid-Analogen Gemcitabin (Gemzar®, Eli Lilly and Company) – der EGFR-spezifische Kinase-Inhibitor Erlotinib (Tarceva®, Genentech/OSI Pharmaceuticals/Roche) eingesetzt werden (Bareschino *et al.*, 2007; Comis, 2005). Der ErbB Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib (Tyverb®, GlaxoSmithKline), welcher die Kinasedomänen von EGFR und ErbB2 gleichermaßen inhibiert, ist zur Behandlung von ErbB2-überexprimierenden metastasierenden Mammakarzinomen in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Capecitabin/Xeloda (Roche) seit März 2007 (FDA) bzw. Juni 2008 (EMEA) zugelassen (Johnston und Leary, 2006).

Bezeichnung	Rezeptor	FDA	EMA	Indikation
Gefitinib (Iressa [®])	EGFR	05-2003*	-	NSCLC
Erlotinib (Tarceva [®])	EGFR	11-2004	06-2005	NSCLC
		11-2005	02-2007	Pankreaskarzinom
Lapatinib (Tyverb [®])	EGFR/ErbB2	03-2007	06-2008	Mammakarzinom

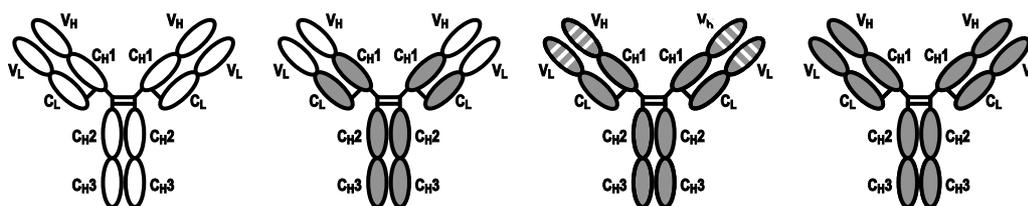
Tab. 1-9: Indikationen und Zulassungsdaten von ErbB Tyrosinkinase-Inhibitoren. * = Die allgemeine FDA-Zulassung für Gefitinib (Iressa[®]) wurde im Jahre 2004 zurückgezogen. Seit Juni 2005 kann das Medikament im Einzelfall weiterhin zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden, falls eine vorherige Behandlung nachweislich zur Verbesserung der Krankheitssituation geführt hat. NSCLC = nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom.

1.4.2 Monoklonale Antikörper

Biochemische Analysen von Rezeptor-Antikörper Komplexen und röntgenkristallographische Daten haben gezeigt, welche Bereiche der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen für die Bindung von Antikörpern kritisch sind, um effektiv die Rezeptoraktivierung beeinflussen zu können. Die erste Generation monoklonaler Antikörper zur passiven Immuntherapie, die gegen EGFR als Antigen gerichtet sind, stammte aus Immunisierungen von Mäusen mit dem humanen Protein bzw. mit EGFR-positiven Tumorzellen oder -lysaten. Nach der Immunisierung wurden diejenigen B-Zellklone identifiziert und isoliert, die gegen EGFR gerichtete Antikörper produzierten, um aus diesen durch Fusion mit immortalisierten Zellen Hybridome zur Produktion monoklonaler Antikörper zu erzeugen. Antikörper mit vollständig muriner Sequenz sind jedoch nicht zur passiven Immuntherapie im menschlichen Empfänger geeignet, da deren Wirkung durch die Bildung von humanen anti-Maus Antikörpern (HAMA) bei wiederholter Anwendung neutralisiert wird (Reilly *et al.*, 1995). Um dieses Problem zu umgehen, wurden bei der nächsten Generation therapeutischer Antikörper für den klinischen Einsatz die konstanten Bereiche gegen humane Immunglobulin-Sequenzen ausgetauscht. Bei diesen chimären Antikörpern besteht das variable Fragment (Fv) jedoch noch vollständig aus muriner Sequenz, wodurch es auch bei der Anwendung solcher chimärer Antikörper zu wirkungsmindernden Immunreaktionen kommen kann. Zur Konstruktion von nahezu vollständig humanisierten Antikörpern wird daher häufig mittels „CDR-Grafting“ nur die hypervariablen Regionen (CDR) des murinen Vorläufermoleküls erhalten, welche die Spezifität für das Antigen bestimmen. Die heute klinisch eingesetzten Antikörper wurden in den meisten Fällen auf diese Weise gentechnisch für den Einsatz am Patienten optimiert.

Monoklonale Antikörper werden in der Regel intravenös in Form einer stabilisierten Proteinlösung verabreicht. Ihrer lebensverlängernden Wirksamkeit und hohen Spezifität für das jeweilige tumorassoziierte Antigen stehen hohe Produktionskosten sowie die Notwendigkeit zu häufigen Wiederholungen der Injektionen gegenüber (Mutschler *et al.*, 2001; Reilly *et al.*, 1995).

Bezeichnung	Antigen	Typ	Fc	Fv	CDR
Cetuximab (Erbix [®])	EGFR	IgG1	human	murin	murin
Matuzumab	EGFR	IgG1	human	human	murin
Panitumumab (Vectibix [®])	EGFR	IgG2a	human	human	human
Zalutumumab	EGFR	IgG1	human	human	human
Nimotuzumab (Theraloc [®])	EGFR	IgG1	human	human	murin
Trastuzumab (Herceptin [®])	ErbB2	IgG1	human	human	murin
Pertuzumab (Omnitarg [®])	ErbB2	IgG1	human	human	human
Bevacizumab (Avastin [®])	VEGF	IgG1	human	human	murin



Antigen	muriner mAb	chimärer mAb	humanisierter mAb	humaner mAb
EGFR	225	C225 / Cetuximab	—	—
EGFR	425 / EMD55900	—	EMD72000 / Matuzumab	—
EGFR	—	—	—	ABX-EGF / Panitumumab
EGFR	—	—	—	HuMax-EGF / Zalutumumab
EGFR	IOR EGF/R3	—	h-R3 / Nimotuzumab	—
ErbB2	4D5	—	Trastuzumab / Herceptin	—
ErbB2	2C4	—	Pertuzumab	—
VEGF	A.4.6.1	—	Bevacizumab / Avastin	—

Abb. 1-10: Monoklonale Antikörper zur Tumorthherapie (Auswahl). Bei humanisierten Antikörpern ist das jeweilige murine Vorläufermolekül angegeben. IgG = Immunglobulin G; Fc = konstantes Fragment; Fv = variables Fragment; CDR = hypervariable Regionen des Fv-Fragmentes; EGFR = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; mAb = monoklonaler Antikörper.

Zur Klasse der chimären monoklonalen Antikörper gehört der Antikörper Cetuximab (ImClone/Bristol Myers-Squibb/Merck), der unter der Bezeichnung Erbitux[®] seit Februar 2004 zur Behandlung von metastasierendem Kolonkarzinom sowie seit März 2006 von Kopf- und Halstumoren von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA), und mittlerweile auch von der European Medicines Agency (EMA) in der Europäischen Union für diese Indikationen zugelassen ist (Abb. 1-10). Cetuximab bindet mit hoher Affinität (Mendelsohn *et al.*, 2003) an die Ektodomäne III/L2 von EGFR und blockiert dadurch direkt die Ligandenbindung (Fan *et al.*, 1993), indem er einen Teil der für diese Interaktion nötigen Aminosäuren abdeckt (Li *et al.*, 2005). Die Kristallstruktur zeigt, dass die inaktive, autoinhibierte Konformation des Rezeptors vom Fab-Fragment gebunden wird. Da es sich bei Cetuximab

um ein Immunglobulin G des Isotyps IgG1 handelt, können durch gebundenen Antikörper markierte Zellen über die Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an den Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) von Effektorzellen des Immunsystems erkannt werden (z.B. natürliche Killerzellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten; Imai und Takaoka, 2006; Shields *et al.*, 2001; Presta *et al.*, 2002).

Die meisten monoklonalen anti-ErbB Antikörper, die sich derzeit in der klinischen Entwicklung oder bereits im klinischen Einsatz befinden, gehören zum IgG1 Subtyp (Abb. 1-10). Es wird vermutet, dass ein Teil der beobachteten antitumoralen Effekte von Cetuximab auf die Lyse von Tumorzellen durch immunologische Effektorprozesse wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bzw. die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) zurückzuführen ist (Abb. 1-11; Astsaturov *et al.*, 2007; Fukai *et al.*, 2008; Imai und Takaoka, 2006). Zu den beobachteten Nebenwirkungen und wirkungsmindernden Ereignissen einer Behandlung mit Cetuximab zählen Akne-artige Hautausschläge sowie die selten auftretende Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen den murinen Anteil des Antikörpers (Astsaturov *et al.*, 2007; Harding *et al.*, 2005). Aus diesem Grund werden murine Sequenzen in neueren Generationen therapeutischer Antikörper mittels gentechnischer Methoden durch humane IgG Sequenzen ersetzt, oder der Antikörper wird von Grund auf als humanes Molekül entwickelt.

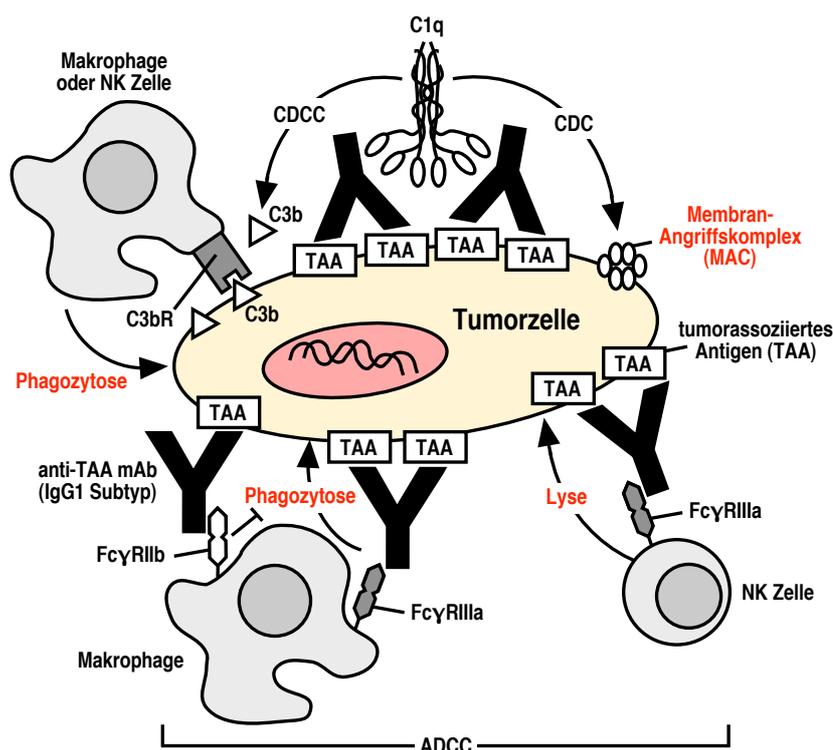


Abb. 1-11: Schematische Darstellung der möglichen Immunreaktionen gegen Antikörper-markierte Tumorzellen. Immunglobuline des Subtyps IgG1 sind in der Lage, nach Bindung an das Antigen auf der Oberfläche einer Tumorzelle die komplementabhängige Zytotoxizität (CDC, oberer Teil der Abbildung) bzw. die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, unterer Teil der Abbildung) auszulösen. mAb = monoklonaler Antikörper; IgG = Immunglobulin G; Fc = konstantes Fragment; Fc γ R = Immunglobulin G Fc-Rezeptor; C1q = Komplement-Faktor C1q; C3b = Komplement-Faktor C3b; C3bR = Komplement-Faktor C3b Rezeptor; MAC = Membran-Angriffskomplex; TAA = tumorassoziiertes Antigen (nach Imai und Takaoka, 2006).

Ein weiterer, in der klinischen Entwicklung weit fortgeschrittener anti-EGFR Antikörper ist Matuzumab (EMD72000, Merck/Takeda), der aus dem murinen mAb 425 (EMD55900) abgeleitet und durch gentechnische Methoden bis auf die hypervariablen Regionen (CDR) vollständig humanisiert wurde (Abb. 1-10; Kettleborough *et al.*, 1991; Murthy *et al.*, 1987). Dieser Antikörper bindet mit einer ähnlich hohen Affinität wie Cetuximab an EGFR (Vanhoefer *et al.*, 2004). Der aus der Immunisierung von BALB/c Mäusen mit humanen A431 Tumorzellen hervorgegangene Antikörper blockiert, ähnlich wie Cetuximab, die ligandenabhängige Aktivierung von EGFR in Tumorzelllinien. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass das Wachstum EGFR-abhängiger Tumoren durch den murinen Vorläufer mAb 425 (EMD55900) verhindert werden kann (Rodeck *et al.*, 1987a; Rodeck *et al.*, 1987b; Rodeck *et al.*, 1990). In klinischen Prüfungen der Phase I gegen diverse Krebsarten konnte gezeigt werden, dass der humanisierte Antikörper Matuzumab sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapeutika wirksam und gut verträglich ist (Bier *et al.*, 2001; Graeven *et al.*, 2006; Kollmannsberger *et al.*, 2006; Vanhoefer *et al.*, 2004). Derzeit werden mehrere klinische Studien der Phase II mit EMD72000/Matuzumab durchgeführt (Seiden *et al.*, 2007; Socinski, 2007).

Im April 2008 wurde die Kokristallstruktur des Fab-Fragmentes von Matuzumab mit der EGFR Ektodomäne III/L2 beschrieben (Schmiedel *et al.*, 2008). Der Antikörper erkennt ein anderes Epitop als Cetuximab, welches jedoch direkt benachbart in Ektodomäne III von EGFR liegt. Es gibt keine direkte Überlappung der Kontaktstellen mit für die Ligandenbindung wichtigen Aminosäuren, allerdings scheint die Bindung des Antikörpers an den autoinhibierten Rezeptor die zur Dimerisierung nötigen Konformationsänderungen von EGFR sterisch zu behindern. Die gleichzeitige Bindung von Matuzumab und Cetuximab an EGFR erscheint möglich, wie Oberflächenplasmonresonanz (SPR) Studien, Gelfiltrationsexperimente sowie analytische Ultrazentrifugation gezeigt haben (Kamat *et al.*, 2008). Es ist daher denkbar, dass beide Antikörper als Kombinationstherapie einen stärkeren antitumoralen Effekt gegen EGFR positive Tumoren zeigen könnten, wofür bereits Hinweise aus *in vitro* Experimenten vorliegen (Kamat *et al.*, 2008).

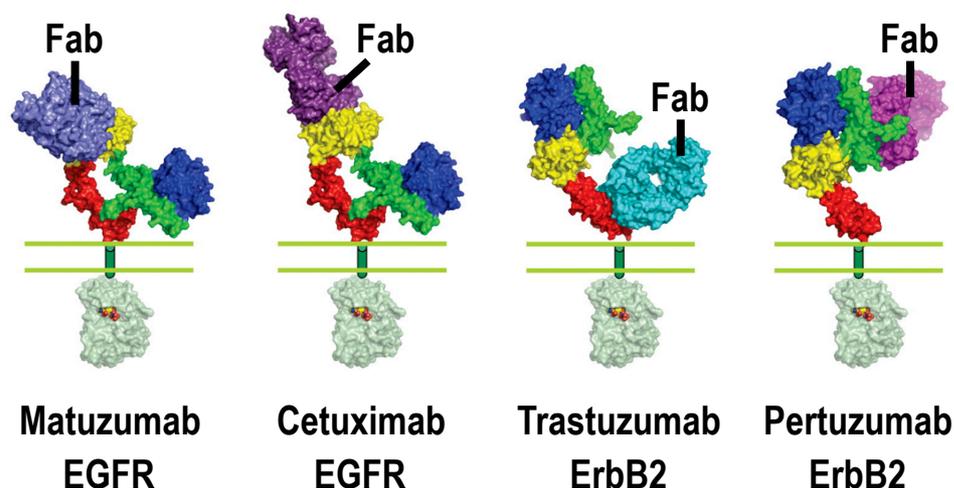


Abb. 1-12: Röntgenkristallstrukturen der Fab-Fragmente monoklonaler anti-ErbB Antikörper im Komplex mit dem Rezeptor. Die Ektodomänen der extrazellulären Bereiche von EGFR bzw. ErbB2 sind farbkodiert dargestellt (Ektodomäne I/L1 = dunkelblau; Ektodomäne II/CR1 = grün; Ektodomäne III/L2 = gelb; Ektodomäne IV/CR2 = rot). Die membrandurchspannende Helix ist strukturell nicht aufgelöst und als dunkelgrüner Zylinder in der durch zwei grüne Balken angedeuteten Zellmembran dargestellt. Die intrazelluläre Domäne (grau) ist mit gebundenem Nukleotid in der Bindungstasche der Kinasedomäne gezeigt. Fab = Struktur des Fab-Fragments des jeweils dargestellten Antikörpers (mod. nach Leahy, 2008).

Ein weiteres Beispiel für den erfolgreichen klinischen Einsatz monoklonaler Antikörper gegen ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen ist der humane anti-EGFR Antikörper Panitumumab (Amgen), der unter der Bezeichnung Vectibix zur Behandlung von EGFR-positivem metastasierenden Kolonkarzinomen durch die FDA im September 2006 zugelassen wurde (Abb. 1-10). Dieser anti-EGFR Antikörper wurde aus genetisch modifizierten Mäusen (XenoMouse, Abgenix) gewonnen, die Immunglobuline mit vollständig humaner Sequenz gegen ein appliziertes Antigen herstellen (Green, 1999; Jakobovits *et al.*, 2007). Panitumumab bindet an Ektodomäne III/L2 von EGFR und verhindert die Ligandenbindung an den Rezeptor, ähnlich wie im Fall von Cetuximab (Freeman *et al.*, 2008). Da es sich um eine ausschließlich humane Antikörpersequenz handelt, sind bei Behandlung mit Panitumumab auf Immunreaktionen gegen murine Sequenzanteile zurückgeführte Nebenwirkungen, wie sie bei Gabe von Cetuximab beobachtet wurden, nicht zu erwarten (Weiner, 2006). Panitumumab ist ein Immunglobulin G des Isotyps IgG2a, daher sind wirkungsunterstützende sekundäre Reaktionen des Immunsystems wie ADCC und CDC sehr wahrscheinlich von Bedeutung (Lynch und Yang, 2002; Yang *et al.*, 2001). Darüber hinaus befinden sich weitere humanisierte bzw. vollständig humane monoklonale anti-EGFR Antikörper, z.B. Zalutumumab (Genmab) und Nimotuzumab (Theraloc[®], YM Biosciences), in der klinischen Entwicklung (Rivera *et al.*, 2008; Lammerts van Bueren *et al.*, 2008).

Auch gegen andere ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen wurden monoklonale Antikörper entwickelt. Die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 als Zielantigen ist dabei von besonderem Interesse, da dieser Rezeptor häufig bei Mammakarzinomen, bei Kolorektalkarzinomen sowie von Tumorzellen bei Kopf- und

Halskrebs überexprimiert wird (Wainberg und Hecht, 2006; Wainberg und Hecht, 2007; Yarden und Sliwkowski, 2001). Der aus dem murinen IgG-Vorläufermolekül mAb 4D5 (Carter *et al.*, 1992; Hudziak *et al.*, 1989) humanisierte anti-ErbB2 Antikörper Trastuzumab (Genentech/Roche) ist unter der Bezeichnung Herceptin[®] seit September 1998 von der FDA und seit August 2000 auch von der EMEA zur Behandlung von ErbB2-positiven Mammakarzinomen zugelassen (Abb. 1-10). Mit Ausnahme der hypervariablen Regionen (CDR) wurden alle murinen Anteile mittels CDR-Grafting durch humane Immunglobulin G Sequenzen des Isotyps IgG1 ausgetauscht (Carter *et al.*, 1992). Wie in Kristallisationsexperimenten gezeigt werden konnte, bindet Trastuzumab an die membran-nahe Ektodomäne IV/CR2 von ErbB2 (Cho *et al.*, 2003). Die Wirkungsweise beruht vermutlich auf einer Inhibition der signalaktivierenden enzymatischen Spaltung von ErbB2, die an Ektodomäne IV/CR2 stattfindet (Molina *et al.*, 2001; Baselga *et al.*, 2001), sowie auf sekundären Reaktionen des Immunsystems wie ADCC und/oder CDC (Clynes *et al.*, 2000). Durch den Einsatz von Trastuzumab begleitend zu Operation, Bestrahlung und Chemotherapie wurden nachhaltige Behandlungserfolge bei der Therapie von ErbB2-positivem Brustkrebs erzielt (Bernard-Marty *et al.*, 2006; Olver, 2008). Ein weiterer gegen ErbB2 gerichteter humanisierter monoklonaler Antikörper, der sich derzeit in der klinischen Entwicklung u.a. zur Therapie von Mamma- und Ovarialkarzinomen befindet (Albanell *et al.*, 2008), ist Pertuzumab (Omnitarg[®], Genentech/Roche), der aus dem murinen Vorläufer mAb 2C4 abgeleitet wurde (Abb. 1-10; Adams *et al.*, 2006). Die Wirkung von Pertuzumab beruht auf der Inhibition der Dimerisierung von ErbB2 mit anderen ErbB Rezeptor-Tyrosinkinasen durch Bindung an den Dimerisierungsarm der Ektodomäne II/CR1 von ErbB2 (Agus *et al.*, 2002; Albanell *et al.*, 2003).

Neben der Blockade der Signalübertragung tumorassoziiierter Rezeptormoleküle stellt die Inhibition der tumorinduzierten Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) einen weiteren Angriffspunkt dar, um damit die Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen zu unterbinden (Folkman *et al.*, 2001). Ähnlich wie bei den ErbB Rezeptoren spielt auch bei der Angiogenese eine Signalübertragung durch die Bindung von Liganden an membranständige Rezeptor-Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle. Durch das Verhindern dieses Bindungsereignisses, z.B. durch Blockierung der Bindungsstelle des Liganden am Rezeptor oder durch das Abfangen der löslichen Liganden, kann die Angiogenese inhibiert werden. Ein erfolgreiches Beispiel für die klinische Entwicklung derartiger Therapeutika stellt der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin[®], Genentech/Roche) dar, der den vaskulären epidermalen Wachstumsfaktor (VEGF) bindet und damit dessen Bindung an den Rezeptor (VEGFR) an der Oberfläche von Endothelzellen verhindert (Abb. 1-10; Wang *et al.*, 2004). VEGF ist ein angiogener Faktor, dessen Expression und Sekretion durch aktive EGFR Signaltransduktion bzw. durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) induziert wird. Die Neutralisierung von zirkulierendem VEGF durch Bindung von Bevacizumab reduziert bzw. verhindert die Bindung des Peptidliganden an VEGFR auf Endothelzellen und damit die Neubildung afferenter Blutgefäße, auf die schnell wachsende Tumoren angewiesen sind. Der aus dem murinen Vorläufermolekül A.4.6.1 humanisierte Antikörper (Presta *et al.*, 1997) Bevacizumab ist seit Februar 2004 von der FDA und seit Januar 2005 von der EMEA zur

Behandlung von Kolonkarzinomen begleitend zur Chemotherapie zugelassen, und erhielt darüber hinaus im Februar 2008 von der FDA die Zulassung für die Behandlung von metastasierendem Brustkrebs.

Bezeichnung	Antigen	FDA	EMA	Indikation
Cetuximab (Erbix [®])	EGFR	02-2004	07-2004	Kolonkarzinom
		03-2006	04-2006	Kopf- und Halskrebs
Panitumumab (Vectibix [®])	EGFR	09-2006	-	Kolonkarzinom
Trastuzumab (Herceptin [®])	ErbB2	09-1998	08-2000	Mammakarzinom
Bevacizumab (Avastin [®])	VEGF	02-2004	01-2005	Kolonkarzinom
		02-2008	-	Mammakarzinom

Tab. 1-13: Indikationen und Zulassungsdaten monoklonaler Antikörper zur Tumortherapie. FDA = Zulassung durch die amerikanische Gesundheitsbehörde (Food and Drug Administration); EMA = Zulassung durch die Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency); EGFR = epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor.

1.5 Anwendung der Phage Display Methode zur Identifizierung von Mimotopen

In dieser Arbeit wurde eine Variante der Phage Display Methode eingesetzt, um Peptide zu identifizieren, die mit den hypervariablen Regionen (CDR) der monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren. Bibliotheken genetisch modifizierter M13 Bakteriophagen, die als N-terminale Fusion am Hüllprotein pIII Peptide definierter Länge und randomisierter Sequenz tragen (siehe 1.5.2 und 3.4.1), wurden in „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Experimenten auf Bindung dieser Fusionspeptide an die „single-chain“ Antikörperfragmente von Cetuximab bzw. Matuzumab selektiert (siehe 3.4). Das Ziel dieser Experimente war es, sog. Mimotope zu identifizieren: Hierbei handelt es sich um Peptide, die in linearer Form Teile der Epitope nachbilden, welche die spezifische Bindung dieser Antikörper an den humanen EGFR vermitteln (siehe 1.6). In den nachfolgenden Abschnitten werden die Phage Display Methode (siehe 1.5.1) und die Biologie des Bakteriophagen M13 beschrieben (siehe 1.5.2). Zudem werden die ursprüngliche „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Methode und eine Variante vorgestellt. Letztere wurde in dieser Arbeit zur Anreicherung von Bakteriophagen eingesetzt, deren pIII-Fusionspeptide mit „single-chain“ Antikörperfragmenten von Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren (siehe 1.5.3).

1.5.1 Phage Display

Zur Identifizierung von Peptiden, die mit den hypervariablen Regionen (CDR) der monoklonalen Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren, wurde in dieser Arbeit eine Phage Display Screening Methode eingesetzt. Bei der Phage Display Methode handelt es sich um ein Selektionsverfahren zur Identifizierung von Peptidsequenzen oder Proteinen, die an ein vorgegebenes Molekül mit hoher Affinität binden (Wilson und Finlay, 1998; Winter *et al.*, 1994). Das

Ausgangsmaterial ist eine Bibliothek (engl. „library“), die aus einer Population genetisch modifizierter Bakteriophagen besteht. Kommerziell erhältliche Phage Display Bibliotheken, wie auch die in dieser Arbeit verwendeten, bestehen häufig aus modifizierten filamentösen Bakteriophagen M13 der Familie *Inoviridae* (siehe 1.5.2). Die Modifikation besteht aus der genetischen Fusion von Peptiden, deren Sequenzen aus allen möglichen Kombinationen der 20 essentiellen Aminosäuren in zufälliger („randomisierter“) Reihenfolge gebildet werden, mit einem der Hüllproteine der Phagen (z.B. pVIII oder pIII; Barbas, 1993; Barbas und Barbas 1994; Parmley und Smith, 1989). Das Fusionsprotein befindet sich daher exponiert an der Oberfläche der Phagenpartikel, während die entsprechende genetische Information für das jeweilige Fusionspeptid im einzelsträngigen DNA-Genom des Phagenklons vorliegt.

Durch die direkte Verbindung des jeweiligen Peptides als Fusionsprotein an der Oberfläche der Phagenpartikel mit der kodierenden genetischen Information können Peptidsequenzen, die an ein vorgegebenes Zielmolekül (engl. „target“) binden, durch Sequenzierung der Phagen-DNA identifiziert werden. Der *in vitro* Selektionsprozess solcher Phagenklone aus der Library, die an das Target binden, wird als Biopanning oder kurz Panning bezeichnet (Parmley und Smith, 1988; Parmley und Smith, 1989; Smith und Scott, 1993). In positiven Selektionsrunden wird das Target immobilisiert und anschließend mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Nicht-bindende Phagen werden in einem Waschschrift entfernt, und die bindenden Phagenklone werden durch Kompetition der Bindung vom Zielmolekül eluiert. In negativen Selektionsrunden wird mit identischen Bedingungen, jedoch ohne Zugabe des Targets gearbeitet, um auf diese Weise Phagenklone zu entfernen, die eine Affinität für andere im Versuchsansatz enthaltene Komponenten besitzen. In einer solchen negativen Selektion wird das Versuchsmaterial inklusive daran gebundener Phagenklone durch ein geeignetes Verfahren separiert und verworfen, während die Phagenklone im Überstand einer Amplifikation und anschließend weiteren Selektionsrunden unterzogen werden. Die eluierten Phagenklone werden in einer Amplifikation genannten Arbeitsschritt in Wirtsbakterien vermehrt, bevor sie in einer beliebigen Anzahl weiterer Biopanning-Experimente erneut auf Bindung an das Target selektioniert werden. Durch jedes Biopanning-Experiment wird in der Gesamtpopulation der Phagen eine Anreicherung derjenigen Phagenklone erreicht, die an das Target binden.

Durch alternierende positive und negative Selektionsrunden können Phagenklone, die mit hoher Affinität an das Zielmolekül binden, aus der ursprünglichen Bibliothek selektioniert und durch Amplifikation angereichert werden. Üblicherweise werden nach drei bis vier Selektionsrunden einzelne Phagenklone isoliert. Aus diesen wird dann die DNA präpariert, welche durch Sequenzierung auf die Nukleotidsequenz hin untersucht wird, die für das Fusionspeptid kodiert. Lässt sich aus diesen Analysen ein gemeinsames, lineares Sequenzmotiv der untersuchten Fusionspeptide ableiten, wird dieses als Consensus-Sequenz bezeichnet.

1.5.2 Der Bakteriophage M13

M13 ist ein ubiquitär vorkommender nicht-lytischer filamentöser Bakteriophage, der über den F-Pilus das gram-negative Bakterium *E. coli* infizieren und dieses als Wirtsorganismus zu seiner eigenen Reproduktion nutzen kann. Das Virus aus der Familie der Inoviridae kann nur solche Bakterien infizieren, die episomal das F-Faktor Plasmid (F') tragen (Sambrook *et al.*, 1989; Wilson und Finlay, 1998). Die Phagenpartikel besitzen eine filamentöse (fadenartige) Gestalt, in der das einzelsträngige DNA-Genom (ssDNA) durch mehrere Proteine superhelikal aufgewunden und verpackt ist. Der ssDNA-Strang eines infektiösen Phagenpartikels, der auch als (+)-DNA Strang bezeichnet wird, ist in zehn unterschiedlichen Genen (gI bis gX) organisiert, die kodierten Proteine werden analog als pI bis pX bezeichnet. An der Oberfläche eines M13 Phagenpartikels befinden sich unterschiedliche Hüllproteine. Das Hüllprotein pIII ist polar am Ende des Partikels in 5 Kopien lokalisiert und vermittelt den Kontakt zu Konjugationspili von *E. coli* F' (F-Pili), die Adhäsion an das Wirtsbakterium und dessen Infektion (Abb. 1-14; Sambrook *et al.*, 1989; Holliger und Riechmann, 1997; Riechmann und Holliger, 1997). Während der Infektion wird die Proteinhülle des Phagenpartikels abgestreift und der einzelsträngige (+)-DNA Strang wird in die Wirtszelle injiziert. Bakterielle ssDNA-bindende Proteine (SSB) binden daraufhin an den viralen (+)-DNA Strang. Die an DNA-Reparaturmechanismen beteiligten bakteriellen Enzyme synthetisieren den komplementären (-)-DNA Strang, wodurch eine intrazelluläre, doppelsträngige Form des M13 Phagen-genoms entsteht, die als RF-DNA bezeichnet wird (RF = „replikative Form“). M13 RF-DNA besitzt einen bakteriellen Replikationsursprung und wird während der Zellteilung des Wirtsbakteriums analog doppelsträngiger Plasmid-DNA getreu repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben.

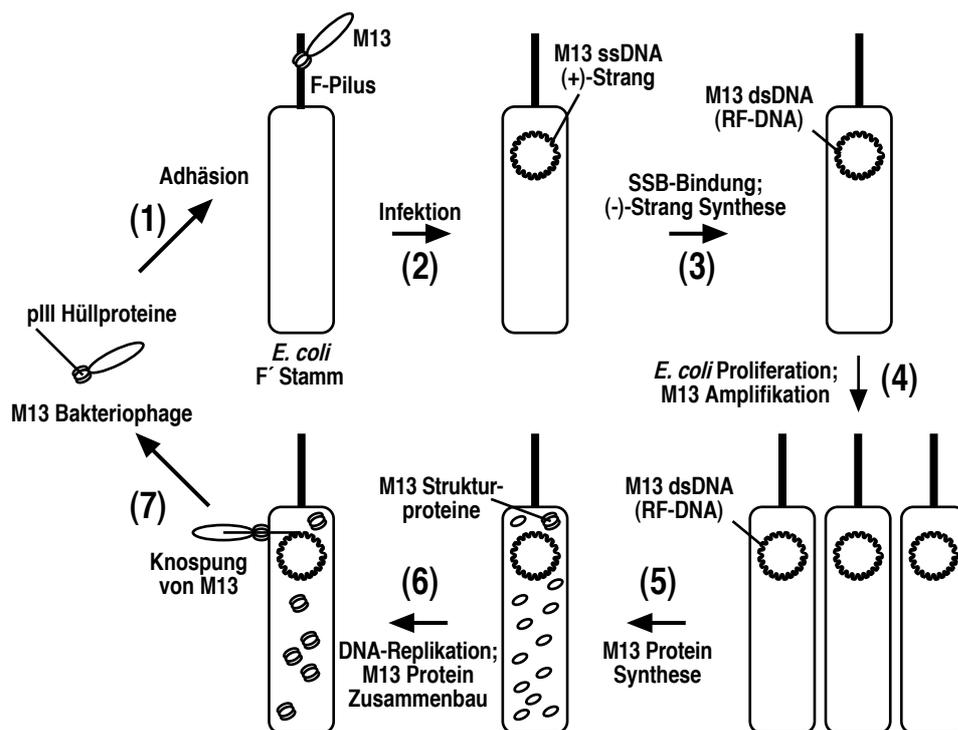


Abb. 1-14: Lebenszyklus des Bakteriophagen M13 (schematische Darstellung). (1) Infektiöse M13 Phagenpartikel heften sich mit den polaren pIII Hüllproteinen an den F-Pilus von *E. coli* Bakterien. (2) Der einzelsträngige (+)-Strang der Phagen-DNA wird in das Bakterium injiziert. (3) Einzelstrangbindende Proteine (SSB) des Wirtsbakteriums binden an die ssDNA und initiieren die Synthese des DNA-Gegenstranges. Der entstandene M13 DNA-Duplex wird RF-DNA genannt (RF = „replikative Form“). (4) Bei der Proliferation der Bakterien wird die M13 RF-DNA getreu repliziert und somit amplifiziert. (5) Die Synthese von durch die RF-DNA kodierten Hüll- und Strukturproteinen der Phagen wird eingeleitet. (6) Die M13 RF-DNA repliziert nach dem „rolling circle“ Mechanismus. Einzelsträngige M13 (+)-Strang DNA wird in neue, infektiöse M13 Phagenpartikel verpackt und diese werden durch Knospung (engl. „budding“) freigesetzt (7) (nach Wilson und Finlay, 1998).

Der Vorgang der nicht-lytischen Sekretion von M13 Phagenpartikeln aus dem Wirtsbakterium wird als Knospung bezeichnet (engl. „budding“; Madigan *et al.*, 2003). Über den „rolling circle“-Mechanismus werden mehrere Kopien des einzelsträngigen (+)-DNA Stranges freigesetzt, die bei gleichzeitiger Anheftung von M13 Hüllproteinen das Wirtsbakterium verlassen. Während der größte Teil der Oberfläche des M13 Phagenpartikels durch zahlreiche Kopien des Haupt-Hüllproteins pVIII bedeckt ist, befinden sich daher an den Polen des Partikels nur wenige Kopien anderer viraler Hüllproteine, u. a. des Hüllproteins pIII, das für die Infektion einer neuen Wirtszelle benötigt wird (Riechmann und Holliger, 1997). Somit schließt sich der Lebenszyklus des Bakteriophagen M13, der nun in der Lage ist, ein neues Wirtsbakterium zu infizieren. Bedingt durch den zusätzlichen Aufwand an M13 DNA- und Proteinsynthese ist bei infizierten *E. coli* durch die verlangsamte Teilungsrate ein zeitlich verzögertes Wachstum der Bakterien zu beobachten. Dies führt auf LB Agarplatten zur Bildung so genannter Pseudo-Plaques (Zonen geringerer Zelldichte) im Bakterienrasen. Genetisch modifizierte Varianten des Bakteriophagen M13 wie z.B. M13mp18 und M13mp19 (Sambrook *et al.*, 1989) werden in kommerziell erhältlichen Phagen-Bibliotheken zum Einsatz in Phage Display Experimenten genutzt.

1.5.3 Delayed Infectivity Panning (DIP)

Eine Variante der Phage Display Methode wird als „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) bezeichnet (Benhar *et al.*, 2000). Hierbei wird das Antigen, auf dessen Bindung Phagenklone selektiert werden sollen, auf der Zelloberfläche von *E. coli* Bakterien präsentiert. Dies wird in einem speziellen Vektorsystem (pIB-Tx) durch genetische Fusion der gewünschten Sequenzinformation an den C-Terminus eines membranständigen Proteinkonstruktes erreicht, das aus dem Signalpeptid und den ersten Aminosäuren des *E. coli* Hauptlipoproteins Lpp (Lpp SP plus AS 1-9) und einer verkürzten Variante des äußeren Membranproteins A (OmpA') besteht (OmpA AS 46-159; Francisco *et al.*, 1992; Georgiou *et al.*, 1997). Bei dem eingesetzten Vektorsystem handelt es sich um einen bakteriellen Expressionsvektor, der unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren Promoters *lpp-lac* steht, was ein kontrolliertes Einleiten der Expression des Fusionskonstruktes ermöglicht. Durch das Signalpeptid von Lpp wird das Konstrukt in das Periplasma von *E. coli* geleitet, in dessen nicht-reduzierendem Milieu die Bildung von Disulfidbrücken möglich ist. Schließlich inseriert das gebildete Protein in die äußere Bakterienmembran, und der C-terminal von OmpA' fusionierte Protein wird auf der Bakterienoberfläche nach außen präsentiert (Abb. 3-5; Abb. 3-7). Der Vorteil der DIP Methode liegt darin, dass der Anreicherungsfaktor antigenspezifischer Phagen mit bis zu $1 \cdot 10^6$ deutlich höher liegt als beim herkömmlichen Phage Display Biopanning (Benhar *et al.*, 2000). Ein weiterer Vorteil der DIP Methode ist die bakterielle Expression des Antigens als Oberflächenprotein, was die Reinigung rekombinanten Antigens überflüssig macht.

In dieser Arbeit wurden „single-chain“ Antikörper-Fragmente (scFv) monoklonaler Antikörper gegen ErbB Rezeptoren als Lpp-OmpA' Fusionsproteine in das pIB-Tx Vektorsystem kloniert. Mit derartigen Konstrukten transformierte, nicht-infizierbare *E. coli* HB101 Bakterien exponieren nach IPTG-Induktion die scFv an ihrer Oberfläche, so dass sie für von außen zugegebener Bakteriophagen aus Phage Display Bibliotheken zugänglich sind (siehe 3.3.3). Nach dem Entfernen nicht-bindender Phagen wurde der infizierbare Bakterienstamm *E. coli* ERE2738 zur Amplifikation bindender Phagenklone zugegeben, scFv-präsentierende *E. coli* HB101 wurden durch Zugabe des Antibiotikums abgetötet. Durch die Trennung der Bindung und Selektion der Phagen einerseits bzw. der Infektion und Amplifikation andererseits unter Verwendung unterschiedlicher Bakterienstämme sollte eine mögliche Hintergrundinfektion scFv-exprimierender *E. coli* ohne vorangegangene Selektion ausgeschlossen werden (siehe 2.2.14 und 3.4.1).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die EGFR-spezifischen monoklonalen Antikörper Cetuximab (ImClone/Bristol Myers-Squibb/Merck) und Matuzumab (Merck/Takeda) befinden sich derzeit im klinischen Einsatz (Cetuximab) bzw. in der fortgeschrittenen Entwicklung (Matuzumab) zur Therapie EGFR-positiver solider Tumoren epithelialen Ursprungs.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die für die Bindung der therapeutischen Antikörper Cetuximab und Matuzumab kritischen Aminosäuren in der extrazellulären Domäne von EGFR noch unbekannt. Beide Antikörper erkennen konformationelle Epitope, deren dreidimensionale Struktur intakt sein muss, damit die Bindung des jeweiligen Antikörpers erfolgen kann. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Analyse kurzer linearer Peptide, die direkt aus der Sequenz des EGFR abgeleitet sind, eine Identifikation der Epitope ermöglicht. Aus diesem Grunde wurde ein indirekter Ansatz zur Identifizierung kurzer Peptide gewählt, welche an die hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper binden, die den spezifischen Kontakt zum Rezeptormolekül vermitteln. Derartige Peptide, sogenannte Mimotope, bilden Bereiche der ursprünglichen, nicht-linearen Epitope strukturell nach (Gomez-Roman *et al.*, 2002; Landry *et al.*, 2001; Vaisman *et al.*, 2000). Eine Charakterisierung derartiger Mimotope von Cetuximab bzw. Matuzumab könnte Strukturen und Sequenzbereiche in der extrazellulären Domäne des Rezeptors aufzeigen, die den spezifischen Kontakt zum Rezeptormolekül vermitteln.

In dieser Arbeit wurde versucht, Mimotope der therapeutischen Antikörper Cetuximab und Matuzumab zu identifizieren, die die Antigenbindungsstellen auf dem EGFR nachbilden. Hierzu wurde eine Variante der Phage Display Methode eingesetzt, die als „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) bezeichnet wird (Benhar *et al.*, 2000). Das DIP Vektorsystem ermöglicht es, „single-chain“ Antikörperfragmente auf der Oberfläche von *E. coli* Bakterien zu exprimieren und zur Selektion von interagierenden Peptiden aus Phagenbibliotheken einzusetzen. Dieses System bietet im Vergleich zum klassischen Phage Display Biopanning den Vorteil, dass eine Anreicherung von Peptiden, die konstante Bereiche der Immunglobuline erkennen, ausgeschlossen werden kann (vgl. Hartmann, 2002). Die Eignung des DIP Systems zur Selektion von Mimotopen, die spezifisch mit den hypervariablen Regionen von Antikörpern interagieren, die konformationelle Epitope erkennen, wurde in dieser Arbeit überprüft. Für den Fall, dass die selektierten Peptide echte Mimotope darstellen und somit Teile des Antigens von Cetuximab bzw. Matuzumab strukturell nachbilden, ist es denkbar, dass diese Peptide in der Lage sind, in Immunisierungsexperimenten eine humorale Immunantwort gegen den humanen EGFR zu induzieren. In diesem Fall würde es sich um Peptide handeln, die immunogene Strukturen des Rezeptors nachbilden, mit denen endogene Antikörper generiert werden können, die die gleiche Antigenpezifität besitzen wie die ursprünglichen monoklonalen anti-EGFR Antikörper.

Die aus diesen Experimenten gewonnenen Informationen könnten bei der Entwicklung von Antikörperderivaten mit erhöhter Bindungsaffinität und/oder verbesserten therapeutischen und pharmakologischen Eigenschaften hilfreich sein. Darüber hinaus könnten aus immunogenen Peptiden Vakzine zur Behandlung EGFR exprimierender Tumoren entwickelt werden, die potenziell in der Lage sind, die immunologische Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu durchbrechen. Derartige Vakzine könnten eine Alternative zur wiederholten, kostenintensiven Behandlung von Patienten, die an EGFR-positiven Tumoren leiden, durch passive Immunisierung mit monoklonalen anti-EGFR Antikörpern darstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien / Reagenzien / Verbrauchsmaterialien

ABTS	Roche Diagnostics (Mannheim)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
6-Amino-capronsäure	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
APS	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Bakterielle Wachstumsmedien	Difco (Augsburg), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Karlsruhe)
BSA (Albumin Fraktion V aus Rinderserum)	Roth (Karlsruhe)
Desoxycholat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Desoxynukleotid-Triphosphate	Roche Diagnostics (Mannheim), Peqlab (Erlangen)
DMSO	Fluka (Buchs, CH)
DNA-Größenstandards	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)
DNA-Polymerasen	Qiagen (Hilden), New England Biolabs (Schwalbach)
ECL Chemolumineszenz Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
EGF	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
FACS-Reagenzien	BD Biosciences (Heidelberg)
Filter	Millipore (Schwalbach)
FCS	PAA (Pasching, A)
G418	Invitrogen (Karlsruhe)
Immobilon P (PVDF Membran)	Millipore (Schwalbach)
Intraglobin CP (IgG aus Humanserum)	Biotest AG (Dreieich)
Intraglobin F (IgG aus Humanserum)	Biotest AG (Dreieich)
IPTG	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	PAA (Pasching, A)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Molekulargewichtsmarker für Proteine	Peqlab (Erlangen), Invitrogen (Karlsruhe)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
MTT	Fluka (Buchs, CH)
Penicillin / Streptomycin	PAA (Pasching, A), BioWhittaker (Verviers, B)
PMSF	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Plastikwaren für Labor und Zellkultur	Corning (Schiphol-Rijk, NL), Greiner (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, USA), Nalgene (Rochester, USA)
Polyethylenglykol 8000	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Proteaseinhibitor-Mix (EDTA-frei)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach)
Röntgenfilme	Fuji Photo Film (Düsseldorf)
Standardchemikalien und Lösungsmittel	Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Peqlab (Erlangen), Chemicon (Hampshire, UK)
Streptomycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman (London, UK)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturmedien	Cambrex (Verviers, Belgien), PAA (Pasching, A), Invitrogen (Karlsruhe)
Zeocin	Invivogen (San Diego, USA), CAYLA (Toulouse, F)

2.1.2 Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Typ	Spezies	Hersteller oder Referenz
Cetuximab	EGFR	monoklonal	chimärisiert	John Mendelsohn, M. D. Anderson Cancer Center (Houston, USA)
Matuzumab	EGFR	monoklonal	humanisiert	Merck (Darmstadt)
15E	EGFR	polyklonal	Kaninchen	Nancy Hynes, Friedrich-Miescher-Institut (Basel, CH)
R-1	EGFR	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
29.1	EGFR	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Herceptin®	ErbB2	monoklonal	humanisiert	Universitätsapotheke (Freiburg)
anti-fd	M13 pVIII	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
2C8	Phospho-tyrosin	monoklonal	Maus	Santa Cruz (Heidelberg)
Intraglobin F	diverse	Serum IgG	human	Biotest (Dreieich)
Intraglobin CP	diverse	Serum IgG	human	Biotest (Dreieich)
anti-human IgG	humanes IgG (Fc)	polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, DK)

Bezeichnung	Antigen	Typ	Spezies	Hersteller oder Referenz
anti-human IgG / HRP-Konjugat	humanes IgG (Fc)	polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-human IgG / FITC-Konjugat	humanes IgG (Fc)	polyklonal	Kaninchen	DAKO (Glostrup, DK)
anti-Kaninchen IgG / HRP-Konjugat	Kaninchen IgG (Fc)	polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Kaninchen IgG / FITC-Konjugat	Kaninchen IgG (Fc)	polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Kaninchen IgG / PE-Konjugat	Kaninchen IgG (Fc)	polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Maus IgG / HRP-Konjugat	Kaninchen IgG (Fc)	polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
anti-Maus IgG / Alexa488-Konjugat	Maus IgG (Fc)	polyklonal	Ziege	Invitrogen (Karlsruhe)
anti-scFv Serum (Max Serum)	scFv(225)-ETA / scFv(14E1)-ETA	Serum	Kaninchen	Winfried Wels, Georg-Speyer-Haus (Frankfurt am Main)
anti-Peptid Serum (KTL)	KTL Peptid	Serum	Kaninchen	diese Arbeit
anti-Peptid Antikörper (KTL)	KTL Peptid	affinitäts- gereinigt	Kaninchen	diese Arbeit
anti-Peptid Serum (YPLG)	YPLG Peptid	Serum	Kaninchen	diese Arbeit
anti-Peptid Antikörper (YPLG)	YPLG Peptid	affinitäts- gereinigt	Kaninchen	diese Arbeit

2.1.3 Plasmide

Bezeichnung (Referenz)	Verwendung
pBluescript KS+ (Invitrogen, Karlsruhe)	Klonierungsvektor; hier zur Amplifikation von PCR-Fragmenten im Rahmen von Subklonierungen eingesetzt
p11-SGH γ 1 (Merck KGaA, Darmstadt)	Klonierungsvektor, der die cDNA der schweren Kette (V _H) von Matuzumab anti-EGFR enthält (PCR Template)
p11-331-425 κ (Merck KGaA, Darmstadt)	Klonierungsvektor, der die cDNA der leichten Kette (V _L) von Matuzumab anti-EGFR enthält (PCR Template)
pIB-Tx (Benhar <i>et al.</i> , 2000)	Vektor zur bakteriellen Oberflächenexpression von Lpp-OmpA'-Fusionsproteinen in der äußeren Membran von <i>E. coli</i>

Bezeichnung (Referenz)	Verwendung
pIB-Tx-scFv(14E1) (Wels <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	Vektor zur bakteriellen Oberflächenexpression des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(14E1) von 14E1 anti-EGFR als Lpp-OmpA'-Fusionsprotein in der äußeren Membran von <i>E. coli</i>
pIB-Tx-scFv(225) (Wels <i>et al.</i> , unveröffentlicht)	Vektor zur bakteriellen Oberflächenexpression des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(225) von Cetuximab anti-EGFR als Lpp-OmpA'-Fusionsprotein in der äußeren Membran von <i>E. coli</i>
pIB-Tx-scFv(E72K) (diese Arbeit)	Vektor zur bakteriellen Oberflächenexpression des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) von Matuzumab anti-EGFR als Lpp-OmpA'-Fusionsprotein in der äußeren Membran von <i>E. coli</i>
pIB-Tx-pIB-Tx-EGFR308-490 (diese Arbeit)	Vektor zur bakteriellen Oberflächenexpression der Ektodomäne III/L2 des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) als Lpp-OmpA'-Fusionsprotein in der äußeren Membran von <i>E. coli</i>

2.1.4 Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotid-Primer wurden von Biospring (Frankfurt am Main), Invitrogen (Karlsruhe) und MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung und Amplifikation des Gens gIII (ssDNA) von M13KE:

M13 -96gIII 5' -CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'

Oligonukleotid-Primer zur Mutagenese von scFv(E72K) V_H cDNA (Eliminierung einer endogenen *XhoI* Schnittstelle):

E72K-VHmut-fwd 5' -CAGGCCAAGGGCTtGAGTGGATTGGCG-3'

E72K-VHmut-rev 5' -CGCCAATCCACTCaAGCCCTTGGCCTG-3'

Oligonukleotid-Primer zur Amplifikation und Sequenzierung von EGFR308-490 (Ektodomäne III/L2) cDNA:

sEGFR-L2-NcoI-fwd 5' -AAACATGCCATGGCCCCCTTGCCGCAAAGTG-3'

sEGFR-L2-NotI-rev 5' -ATAAGAATGCGGCCGCGCCCTCGGGGAGCACAAGGC-3'

EGFR-N-Seq-fwd 5' -CAGATCACGGCTCGTGCCTCCG-3'

EGFR-N-Seq-rev 5' -CGGACGCACGAGCCGTGATCTG-3'

Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung und Amplifikation von scFv(E72K) cDNA:

E72K-VH1-fwd NcoI	5' -CATGCCATGGCCCAGGTCCAAC TAGTGCAGTCCGGCGCCGAAGTGA AGAAACCC-3'
E72K-VH-GS (r12) -rev	5' -GGAGCCACCGCCACCAGAACCGCCACCGCCtgaactgacggtgaca agggtagccctgtccc-3'
E72K-GS (r23) -VL-fwd	5' -GGTGGCGGTGGCTCCGGCGGTGGCGGTTCTgacatccagatgacct agagcccaagcagcc-3'
E72K-VL2-rev NotI	5' -ATAAGAATGCGGCCGCACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCC G-3'
scFv (E72K) -VH-fwd	5' -CAGGTCCAAC TAGTG-3'
scFv (E72K) -VL-rev	5' -ACGTTTGATTTCCAC-3'

2.1.5 Bakterienstämme

***E. coli* ER2738** F' *lacI*^q Δ (*lacZ*)M15 *proA*⁺*B*⁺ zzz:Tn10(Tet^R)/*fhuA2 supE thi*
(New England Biolabs, Schwalbach) Δ (*lac-proAB*) Δ (*hsdMS-mcrB*)5 (*r*_k⁻*m*_k⁻ *McrBC*⁻)

Der *E. coli* Stamm ER2738 wird zur Amplifikation von M13 Bakteriophagen sowie in Experimenten zur Bestimmung des Phagentiters einer Probe verwendet. *E. coli* ER2738 trägt episomal den Fertilitätsfaktor (F-Faktor), der die Bakterien dazu befähigt, Konjugationspili (F-Pili) auszubilden, über die eine Infektion mit M13 Phagen erfolgen kann. Das F-Plasmid trägt zur Selektion von *E. coli* ER2738 F' ein Gen zur Vermittlung einer Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin (Tet^R). *E. coli* ER2738 tragen ein defektes *lacZ* Gen, das zur Expression einer nicht funktionsfähigen β -Galactosidase führt (Δ (*lacZ*)M15). Dieser Defekt kann mittels α -Komplementation durch M13KE Phagen kompensiert werden und gestattet eine blau-weiß Selektion infizierter Bakterien.

***E. coli* HB101** *supE44 ara14 galK2 lacY1* Δ (*gpt-proA*)62 *rpsL20*(Str^R) *xyl-5*
(Stratagene, Amsterdam, NL) *mtl-1 recA13* Δ (*mcrC-mrr*) *HsdS*⁻(*r*⁻*m*⁻)

Bei dem *E. coli* Stamm HB101 handelt es sich um einen Streptomycin-resistenten Bakterienstamm (Str^R), dem im Gegensatz zu *E. coli* ER2738 (siehe oben) das F-Faktor Plasmid fehlt. Bakterien des Stammes *E. coli* HB101 können nicht durch Bakteriophagen M13 infiziert werden, da die Infektion durch den Kontakt des M13 Oberflächenproteins pIII mit F-Pili erfolgt, welche jedoch von *E. coli* HB101 nicht gebildet werden können. In dieser Arbeit dienten kompetente *E. coli* HB101 der Transformation mit Varianten von pIB-Tx-scFv Vektoren, was eine durch IPTG induzierbare Expression von „single-chain“ Antikörperfragmenten an der Bakterienoberfläche ermöglicht (Benhar *et al.*, 2000). Derart modifizierte *E. coli* HB101 wurden in dieser Arbeit in „Delayed Infectivity Panning“ Experimenten eingesetzt (siehe 2.2.14).

***E. coli* XL1-Blue** *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 lac⁻ F'*
(Stratagene, Amsterdam, NL) (*traD36 proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15*)

Der *E. coli* Stamm XL1-Blue wurde im Rahmen dieser Arbeit bei Klonierungsexperimenten zur Amplifikation von Plasmid-DNA genutzt. Kompetente *E. coli* XL1-Blue zeichnen sich durch eine hohe Transformationseffizienz (z.B. bei Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA) aus und sind resistent gegen das Antibiotikum Tetracyclin.

2.1.6 Bakteriophagen

Bezeichnung (Referenz)	Verwendung
M13KE Ph.D.-7 Peptide Library Kit (New England Biolabs, Schwalbach)	Bibliothek gentechnisch modifizierter M13-Phagen (M13KE), die am Oberflächenprotein pIII N-terminal fusionierte, randomisierte, lineare 7mer Peptide tragen
M13KE Ph.D.-12 Peptide Library Kit (New England Biolabs, Schwalbach)	Bibliothek gentechnisch modifizierter M13-Phagen (M13KE), die am Oberflächenprotein pIII N-terminal fusionierte, randomisierte, lineare 12mer Peptide tragen
M13KE Ph.D.-C7C Peptide Library Kit (New England Biolabs, Schwalbach)	Bibliothek gentechnisch modifizierter M13-Phagen (M13KE), die am Oberflächenprotein pIII N-terminal fusionierte, randomisierte, zyklische 7mer Peptide tragen

Die hier verwendeten Phagenbibliotheken wurden als 50% (v/v) Glycerol-Kulturen einer Population gentechnisch für den Einsatz im Phage Display optimierter Bakteriophagen M13KE mit einem Titer von $2 \cdot 10^{10}$ pfu/μl (Herstellerangabe) geliefert. M13KE wurden im Wirtstamm *E. coli* ER2738 hergestellt und tragen am Hüllprotein pIII ein N-terminales Fusionspeptid, das aus 7 bzw. 12 Aminosäuren einer randomisierten Sequenz gebildet wird. Die theoretisch mögliche Diversität (Gesamtanzahl unterschiedlicher Sequenzen) beträgt bei 20 AS an sieben Positionen $20^7 = 1,28 \cdot 10^9$ Heptapeptid-Sequenzen, bzw. bei 20 AS an zwölf Positionen $20^{12} = 4,1 \cdot 10^{15}$ Dodecapeptid-Sequenzen. Laut Herstellerangaben beträgt die Anzahl der elektroporierten Sequenzen in den vorliegenden Bibliotheken $2,8 \cdot 10^9$ Sequenzen (M13KE Ph.D.-7), bzw. $2,7 \cdot 10^9$ Sequenzen (M13KE Ph.D.-12), bzw. $1,2 \cdot 10^9$ Sequenzen (M13KE Ph.D.-C7C). In den jeweils ersten Biopanning-Selektionen wurden 10 μl der Library ($2 \cdot 10^{11}$ pfu) eingesetzt, in denen rechnerisch ~ 70 (M13KE Ph.D.-7), ~ 55 (M13KE Ph.D.-12), bzw. ~ 200 Klone (M13KE Ph.D.-C7C) jeder der möglichen Sequenzen enthalten sind. Im Falle der zyklischen 7mer Bibliothek (M13KE Ph.D.-C7C) wird das Heptapeptid von zwei Cysteinen flankiert, die es durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke räumlich zu einer Schlaufe anordnen. Der N-Terminus wird in dieser Bibliothek von einem Alanin gebildet. Das komplette Fusionspeptid wird in allen drei Bibliotheken über einen Linker der AS-Sequenz GGGs mit dem nativen pIII verknüpft, um dem präsentierten Peptid

zusätzliche sterische Flexibilität in Biopanning-Experimenten zu verleihen. Die Infektiosität von M13KE wird durch das pIII-Fusionspeptid nicht beeinträchtigt (Herstellerangabe). Die M13KE Phagen leiten sich von M13mp19 ab (Sambrook *et al.*, 1989), in dem eine Klonierungsregion (MCS) zur weitergehenden Verwendung des pIII-Fusionspeptides in Klonierungsexperimenten etabliert wurde. Bakteriophagen M13KE tragen ein durch α -Komplementation übertragbares Gen *lacZ α* , was eine blau-weiß Selektion von infizierten *E. coli* ER2738 Bakterien ermöglicht.

M13K07 Helferphage, der die Oberflächencharakteristika des M13
(Bio-Rad, München) Wildtyp-Phagen trägt

Im Rahmen dieser Arbeit diente der Bakteriophage M13K07 als Negativkontrolle in Phagen ELISA Experimenten. Phagenpartikel dieses Typs besitzen mit Ausnahme des pIII-Fusionspeptides die gleichen Oberflächencharakteristika wie die im Biopanning eingesetzten Bakteriophagen des Typs M13KE aus den hier verwendeten Phagenbibliotheken (s.o.). Mit Bakteriophage M13K07 infizierte Bakterien können selektioniert werden, da die Phagen dieses Typs der Wirtszelle eine Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin (Kan^R) verleihen.

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Kulturmedium	Referenz
A431 (humanes Vulvakarzinom)	DMEM ⁺⁺⁺	ATCC-Nr. CRL1555
SKBR3 (humanes Mammakarzinom)	DMEM ⁺⁺⁺	ATCC-Nr. HTB-30
SKOV3 (humanes Ovarialkarzinom)	DMEM ⁺⁺⁺	ATCC-Nr. HTB-77
Renca-lacZ (murines Nierenzellkarzinom) (RLZ)	RPMI-1640 ⁺⁺⁺ ; 0,25 mg/ml Zeocin	Maurer-Gebhard <i>et al.</i> , 1998
Renca-lacZ/EGFR (RLZ/EGFR)	RPMI-1640 ⁺⁺⁺ ; 0,25 mg/ml Zeocin; 0,5 mg/ml G418	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
Renca-lacZ/EGFRvIII (RLZ/EGFRvIII)	RPMI-1640 ⁺⁺⁺ ; 0,25 mg/ml Zeocin; 0,5 mg/ml G418	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
Renca-lacZ/ErbB2 (RLZ/ErbB2)	RPMI-1640 ⁺⁺⁺ ; 0,25 mg/ml Zeocin; 0,5 mg/ml G418	Maurer-Gebhard <i>et al.</i> , 1998

⁺⁺⁺ Supplement: 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Gln, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *E. coli* Bakterien

Luria-Bertani (LB)-Medium	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton in 1 L dH ₂ O; pH 7
LB-Agar	2% (w/v) Agar-Agar in LB-Medium; pH 7
LB-Softagar	0,7% (w/v) Agarose, 1 mg/ml MgCl ₂ in LB-Medium; pH 7
Amp	100 µg/ml Ampicillin in dH ₂ O
Kan	100 µg/ml Kanamycin in dH ₂ O
Strep	10 µg/ml Streptomycin in dH ₂ O
Tet	12,5 µg/ml Tetracyclin in Ethanol
IPTG	50 mg/ml IPTG in DMF
IPTG/X-Gal	50 mg/ml IPTG, 40 mg/ml X-Gal in DMF

Je nach verwendetem Vektorsystem wurden dem LB-Medium die benötigten Antibiotika-Stammlösungen zugegeben (siehe oben). Nach Hitzeschock-Transformation von Plasmid-DNA (siehe 2.2.3) in kompetente Bakterien (siehe 2.2.2) wurden die Bakterien in das vorgewärmte Medium aufgenommen und bei 37°C in einem Schüttler bei 250 Upm kultiviert. Die Expression von Proteinen wurde nach Transformation mit bakteriellen Expressionsvektoren mit IPTG-induzierbarem Promotor durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Blau-weiß Selektionen und Bestimmungen des Phagentiters wurden auf LB-Agar Platten bzw. in LB-Softagar durchgeführt, dem 1/1000 Vol. IPTG/X-Gal Mischung zugesetzt worden war. Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklavierten Materialien unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Lösung I	100 mM RbCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KAc, 10 mM CaCl ₂ , 13% (v/v) Glycerin; pH 5,8; sterilfiltriert
Lösung II	10 mM MOPS, 10 mM RbCl ₂ , 75 mM CaCl ₂ , 13% (v/v) Glycerin; pH 7; sterilfiltriert

500 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert und bei 4°C für 10 min bei 860 x g in einem JA-10 Rotor (Beckman Coulter, Krefeld) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 170 ml eiskalter Lösung I resuspendiert und 1-2 h auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde ein weiteres Mal bei 860 x g zentrifugiert und das Pellet in eiskalter Lösung II resuspendiert. Die Zellen wurden in 100 µl Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3 Amplifikation von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien

Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien

LB-Agarplatten (mit Antibiotikum)	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 2% (w/v) Agar-Agar in 1 L dH ₂ O, nach Autoklavieren ggf. Zugabe von Antibiotika
PBS	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,4

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu 100 µl Bakteriensuspension wurden 10 µl des Ligationsansatzes bzw. 50-100 ng Plasmid-DNA gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock für 1 min bei 42°C wurde die Suspension kurz auf Eis abgekühlt und in 500 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde auf LB-Agarplatten ausplattiert, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion in geeigneter Konzentration (siehe 2.2.1) enthielten, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Plasmidisolierung aus *E. coli* Bakterien

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren und zu reinigen, wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Zur Isolierung geringer Mengen an DNA wurde der „Plasmid Mini Kit“ verwendet. Dazu wurde mit je einer Bakterienkolonie eine Übernachtskultur mit 3 ml LB-Medium (plus Antibiotikum, entsprechend dem Selektionsmarker des Plasmids) angesetzt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien abzentrifugiert und durch Resuspendierung in eiskaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Isolierung der DNA aus dem Bakterienpellet nach den Angaben des Herstellers. Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde der „Plasmid Maxi Kit“ eingesetzt. Die DNA wurde aus einer Übernachtskultur mit 500 ml LB-Medium (plus Antibiotikum) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.4 Bestimmung von DNA- bzw. Protein-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurden durch Messung der Extinktion bei 260 nm in Quarzküvetten mit 1 cm Kantenlänge bestimmt. Nach Chargaff entspricht eine OD₂₆₀ von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Darüber hinaus wurde zur Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. Proteinen in wässrigen Lösungen die direkte Absorptionsmessung in einem „Nanodrop“-Gerät (Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Amplifikationen von DNA-Fragmenten mittels PCR wurden in einem GenAMP 9600 Thermocycler der Firma PerkinElmer (Waltham, USA) durchgeführt. Jedem Reaktionsansatz wurde 1 U Taq Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) oder Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) zugesetzt. Die Reaktionsmischung bestand zusätzlich aus dem jeweiligen vom Hersteller empfohlenen Puffer, je 25 pmol der entsprechenden Oligonukleotid-Primer, der DNA-Matrize (ca. 50 ng Plasmid-DNA) und den vier Desoxyribonukleotiden in einer Endkonzentration von jeweils 200 μ M. Der Reaktionsansatz wurde in PCR-Röhrchen auf Eis gemischt und diese in den auf 94°C vorgeheizten Heizblock des Thermocyclers überführt („hot start“ PCR). Soweit nicht anders angegeben, wurde die Denaturierung für 1 min bei 94°C, die Hybridisierung der Oligonukleotide für 1 min bei T_M (siehe unten) und die Polymerasereaktion bei 72°C (für 10 min) in 30 Zyklen durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur T_M wurde für jedes Oligonukleotid nach folgender Formel berechnet:

$$T_M [^{\circ}\text{C}] = 20/n_{\text{ges}} \cdot [2 \cdot (n_A+n_T) + 4 \cdot (n_G+n_C)] - 5^{\circ}\text{C}$$

Die Gesamtzahl der hybridisierenden Nukleotide ist mit n_{ges} abgekürzt. n_A , n_T , n_G und n_C bezeichnen die entsprechende Anzahl dieser Basen im hybridisierenden Bereich des Oligonukleotids. Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch Elektrophorese im Agarosegel aufgetrennt, unter UV-Licht analysiert und im Falle von präparativen Ansätzen mit dem „Qiaquick“ Gelextraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) aus der Agarose isoliert.

2.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Zur Spaltung von 1 μ g Plasmid-DNA wurden 5 U des Restriktionsenzym im entsprechenden Puffer eingesetzt. Zur Vermeidung von unspezifischer Aktivität des Restriktionsenzym („star activity“) enthielt ein Restriktionsansatz nicht mehr als 5% (v/v) Glycerin. Die Reaktion erfolgte für mindestens 2 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur. Durch Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer wurde die Reaktion gestoppt. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte durch Elektrophorese in 1%igen Agarosegelen in TAE-Puffer bei einer Spannung von 60-100 V (siehe 2.2.11). Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Qiaquick“ Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden Vektor-DNA und DNA-Insert in den Verhältnissen 1:10 (w/w) und 1:1 (w/w) zueinander eingesetzt. Ligationen erfolgten bei 16°C über Nacht in einem Gesamtvolumen von 20 μ l, katalysiert durch 1 U der T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) im Ligasepuffer des Herstellers.

2.2.8 Gelelektrophorese

Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Agarose

TAE-Puffer	40 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0 eingestellt mit konz. Essigsäure
6x DNA-Probenpuffer	15% (w/v) Ficoll 400, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol in dH ₂ O
Ethidiumbromidlösung	10 µg/ml in dH ₂ O

Zur Analyse und Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht, in eine Gelkammer gegeben und mit 5 µl 1% (w/v) Ethidiumbromidlösung versetzt. Nach dem Erkalten der Agarose wurden die mit DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben aufgetragen. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein Größenstandard (1 kB DNA Ladder bzw. 100 bp DNA Ladder - Invitrogen, Karlsruhe) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60-100 V für 60 min. Anschließend wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht durch das interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Im Falle von präparativen Gelen wurden die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem „Qiaquick“ Gelextraktionskit (Qiagen, Hilden) aus der Agarose isoliert.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid : 0,8% (w/v) Bisacrylamid
„Roti-Puran“ (Roth, Karlsruhe)	
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris; pH 8,6
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris; pH 6,8
SDS-Lösung	10% (w/v) in dH ₂ O
APS-Lösung	10% (w/v) in dH ₂ O
TEMED	
Laemmli-Probenpuffer	50 mM Tris (pH 6,8), 10% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, (+ 2% (v/v) β-Mercaptoethanol für die Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen)
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3

Die Komponenten wurden in folgendem Verhältnis zueinander eingesetzt:

	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (5%)
Roti-Puran	3,32 ml	0,4 ml
Trenngel-Puffer	2 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	1 ml
dH ₂ O	2,66 ml	2,6 ml
SDS-Lösung	80 µl	40 µl
APS-Lösung	60 µl	30 µl
TEMED	20 µl	10 µl

Nach der Polymerisation des Gels wurden die zu analysierenden Proteinlösungen mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt.

2.2.9 Immundetektion von Proteinen (Western blot)

Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20% (v/v) Ethanol; pH 10,4
Anodenpuffer I	30 mM Tris, 20% (v/v) Ethanol; pH 10,4
Anodenpuffer II	300 mM Tris, 20% (v/v) Ethanol; pH 10,4
PBS	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,4
PBST	0,05% (w/v) Tween [®] -20 in PBS; pH 7,4
Blockierlösung	3% (w/v) Magermilchpulver in TBST

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in Halbtrockenblotkammern (Froebel, Lindau) auf „Immobilon P“ PVDF Membranen (Millipore, Schwalbach) übertragen (Blotaufbau: drei Lagen Whatman 3MM Papier in Anodenpuffer I, drei Lagen in Anodenpuffer II, Membran, SDS-Polyacrylamidgel, drei Lagen Whatman 3MM Papier in Kathodenpuffer). Die Membranen wurden vorher für 5 min in Ethanol und anschließend für 5 min in Anodenpuffer II getränkt. Die Elektrophorese wurde für 50 min bei 1 mA/cm² Membranfläche durchgeführt. Zur Absättigung der auf der PVDF Membran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurden die zu analysierenden Membranen über Nacht bei 4°C in Blockierlösung inkubiert und anschließend je dreimal für 5 min mit PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur, die Inkubation mit dem zweiten, enzymkonjugierten Antikörper für 30 min jeweils in Blockierlösung. Zwischen sowie nach beiden Inkubationsschritten wurde die Membran wie zuvor mit PBST gewaschen. Abschließend wurde die Membran mit PBS gewaschen.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden unter Verwendung von HRP-gekoppelten Sekundäntikörpern mit Hilfe des ECL Chemolumineszenz Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben nachgewiesen und durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji Photo Film, Düsseldorf) visualisiert.

2.2.10 Kultivierung von Säugerzelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, mindestens einmal wöchentlich mit frischem Medium versorgt bzw. bei Bedarf mit Trypsin abgelöst und verdünnt neu ausgesät.

DMEM und RPMI-1640 Medien wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Bei stabil transfizierten Zelllinien wurde das entsprechende Selektionsantibiotikum ebenfalls zum Medium hinzugegeben. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff in FCS mit 10% (v/v) DMSO. Zur Inaktivierung von Komplement wurde FCS vor Gebrauch 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

2.2.11 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Säugerzellen

Lysepuffer 50 mM Tris, 1% (w/v) Triton X-100, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSE;
pH 7,2

Die Herstellung von Gesamtzellextrakten aus kultivierten Säugerzellen erfolgte zum Nachweis der Expression von Proteinen mittels Western blot. Dazu wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen nach zweimaligem Waschen in PBS in 1 ml Lysepuffer für 20 min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation zur Abtrennung unlöslicher Zelltrümmer wurden die Überstände mit Laemmli-Probenpuffer mit bzw. ohne β-Mercaptoethanol für die Gelelektrophorese unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen versetzt.

2.2.12 Konstruktion des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) aus der cDNA von Matuzumab

Zur Konstruktion eines „single-chain“ Antikörperfragmentes (scFv) von Matuzumab dienten zwei von der Firma Merck zur Verfügung gestellte Vektoren als Ausgangsmaterial, welche die cDNA der schweren Kette V_H (p11-SGHγ1) bzw. der leichten Kette V_L (p11-331-425κ) des monoklonalen Antikörpers enthielten (Andree Blaukat, Merck KGaA, Darmstadt; persönliche Mitteilung).

Zunächst wurde unter Verwendung des „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam, NL) in die V_H cDNA zur Vorbereitung weiterer Klonierungen eine stumme Mutation

eingeführt, um eine endogene *XhoI* Schnittstelle zu eliminieren. Hierfür wurden die Oligonukleotid-Primer **E72-VHmut-fwd** und **E72-VHmut-rev** eingesetzt und die Mutagenese wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Überprüfung wurden beide DNA-Stränge des Konstruktes unter Einsatz der terminalen Primer für die V_H cDNA sequenziert.

Das „single-chain“ Antikörperfragment von Matuzumab (scFv(E72K); Orientierung V_H-Linker-V_L) wurde in die bakteriellen Expressionsvektoren pIB-Tx und pHEN2 eingesetzt. Zur Expression von scFv(E72K) als membranverankertes Oberflächenprotein in „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Experimenten (Vektorsystem pIB-Tx; Benhar *et al.*, 2000) wurde an das 5'-Ende der V_H cDNA mittels Primer eine *NcoI* Schnittstelle eingefügt (**E72K-VH1-fwd NcoI**). Der 3'-Primer in dieser PCR wurde so gewählt, dass dieser den N-terminalen Teil des Glycin/Serin-Linkers an die V_H Sequenz anfügte (**E72K-VH-GS (r12) -rev**). Ein mit diesem Teil der Sequenz des Glycin/Serin-Linkers überlappender Oligonukleotid-Primer wurde als 5'-Primer zur Amplifikation der V_L cDNA verwendet (**E72K-GS (r23) -VL-fwd**), und am 3'-Ende wurde durch einen Oligonukleotid-Primer eine *NotI* Schnittstelle angehängt (**E72K-VL2-rev NotI**). Die in den PCR-Reaktionen erhaltenen Fragmente für die schwere Kette und die leichte Kette wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel eluiert.

Zur Verbindung der beiden Ketten zu einem scFv-Antikörperfragment wurden die beiden PCR Produkte im Verhältnis 1:1 vermischt und durch Erhitzen für 10 min bei 95°C in ihre DNA-Einzelstränge geschmolzen. Durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur wurde erreicht, dass ein Teil der DNA-Einzelstränge am überlappenden Sequenzbereich der DNA, der für den Glycin/Serin-Linker kodiert, einen Heteroduplex bilden konnte. In einer nachfolgenden Reaktion wurden durch Einsatz des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (New England Biolabs, Schwalbach) die einzelsträngigen DNA-Überhänge komplementär mit dNTPs aufgefüllt. Aus der entstandenen Mischung teilhybridisierter V_H cDNA bzw. V_L cDNA und mittels Klenow-Fragment aufgefüllter Duplexe wurde durch Einsatz der Mischung in einer „Assembly PCR“ das gewünschte Gesamtkonstrukt *NcoI*-scFv(E72K)-*NotI* (~ 750 bp) unter Einsatz der terminalen Primer **E72K-VH1-fwd NcoI** und **E72K-VL2-rev NotI** amplifiziert und nach Auftrennung aus einem Agarosegel isoliert. Nach Restriktionsverdau des Gesamtkonstruktes und des Vektors pIB-Tx-scFv(225) (Wels *et al.*, unveröffentlicht) mit den Enzymen *NcoI* und *NotI* und anschließender Gelextraktion wurde das „single-chain“ Antikörperfragment scFv(225) per Ligation durch scFv(E72K) ersetzt (pIB-Tx-scFv(E72K) Konstrukt).

Die Anwesenheit des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) wurde in allen Konstrukten mit den von terminal angefügten Restriktionsschnittstellen unabhängigen Sequenzierungsprimern **scFv (E72K) -VH-fwd** und **scFv (E72K) -VL-rev** mittels PCR nachgewiesen.

2.2.13 Nachweis der Expression von Proteinen auf der Oberfläche von *E. coli* Bakterien (Spun Cell ELISA)

Luria-Bertani (LB)-Medium 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton in 1 L dH₂O; pH 7

HRP-Substratlösung 1 mg/ml ABTS in ABTS Citratpuffer (Roche Diagnostics, Mannheim)

Kulturen von mit Derivaten des Expressionsvektors pIB-Tx transformierten *E. coli* HB101 Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,0 in LB Medium mit 10 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Kanamycin bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden 1 mM IPTG zugesetzt, und die Inkubation wurde für weitere 60 min bei 37°C fortgesetzt. Zur Kontrolle wurde ein Teil der Kultur vor der IPTG-Zugabe entfernt und parallel dazu weiter ohne Induktor kultiviert. Als weitere Kontrolle wurde eine Kultur nicht-transformierter *E. coli* HB101 kultiviert.

Die induzierten Bakterienkulturen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet, dreimal mit PBS gewaschen und jeweils erneut abzentrifugiert. Zur Detektion der „single-chain“ Antikörperfragmente an der Bakterienoberfläche wurde anti-scFv Serum („Max Serum“) aus Kaninchen verwendet, welches zuvor durch Vorinkubation mit untransformierten *E. coli* HB101 Bakterien von anti-*E. coli* Antikörpern befreit wurde. Dieses Serum war zuvor durch Immunisierung eines Kaninchens mit zwei gegen den humanen EGFR gerichteten Immuntoxinen generiert worden, und enthält Antikörper gegen die Zellbindungsdomänen dieser Moleküle (scFv(225)-ETA und scFv(14E1)-ETA; Wels *et al.*, unveröffentlicht). Im Falle der Detektion der Ektodomäne III/L2 von EGFR wurden die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab als Primärantikörper eingesetzt. Nach Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Bakterien sechsmal mit PBS gewaschen und jeweils abzentrifugiert. Die Detektion gebundener Serum-Antikörper erfolgte durch Zugabe von anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat bzw. anti-human IgG/HRP Konjugat als sekundärer Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur, dreimaligem Waschen in PBS, gefolgt von einer Inkubation für 15 min bei 37°C mit HRP-Substratlösung (Roche Diagnostics, Mannheim). Die Suspension wurde durch zweimaliges scharfes Abzentrifugieren von Bakterien befreit und die Absorption der Überstände bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde in einem MWG „SpectraMax 340“ 96-well Mikrotiterplatten-Lesegerät (Molecular Devices, Ismaning) gemessen.

2.2.14 Delayed Infectivity Panning (DIP)

PBS	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; pH 7,4
PBST	0,05% (w/v) Tween [®] -20 in PBS; pH 7,4

Zur Anreicherung, Selektion und Identifikation von phagen-präsentierten Fusionspeptiden, die mit den „single-chain“ Antikörperfragmenten scFv(E72K) bzw. scFv(225) interagieren, wurden Bakterien zur Oberflächenpräsentation der scFv Konstrukte konstruiert (siehe 2.2.12) und in „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Biopanning Experimenten zum Screening der Phagen eingesetzt (Benhar *et al.*, 2000). Hierzu wurden Aliquots von IPTG-induzierten Kulturen von *E. coli* HB101 pIB-Tx-scFv(E72K) und *E. coli* HB101 pIB-Tx-scFv(225) (siehe 2.2.13) in getrennten Ansätzen mit jeweils einer der hier verwendeten Phage Display Phagenbibliotheken (New England Biolabs) inkubiert. Diese bestehen aus gentechnisch modifizierten M13 Bakteriophagen (M13KE), die am polaren Hüllprotein pIII N-terminale Fusionspeptide mit randomisierter Aminosäuresequenz präsentieren. In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Varianten dieser Bibliotheken eingesetzt, in denen die Fusionspeptide aus linearen 7mer- (Ph.D.-7), linearen 12mer- (Ph.D.-12) oder aus zyklischen 7mer-Peptiden (Ph.D.-C7C, verbrückt über zwei flankierende Cysteine) gebildet werden.

Nach Inkubation von mit PBS gewaschenen Aliquots der scFv exprimierenden Bakterien mit den Phagenbibliotheken für 20 min wurden nicht-bindende Phagen durch intensives, achtmaliges Waschen mit PBST und zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die gewaschenen Bakterien wurden nun mit einem Aliquot einer OD₆₀₀ 0,8 – 1,0 Kultur von infizierbaren *E. coli* ER2738 (New England Biolabs) vermischt und für 30 min bei 37°C inkubiert, um die F-Pilus vermittelte Infektion dieser Bakterien durch die noch in der Probe enthaltenen Phagen zu ermöglichen. Die Mischkultur wurde in 20 ml LB-Medium aufgenommen, und antigenpräsentierenden Bakterien wurden durch Zugabe von 12,5 µg/ml des Antibiotikums Tetracyclin abgetötet, gegen das der Amplifikationsstamm resistent ist. In der folgenden Inkubation für 3 h bei 37°C wurden die selektierten Phagen durch die gegen Tetracyclin resistenten *E. coli* ER2738 Bakterien amplifiziert. Insgesamt wurden drei positive Selektionsrunden durchgeführt.

Die Kontrolle der Bildung der zur Infektion durch Bakteriophagen nötigen F-Pili wird im publizierten DIP Protokoll über die Temperatur geregelt, bei der das Biopanning stattfindet (Benhar *et al.*, 2000): Bei einer Temperatur unterhalb von 16°C exprimieren diese Bakterien den für die Infektion mit Phagen notwendigen F-Pilus nicht bzw. nur in sehr geringem Umfang. Nach Bindung antigenspezifischer Phagen und Entfernen ungebundener Phagen wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37°C die Expression des F-Pilus induziert, so dass die Infektion der Bakterien durch die verbliebenen Phagenklone erfolgen kann. Durch hier verwendete Variation der DIP Methode sollte der Tatsache Rechnung getragen werden, dass bei 16°C noch eine basale Expression kurzer F-Pili vorliegen kann. Eine Infektion der Bakterien

durch nicht selektionierte Phagenklone kann durch die Verwendung nicht-infizierbarer *E. coli* Bakterien zur Expression der Zielstruktur vor Zugabe eines separaten, infizierbaren Stammes ausgeschlossen werden.

Durch die Verwendung nicht-transformierter Bakterien des Präsentationsstammes in den anschließenden negativen Selektionsrunden wurden solche Phagenklone, die an Oberflächenproteine von *E. coli* binden, aus dem Phagenpool entfernt (Abb. 3-12). Hierzu wurden nicht-modifizierte *E. coli* HB101 mit den verbliebenen, amplifizierten Phagen inkubiert. Nach der Inkubation für 20 min wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und zusammen mit irrelevanten Phagen, die an Moleküle an der Oberfläche von *E. coli* gebunden waren, verworfen. Der Überstand wurde nach Amplifikation (s.o.) in der nächsten positiven Selektionsrunde eingesetzt. Der Phagentiter in den Ansätzen wurde während der Selektionsrunden durch Entnahme geringer Proben fortlaufend beobachtet (siehe 2.2.15).

Nach drei positiven und drei negativen Selektionsrunden wurde der auf scFv-bindende Phagen angereicherte Phagenpool erneut wie oben beschrieben in *E. coli* ER2738 amplifiziert und einzelne M13KE Phagenklone wurden gepickt. Diese Einzelklone wurden in Kulturen von *E. coli* ER2738 erneut amplifiziert, der Titer wurde bestimmt (siehe 2.2.15) und die einzelsträngige Phagen-DNA wurde mit dem QIAprep Spin M13 Kit (Qiagen, Hilden) isoliert, um durch Sequenzierung direkt Aufschluss über die Sequenzen der zugehörigen N-terminalen Fusionspeptide zu erhalten.

2.2.15 Titerbestimmung von M13 Bakteriophagen

Luria-Bertani (LB)-Medium	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton in 1 L dH ₂ O; pH 7
LB-TIX Agarplatten	5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 2% (w/v) Agar-Agar in 1 L dH ₂ O, nach Autoklavieren Zugabe von 12,5 mg/ml Tetracyclin, 50 g/ml IPTG, 40 µg/ml X-Gal
Softagar	0,7% (w/v) Agarose, 1 mg/ml MgCl ₂ in LB Medium; pH 7

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden Verdünnungsreihen der zu testenden Proben in LB-Medium erstellt und zu jeweils 5 ml warmem Softagar gegeben, dem darüber hinaus 1 ml einer dicht gewachsenen Kultur infizierbarer *E. coli* ER2738 Bakterien zugesetzt wurde. Diese Mischung wurde auf vorgewärmte LB-TIX Agarplatten gegossen. Nach Aushärten des Softagars wurden die Platten bei 37°C für 14 h bzw. über Nacht inkubiert.

Bakteriophagen des Typs M13KE (New England Biolabs) komplementieren nach Infektion von *E. coli* ER2738 das defekte *lacZ* Gen dieser Bakterien. Bei einer geeigneten Verdünnung der Phagen in der Probe werden daher individuelle Phagenklone in Form blauer Phagen-Pseudoplaques im

Bakterienrasen sichtbar, wobei bei guter räumlicher Trennung jeder einzelne Plaque auf einen einzelnen, infizierenden Phagenklon zurückgeht. Dies erlaubt nicht nur die klonale Expansion individueller Phagenklone von diesen Platten, sondern auch einen direkten Rückschluss auf die Phagentiter in der ursprünglichen Probe (unter Berücksichtigung der Verdünnung). In dieser Arbeit wurden LB-TIX Agarplatten, die maximal 100 blaue Plaques enthielten, als geeignet zur zuverlässigen Bestimmung von Phagentitern erachtet. Bei dieser Dichte der Plaques ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass der gewählte Plaque einen einzelnen Phagenklon enthält (vgl. Angaben des Herstellers der hier verwendeten Phagenbibliotheken, New England Biolabs).

2.2.16 Phagen ELISA

Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ ; pH 8,6
Blockierungspuffer	3% (w/v) Magermilchpulver in PBS; pH 7,4
HRP-Substratlösung	1 mg/ml ABTS in ABTS Citratpuffer (Roche Diagnostics)
PEG/NaCl Fällungslösung	20% (w/v) Polyethylenglykol 8000, 2,5 M NaCl in dH ₂ O; pH 7

Isolierte M13KE Einzelklone aus den durch DIP Biopanning selektierten, angereicherten Phagenpools (siehe 2.2.14) wurden auf ihre Bindungsspezifität an die monoklonalen Antikörper Cetuximab anti-EGFR bzw. Matuzumab anti-EGFR getestet, Immunglobulin G aus humanem Serum (Intraglobin F/CP, Biotest, Dreieich) diente als Kontrolle. Die genannten Proteine wurden in Beschichtungspuffer aufgenommen und es wurden jeweils 100 ng/well auf 96-well ELISA Mikrotiterplatten pipettiert und durch Inkubation für 14 h bzw. über Nacht bei 4°C immobilisiert. Die Platten wurden anschließend mit Blockierungspuffer für 60 min abgesättigt und dreimal mit PBS gewaschen.

M13KE Phagenklone (bzw. M13K07 Helferphagen ohne Fusionspeptide als Kontrolle) wurden direkt aus Kulturüberständen bzw. nach Fällung durch Zugabe von 1/6 Vol. PEG/NaCl Fällungslösung und Resuspendierung auf die beschichteten und geblockten Platten pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Phagen im Überstand wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, und anti-fd Bakteriophagen-Antikörper aus Kaninchen (Sigma) wurde zur Detektion gebundener Phagen für 60 min bei Raumtemperatur zugegeben. Nach dem Entfernen überschüssiger, ungebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS wurde anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat als Sekundärantikörper zugegeben und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µl/well HRP-Substratlösung zugegeben. Nach 15 min bei 37°C wurde die Absorption bei 405 nm an einem MWG „SpectraMax 340“ 96-well Mikrotiterplatten-Lesegerät (Molecular Devices, Ismaning) gemessen.

2.2.17 MTT-Zytotoxizitätsassay

MTT-Lösung	10 mg/ml in PBS
Lysepuffer	20% SDS in 50% Dimethylformamid; pH 4,7 eingestellt mit 80% Eisessig / 20% 1 M HCl

Zur Untersuchung der Kompetition des zytotoxischen Effektes von Immuntoxinen durch Zugabe von Peptid-tragenden Phagen bzw. synthetischen Peptiden wurden semikonfluent wachsende adhärenente Zellen trypsiniert, gewaschen und gezählt. Die Zellen wurden in einer Dichte von $2 \cdot 10^4$ Zellen/well in 96-well Zellkulturplatten ausgesät und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert, um eine Anheftung der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ng/ml EGFR- bzw. ErbB2-spezifischen, von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) abgeleiteten Immuntoxinen inkubiert [scFv(225)-ETA, TGF α -ETA, scFv(FRP5)-ETA]. Den Immuntoxinen wurden zuvor jeweils auf Kompetition zu testende Peptid-tragende Phagenklone (ca. 10-facher molarer Überschuss bezogen auf die Bindungsdomäne des Immuntoxins) bzw. synthetische Peptide (ca. 1000-facher molarer Überschuss) bzw. PBS als Kontrolle zugegeben, und die Ansätze wurden vor Zugabe zu den Zellen für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als weitere Negativkontrollen dienten M13K07 Helferphagen bzw. die irrelevanten Kontrollpeptide **SFLQDIQEV** bzw. **LPASPETHL**. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die behandelten Zellen für weitere 48 h bei 37°C inkubiert. Zur Detektion lebender Zellen wurden anschließend 10 μ l MTT-Lösung zugegeben, für 3 h bei 37°C inkubiert und vor der Messung wurden durch Zugabe von 90 μ l Lysepuffer sämtliche Zellen für mindestens 60 min vollständig lysiert (Kontrolle unter dem Lichtmikroskop). Die Absorption des von lebenden Zellen aus MTT gebildeten Formazan-Salzes wurde bei 590 nm in einem MWG „SpectraMax 340“ 96-well Mikrotiterplatten-Lesegerät (Molecular Devices, Ismaning) gemessen und die relative Zahl lebender Zellen im Vergleich zur mit PBS behandelten Kontrolle wurde berechnet (Schmidt *et al.*, 1997).

2.2.18 Immunisierungsexperimente in Kaninchen

Basierend auf der Sequenzanalyse und den Bindungs- und Kompletionsdaten der M13KE pIII-Fusionspeptide wurden Sequenzen für zwei ausgewählte Peptide zur Immunisierung von Kaninchen ermittelt. Die Peptide **VLPKTLCGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGGS** (YPLG Motiv) wurden synthetisiert, an das Protein „keyhole limpet hemocyanine“ (KLH) zur Verstärkung der Immunreaktion gekoppelt und für sechs Injektionen (Wochen 0, 2, 3, 5, 7, 9) pro Kaninchen eingesetzt. Die Immunisierungen wurden extern durch die Firma Davids Biotechnologie, Regensburg durchgeführt.

Zehn Wochen nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere getötet und die Seren wurden gesammelt. Ein Teil jedes Serums wurde über eine Affinitätsäule gereinigt, an die das entsprechende Peptid chemisch gekoppelt worden war, um die spezifischen anti-Peptid Antikörper aus dem Serum zu isolieren

(Davids Biotechnologie, Regensburg). Kaninchenserum und affinitätsgereinigte anti-Peptid Antikörper wurden zum Entfernen von Natriumazid 5x für jeweils 3 h gegen 10 Vol. PBS dialysiert und in nachfolgenden ELISA, FACS und Western blot Experimenten auf Reaktivität gegen den humanen EGFR untersucht (siehe 3.7 und 3.8).

2.2.19 Peptid ELISA

Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ ; pH 8,6
Blockierungspuffer	3% (w/v) Magermilchpulver in PBS; pH 7,4

Zur Überprüfung der Spezifität von Kaninchenserum bzw. affinitätsgereinigter anti-Peptid Antikörper aus Immunisierungsexperimenten wurden die Peptide **VLPKTLCGGGS** (KTL Motiv) and **ACKYPLGHQCGGGS** (YPLG Motiv) in Beschichtungspuffer gelöst und in Verdünnungsreihen (5 ng/well bis 50 µg/well) auf 96-well ELISA Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Plastikoberfläche mit Blockierungspuffer abgesättigt und die Peptide wurden mit verdünnten Kaninchenserum bzw. affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörpern für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat als Sekundärantikörper zur Detektion zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel dazu wurden die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab als Positivkontrollen, sowie Herceptin anti-ErbB2 und die sekundären Antikörper anti-human IgG/HRP und anti-Kaninchen IgG/HRP als Negativkontrollen auf Bindung an die Peptide getestet.

2.2.20 Nachweis von EGFR auf Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Semikonfluent wachsende Zellen der adhärenenten murinen Nierenkarzinomzelllinie Renca, die mit dem bakteriellen *lacZ* Gen stabil transfiziert ist (Renca-lacZ; Maurer-Gebhard *et al.*, 1998), sowie Zellen des gleichen Typs die zusätzlich den humanen EGFR stabil exprimieren (Renca-lacZ/EGFR; Schmidt *et al.*, 1999) und Zellen der humanen Vulvakarzinomzelllinie A431 wurden zunächst trypsiniert, in PBS gewaschen, in einer Neubauer-Kammer gezählt und in einer Dichte von $7,5 \cdot 10^5$ Zellen/well auf „round bottom“ 96-well Mikrotiterplatten ausgesät. In Competitionsexperimenten wurden Renca-lacZ bzw. Renca-lacZ/EGFR Zellen vor der Zugabe der primären Antikörper für 30 min auf Eis mit affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörpern, Präimmenserum oder PBS vorinkubiert. Die Bindung der anti-Peptid Antikörper an A431 Zellen wurde in einigen Proben durch einen Überschuss der synthetischen Peptide **VLPKTLCGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGGS** (YPLG Motiv) vor Zugabe der Antikörper auf die Zellen für 30 min auf Eis kompetiert. Als primäre Antikörper wurden jeweils 1 µg Cetuximab anti-EGFR, Matuzumab anti-EGFR, sowie Herceptin anti-ErbB2 bzw. PBS als Kontrollen eingesetzt. Darüber hinaus wurde die Bindung der affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper,

sowie des Präimmunsersums als Kontrolle, an EGFR exprimierende Zellen untersucht (Verdünnung 1:10). Die Inkubation mit den primären Antikörpern bzw. Seren erfolgte für 45 min auf Eis. Vor der Detektion an EGFR gebundener Antikörper wurden die Zellen erneut mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend für 45 min auf Eis mit FITC-konjugiertem anti-human IgG/FITC bzw. anti-Kaninchen IgG/FITC Konjugat inkubiert. Die Messung der in FACS-Röhrchen überführten Proben wurde an einem FACScan Zytometer (Beckton-Dickinson) durchgeführt.

2.2.21 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Antikörper-Puffer	3% (w/v) BSA in PBS
Fixierlösung	4% (w/v) Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungslösung	3% (w/v) BSA in PBS

Die Bindung primärer anti-EGFR Antikörper bzw. anti-Peptid Antikörper an den humanen EGFR auf der Oberfläche von Tumorzellen wurde in Immunfluoreszenz Studien untersucht. Hierzu wurden semikonfluent wachsende Renca-lacZ/EGFR Zellen zunächst trypsiniert, gewaschen, gezählt und in einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/well auf Lab-Tek II 8-well Objektträger (Nalge Nunc International, Roskilde, DK) ausgesät. Nach einer Inkubation bei 37°C im Brutschrank über Nacht wurden die Zellen zunächst durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS vom Medium befreit. Es folgte die Inkubation mit den in Antikörper-Puffer verdünnten primären Antikörpern zur Oberflächendetektion von EGFR, mit jeweils 1 µg/ml der humanen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab, des murinen anti-EGFR Antikörpers R-1 (Santa Cruz, Heidelberg), bzw. mit 1:10 verdünnten anti-Peptid Antikörpern aus Immunisierungsexperimenten (jeweils mit oder ohne Vorinkubation mit einem Überschuss der synthetischen Peptide **VLPKTLCGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGGS** (YPLG Motiv) zur Konkurrenz der Bindung). Zur Kontrolle dienten in diesem Arbeitsschritt nur mit PBS behandelte Zellen (Sekundärantikörper-Kontrolle) sowie Zellen, die mit 1:10 verdünntem Präimmunsersum behandelt wurden.

In Ko-Lokalisationsstudien wurden Doppelfärbungen durchgeführt, bei denen die Zellen mit dem murinen anti-EGFR mAb R-1 gefärbt wurden, jeweils in Kombination mit 1:10 verdünnten anti-Peptid Antikörpern bzw. mit 1:10 verdünntem Präimmunsersum oder PBS als Kontrollen. Sämtliche hier verwendete Antikörper wurden in Antikörper-Puffer (siehe oben) angesetzt. Überschüssige Primärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit eiskaltem PBS entfernt. Es folgte die Zugabe der sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-human IgG/FITC, anti-Kaninchen IgG/FITC, anti-Kaninchen-Phycoerythrin, anti-Maus IgG/Alexa488, oder Kombinationen aus diesen Antikörpern in den Doppelfärbungen) gefolgt von einer erneuten Inkubation für 45 min bei 4°C unter Lichtausschluss. Für jeden der hier verwendeten sekundären Antikörper wurde ein Kontrollansatz ohne Primärantikörper parallel mitgeführt (Sekundärantikörper-Kontrollen).

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von Fixierlösung für 10 min fixiert, erneut gewaschen und durch Zugabe von Permeabilisierungslösung durchlässig gemacht für im Eindeckmedium enthaltene Farbstoffe. Diese Arbeitsschritte zur Fixierung und Permeabilisierung wurden bei den Doppelfärbungen nicht durchgeführt, bei denen Eindeckmedium ohne zugesetzten Farbstoff verwendet wurde. Abschließend wurden die Zellen mit Vectashield Eindeckmedium (Vector Labs, Burlingame, USA) überschichtet, welches je nach Experiment entweder keinen Farbstoff oder einen vierfachen Überschuss Propidiumiodid (im Vergleich zur eingesetzten Menge bei einer Zellkernfärbung) enthielt, um den gesamten Zellkörper sichtbar zu machen. Die derart behandelten Proben wurden mit einem Leica TCS SL konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

2.2.22 Detektion von EGFR durch anti-Peptid Antikörper in Lysaten von Tumorzellen (Western blot)

Lysepuffer	50 mM Tris, 1% (w/v) Triton X-100, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF; pH 7,2
PBST	0,05% (w/v) Tween [®] -20 in PBS; pH 7,4
Blockierungspuffer	3% (w/v) Magermilchpulver in PBS; pH 7,4

Semikonfluent wachsende Tumorzellen (Renca-lacZ/EGFR, A431, SKBR3, sowie Renca-lacZ, Renca-lacZ/ErbB2 und SKOV3 Kontrollzellen) wurden durch Zugabe von Lysepuffer für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Vortexen lysiert, und Zelltrümmer wurden durch scharfe Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 4°C entfernt. Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben (siehe 2.2.8) wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden auf PVDF Membranen transferiert (siehe 2.2.9), und diese wurden mit Blockierungspuffer abgesättigt. Zur Detektion des EGFR Proteins wurden die Membranen mit affinitätsgereinigten anti-KTL Peptid bzw. anti-YPLG Peptid Antikörpern (Verdünnung 1:200) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gebundene Primäntikörper wurden nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBST durch Inkubation für 30 min mit dem Sekundäntikörper anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat detektiert und nach einem erneuten Waschschrift mit dem ECL Chemolumineszenz Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert.

2.2.23 Konkurrenz der Stimulation von EGFR durch den natürlichen Liganden EGF (Western blot)

Lysepuffer-II	50 mM Tris, 1% (w/v) SDS, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 100 µM Na ₃ VO ₄ , 1 mM PMSF; pH 7,2
Blockierungspuffer	3% (w/v) Magermilchpulver in PBS; pH 7,4

Zur Untersuchung der Konkurrenz des natürlichen EGFR Liganden EGF wurden A431 Zellen über Nacht in DMEM Medium bei geringer Serumkonzentration (1% (v/v) FCS) in 6-well Mikrotiterplatten

kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden für 10 min bei 37°C mit 2 µg/ml der anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab, gereinigten anti-Peptid Antikörpern (anti-KTL bzw. anti-YPLG), und Präimmenserum bzw. PBS als Negativkontrollen vorinkubiert. Anschließend wurden zur Stimulation des Rezeptors 50 ng/ml humanes EGF für 10 min bei 37°C zugegeben. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis durch Zugabe von Lysepuffer-II und gelegentlichem Vortexen lysiert, und Zelltrümmer wurden durch scharfe Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 4°C entfernt.

Die Proben wurden mit Laemmli-Puffer (siehe 2.2.8) für 5 min bei 95°C erhitzt und die enthaltenen Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF Membran (siehe 2.2.9) und Absättigung freier Bindungsstellen mit Blockierungspuffer wurde zur Detektion des phosphorylierten EGFR durch der murine anti-Phosphotyrosin Antikörper 2C8 (sc-81529; Santa Cruz) bzw. zum Nachweis des Gesamtproteins der murine anti-EGFR Antikörper 29.1 (Sigma-Aldrich) für 45 min bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBST gewaschen. Als Sekundäntikörper wurde anti-Maus IgG/HRP Konjugat (Sigma-Aldrich) verwendet, die Membran wurde nach 30 min Inkubation erneut gewaschen und mit dem ECL Chemolumineszenz Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) entwickelt. Die Intensitäten der Banden wurden aus den gemittelten Graustufenwerten mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms „ImageJ 1.42g“ der National Institutes of Health (NIH) densitometrisch quantifiziert (<http://rsweb.nih.gov/ij/>). Die dargestellten Werte sind als relatives Signal in Bezug auf die jeweilige Positivkontrolle (Stimulation des Rezeptors mit EGF ohne Kompetitor) angegeben. Bei der Bewertung der so erhaltenen Daten ist zu berücksichtigen, dass Artefakte auf den Immunoblots die ermittelten Signalstärken positiv und Bereiche maximaler Schwärzung auf dem aufgelegten Röntgenfilm die Werte negativ beeinflussen können.

2.2.24 Sättigungs-ELISA zur Bestimmung der Affinitäten gereinigter anti-Peptid Antikörper

Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO ₃ ; pH 8,6
Blockierungspuffer	3% (w/v) Magermilchpulver in PBS; pH 7,4
HRP-Substratlösung	1 mg/ml ABTS in ABTS Citratpuffer (Roche Diagnostics)

Zur Bestimmung der Affinitäten gereinigter anti-Peptid Antikörper wurden 96-well Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit 5 µg/well synthetischen Peptiden bzw. 100 ng/well gereinigter EGFR Ektodomäne (zur Verfügung gestellt von M. Jeschke und W. Weber) in Beschichtungspuffer immobilisiert. Nach Absättigung freier Bindungsstellen mit Blockierungspuffer wurden in Verdünnungsreihen die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab sowie affinitätsgereinigte anti-Peptid Antikörper und der monoklonale anti-ErbB2 Antikörper Herceptin als Kontrolle in Triplikaten zugefügt (maximal 5 µg/well). Nach einer Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal

mit PBS gewaschen, und die entsprechenden Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper, anti-human IgG/HRP bzw. anti-Kaninchen IgG/HRP, wurden zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min bei 37°C, und die Platten wurden dreimal mit PBS gewaschen. Für die Messung wurden 100 µl/well HRP-Substratlösung für 30 min bei 37°C zugegeben, und die Absorption bei 405 nm wurde in einem MWG „SpectraMax 340“ 96-well Mikrotiterplatten-Lesegerät (Molecular Devices, Ismaning) gemessen. Die Bindungskurven wurden unter Einsatz der Datenanalyse-Software „GraphPad Prism 5“ (<http://www.graphpad.com/prism/>) für die hier getesteten Antikörper erstellt. Die resultierenden Bindungsaffinitäten (K_D Werte) wurden aus diesen Bindungskurven durch nicht-lineare Regression mithilfe desselben Computerprogramms ermittelt.

2.2.25 Epitopvorhersage (Epitope Mapping) *in silico*

Vorhersagen der Lage von Epitopen der anti-Peptid Antikörper auf der Oberfläche des humanen EGFR wurden *in silico* durch Nutzung des Pepitope Servers der Bioinformatik Abteilung der G. S. Wise Faculty of Life Sciences, Universität Tel Aviv, Israel (<http://pepitope.tau.ac.il>) unter Anwendung des PepSurf Algorithmus berechnet (Mayrose *et al.*, 2007a; Mayrose *et al.*, 2007b). Die Ergebnisse wurden mithilfe der Software „VMD – Visual Molecular Dynamics“, entwickelt von der Theoretical and Computational Biophysics Group der University of Illinois, visualisiert (Humphrey *et al.*, 1996; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). Zur Darstellung der dreidimensionalen Strukturen von EGFR wurden die publizierten Röntgenkristalldaten aus **1IVO.PDB** (EGFR Ektodomäne – offene Konformation; Ogiso *et al.*, 2002), und **1YY9.PDB** (EGFR Ektodomäne – autoinhibierte Konformation; Li *et al.*, 2005) verwendet. Die Dateien sind in der RCSB Protein Data Bank (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://www.rcsb.org>) verfügbar.

3. Ergebnisse

3.1 Ausgangsposition und Fragestellung

Der Einsatz monoklonaler Antikörper zur gerichteten Therapie von Tumoren, welche die entsprechenden Zielantigene exprimieren, hat sich in den vergangenen Jahren zu einer vielversprechenden Strategie entwickelt, um neben den klassischen Maßnahmen wie Operation, Radiotherapie und Chemotherapie das Überleben der Patienten zu verlängern und im Idealfall eine Heilung des Patienten oder zumindest eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs zu erreichen. Hierbei wird die hohe Spezifität genutzt, mit der Antikörper an ihr Antigen binden, um unerwünschte Nebenwirkungen durch die Beeinträchtigung gesunder Körperzellen, wie sie bei den systemisch wirksamen klassischen Chemotherapeutika auftritt, weitgehend auszuschließen. Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist auf vielen Tumoren epithelialen Ursprungs übermäßig stark exprimiert und/oder mutiert, und die durch diese membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase vermittelte Signaltransduktion ist kausal am Voranschreiten derartiger Tumorerkrankungen beteiligt (Mendelsohn und Baselga, 2006; Wells, 1999; Wells, 2000). Dies macht EGFR zu einem geeigneten Kandidaten als Zielantigen zur gerichteten Tumortherapie mittels monoklonaler anti-EGFR Antikörper.

Die erste Generation therapeutischer Antikörper leitete sich aus murinen Vorläufermolekülen ab, die bei direkter Verwendung im Patienten zu Immunreaktionen führten, welche die Bildung von wirkungshemmenden humanen anti-Maus Antikörpern (HAMA) auslösen (Reilly *et al.*, 1995). Daraufhin wurden die konstanten Bereiche (Fc) solcher Antikörper durch Sequenzen humaner Immunglobuline ersetzt, was zu einer deutlichen Verbesserung der Verträglichkeit und Wirkung *in vivo* führte (Astsaturov *et al.*, 2007; Harding *et al.*, 2005). Zu dieser Klasse gehört der chimäre anti-EGFR Antikörper Cetuximab (ImClone/BMS/Merck), der unter dem Namen Erbitux[®] zur Therapie von metastasierenden Kolonkarzinomen und Kopf- und Halskrebs zugelassen ist (FDA/EMA). Auch bei anderen Krebserkrankungen, wie etwa dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), wird Cetuximab in klinischen Studien erprobt (z.B. FLEX Studie; Von Pawel *et al.*, 2006). Therapeutische Antikörper der nächsten Generation, zu denen auch der monoklonale anti-EGFR Antikörper Matuzumab (EMD72000, Merck/Takeda) gehört, sind vollständig humanisiert und befinden sich zur Zeit in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Entwicklung (Seiden *et al.*, 2007; Socinski, 2007). Durch die Minimierung nicht-menschlicher Sequenzanteile in den Immunglobulinen soll eine weitere Verbesserung von Wirkung und Verträglichkeit erreicht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Epitope der beiden therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab noch unbekannt. Die Kenntnis der Epitope der Antikörper kann wertvolle Hinweise auf die molekularen Grundlagen ihrer Wirkung liefern, sowie zur Erklärung von Unterschieden in Wirkung und Effizienz dieser Moleküle beitragen und deren weitere Optimierung erleichtern. In vorangegangenen

Arbeiten wurde versucht, Hinweise auf die Bindungsstelle von Cetuximab an EGFR mittels klassischem Phage Display Biopanning mit Peptid-tragenden Phagen zu gewinnen (Hartmann, 2002). Wertvolle Beiträge zur räumlichen Eingrenzung des in Frage kommenden Bereiches lieferten dabei neben den ersten experimentellen Untersuchungen zur Bindung des Antikörpers an EGFR und Sequenz- und Strukturanalysen *in silico* die zwischenzeitlich veröffentlichten Strukturen der Ektodomänen der vier Mitglieder der ErbB Rezeptorfamilie (Bouyain *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003; Ferguson *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2003).

Es wurde beobachtet, dass in Phage Display Biopanning Experimenten mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern überwiegend falsch-positive Phagenklone angereichert worden waren, deren exponierte Peptide an die konstanten Regionen von Immunglobulin G binden. Um den Anteil von Phagenklonen in den eluierten Phagenpools zu erhöhen, die spezifisch mit den hypervariablen Regionen (CDR) von Cetuximab interagieren, wurde in nachfolgenden Biopanning Experimenten das „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) System (Benhar *et al.*, 2000) eingesetzt. In diesen Experimenten werden „single-chain“ Antikörperfragmente an der Oberfläche von Bakterien exprimiert und diese werden mit den Phagen inkubiert. In den verwendeten Konstrukten stehen die konstanten Regionen der eingesetzten Antikörper daher nicht als Zielstruktur zur Selektion bindender Phagenklone zur Verfügung.

Im Verlauf der Arbeiten zu dieser Dissertation wurde durch die Arbeitsgruppe von K. M. Ferguson zunächst das Epitop von Cetuximab durch Röntgenkristallstrukturanalyse des Kokristalls des Fab-Fragmentes von Cetuximab und der extrazellulären Domäne des EGFR (sEGFR) aufgeklärt (Li *et al.*, 2005). Im Frühjahr 2008 gelang es dieser Arbeitsgruppe zudem, ebenfalls mittels Röntgenkristallstrukturanalyse das Epitop von Matuzumab in einem Kokristall des Fab-Fragmentes mit der Ektodomäne von EGFR zu identifizieren (Schmiedel *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der genannten Publikationen bestätigten die bis dato im Rahmen dieser Arbeit gesammelten experimentellen Daten zur Lage der Epitope von Cetuximab und Matuzumab.

Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage, die mit den CDR der anti-EGFR mAbs interagierenden Peptide, die in den in dieser Arbeit durchgeführten „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Phage Display Biopanning Screenings (siehe 3.4) identifiziert wurden, auf Übereinstimmungen in den Aminosäuresequenzen der Epitope zu untersuchen. Aus den publizierten Strukturdaten ist ersichtlich, dass die Epitope von Cetuximab und Matuzumab in unmittelbar benachbarten, aber unterschiedlichen, sich nicht überlappenden Bereichen des EGFR Moleküls liegen. In den in dieser Arbeit durchgeführten Screenings wurden jedoch überraschenderweise auch Peptide identifiziert, die eine Kreuzreaktivität zeigen und mit beiden Antikörpern interagieren (siehe 3.4 und 3.5). Ferner weisen solche Peptide gemeinsame kurze Sequenzmotive auf, in denen sich einige der kritischen Aminosäuren der publizierten Epitope beider Antikörper wiederfinden. Aus Bindungs- und Kompetitionsstudien zu diesen Peptiden gewonnene Daten wurden verwendet, um Peptide auszuwählen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit als

Mimotope die Epitope von Cetuximab und Matuzumab nachbilden. Mit diesen kreuzreaktiven Peptiden wurden Immunisierungsexperimente in Kaninchen durchgeführt (siehe 3.7) und die dabei gewonnenen Seren und anti-Peptid Antikörper daraufhin untersucht, ob in den Versuchstieren eine kreuzreaktive endogene Immunantwort gegen den humanen EGFR ausgelöst wurde und Antikörper aus den Seren die gleichen Bereiche des EGFR erkennen wie die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab (siehe 3.8). Die Weiterentwicklung derartiger Peptide zu Peptidvakzinen zur Generierung endogener, in ihrer Wirkung der passiven Immunisierung mit monoklonalen anti-EGFR Antikörpern ähnlicher Immunreaktionen könnte eine vielversprechende Strategie zur Effizienzsteigerung der Therapie von EGFR-positiven Tumorerkrankungen darstellen.

3.2 Cetuximab und Matuzumab erkennen konformationelle EGFR Epitope

3.2.1 Detektion von EGFR in Lysaten von Tumorzellen

Zur Überprüfung der Bindung der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) wurden die adhärent wachsenden Zelllinien Renca-lacZ, Renca-lacZ/EGFR, Renca-lacZ/EGFRvIII und A431 kultiviert, in der semikonfluent wachsenden Phase trypsiniert und durch Zentrifugation geerntet. Anschließend wurden durch Zugabe von Zelllysepuffer und erneute Zentrifugation gereinigte Lysate hergestellt. Renca-lacZ/EGFR und Renca-lacZ/EGFRvIII wurden durch stabile Transfektion der murinen Nierenzellkarzinomzelllinie Renca-lacZ mit den entsprechenden Konstrukten zur Expression des humanen EGFR (170 kDa) bzw. der tumorspezifischen EGFR Variante (EGFRvIII: $\Delta 6-273$; V6G; 145 kDa) befähigt (Schmidt *et al.*, 1999). Für die humane Vulvakarzinom-Zelllinie A431 ist beschrieben, dass sie neben dem Wildtyp EGFR (Kawamoto *et al.*, 1983) durch proteolytischen Abbau entstehende kleinere Degradationsprodukte von EGFR enthält (EGFRA; Murthy *et al.*, 1987). Ferner exprimieren A431 Zellen geringere Mengen des mit EGFR verwandten Rezeptormoleküls ErbB2 (Giard *et al.*, 1973).

Von jeweils 200 μ l Gesamtvolumen der gereinigten Lysate wurden Proben zu je 20 μ l mit Protein-Ladepuffer (Roth) versetzt, auf Polyacrylamid-Gele geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wurde ein Teil der Proben mit Dithiothreitol (DTT) zur Reduktion von Disulfidbrücken versetzt. Nach dem Transfer der Proteine auf Immobilon PVDF-Membranen wurden diese mit Magermilchpulver in PBS geblockt und mit dem jeweiligen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab inkubiert. Nach Entfernen von nicht gebundenem Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBS/Tween[®]-20 erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärintikörper anti-human IgG/HRP Konjugat. Zur Detektion gebundener Antikörperkomplexe wurde das ECL Chemolumineszenz Kit (Amersham) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet, und der Immunoblot wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji) belichtet.

Nach der ersten Detektion wurde die mit Cetuximab und anti-human IgG/HRP Konjugat entwickelte Membran mit PBS/Tween[®]-20 gewaschen und für 30 min in Stripping-Puffer (25 mM Glycin-HCl, 1% (w/v) SDS in dH₂O; pH 2,0) gelegt. Nach erfolgter Denaturierung der zuvor verwendeten Antikörper im sauren Milieu wurden diese durch zweimaliges Waschen der Membran in PBS/Tween[®]-20 entfernt. Das erfolgreiche Ablösen der Antikörper-Komplexe wurde zunächst durch Entwicklung mit ECL und Auflegen eines Röntgenfilmes bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die derart behandelten Membranen wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS/Tween[®]-20 mit dem polyklonalen Kaninchen-Serum 15E anti-EGFR inkubiert (zur Verfügung gestellt von Nancy Hynes, Friedrich Miescher Institut, Basel), gefolgt von anti-Kaninchen IgG/HRP und ECL zur Detektion mittels Röntgenfilm.

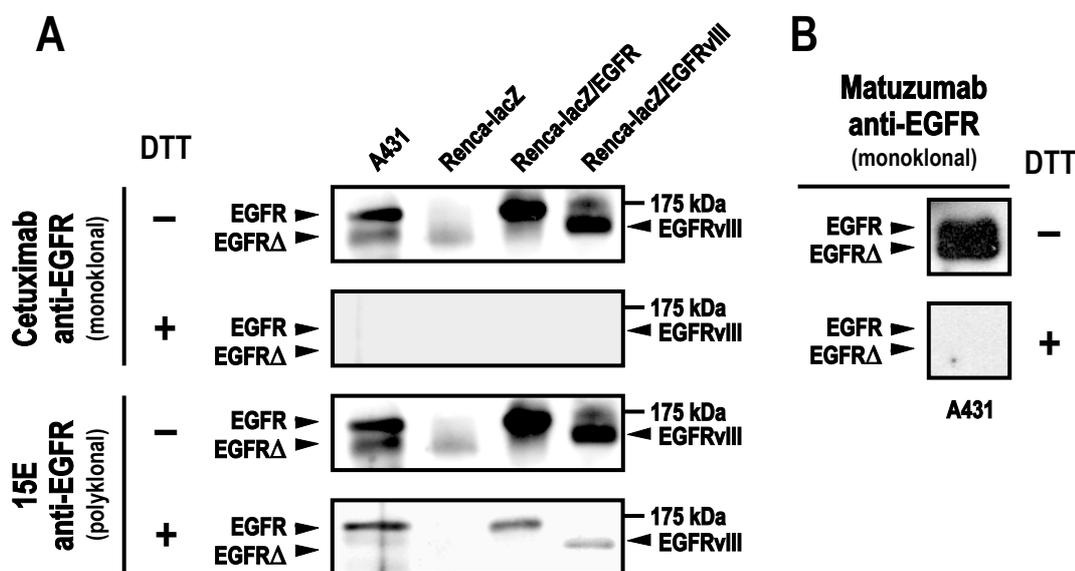


Abb. 3-1: Die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab erkennen konformationelle Epitope. (A) Detektion von EGFR in Lysaten von A431, Renca-lacZ/EGFR und Renca-lacZ/EGFRvIII Zellen durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab (erste Reihe). Die Größen von EGFR Wildtyp (170 kDa) und EGFRvIII (145 kDa) sowie das Signal der bei A431 Zellen vorkommenden Degradationsprodukte von EGFR (EGFR Δ) sind hervorgehoben. Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zu den Lysaten zerstört das diskontinuierliche konformationelle Epitop von Cetuximab am EGFR Molekül und somit die Antikörperbindung (zweite Reihe). Die Detektion von EGFR durch das polyklonale Kaninchen-Serum 15E anti-EGFR, welches ein lineares Epitop von EGFR erkennt, bleibt auch nach Zugabe des Reduktionsmittels erhalten (dritte und vierte Reihe). **(B)** Die Bindung von Matuzumab an EGFR in Lysaten von A431 Zellen ist ebenfalls abhängig von intakten Disulfidbrücken, die durch Zugabe von DTT zerstört werden. Matuzumab bindet damit ebenfalls an ein konformationelles Epitop.

Der humane EGFR bzw. die Deletionsvariante EGFRvIII konnten in Renca-lacZ/EGFR, Renca-lacZ/EGFRvIII und A431 Zellen mit Cetuximab (Abb. 3-1A) und in A431 Zellen mit Matuzumab (Abb. 3-1B) nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass EGFRvIII von Cetuximab erkannt wird, grenzt die mögliche Lage des Epitops weiter ein, da in dieser verkürzten Rezeptorvariante die AS 6-273 fehlen und somit ein großer Bereich der extrazellulären Domäne deletiert ist. Im Gegensatz zum polyklonalen Serum 15E anti-EGFR, das gegen ein aus EGFR abgeleitetes C-terminales lineares Peptid gerichtet ist, sind die beiden monoklonalen Antikörper nach Reduktion von Disulfidbrücken in EGFR nicht mehr in der Lage,

an ihr Antigen zu binden. Hieraus läßt sich schließen, dass es sich bei den Bindungsstellen der Antikörper Cetuximab und Matuzumab am EGFR um diskontinuierliche konformationelle Epitope handelt, die auf eine intakte, durch Disulfidbrücken stabilisierte Raumstruktur des Zielproteins für die Antigenerkennung angewiesen sind.

3.2.2 Sequenz- und Strukturvergleich von anti-EGFR „single-chain“ Antikörperfragmenten

Um einen ersten Eindruck über Sequenzhomologien und damit mögliche Überlappungen der Epitope unterschiedlicher anti-EGFR Antikörper zu erhalten, wurden die Aminosäuresequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der anti-EGFR Antikörper Cetuximab, Matuzumab sowie 14E1 (Schmidt *et al.*, 1997; Triton Diagnostics, Alameda, USA) gemäß den Richtlinien von Andrew Martin, Institute of Structural Molecular Biology, University College London (<http://www.bioinf.org.uk/abs/>) ermittelt und vergleichend analysiert. Der murine Antikörper 14E1 wurde in diese Analysen einbezogen, weil es sich hierbei um einen Kompetitor handelt, der mit Cetuximab um die Bindung an EGFR konkurriert und ebenfalls in der Lage ist, die Bindung natürlicher Liganden an EGFR zu blockieren (Fan *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1997). Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Antikörper 14E1 ein ähnliches Epitop erkennt wie Cetuximab. Für Matuzumab ist hingegen beschrieben, dass eine Bindung an EGFR gleichzeitig mit Cetuximab erfolgen kann (Schmiedel *et al.*, 2008; Kamat *et al.*, 2008). Die Sequenzen der anti-EGFR Antikörper wurden jeweils paarweise angeordnet und miteinander abgeglichen (Abb. 3-2).

V_H	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
	*::*** :*	.. * **:* *..	. **.*:***
Cetuximab	GFSLTNYGVH	VIWSG-GNTDYNTPF [*] TS	-AL [*] TYDYEFAY
14E1	GYTFTNYWMH	YTNPNTGYTDFN [*] QKFKD	-G-DYYGYDFAY
	::. :*	: .. *.*:** *.*	* . * *
Cetuximab	GFSLTNYGVH	VIWSG-GNTDYNTPF [*] TS	-AL [*] TYDYEFAY
Matuzumab	GYTFTSHWMH	EFNPSNGRTNYNEK [*] FKS	RDYDYDGRYFDY
	*****.:***	**..* *.:*:***	* ** * * *
14E1	GYTFTNYWMH	YTNPNTGYTDFN [*] QKFK-	-DGDYYGYDFAY
Matuzumab	GYTFTSHWMH	EFNPSNGRTNYNEK [*] FKS	RDYDYDGRYFDY
V_L	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
	*****	*****	**.:.****
Cetuximab	RASQSIGTNIH	YASESIS	QQNNNWPTT
14E1	RASQSIGTNIH	YASESIS	QQSDSWPTT
	**.*: * ::	:*: *	** .. *
Cetuximab	RASQSIGTNIH	YASESIS	QQNNNWPTT
Matuzumab	SASSSV-TYMY	DTSNLAS	QQWSSHIFT
	**.*: * ::	:*: *	** .* *
14E1	RASQSIGTNIH	YASESIS	QQSDSWPTT
Matuzumab	SASSSV-TYMY	DTSNLAS	QQWSSHIFT

Abb. 3-2: Vergleichende Anordnung der Aminosäure-Sequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper Cetuximab, Matuzumab und 14E1 anti-EGFR. Anordnung und Abgleich der Sequenzen der CDR in der schweren Kette (V_H) und der leichten Kette (V_L) der Antikörper erfolgte mit dem Programm „Clustal X 2.0.7“ (Larkin *et al.*, 2007). Identische Aminosäuren innerhalb eines Abgleichs sind oberhalb der Referenzsequenz mit einem Stern gekennzeichnet, Aminosäuren mit stark homologen physikochemischen Eigenschaften mit einem Doppelpunkt, Aminosäuren mit schwach homologen physikochemischen Eigenschaften durch einen Punkt (qualitative Gewichtung nach der Gonnet Pam250 Matrix; Thompson *et al.*, 1994; Thompson *et al.*, 2002).

Die aus dem gezeigten Sequenzabgleich resultierenden absoluten und prozentualen Sequenzhomologien der CDR untereinander sind in Abb. 3-3 dargestellt. Die ermittelten Homologien zwischen Cetuximab und 14E1 (41% bis 93%) sind generell größer als die Homologien zwischen den CDR Sequenzen von Cetuximab und Matuzumab (31% bis 52%). Auch die Homologien im direkten Vergleich von Matuzumab und 14E1 liegen in diesem Bereich (37% bis 67%). Auffällig ist die nahezu vollständige Sequenzhomologie der CDR der leichten Kette (V_L) zwischen Cetuximab und 14E1. Ein Vergleich von *in silico* generierten Strukturmodellen der Fv-Fragmente von Cetuximab, Matuzumab, 14E1 anti-EGFR,

sowie FRP5 anti-ErbB2 als irrelevantes Fv-Fragment anderer Spezifität, ist in Abb. 3-4 gezeigt. Der Vergleich von Cetuximab und 14E1 zeigt deutliche Strukturhomologien auf, die beim Vergleich von Cetuximab und Matuzumab so nicht zu erkennen sind. Eine Überlappung der Epitope von Cetuximab und Matuzumab erschien nach diesen Daten unwahrscheinlich, was durch die später publizierten Röntgenkristallstrukturdaten der Fab-Fragmente von Cetuximab und Matuzumab im Kokristall mit der EGFR Ektodomäne bestätigt wurde (Li *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2008).

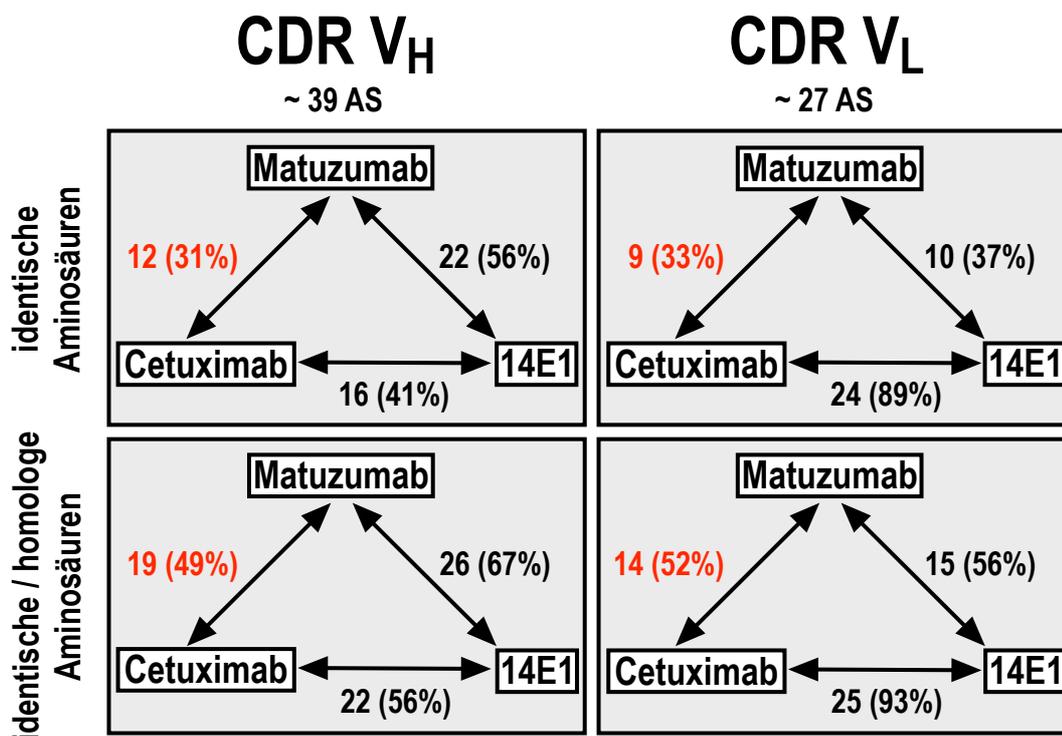


Abb. 3-3: Absolute und prozentuale Sequenzhomologien der Aminosäure-Sequenzen der hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper Cetuximab, Matuzumab und 14E1 anti-EGFR. Aufgrund der Unterschiede der Anzahl der Aminosäuren in den einzelnen ermittelten CDR Sequenzen wurde für die Berechnung der angegebenen prozentualen Werte eine konstante Gesamtzahl der Aminosäuren mit 39 (CDR V_H) bzw. 27 (CDR V_L) zugrunde gelegt.

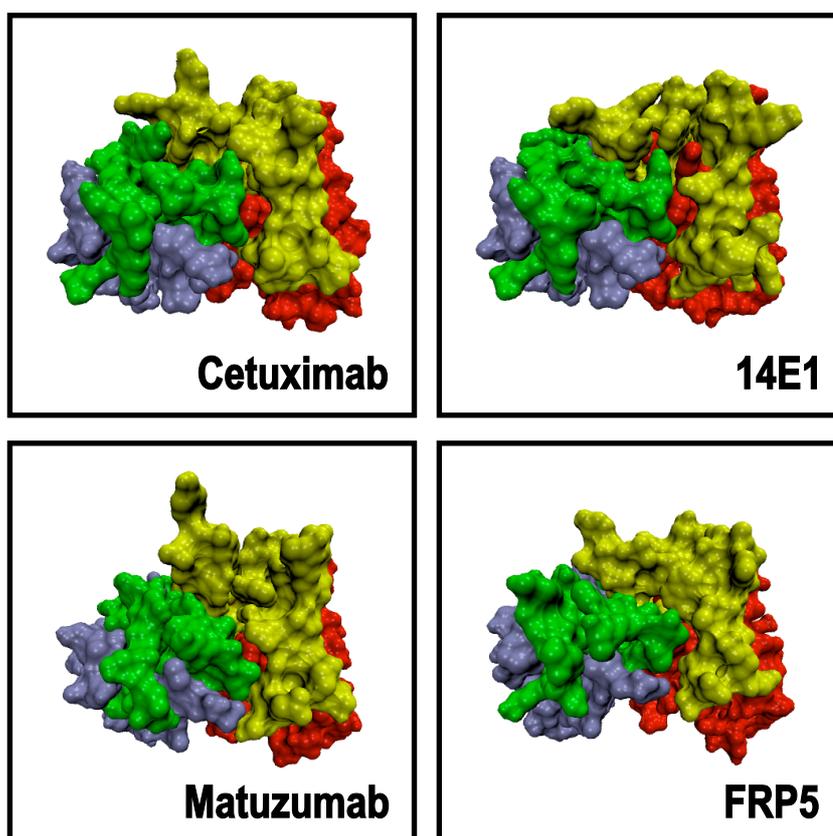


Abb. 3-4: Räumliche Modelle der Fv-Fragmente von Cetuximab, Matuzumab und 14E1 anti-EGFR sowie FRP5 anti-ErbB2. Die Moleküloberfläche der leichten Kette V_L ist in blau, die der schweren Kette V_H ist in rot dargestellt. Die CDR der leichten Kette sind grün und die CDR der schweren Kette sind gelb hervorgehoben. Die Strukturmodelle wurden aus den Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Kette des jeweiligen Antikörpers generiert unter Verwendung des „Web Antibody Modelling“ (WAM) Servers, University of Bath, UK (<http://antibody.bath.ac.uk/refs.html>) und mit dem Computerprogramm „iMol 0.40“ (<http://www.pirx.com/iMol/>) zur Generierung fehlender molekularer Bindungen in den PDB Dateien nachbearbeitet. Die grafische Bearbeitung sowie die Berechnung der Moleküloberfläche erfolgte mit dem Computerprogramm „VMD 1.8.6“ der Theoretical and Computational Biophysics Group, NIH Resource for Macromolecular Modeling and Bioinformatics, University of Illinois (Humphrey *et al.*, 1996; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

3.2.3 Cetuximab und Matuzumab binden an die Ektodomäne III/L2 von EGFR

Zur weiteren Eingrenzung der Lage der Epitope von Cetuximab und Matuzumab an EGFR wurde die Bindung der Antikörper an ein rekombinantes Fragment des Rezeptors untersucht, das der Ektodomäne III/L2 entspricht. Mittels PCR wurde aus einem Konstrukt, das die cDNA des humanen EGFR enthält, das Fragment EGFR308-490 amplifiziert und über die Primer wurden terminale Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NcoI* und *NotI* angefügt. Das PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel mit anschließender Gelextraktion gereinigt und parallel zum Expressionsvektor pIB-Tx mit *NcoI* und *NotI* geschnitten. Nach erneuter Elektrophorese und Gelextraktion wurde das geschnittene PCR-Fragment mit dem Vektor ligiert und die Ligationsansätze wurden zur Amplifikation per Hitzeschock in kompetente *E. coli* XL1-Blue Bakterien transformiert. Das resultierende Konstrukt pIB-Tx-EGFR308-490 (Abb. 3-5A) wurde mittels Miniprep DNA Kit (Qiagen) isoliert, sequenziert und in *E. coli* HB101 Bakterien transformiert.

Bei dem Vektor pIB-Tx handelt es sich um einen vom IPTG-induzierbaren Promoter *lpp-lac* gesteuerten bakteriellen Expressionsvektor. Dieser Vektor bildet die Grundlage für das „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) System (Benhar *et al.*, 2000; siehe 3.4.1) und wurde in dieser Arbeit auch zur Generierung weiterer Konstrukte eingesetzt (siehe 3.3.2). Über *NcoI* und *NotI* im Leserahmen ligierte Proteine werden nach Induktion über IPTG als Fusionsprotein mit dem N-terminalen Signalpeptid und AS 1-9 des reifen Hauptlipoproteins Lpp von *E. coli* sowie einer verkürzten Variante des membrandurchspannenden *E. coli* Außenmembranproteins OmpA₄₆₋₁₅₉ (OmpA') exprimiert. Das Signalpeptid von Lpp steuert das Fusionsprotein zunächst durch bakterielle Transportmechanismen durch die innere Bakterienmembran in das Periplasma, wo sich Lpp und OmpA' in die äußere Bakterienmembran einlagern. Hierdurch wird das Fusionskonstrukt in der äußeren Membran verankert und der zwischen den Restriktionsschnittstellen von *NcoI* und *NotI* gelegene Fusionspartner wird auf der Bakterienoberfläche in das umgebende Medium weisend präsentiert (Abb. 3-5B).

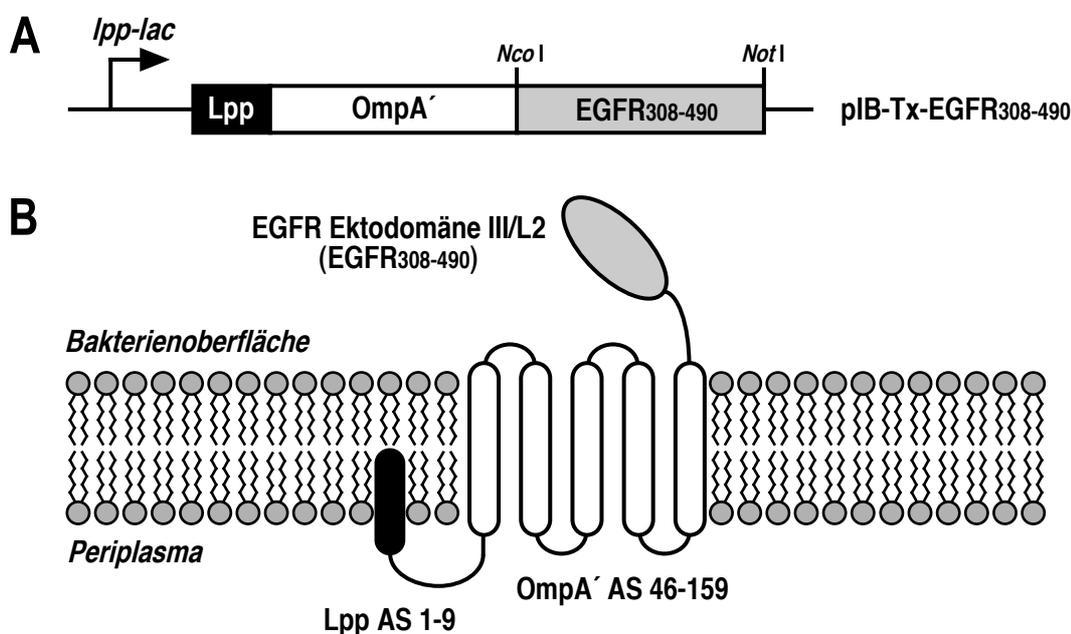


Abb. 3-5: Bakterielle Oberflächenexpression der Ektodomäne III/L2 von EGFR. (A) Der Expressionsvektor pIB-Tx-EGFR308-490. *lpp-lac*: IPTG-induzierbarer bakterieller Promotor; Lpp: Signalpeptid und AS 1-9 des Hauptlipoproteins von *E. coli*; OmpA': AS 46-159 des Außenmembranproteins OmpA von *E. coli* (B) Schematische Darstellung des resultierenden Fusionsproteins in der äußeren Bakterienmembran.

Mit dem Konstrukt pIB-Tx-EGFR308-490 transformierte *E. coli* HB101 sowie als Kontrolle dienende *E. coli* HB101 Wildtyp Bakterien wurden in Schüttelkulturen vermehrt und die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Nach weiteren 60 min Inkubation wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und das Pellet wurde mit PBS gewaschen. In einem Spun Cell ELISA Experiment (Abb. 3-6B; siehe 2.2.13) wurden nun die gewaschenen Bakterien mit den anti-EGFR

Antikörpern Cetuximab bzw. Matuzumab inkubiert, nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-human IgG/HRP Konjugat wurde erneut gewaschen und durch Zugabe der HRP-Substratlösung ABTS (Roche) wurden gebundene Antikörperkomplexe durch Absorptionsmessung der Überstände bei 405 nm nachgewiesen (Abb. 3-6C).

Die auf der Oberfläche exponierte Ektodomäne III/L2 von EGFR wurde sowohl von Cetuximab als auch von Matuzumab erkannt und gebunden. In den Kontrollansätzen (nur Sekundärantikörper bzw. *E. coli* HB101 Wildtyp Bakterien) wurden erwartungsgemäß nur Hintergrundsignale detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Epitope von Cetuximab und Matuzumab in der Ektodomäne III/L2 (EGFR308-490) lokalisiert sind. Diese Daten wurden im Verlauf dieser Arbeit durch die Publikation der Röntgenkristallstrukturen der Komplexe von EGFR mit den Fab-Fragmenten beider Antikörper bestätigt (Li *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2008).

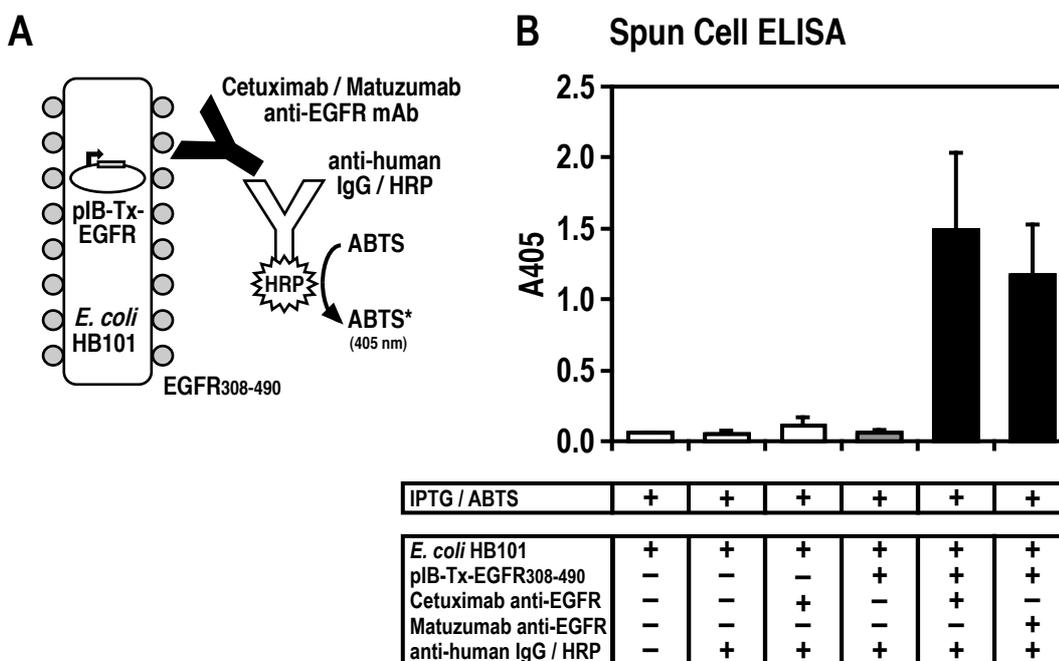


Abb. 3-6: Cetuximab und Matuzumab binden an die Ektodomäne III/L2 von EGFR (Spun Cell ELISA). (A) Schematische Darstellung des Spun Cell ELISA Experimentes (Darstellung mod. nach Hyland, 2003). (B) Cetuximab und Matuzumab binden an die bakteriell exprimierte Ektodomäne III/L2 von EGFR auf der Oberfläche von *E. coli* HB101 Bakterien.

3.3 Experimentelle Strategie und Herstellung der benötigten Konstrukte

3.3.1 Strategie zur Aufklärung der Epitope von Cetuximab und Matuzumab

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Epitope der beiden therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab noch unbekannt. Im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit wurde versucht, über die Selektion von Peptid-Mimotopen mittels klassischem Phage Display Biopanning Hinweise auf die Bindungsstelle von Cetuximab am EGFR zu erhalten (Hartmann, 2002). Eine Screening Strategie, bei der das EGFR Molekül in kleinere, lineare Teile zerlegt, exprimiert und jeweils auf Bindung an den Antikörper untersucht wird, erschien zur Aufklärung eines konformationellen Epitops (siehe 3.2.1) dagegen ungeeignet, da sich ein derartiges Epitop aus räumlich weit voneinander entfernten Aminosäuren vieler verschiedener Bereiche des Proteins zusammensetzen kann. Diese Überlegung führte zu der Entscheidung, die Phage Display Methode zu verwenden, um Peptide zu identifizieren, die die ursprünglichen Epitope der Antikörper am EGFR auf linearen bzw. zyklisch restringierten Peptiden nachbilden (sog. „Mimotope“). Hierzu wurde der monoklonale Antikörper auf einer Polystyrol-Oberfläche immobilisiert bzw. an paramagnetische Beads gekoppelt und mit Phagenbibliotheken inkubiert, in denen sich Bakteriophagen mit an der Oberfläche präsentierten randomisierten Fusionspeptiden befanden. In den dort gewählten Selektionsmethoden diente das komplette Cetuximab Immunglobulin G Molekül als Zielstruktur für die Selektion bindender Fusionspeptide, und es wurde bei den nachfolgenden Analysen festgestellt, dass in den Phagenpools hauptsächlich solche Phagenklone angereichert wurden, deren Fusionspeptide an die konstanten Bereiche von Immunglobulinen binden. Zum Ende der vorangegangenen Diplomarbeit wurden daher erste Experimente unter Verwendung der „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Methode durchgeführt (Benhar *et al.*, 2000; siehe 3.4.1), bei der ein „single-chain“ Antikörperfragment (scFv) des monoklonalen anti-EGFR Antikörpers Cetuximab exprimiert an der Oberfläche von *E. coli* Bakterien als Zielstruktur in Biopannings eingesetzt wurde. Diese Strategie eliminiert die konstanten Bereiche der verwendeten monoklonalen Antikörper und sollte daher das Problem der Anreicherung an diese Sequenzabschnitte bindender Peptide vermeiden (Hartmann, 2002). Aus diesem Grunde wurde eine Variante des „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) in der vorliegenden Arbeit zur Selektion CDR-spezifischer Fusionspeptide aus Phagenbibliotheken verwendet.

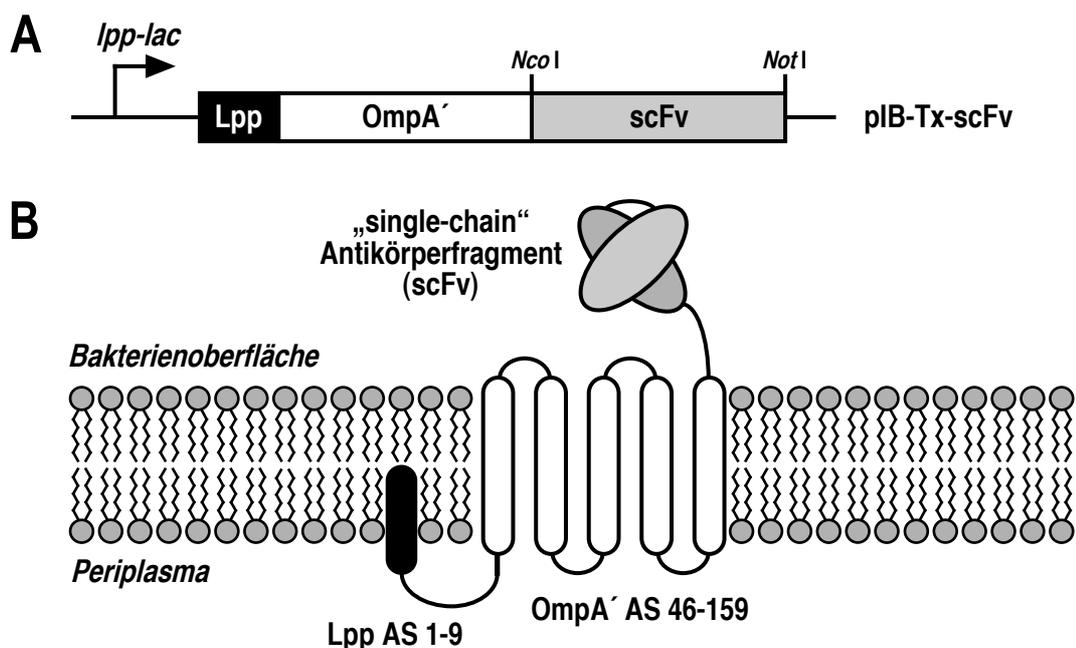


Abb. 3-7: Bakterielle Oberflächenexpression von „single-chain“ Antikörperfragmenten zur Verwendung in DIP Experimenten. (A) Der Expressionsvektor pIB-Tx-scFv. *lpp-lac*: IPTG-induzierbarer bakterieller Promotor; Lpp: Signalpeptid und AS 1-9 des Hauptlipoproteins von *E. coli*; OmpA': AS 46-159 des Außenmembranproteins OmpA von *E. coli*. **(B)** Schematische Darstellung des resultierenden Fusionsproteins in der äußeren Bakterienmembran.

Zur Identifizierung von Mimotopen, die spezifisch mit den hypervariablen Regionen (CDR) von Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren, wurden Expressionsvektoren zur Durchführung von „Delayed Infectivity Panning“ Experimenten mit scFv der anti-EGFR Antikörper konstruiert (siehe 3.3), um aus den Sequenzen der selektierten Fusionspeptide Rückschlüsse auf die Epitope an EGFR ziehen zu können. Grundlage der DIP Methode ist die durch den bakteriellen Expressionsvektor pIB-Tx ermöglichte Expression der gewünschten Zielproteine auf der Oberfläche von *E. coli* Bakterien (Abb. 3-7; vgl. 3.2.3). Entsprechende Konstrukte für die Expression der „single-chain“ Antikörperfragmente von Cetuximab und 14E1 anti-EGFR lagen bereits vor (pIB-Tx-scFv(225) bzw. pIB-Tx-scFv(14E1); Wels *et al.*, unveröffentlicht). Hierbei ist 225 die Bezeichnung des ursprünglichen murinen Antikörpers, aus dem der chimärisierte Antikörper Cetuximab (C225) hervorgegangen ist. V_H und V_L von 225 und Cetuximab sind identisch, da der chimärisierte Antikörper die ursprünglichen murinen variablen Regionen enthält. Ausgehend von der cDNA des Antikörpers Matuzumab (zur Verfügung gestellt von Andree Blaukat, Merck KGaA, Darmstadt) wurde ein „single-chain“ Antikörperfragment von Matuzumab konstruiert, mit dem ein entsprechender Expressionsvektor zur Durchführung von DIP Biopannings erstellt wurde (pIB-Tx-scFv(E72K); siehe 3.3.2). Die Vektoren pIB-Tx-scFv(225) und pIB-Tx-scFv(E72K) wurden verwendet, um *E. coli* Bakterien herzustellen, die die „single-chain“ Antikörperfragmente beider anti-EGFR Antikörper auf der Oberfläche präsentieren (siehe 3.3.3), um damit in mehreren Selektionsrunden von DIP Experimenten CDR-spezifische Peptide aus Phagenbibliotheken zu selektionieren, die aus Peptid-tragenden Bakteriophagen bestehen (siehe 3.4).

3.3.2 Ableitung eines „single-chain“ Antikörperfragmentes von Matuzumab aus cDNA – Konstruktion des Expressionsvektors pIB-Tx-scFv(E72K)

Als Ausgangsmaterial zur Ableitung eines „single-chain“ Antikörperfragmentes von Matuzumab (siehe 2.2.12) dienen die von Andree Blaukat (Merck KGaA, Darmstadt) zur Verfügung gestellten Vektoren p11-SGH γ 1 (V_H cDNA) und p11-311-425 κ (V_L cDNA). Zunächst wurde eine ortsspezifische Mutagenese durchgeführt, um eine endogene *XhoI* Schnittstelle in der cDNA der schweren Kette (V_H) durch eine stumme Mutation zu entfernen. Der resultierende Vektor p11-SGH γ 1(mut) sowie der unmodifizierte Vektor p11-311-425 κ dienen jeweils als Template für PCR Reaktionen, mittels derer die cDNA der jeweiligen Antikörperkette amplifiziert und mit terminalen Schnittstellen für *NcoI* bzw. *NotI* versehen wurde. Zwischen V_H und V_L wurde ein Glycin-Serin-Linker eingeführt. Hierzu wurden die entsprechenden terminalen Oligonukleotid-Primer so gewählt, dass jeweils ein Teil der Linker-Sequenz im jeweils anderen Konstrukt überlappte, um so über ein Aufschmelzen, Mischen, Abkühlen und zwei weitere PCR Reaktionen das „single-chain“ Antikörperfragment scFv(E72K) in V_H-Linker-V_L Orientierung zu erhalten (Abb. 3-8). Das Produkt wurde nach doppeltem Verdau mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NotI* in den analog geschnittenen bakteriellen Expressionsvektor pIB-Tx-scFv(225) ligiert, wodurch das „single-chain“ Antikörperfragment scFv(225) im Leserahmen durch scFv(E72K) ausgetauscht wurde. Abschließend wurde das Konstrukt durch Hitzeschock-Transformation zunächst in *E. coli* XL1-Blue Bakterien amplifiziert, aus diesen isoliert und anschließend durch Sequenzierung der DNA Präparation überprüft. Mit dem resultierenden Expressionsvektor pIB-Tx-scFv(E72K) transformierte *E. coli* HB101 Bakterien wurden dann in Spun Cell ELISA Experimenten auf die Expression des „single-chain“ Antikörpers untersucht (siehe 3.3.3). Diese Bakterien wurden anschließend in „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Phage Display Experimenten eingesetzt (siehe 3.4.1).

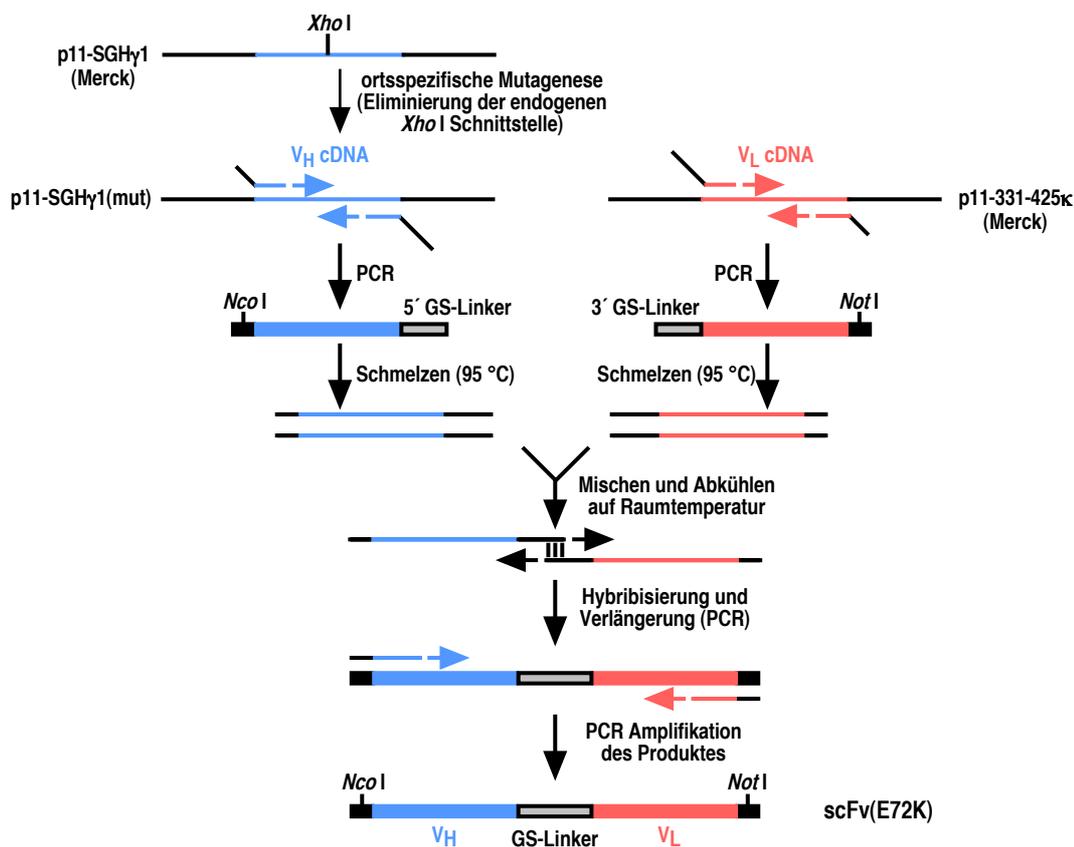


Abb. 3-8: Ableitung des „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) von Matuzumab aus cDNA.

3.3.3 Expression von „single-chain“ Antikörperfragmenten auf der Oberfläche von *E. coli* Bakterien

Kompetente *E. coli* HB101 Bakterien wurden durch Hitzeschock-Transformation mit den DIP Expressionsvektoren pIB-Tx-scFv(E72K), pIB-Tx-scFv(225) und pIB-Tx-scFv(14E1) transformiert und kultiviert. Die Oberflächenexpression der „single-chain“ Antikörperfragmente (scFv) wurde in jeweils einer Kultur durch Zugabe von IPTG induziert, während eine weitere Kultur zur Kontrolle ohne Induktion parallel weitergeführt wurde. Nach dem Ernten und Waschen der Bakterien wurde die Oberflächenexpression der scFv in einem Spun Cell ELISA Experiment untersucht (Abb. 3-9B; vgl. 3.2.3). Der Nachweis erfolgte mit 1:500 verdünntem anti-scFv Serum aus Kaninchen („Max Serum“) als Primärantikörper. Dieses Serum wurde aus einem Immunisierungsexperiment gewonnen, bei dem einem Versuchstier die beiden rekombinanten, gegen EGFR gerichteten Immuntoxine scFv(225)-ETA (Wels *et al.*, 1995; Azemar *et al.*, 2000) und scFv(14E1)-ETA (Schmidt *et al.*, 1997) injiziert worden waren (Wels *et al.*, unveröffentlicht; ETA: AS 252-613 von Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa*). Das anti-scFv Serum wurde vor der Verwendung mit einem Aliquot von *E. coli* HB101 Wildtyp Bakterien vorinkubiert, um gegen Colibakterien gerichtete Antikörper aus dem Serum zu entfernen. Nach den anschließenden Zentrifugations- und Waschschrritten wurden die scFv-exprimierenden Bakterien mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG/HRP-Konjugat zur Detektion gebundener Primärantikörper

inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die HRP-Substratlösung ABTS (Roche) zugegeben. Nach 15 min bei 37°C wurden die Bakterien scharf abzentrifugiert, die Überstände wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 405 nm wurde gemessen.

Die Expression der drei hier überprüften anti-EGFR „single-chain“ Antikörperfragmente konnte in Spun Cell ELISA Experimenten (siehe 2.2.13) nachgewiesen werden, wobei erwartungsgemäß nur nach Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von IPTG signifikante Signale im Vergleich zur *E. coli* HB101 Wildtyp Kontrolle zu detektieren waren (Abb. 3-9C). Trotz Vorinkubation des anti-scFv Serums wurde auf *E. coli* HB101 Wildtyp Bakterien ein deutliches Hintergrundsignal detektiert, die Signale für die induzierten scFv-exprimierenden Kulturen waren jedoch stärker und die gefundenen Unterschiede waren statistisch signifikant (HB101+IPTG / HB101-scFv(E72K/225/14E1)+IPTG, $p < 0,01$; scFv(E72K) / scFv(E72K)+IPTG, $p < 0,1$; scFv(225) / scFv(225)+IPTG, $p < 0,01$; scFv(14E1) / scFv(14E1)+IPTG, $p < 0,1$). Die Detektion des in dieser Arbeit konstruierten „single-chain“ Antikörperfragmentes scFv(E72K) durch anti-scFv Serum ist entweder durch die Anwesenheit von anti-scFv Framework Antikörpern oder durch eine Kreuzreaktion von anti-scFv(225) oder anti-scFv(14E1) Serumantikörpern mit scFv(E72K) zu erklären. Biopanning Experimente nach der DIP Methode wurden im Anschluss mit den hier präparierten und getesteten scFv(E72K)- und scFv(225)-exprimierenden Bakterien durchgeführt (siehe 3.4.1).

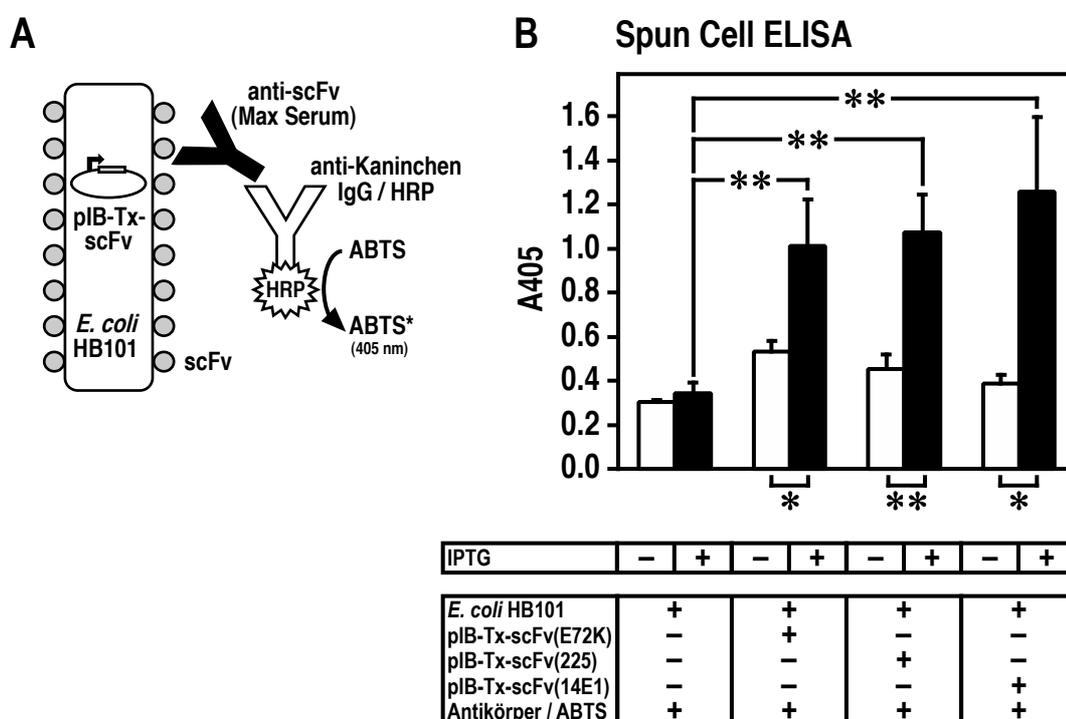


Abb. 3-9: Oberflächenexpression von anti-EGFR scFv nach IPTG-Induktion auf *E. coli* HB101 Bakterien (Spun Cell ELISA). (A) Schematische Darstellung des Spun Cell ELISA Experimentes. (B) Nachweis der Expression der anti-EGFR scFv(E72K), scFv(225) und scFv(14E1) nach IPTG-Induktion an der Oberfläche von *E. coli* HB101 Bakterien im Spun Cell ELISA.

3.4 Selektion von anti-EGFR Antikörper-spezifischen Fusionpeptiden aus M13KE Phagenbibliotheken

3.4.1 Delayed Infectivity Panning (DIP) – Phage Display Biopanning Experimente

Zur Selektion und Anreicherung von Peptiden, die spezifisch mit den hypervariablen Regionen (CDR) der anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren, wurden kommerziell erhältliche Phagenbibliotheken als Ausgangsmaterial verwendet, die genetisch modifizierte M13 Bakteriophagen enthalten (M13KE; New England Biolabs). M13KE Phagen tragen je nach Bibliothek auf ihrer Oberfläche lineare 7mer, lineare 12mer bzw. über eine Disulfidbrücke zwischen zwei flankierenden Cysteinen entstehende zyklische 7mer Peptide mit randomisierter Sequenz. Die Fusionspeptide werden als N-terminale Fusion mit dem Hüllprotein pIII über einen kurzen Glycin-Serin Linker (G_3S) an der Oberfläche präsentiert (Abb. 3-10; siehe 2.1.6).

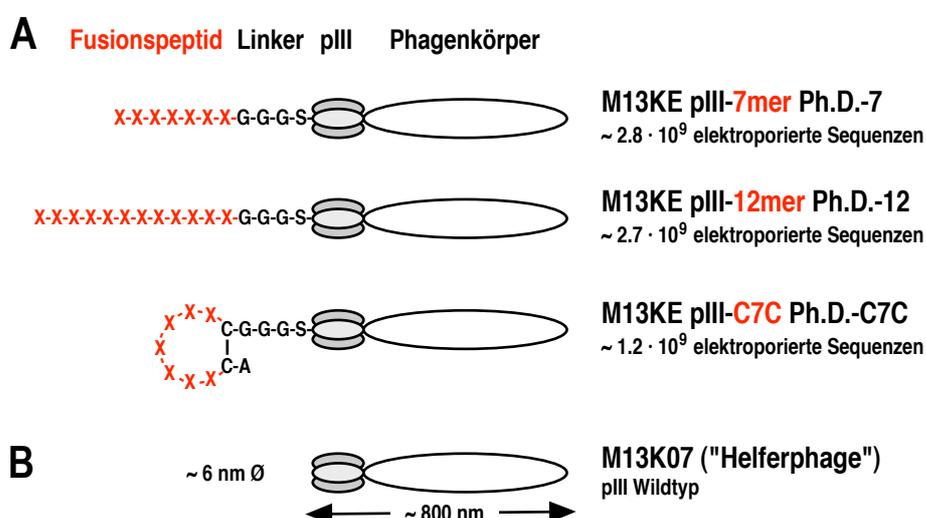


Abb. 3-10: M13KE Phage Display Phagenbibliotheken (New England Biolabs). (A) Die N-terminalen, über einen kurzen Glycin-Serin Linker verknüpften Fusionspeptide mit randomisierter Sequenz sind in rot dargestellt. Im Falle der zyklisch restringierten 7mer Bibliothek (C7C) wird das Fusionspeptid von zwei Cysteinen flankiert, zwischen denen sich eine Disulfidbrücke bildet, ferner befindet sich konstruktionsbedingt ein Alanin am N-Terminus. Die Anzahl der durchschnittlich in den Phagenbibliotheken vorhandenen unterschiedlichen Sequenzen der Fusionspeptide entspricht den Angaben des Herstellers. (B) Der sog. „Helferphage“ M13K07 besitzt identische Oberflächencharakteristika wie M13KE Phagen mit Ausnahme des pIII Fusionspeptides und des Glycin-Serin Linkers, die beim Wildtyp pIII Hüllprotein fehlen.

Zur Selektion solcher Phagenklone mit Fusionspeptiden aus den genannten Bibliotheken, die spezifisch mit den CDR von Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren, wurden „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Experimente durchgeführt. Zur Präsentation der Zielstrukturen wurden *E. coli* HB101 Bakterien eingesetzt, die mit den Vektoren pIB-Tx-scFv(E72K) und pIB-Tx-scFv(225) transformiert waren und nachweislich „single-chain“ Antikörperfragmente der genannten anti-EGFR Antikörper auf der Oberfläche exprimierten (siehe 3.3.3).

In den positiven Selektionsrunden (schematische Darstellung in Abb. 3-11) wurden mit PBS gewaschene Aliquots IPTG-induzierter Kulturen von mit pIB-Tx-scFv(E72K) bzw. pIB-Tx-scFv(225) transformierten *E. coli* HB101 mit den drei hier verwendeten M13KE Phagenbibliotheken inkubiert. Dabei wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers ein konstanter Phagen-Input-Titer von $2 \cdot 10^{11}$ pfu eingesetzt. Die Positivselektion wurde nach dem in Abschnitt 2.2.14 beschriebenen Protokoll durchgeführt und der Phagen-Output-Titer wurde unmittelbar nach der Selektion bestimmt (siehe 2.2.15). Anschließend wurden die Phagen durch Infektion einer Kultur von *E. coli* ER2738 (New England Biolabs) amplifiziert, nach Zentrifugation durch Zugabe von 1/6 Vol. Fällungspuffer (20% (w/v) Polyethylenglykol 8000 / 2,5 M NaCl in dH₂O; pH 7) aus dem Kulturüberstand gefällt und nach Resuspension in der nachfolgenden Negativselektion eingesetzt.

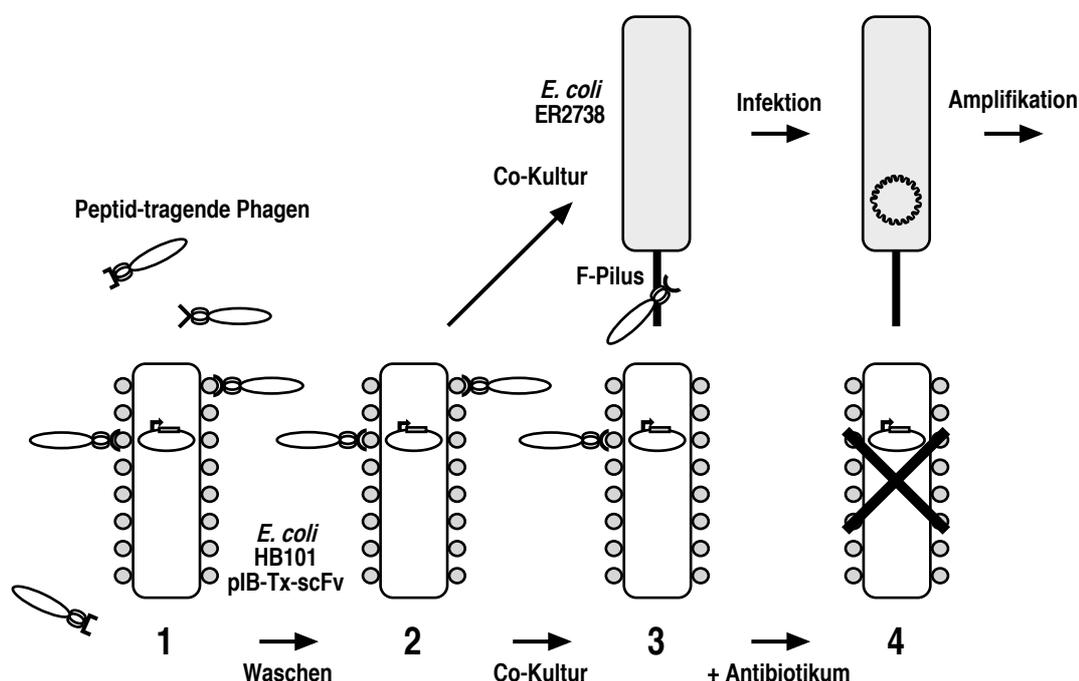


Abb. 3-11: „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) – Positivselektion. (1) In einer Kultur des mit dem bakteriellen Expressionsvektor pIB-Tx-scFv transformierten Bakterienstammes *E. coli* HB101 (untere Reihe) wird durch Zugabe von IPTG die Expression des membranverankerten Fusionsproteins an der Oberfläche induziert. Peptid-tragende Phagenbibliotheken bzw. angereicherte Phagenpools werden zugegeben. Phagenklone, die mit den präsentierten Oberflächenproteinen interagieren, binden an ihr Antigen. (2) In mehreren Waschschritten werden nicht-bindende Phagenklone entfernt. (3) F-Pilus tragende *E. coli* ER2738 Bakterien (obere Reihe) werden zugegeben. In der Mischkultur können die Bakteriophagen diese Bakterien infizieren und ihr einzelsträngiges DNA-Genom in diese Bakterien einbringen. (4) Durch Zugabe des Antibiotikums Tetracyclin, gegen das die antigenpräsentierenden *E. coli* HB101 sensitiv sind, werden diese Bakterien abgetötet. *E. coli* ER2738 Bakterien werden anschließend in Kultur gehalten und amplifizieren so die zuvor selektierten antigenbindenden Phagenklone.

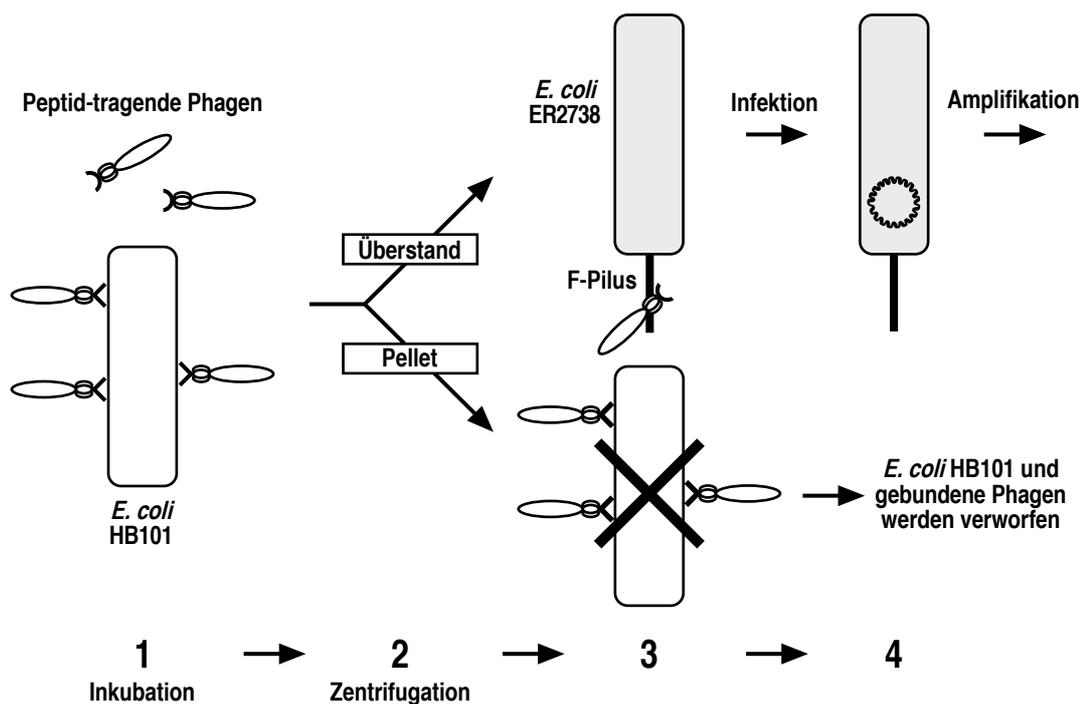


Abb. 3-12: „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) – Negativselektion. (1) *E. coli* HB101 Wildtyp Bakterien werden mit Peptid-tragenden Phagen inkubiert. Phagenklone, deren Fusionspeptide eine Affinität für *E. coli* Oberflächenproteine besitzen, binden an die Bakterien. (2) Nach Zentrifugation werden mit den Phagenklonen, die sich im Überstand befinden, F-Pilus tragende *E. coli* ER2738 Bakterien (obere Reihe) infiziert (3), während das Pellet mit den *E. coli* HB101 Bakterien und den daran haftenden Phagenklonen verworfen wird. (4) *E. coli* ER2738 Bakterien werden anschließend in Kultur gehalten und amplifizieren so die nach der Negativselektion noch vorhandenen Phagenklone.

In den negativen Selektionsrunden (schematische Darstellung in Abb. 3-12) wurden anstelle der scFv-exprimierenden Bakterien nicht-transformierte *E. coli* HB101 Wildtyp Bakterien eingesetzt, um Phagen zu entfernen, die anstelle von scFv-Fragmenten natürliche Oberflächenproteine von *E. coli* binden. Nach Inkubation der Phagenpools mit den Bakterien und anschließender scharfer Zentrifugation wurden die Phagen aus dem Überstand in *E. coli* ER2738 amplifiziert und wie oben beschrieben aus dem Kulturüberstand gefällt. Der Phagentiter wurde bestimmt (siehe 2.2.15), um in der anschließenden, erneuten positiven Selektionsrunde wieder einen konstanten Phagen-Input-Titer einsetzen zu können.

Es wurden drei positive Selektionsrunden und drei negative Selektionsrunden alternierend durchgeführt. Die beobachteten Phagentiter nach den Positivselektionen im Verhältnis zum konstanten Phagen-Input-Titer weisen auf eine erfolgreiche Anreicherung von Phagenklonen hin, die an die bakteriell exprimierten „single-chain“ Antikörperfragmente binden: Das Verhältnis von Phagen-Output-Titer zu Phagen-Input-Titer hatte sich, unabhängig von der scFv Zielstruktur oder der eingesetzten Phagenbibliothek, bereits nach der dritten Positivselektion dem Wert 1 angenähert, was auf eine nahezu vollständige Bindung der eingesetzten Phagenklone an die Zielstrukturen schließen lässt (Abb. 3-13). Von den Agarplatten zur Titerbestimmung nach der dritten Negativselektion wurden aus blauen Pseudoplaques einzelne

Phagenklone gepickt und in separaten Kulturen von *E. coli* ER2738 für nachfolgende Bindungsexperimente amplifiziert (siehe 2.2.15).

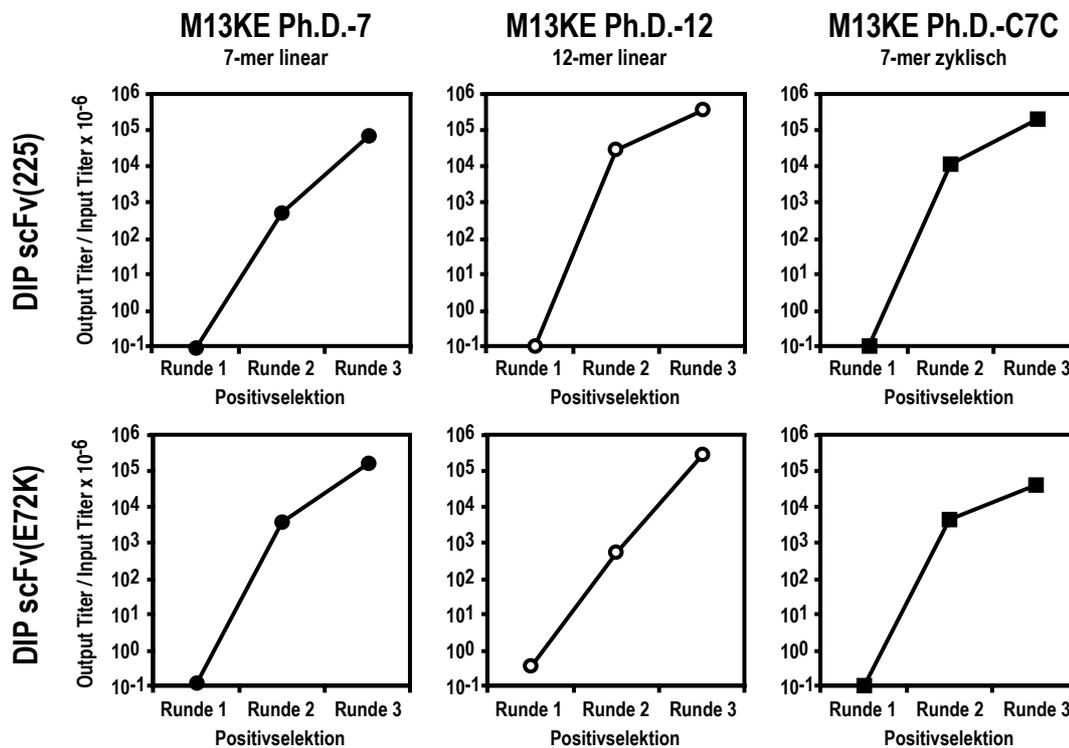


Abb. 3-13: Verlauf des Phagentiters in den positiven Selektionsrunden von DIP Experimenten.

3.4.2 Überprüfung der Bindungsspezifität der Fusionspeptide DIP-selektionierter Phagenklone

Separat amplifizierte M13KE Phagenklone aus den durch „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Biopanning Experimenten angereicherten Phagenpools, die auf Bindung an die „single-chain“ Antikörperfragmente scFv(225) bzw. scFv(E72K) selektioniert waren (siehe 3.4.1), wurden in Phagen ELISA Experimenten auf Bindungsspezifität für die parentalen anti-EGFR Antikörper untersucht. Hierzu wurden die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Matuzumab auf der Polystyrol-Oberfläche der Vertiefungen von 96-well Mikrotiterplatten immobilisiert. Humanes Immunglobulin G aus Serum (Intraglobin F / CP, Biotest AG, Dreieich) diente als unspezifischer Kontrollantikörper. Der Helferphage M13K07, der das Hüllprotein pIII in seiner Wildtyp Form an der Oberfläche trägt, wurde in diesen Experimenten zur Überprüfung der Spezifität der Bindungssignale vermittelt durch die N-terminalen pIII-Fusionspeptide von M13KE Phagen parallel getestet. Neben Tests auf Bindung an den jeweiligen parentalen Antikörper wurden die Phagen auch auf Bindung an den jeweils anderen monoklonalen Antikörper untersucht, um mögliche kreuzreaktive Phagenklone zu identifizieren. Die immobilisierten Antikörper wurden mit den Phagenpräparationen inkubiert und gebundene Phagen wurden mit einem für das Hüllprotein pVIII spezifischen anti-fd Bakteriophagen-Antikörper (Sigma) aus Kaninchen als

Primärantikörper detektiert. Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat, und nach erneutem Waschen die Zugabe der HRP-Substratlösung. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde anschließend in einem Mikrotiterplatten Lesegerät gemessen.

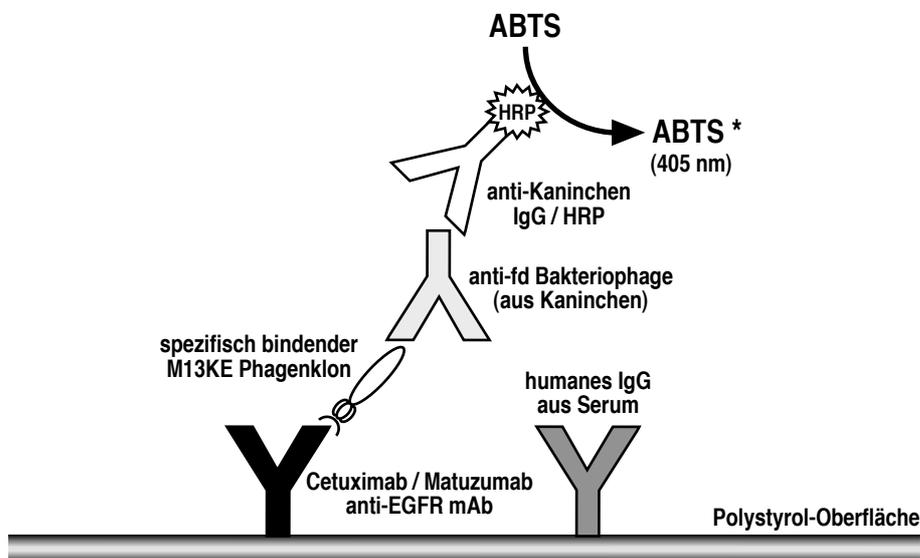


Abb. 3-14: Phagen ELISA Bindungstest von M13KE Phagenklonen an immobilisierte Antikörper (schematisch).

Unabhängig von der Herkunft der Phagen aus den drei hier verwendeten M13KE Phagenbibliotheken (Abb. 3-10) wurden für sämtliche hier getesteten Phagenklone höhere Signale für die spezifische Bindung an den monoklonalen Antikörper gemessen, gegen dessen scFv-Variante die Phagen in DIP Biopanning Experimenten selektioniert worden waren, im Vergleich zur unspezifischen Bindung an humanes IgG aus Serum (Abb. 3-15 und Abb. 3-16). Gezeigt sind nur die Phagen ELISA Bindungsdaten für diejenigen Klone, die in nachfolgenden Experimenten näher untersucht wurden. Für den als Negativkontrolle eingesetzten Helferphagen M13K07, der kein Fusionspeptid am Hüllprotein pIII besitzt, wurden lediglich Hintergrundsignale gemessen. Im Phagen ELISA mit Phagenklonen aus dem scFv(225) DIP Biopanning wurde eine schwache Bindung des Helferphagen M13K07 an Cetuximab detektiert, was jedoch in Experimenten mit Phagenklonen aus dem scFv(E72K) DIP Biopanning nicht wieder auftrat. Die hier gemessenen Signale für die Bindung der getesteten M13KE Phagenklone an die immobilisierten anti-EGFR Antikörper sind daher spezifisch auf die Interaktion der pIII-Fusionspeptide mit den Antikörpern zurückzuführen. Beim Test auf Kreuzreaktivität zeigten einige der hier gezeigten Phagenklone ebenfalls eine signifikant höhere Bindung an den jeweils anderen monoklonalen Antikörper, dessen scFv Variante ihnen in den Selektionsrunden der DIP Experimente nicht als Zielstruktur zur Bindung präsentiert worden war (siehe z.B. M13KE Phagenklon E72.4A in Abb. 3-16). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein überlappendes Epitop für die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab nicht ausgeschlossen werden (die Kristallstrukturen der Antikörper im Komplex mit EGFR waren zu diesem Zeitpunkt der Arbeit noch nicht veröffentlicht).

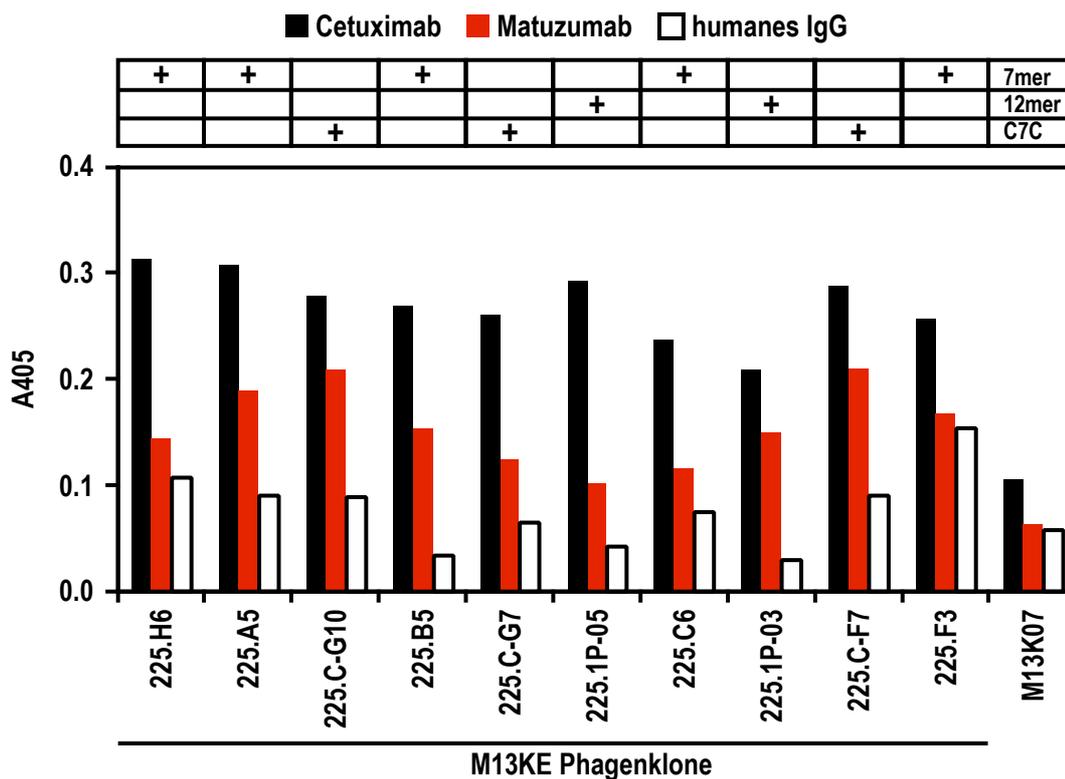


Abb. 3-15: Phagen ELISA Bindungstest von M13KE Phagenklonen aus DIP Experimenten mit scFv(225) als Zielstruktur.

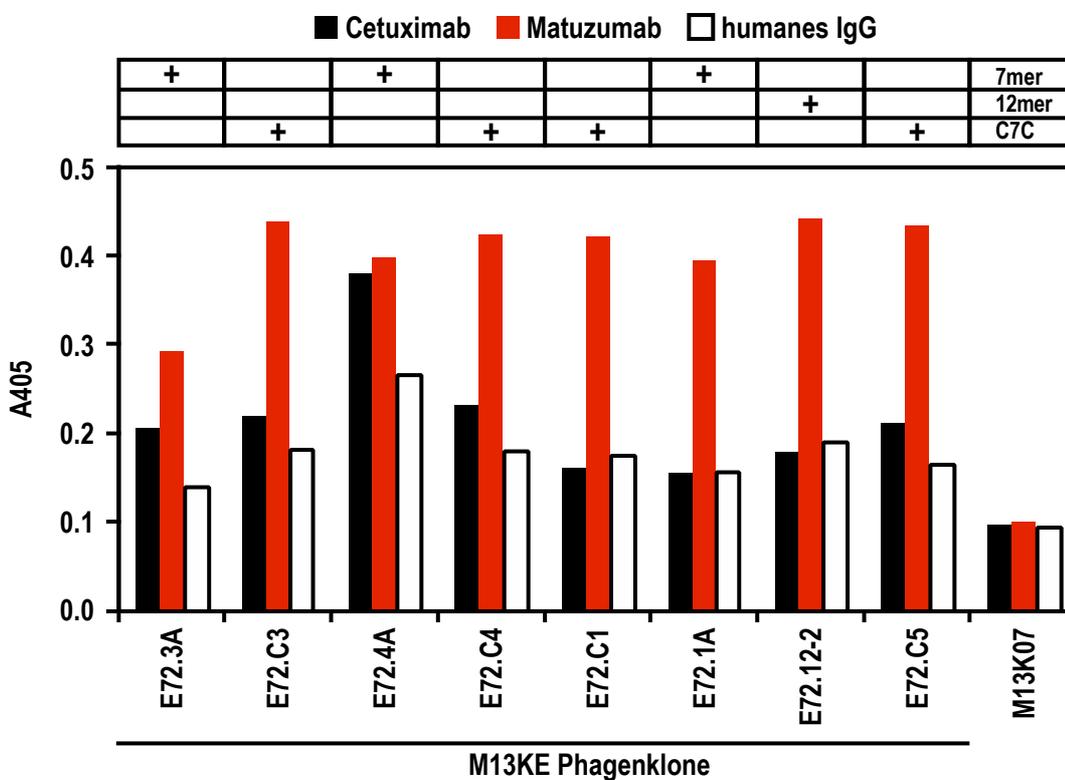


Abb. 3-16: Phagen ELISA Bindungstest von M13KE Phagenklonen aus DIP Experimenten mit scFv(E72K) als Zielstruktur.

Die Ergebnisse der hier gezeigten Phagen ELISA Experimente demonstrieren die erfolgreiche Anreicherung der Phagenpools mit M13KE Klonen, deren pIII-Fusionspeptide spezifisch mit den monoklonalen anti-EGFR Antikörpern Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen früherer Arbeiten, bei denen in klassischen Phage Display Biopannings eine Reihe unspezifischer Immunglobulin G bindender Phagenklone angereichert worden waren (siehe 3.2.4), hat die hier verwendete Selektionsmethode mit bakteriell exprimierten „single-chain“ Antikörperfragmenten in „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Experimenten die Anreicherung spezifisch interagierender Phagenklone ermöglicht. Um Informationen über die Sequenz der pIII-Fusionspeptide der hier getesteten Phagenklone zu erhalten, wurden Präparationen der einzelsträngigen Phagen-DNA aus infizierten *E. coli* ER2738 Bakterien isoliert und sequenziert (siehe 3.4.3).

3.4.3 Sequenzanalyse der Fusionspeptide der getesteten Phagenklone

Die Analyse der durch Sequenzierung von Phagen ssDNA ermittelten Sequenzen der pIII-Fusionspeptide der in Phagen ELISA Experimenten getesteten Phagenklone (siehe 3.4.2) ließ die Ableitung einer eindeutigen Consensus Sequenz für mit Cetuximab bzw. Matuzumab interagierende Peptide nicht zu. Auch der Vergleich der Sequenzen mit bereits publizierten, mit dem Antikörper Cetuximab interagierenden Peptiden (Riemer *et al.*, 2005) ergab keine unmittelbar erkennbaren Übereinstimmungen. Ein näherer manueller Abgleich ergab jedoch, dass die Sequenzen einiger der getesteten Phagenklone kurze gemeinsame Sequenzmotive aufwiesen. Diese gemeinsamen Sequenzmotive wurden in den Fusionspeptiden von Phagenklonen gefunden, die aus den drei verwendeten Phagenbibliotheken stammten, unabhängig von dem als Zielstruktur verwendeten „single-chain“ Antikörperfragment scFv(225) bzw. scFv(E72K). Die Sequenzen der Fusionspeptide der M13KE Phagenklone, auf welche diese Beobachtungen zutreffen, sind in Tab. 3-17 gezeigt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Sequenzen in der Abbildung derart dargestellt, dass die innerhalb dieser Peptidsequenzen identifizierten Motive vertikal untereinander angeordnet sind. Ferner wurde festgestellt, dass sich die Sequenzmotive KTL bzw. YPLG in der Sequenz der pIII-Fusionspeptide mehrfach in Klonen aus unterschiedlichen Phagenbibliotheken wiederfanden (Tab. 3-17). Aus einem Abgleich der hier gezeigten Peptidsequenzen mit der linearen Aminosäuresequenz des humanen EGFR wurden allerdings keine offensichtlichen Übereinstimmungen ersichtlich. Dies war jedoch auch nicht unbedingt zu erwarten, da es sich bei den selektierten Peptiden potentiell um Mimotope handelt, die diskontinuierliche, konformationelle Epitope nachbilden, die von den Antikörpern Cetuximab bzw. Matuzumab erkannt werden (siehe 3.2.1; Abb. 3-1).

Zielstruktur	Bibliothek	Bezeichnung	Sequenz des pIII-Fusionspeptides	Spezifitätsindex*
scFv(225)	M13KE-7mer	225.H6	TLLPSRV	-GGGS 2,925
scFv(225)	M13KE-7mer	225.A5	SFKPSIP	-GGGS 3,374
scFv(225)	M13KE-C7C	225.C-G10	A- CKPLPVWKC	-GGGS 3,124
scFv(225)	M13KE-7mer	225.B5	DYLPVWT	-GGGS 7,941
scFv(225)	M13KE-C7C	225.C-G7	A- CQTVKTLRC	-GGGS 4,078
scFv(225)	M13KE-12mer	225.1P-05	HESKTLNITTWG	-GGGS 6,952
scFv(225)	M13KE-7mer	225.C6	AKTQPIIS	-GGGS 3,160
scFv(225)	M13KE-12mer	225.1P-03	TSQLTFYPLGNM	-GGGS 6,933
scFv(225)	M13KE-C7C	225.C-F7	CQSFPLPEC	-GGGS 3,200
scFv(225)	M13KE-7mer	225.F3	FPLQLRA -GGGS	1,669
scFv(E72K)	M13KE-7mer	E72.3A	VLPKTLIC	-GGGS 2,101
scFv(E72K)	M13KE-C7C	E72.C3	A-CDVLPKTLIC	-GGGS 2,420
scFv(E72K)	M13KE-7mer	E72.4A	YPLGHQC -GGGS	1,496
scFv(E72K)	M13KE-C7C	E72.C4	A- CKYPLGHQC -GGGS	2,369
scFv(E72K)	M13KE-C7C	E72.C1	A-CINPLKRIC	-GGGS 2,425
scFv(E72K)	M13KE-7mer	E72.1A	NPLKRIS	-GGGS 2,532
scFv(E72K)	M13KE-12mer	E72.12-2	EYSPKRLMMFN	-GGGS 2,339
scFv(E72K)	M13KE-C7C	E72.C5	A- CYSRYPHC	-GGGS 2,630

Tab. 3-17: Sequenzanalyse der pIII-Fusionspeptide von mit den Antikörpern Cetuximab und Matuzumab anti-EGFR interagierenden M13KE Phagenklonen (Auswahl). Eine Consensus Sequenz ließ sich aus den hier gezeigten Sequenzen nicht ermitteln, es wurden jedoch Phagenbibliotheks- und Zielstruktur übergreifende kurze gemeinsame Sequenzmotive gefunden (zur einfacheren Identifizierung farblich hervorgehoben), wobei die Motive KTL und YPLG bei denjenigen Phagenklonen auftraten, bei denen die Bindungsdaten aus Phagen ELISA Experimenten eine signifikante Kreuzreaktivität zu beiden anti-EGFR Antikörpern vermuten ließ (siehe 3.4.2). Bei Klonen, die aus der zyklisch restringierten 7mer Phagenbibliothek stammen, sind die flankierenden Cysteine sowie das N-terminale Alanin in der Sequenz ebenfalls angegeben. (*) Der Spezifitätsindex gibt den Quotienten des für den jeweiligen M13KE Phagenklon in Phagen ELISA Experimenten gemessenen Bindungssignals für den parentalen anti-EGFR mAb im Verhältnis zu humanem IgG aus Serum (Negativkontrolle) an.

Aus den gezeigten Sequenzinformationen und Phagen ELISA Daten (siehe 3.4.2) war nicht ersichtlich, ob die hier nachgewiesene selektive Bindung der Peptide an die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab auf Interaktion mit den hypervariablen Regionen (CDR) der Immunglobuline oder Bereichen der an der Antigenbindung nicht beteiligten konstanten „framework“ Regionen der Antikörper zurückzuführen ist. Von sogenannten Mimotopen, die die diskontinuierlichen, konformationellen Epitope dieser Antikörper (siehe 3.2.1) in Form linearer oder zyklischer Peptide nachahmen, wäre eine derartige CDR-spezifische Interaktion jedoch zu erwarten. Um die Spezifität der pIII-Fusionspeptide der hier gezeigten Phagenklone für die hypervariablen Regionen (CDR) der monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab zu untersuchen, und darüber hinaus die Relevanz der ermittelten Sequenzmotive bewerten zu können, wurden die hier gezeigten Phagenklone in Wettbewerbsstudien näher untersucht (siehe 3.5).

3.5 Wettbewerbsstudien zur Bestätigung der Bindungsspezifität selektionierter Peptide

3.5.1 Untersuchungen zur Antikörper-Kompetition mittels ELISA

M13KE Phagenklone aus „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Experimenten, die im Phagen ELISA selektive Bindung an die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab zeigten (siehe 3.4.2), wurden auf ihre Fähigkeit, die Antikörperbindung an EGFR-exprimierende Zellen zu blockieren, untersucht. Hierzu wurde zunächst versucht, Wettbewerbsassays im ELISA Format zu etablieren (Abb. 3-18), bei denen EGFR-exprimierende Renca-lacZ/EGFR Zellen bzw. Renca-lacZ Kontrollzellen in Mikrotiterplatten kultiviert wurden. Diese Zellen wurden entweder direkt mit den anti-EGFR Antikörpern, oder mit denselben Antikörpern nach Vorinkubation mit den zu testenden M13KE Bakteriophagen inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte der Nachweis gebundener anti-EGFR Antikörper durch den Sekundärantikörper anti-human IgG/HRP Konjugat, gefolgt von einem weiteren Waschschrift und der Zugabe der HRP-Substratlösung ABTS (Roche). Die Messung der Absorption bei 405 nm erfolgte in einem Mikrotiterplatten Lesegerät. Im Falle von Konkurrenz der Antikörperbindung (Abb. 3-18B) wäre eine geringere Bindung der anti-EGFR Primärantikörper, der Verlust der Phagen/Antikörper-Komplexe während des nachfolgenden Waschschriftes und somit schließlich eine Reduktion des gemessenen Signals im Vergleich zur nicht kompetierten Bindung der gleichen Menge des Primärantikörpers (Abb. 3-18A) zu erwarten.

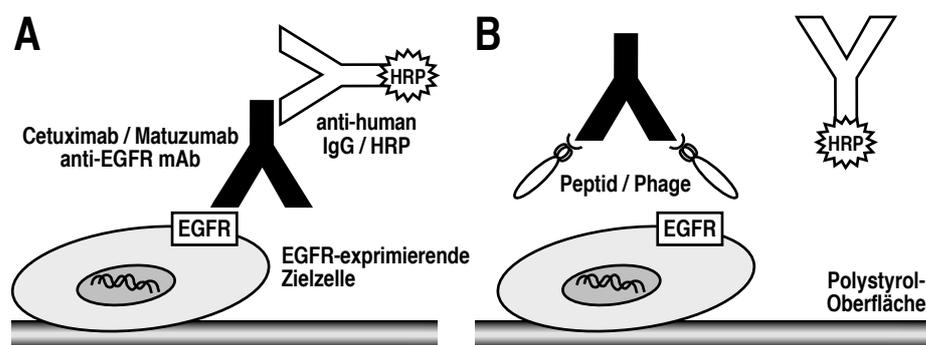


Abb. 3-18: ELISA zur Untersuchung der Konkurrenz von anti-EGFR Antikörpern durch selektiv bindende M13KE Phagenklone bzw. Peptide (schematisch). (A) In Abwesenheit von Konkurrent können anti-EGFR Antikörper ungehindert an das Antigen EGFR binden. (B) Die Bindung spezifischer, mit den hypervariablen Regionen (CDR) der anti-EGFR Antikörper interagierender Peptid-tragender Phagen konkurriert die Bindung des Antikörpers an das Antigen EGFR und reduziert dadurch das gemessene Bindungssignal.

In keinem dieser Ansätze konnte jedoch eine Reduktion der gemessenen Absorptionssignale und damit eine Konkurrenz der monoklonalen anti-EGFR Antikörper nachgewiesen werden. In einigen Fällen wurde eine leichte Reduktion der anti-EGFR Antikörperbindung nach Zugabe von Peptid-tragenden Phagen festgestellt, diese war jedoch minimal und statistisch nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). Diese experimentellen Beobachtungen deuteten zunächst darauf hin, dass keines der getesteten pIII-Fusionspeptide im Phagenkontext in der Lage war, die Bindung der Antikörper zu konkurrieren. Für ein Peptid, das mit den für die Antigenbindung kritischen hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper

interagiert, wäre ein solcher Effekt jedoch zu erwarten. Allerdings bestand die Möglichkeit, dass die Affinitäten der Peptide für die Antikörper für die Detektion einer Konkurrenz in diesem Assay zu gering waren. Bedingt durch die nach Fällung der Phagenpartikel mit Fällungslösung (Polyethylenglykol / Natriumchlorid) erreichbaren Titer und die geringen maximal einsetzbaren Volumina in diesen Experimenten ist die einsetzbare Menge des potentiellen Konkurrenten zudem stark limitiert. Daher wurde ein alternatives Assay entwickelt, um die gleiche experimentelle Fragestellung nach der Konkurrenzfähigkeit der Peptide im Phagenkontext mit weitaus höherer Sensitivität zu untersuchen. Basis für dieses Assay ist die hohe Empfindlichkeit von Zielzellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von gerichteten Immuntoxinen (siehe 3.5.2).

3.5.2 Untersuchungen zur Immuntoxin-Konkurrenz mittels MTT-Zytotoxizitätsassays

Die Fähigkeit der pIII-Fusionspeptide der auf anti-EGFR Antikörperbindung selektierten M13KE Phagenklone, mittels ihres pIII-Fusionspeptides an die hypervariablen Regionen (CDR) solcher Antikörper zu binden, wurde in einem MTT-Zytotoxizitätsassay unter Einsatz des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA überprüft. In diesem Molekül ist die Zellbindungsdomäne Ia des bakteriellen Toxins Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* durch das „single-chain“-Antikörperfragment des monoklonalen anti-EGFR Antikörpers Cetuximab ersetzt (Wels *et al.*, 1995; Azemar *et al.*, 2000). Hierdurch wird eine selektive Bindung an EGFR-exprimierende Zellen sichergestellt. Geringe Mengen dieses Toxins sind hinreichend, um nach Endozytose und Translokation des Moleküls in das Zytoplasma (Ogata *et al.*, 1992) durch Inhibierung der Translation eine Zielzelle abzutöten (Abb. 3-19A; Thorburn *et al.*, 2004). Vorteile dieses Assays sind die hohe Sensitivität und die Möglichkeit, im Vergleich zu vorangegangenen Konkurrenzexperimenten im ELISA Format (siehe 3.5.1) eine deutlich höhere Phagen- bzw. Peptidkonzentration einsetzen zu können (ca. 1.000-facher molarer Überschuss im MTT-Assay gegenüber ca. 10-facher molarer Überschuss im ELISA).

Peptide, die mit den CDR der scFv(225) Zellbindungsdomäne des Immuntoxins scFv(225)-ETA interagieren, verhindern die Bindung des Immuntoxins an EGFR, wodurch die Zelle überleben kann (Abb. 3-19B). Diejenigen M13KE Phagenklone, deren Fusionspeptide kurze gemeinsame Sequenzmotive aufweisen (Tab. 3-17), wurden in MTT-Zytotoxizitätsassays auf Blockade der Immuntoxinbindung an EGFR-exprimierende Renca-lacZ/EGFR untersucht. Als Kontrolle dienten Renca-lacZ Zellen, die den humanen EGFR nicht exprimieren, sowie das gegen die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 gerichtete Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA (Wels *et al.*, 1992; Wels *et al.*, 1995; Maurer-Gebhard *et al.*, 1998). In diesen Experimenten konnte darüber hinaus die in Phagen ELISA Experimenten beobachtete partielle Kreuzreaktivität einiger der gegen scFv(E72K) selektierten Peptide mit Cetuximab überprüft werden, da es sich bei der zu konkurrierenden Zellbindungsdomäne des eingesetzten Immuntoxins scFv(225)-ETA um das „single-chain“-Antikörperfragment dieses anti-EGFR Antikörpers handelt.

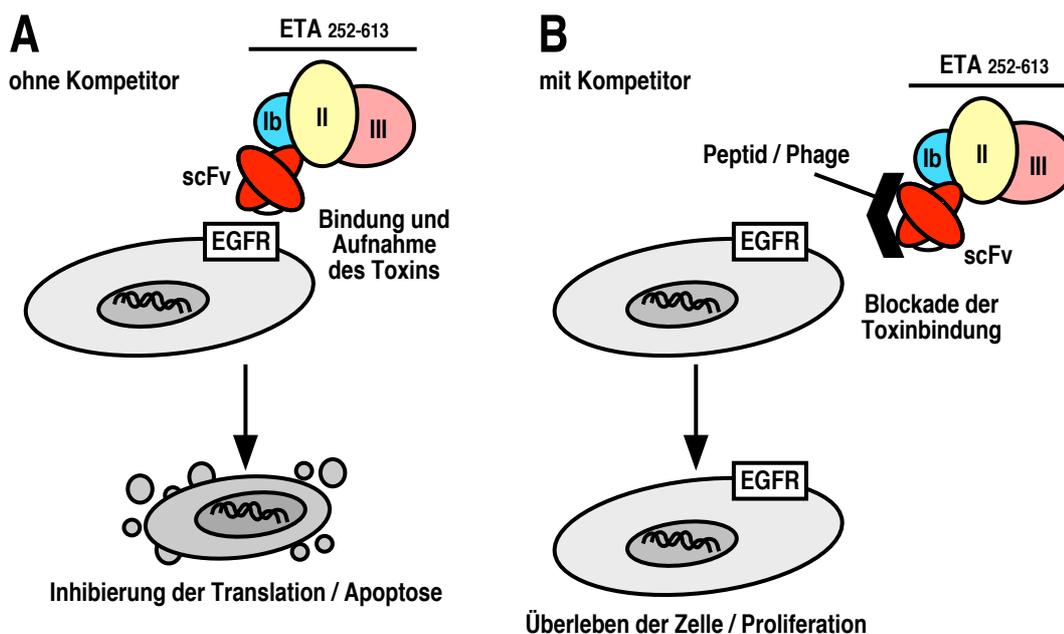


Abb. 3-19: MTT-Zytotoxizitätsassay zur Untersuchung der Konkurrenz von anti-EGFR Antikörpern durch selektiv bindende M13KE Phagenklone bzw. Peptide (schematisch). (A) Bei ungehinderter Bindung der gegen EGFR gerichteten Bindungsdomäne an den Rezeptor folgt die Aufnahme des Immuntoxins durch Endozytose, was schließlich vermittelt durch die Exotoxin A Effektordomäne zur Inhibierung der Translation und damit zum Abtöten der Zielzelle führt. (B) Durch die Blockade der Zellbindung des Immuntoxins durch einen Inhibitor (Peptid) wird die Aufnahme des Immuntoxins verhindert und die Zielzelle überlebt. EGFR = humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor; scFv = „single-chain“ Antikörperfragment; ETA = verkürzte Variante des Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (ETA AS 252-613) mit den Domänen Ib (C-terminaler Teil der Zellbindungsdomäne), II (Translokationsdomäne) und III (enzymatische Domäne).

Als mögliche Kompetitoren der Bindung des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA wurden die in Tab. 3-17 gezeigten M13KE Phagenklone aus DIP Biopannings gegen scFv(225) bzw. scFv(E72K) sowie der Helferphage M13K07 als Negativkontrolle und der monoklonale anti-EGFR Antikörper Cetuximab (1 µg/ml) als Positivkontrolle eingesetzt. Auf beschichteten 96-well Mikrotiterplatten wurden Renca-lacZ/EGFR bzw. Renca-lacZ/ErbB2 Zellen ausgesät und nach Anheften der Zellen mit den Immuntoxinen, mit oder ohne Vorinkubation mit einem Überschuss der Kompetitoren, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für weitere 40 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, und nach Zugabe von MTT und Komplettlyse der Zellen wurde die Absorption des gebildeten Formazan Salzes bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

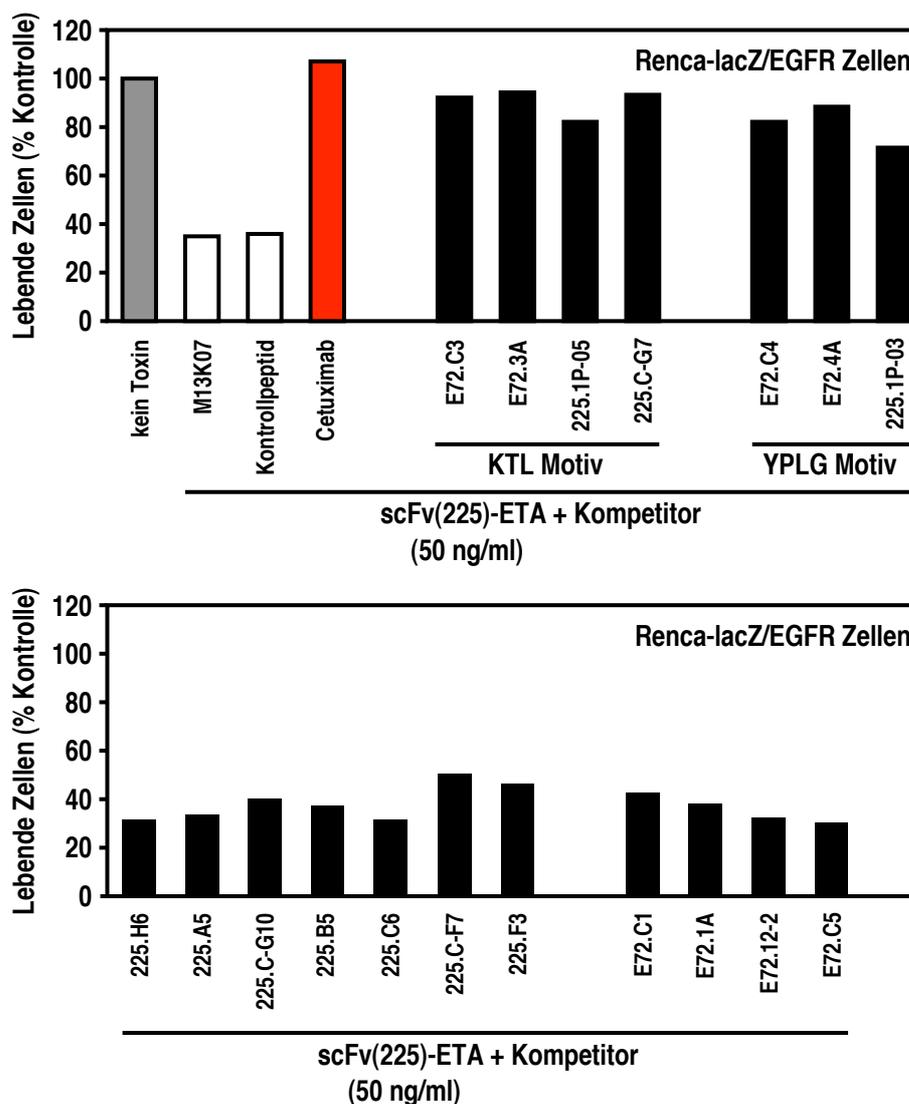


Abb. 3-20: MTT-Zytotoxizitätsassay von Renca-lacZ/EGFR Zellen, die mit dem Immuntoxin scFv(225)-ETA behandelt wurden – Test von selektionierten M13KE Phagenklonen als Kompetitoren. Der parentale anti-EGFR Antikörper Cetuximab wurde als Positivkontrolle zur Konkurrenz der Zellbindungsdomäne von scFv(225)-ETA eingesetzt. M13K07 Helferphagen ohne Fusionspeptid sowie das irrelevante Kontrollpeptid **SFLQDIQEV** wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Für Fusionspeptide mit den kurzen Sequenzmotiven KTL bzw. YPLG wurde Konkurrenz der Bindung des Immuntoxins beobachtet (obere Reihe). Die übrigen getesteten Peptide zeigen keine Konkurrenz des Immuntoxins (untere Reihe).

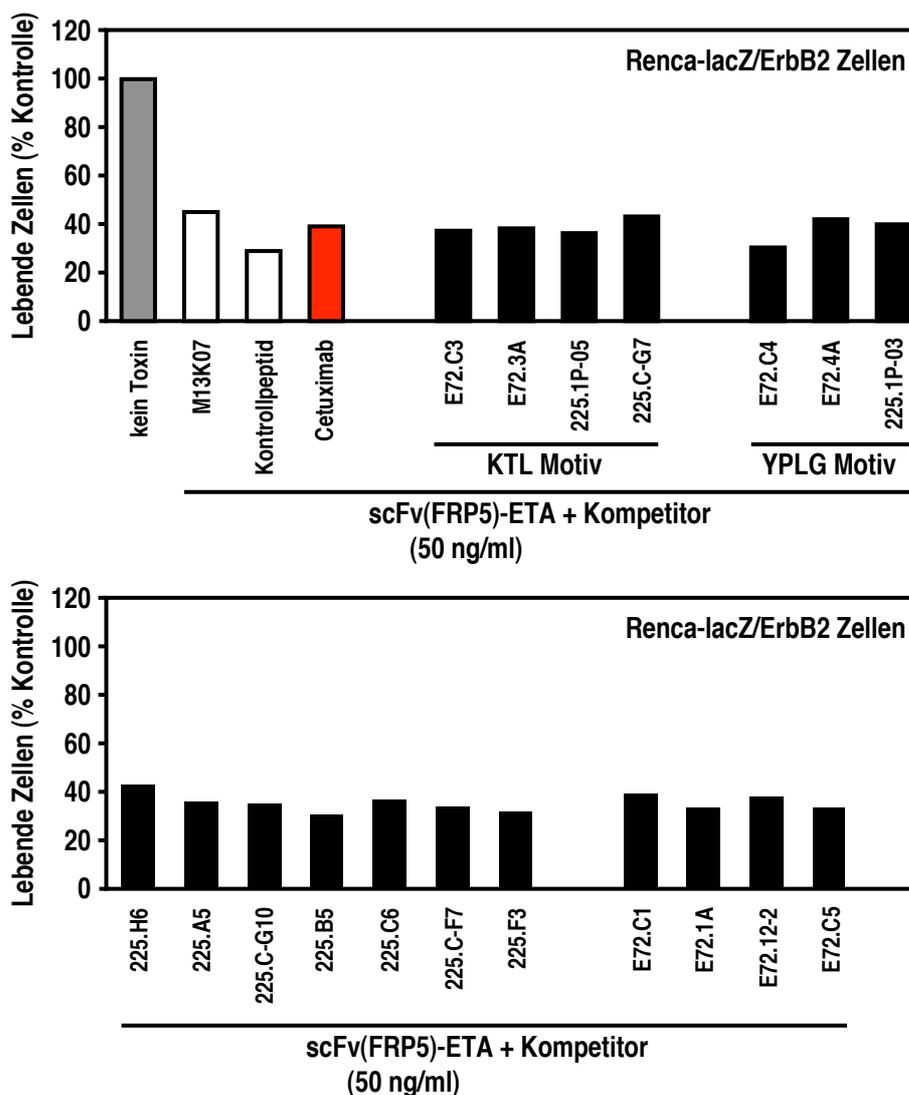


Abb. 3-21: MTT-Zytotoxizitätsassay von Renca-lacZ/ErbB2 Zellen, die mit dem Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA behandelt wurden – Test von selektionierten M13KE Phagenklonen als Kompetitoren (Kontrollexperiment). M13K07 Helferphagen ohne Fusionspeptid sowie das irrelevante Kontrollpeptid **SFLQDIQEV** wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Wie erwartet konnten weder der Antikörper Cetuximab noch die getesteten Phagenklone die Bindung des ErbB2-spezifischen Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA kompetieren.

Die gemessenen Signale für mit PBS behandelte Zellen (kein Toxin) wurde als Referenz für 100% lebende Zellen, eine Absorptionskontrolle ohne Zellen wurde als Referenzwert für 0% lebende Zellen definiert, und die übrigen Messwerte wurden entsprechend prozentual in Relation zu diesen Referenzwerten gesetzt. Der Anteil der lebenden Zellen bei Inkubation von Renca-lacZ/EGFR bzw. Renca-lacZ/ErbB2 Zellen mit 50 ng/ml Immuntoxin lag zwischen 30% und 40%, wenn M13K07 Helferphage bzw. das irrelevante Kontrollpeptid **SFLQDIQEV** als Kompetitoren eingesetzt wurden (Abb. 3-20 und Abb. 3-21). Erwartungsgemäß wurde die Bindung von scFv(225)-ETA an Renca-lacZ/EGFR, nicht jedoch die Bindung von scFv(FRP5)-ETA an Renca-lacZ/ErbB2 Zellen beim Einsatz eines Überschusses des monoklonalen Antikörpers Cetuximab verhindert. Ein Überleben aller Zellen wurde in dieser Probe beobachtet.

Der überwiegende Anteil der getesteten M13KE Phagenklone zeigte keine oder eine nicht signifikante Konkurrenz der Wirkung des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA (Abb. 3-20, untere Reihe). Dies zeigt, dass die Bindung der Fusionspeptide dieser Phagenklone an das „single-chain“-Antikörperfragment von Cetuximab die Interaktion der hypervariablen Regionen (CDR) der Zellbindungsdomäne mit EGFR nicht beeinflusst. Hieraus lässt sich schließen, dass die für diese Phagenklone in Phagen ELISA Experimenten (siehe 3.4.2) beobachtete Affinität zu Cetuximab auf der Bindung an andere Bereiche des Antikörpers beruht, was die Antigenbindung jedoch nicht beeinflusst. Diejenigen Phagenklone, deren pIII-Fusionspeptide die Sequenzmotive KTL bzw. YPLG aufweisen (E72.C3, E72.3A, 225.1P-05, 225.C-G7, E72.C4, E72.4A, 225.1P-03; vgl. Tab. 3-17), zeigten jedoch in diesen Experimenten eine deutliche Protektion von Renca-lacZ/EGFR Zellen bei Einsatz als Kompetitor der Bindung des Immuntoxins scFv(225)-ETA an EGFR (70% bis 100% Überleben der Zellen im Vergleich zur mit PBS behandelten Referenz; Abb. 3-20, obere Reihe). Diese Beobachtungen bestätigten die in Phagen ELISA Experimenten (siehe 3.4.2) beobachtete Kreuzreaktivität derjenigen Phagenklone mit KTL bzw. YPLG Motiven mit Cetuximab, die in DIP Biopanning Experimenten auf Affinität zum „single-chain“-Antikörperfragment scFv(E72K) von Matuzumab selektiert worden waren (E72.C3, E72.3A, E72.C4, E72.4A; siehe 3.4.1 und 3.4.2). Die Konkurrenz der Bindung von scFv(225) an EGFR in diesem Experiment ist spezifisch, denn in dem Kontrollansatz, in dem Renca-lacZ/ErbB2 Zellen mit dem gegen ErbB2 gerichteten Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA behandelt wurden, zeigte keiner der getesteten Phagenklone eine protektive Wirkung als Kompetitor (Abb. 3-21). Auf Basis der bis hierher gesammelten Daten zur Konkurrenz von anti-EGFR Antikörpern durch Peptide mit KTL bzw. YPLG Motiven wurden zwei dieser Peptide für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt (siehe 3.7).

3.6 Zusammenfassung der Abschnitte 3.1 bis 3.5

In Immunoblot Experimenten konnte gezeigt werden, dass die zur Tumortherapie eingesetzten anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) in Lysaten EGFR-exprimierender Tumorzellen erkennen und dabei an nicht-lineare, konformationelle Epitope binden (siehe 3.2.1). Ein Vergleich der Primärsequenzen der hypervariablen Regionen sowie der Strukturen von computergenerierten Modellen der F_v-Fragmente von Cetuximab und Matuzumab (siehe 3.2.2) lieferte keine offensichtlichen Hinweise darauf, dass die beiden Antikörper ein ähnliches bzw. überlappendes Epitop am EGFR erkennen. In Spun Cell ELISA Experimenten wurde Bindung der Antikörper an die mittels des „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Vektorsystems pIB-Tx auf *E. coli* HB101 exprimierte Ektodomäne III/L2 von EGFR nachgewiesen (siehe 3.2.3). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den mittlerweile publizierten Röntgenkristallstrukturen, die die Bindung der Fab-Fragmente von Cetuximab bzw. Matuzumab an diese Domäne von EGFR zeigen.

Zur Anreicherung von Peptid-tragenden M13KE Bakteriophagen aus den drei hier verwendeten Phagenbibliotheken in „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Experimenten wurde zunächst ein „single-chain“ Antikörperfragment aus der cDNA von Matuzumab konstruiert und in den DIP Vektor pIB-Tx kloniert (siehe 3.3.1). Mit dem resultierenden Konstrukt pIB-Tx-scFv(E72K) bzw. dem bereits vorhandenen analogen Konstrukt pIB-Tx-scFv(225), welches das „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab enthält, wurden *E. coli* HB101 Bakterien transformiert, um die durch IPTG induzierbare, bakterielle Oberflächenexpression dieser Antikörperfragmente zum Einsatz in Biopannings zu erreichen (siehe 3.3.2). Diese Bakterien wurden nachfolgend in DIP Experimenten eingesetzt, um aus M13KE Phagenbibliotheken (lineare 7mer, lineare 12mer, zyklische 7mer pIII-Fusionspeptide; New England Biolabs) Phagenklone mit pIII-Fusionspeptiden zu isolieren, die selektiv an die „single-chain“ Antikörperfragmente von Cetuximab bzw. Matuzumab binden (siehe 3.4.1). In Phagen ELISA Experimenten wurden M13KE Einzelklone auf Bindung an die immobilisierten monoklonalen Antikörper Cetuximab und Matuzumab getestet (siehe 3.4.2). Aus allen eingesetzten Bibliotheken konnten Phagen mit Fusionspeptiden isoliert werden konnten, die an den jeweiligen parentalen Antikörper des zur Selektion eingesetzten „single-chain“ Antikörperfragmentes binden. Ein Teil der Phagenklone wies in diesen Experimenten eine zumindest partielle Kreuzreaktivität mit beiden anti-EGFR Antikörpern auf. Die Sequenzanalyse der Fusionspeptide zeigte, dass die hier selektionierten Phagenklone keine gemeinsame Consensus Sequenz aufweisen (siehe 3.4.3). Es konnten jedoch bei Phagenklonen aus allen drei hier verwendeten Bibliotheken und für beide Zielstrukturen kurze, gemeinsame Sequenzmotive identifiziert werden.

Zur Überprüfung der Bindung dieser Fusionspeptide an die hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper wurden die entsprechenden Phagenklone als mögliche Kompetitoren der Bindung des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA in MTT-Zytotoxizitätsassays eingesetzt (siehe 3.5). Nur ein Teil der selektionierten Fusionspeptide war in der Lage, die Bindung der aus dem „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab scFv(225) bestehenden Zellbindungsdomäne des Immuntoxins an EGFR exprimierende Zellen zu kompetieren. Auch für einige der Fusionspeptide, die auf Bindung an scFv(E72K) selektioniert worden waren, wurde dieses Verhalten beobachtet, was auf eine echte Kreuzreaktivität dieser Fusionspeptide für beide anti-EGFR Antikörper hindeutete. Peptide, für die in diesem sensitiven Assay eine Kompetition des Immuntoxins beobachtet werden konnte, wiesen in ihren pIII-Fusionspeptiden die gemeinsamen Sequenzmotive KTL bzw. YPLG auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Fokus der weiteren Untersuchungen auf diese kreuzreaktiven, kompetierenden Peptide gelegt. Nach einem Abgleich der Sequenzen der kompetierenden, kreuzreaktiven Peptide mit KTL bzw. YPLG Motiven wurden zwei Peptide ausgewählt. Diese wurden wie im Folgenden beschrieben zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt, um zu untersuchen, ob derartige Peptide in der Lage sind, in Versuchstieren die Bildung von Antikörpern mit ähnlichen Eigenschaften wie Cetuximab bzw. Matuzumab und somit eine endogene Immunantwort gegen den humanen EGFR auszulösen.

3.7 Charakterisierung der Immunantwort gegen KTL Motiv und YPLG Motiv enthaltende Peptide

3.7.1 Immunisierung von Kaninchen mit KTL Motiv und YPLG Motiv enthaltenden Peptiden

Auf der Grundlage der für KTL Motiv bzw. YPLG Motiv enthaltende Peptide gewonnenen experimentellen Daten aus Phagen ELISA Experimenten (siehe 3.4.2) und Kompetitionsstudien (siehe 3.5.2) wurden zwei synthetische Peptide ausgewählt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Der C-terminale Glycin-Serin Linker (G₃S), der im ursprünglichen Kontext der M13KE Phagen vorhanden ist, wurde in die Sequenz dieser synthetischen Peptide übernommen, um dessen möglichen Beitrag zur Bindung an die anti-EGFR Antikörper Rechnung zu tragen. Die Sequenzen der finalen synthetischen Peptide entsprechen den pIII-Fusionspeptiden der beiden M13KE Phagenklone E72.3A bzw. E72.C4 aus DIP Experimenten mit scFv(E72K) als Zielstruktur (Abb. 3-22).

	M13KE Phagenklon	pIII-Fusionspeptid	Kompetition scFv(225)-ETA (MTT Assay)	Bindung	
				Matuzumab (Phagen ELISA)	Cetuximab (Phagen ELISA)
KTL Motiv					
	E72 . C3	ACDVLP KTL LC	+++	+++	schwach
▶	E72 . 3A	VLP KTL LC	+++	+	+
	225 . 1P-05	HES KTL LNITTWG	+	schwach	+
	225 . C-G7	ACQTV KTL RC	+	schwach	+
YPLG Motiv					
▶	E72 . C4	ACKY YPLG HQC	+++	+++	schwach
	E72 . 4A	YPLG HQC	+++	+	+
	225 . 1P-03	TSQLTF YPLG NM	+	+	+
synthetische Peptide		VLP KTL C-GGGS ACKY YPLG HQC-GGGS	KTL Motiv YPLG Motiv		

Abb. 3-22: Auswahl von synthetischen Peptiden zur Immunisierung von Kaninchen. Die zugehörigen Daten zu den Phagen ELISA Experimenten bzw. den MTT-Zytotoxizitätsassays sind in den Abschnitten 3.4.2 und 3.5.2 gezeigt.

Die Peptidsynthese sowie die Immunisierungen wurden im Auftrag von der Firma Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg durchgeführt. Ein Teil der synthetischen Peptide **VLPKTL**CGGGS (KTL Motiv; 1030,52 g/mol; 98 % Reinheit laut HPLC Analyse) und **ACKYPLGHQ**CGGGS (YPLG Motiv; 1376,57 g/mol; 79 % Reinheit laut HPLC Analyse) wurde jeweils mit dem Trägerprotein „keyhole limpet hemocyanine“ (KLH) als Immunadjuvanz gekoppelt und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (Abb. 3-23). Nach einer Blutentnahme zur Gewinnung von Präimmenserum wurde pro KLH-gekoppeltem Peptid je ein Versuchstier durch eine intradermale Injektion zu Beginn des Experimentes (Woche 0), sowie fünf weitere intramuskuläre Injektionen in den Wochen 2, 3, 5, 7 und 9 des Experimentes immunisiert. In Woche 10 wurden die endgültigen anti-Peptid Seren gewonnen. Jeweils ein Teil der Seren wurde über mit dem jeweiligen Peptid durch Epoxy-Immobilisierung beschichtete

Sepharosensäulen zur Isolierung der monospezifischen anti-Peptid Antikörper affinitätschromatographisch gereinigt. In den Präparationen zur Konservierung enthaltenes Natriumazid wurde durch Dialyse gegen 10 Vol. PBS bei fünfmaligem Pufferwechsel entfernt, um die Seren bzw. die anti-Peptid Antikörper in Experimenten mit lebenden Zellen einsetzen zu können (siehe 3.8). Zunächst wurde untersucht, ob die synthetischen Peptide (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) die Bindung des Immuntoxins scFv(225)-ETA an EGFR-exprimierende Zellen kompetieren können, wie dies für die entsprechenden Fusionspeptide im Phagenkontext beobachtet werden konnte (siehe 3.7.2; vgl. 3.5.2). Die Anwesenheit von gegen die zur Immunisierung eingesetzten synthetischen Peptide gerichteten Antikörpern in den Kaninchenserum und den gereinigten anti-Peptid Antikörper wurde überprüft (siehe 3.7.3). Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz Experimenten untersucht, ob die Immunisierung mit synthetischen Peptiden in den Versuchstieren eine Immunreaktion hervorgerufen hat, die zur Bildung von mit humanem EGFR kreuzreagierenden Antikörpern geführt hat (siehe 3.8).

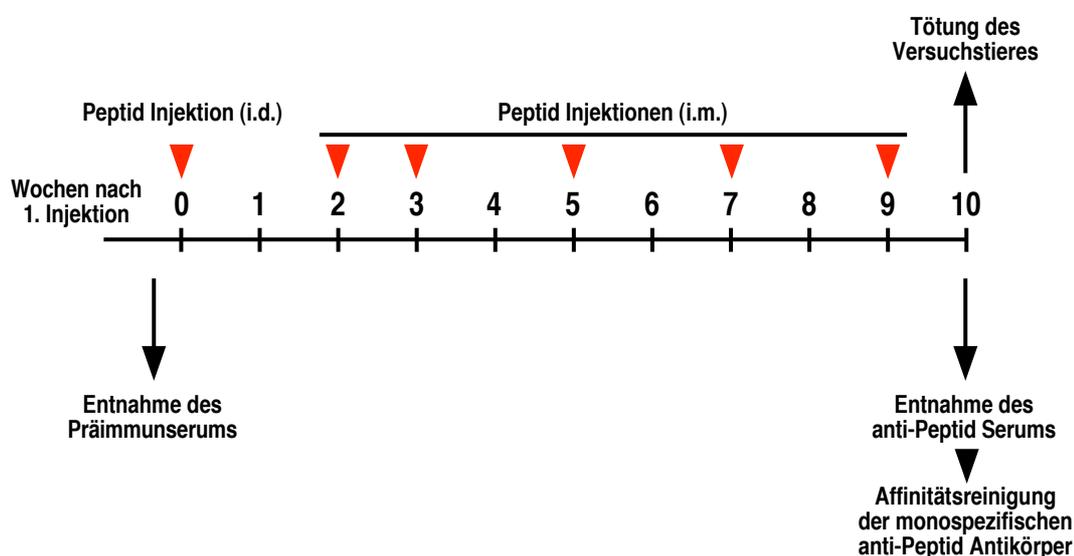


Abb. 3-23: Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden (schematisch). Die zur Immunisierung verwendeten synthetischen Peptide sind in Abb. 3-22 gezeigt (KTL Motiv und YPLG Motiv). Vor der Immunisierung wurden die Peptide chemisch an das Trägerprotein „keyhole limpet hemocyanine“ (KLH) als Immunadjuvanz gekoppelt. Bei der Entnahme der Seren in Woche 10 nach der ersten Injektion wurden die anti-Peptid Seren entnommen, die Versuchstiere wurden hierbei geopfert. i.d. = intradermal, i.m. = intramuskulär.

3.7.2 Konkurrenz von Immuntoxinen durch synthetische Peptide

Die zur Immunisierung von Kaninchen verwendeten synthetischen Peptide (KTL Motiv und YPLG Motiv) wurden aus pIII-Fusionspeptiden von M13KE Phagenklonen abgeleitet, die aus DIP Phage Display Experimenten mit scFv(E72K) als Zielstruktur stammten (siehe 3.7.1). Die Fähigkeit zur Konkurrenz des EGFR-gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA wurde für die betreffenden M13KE Phagenklone E723A und E72.C4 bereits experimentell in MTT-Zytotoxizitätsassays gezeigt (siehe 3.5.2). In einer weiteren Serie von MTT-Zytotoxizitätsassays wurde untersucht, ob die hieraus abgeleiteten

synthetischen Peptide beim Einsatz als Kompetitoren der Bindung gegen ErbB Rezeptoren gerichteter Immuntoxine ebenfalls diese Eigenschaften zeigen. Hierzu wurden Renca-lacZ, Renca-lacZ/EGFR und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen mit dem gegen EGFR gerichteten Immuntoxin scFv(225)-ETA (Abb. 3-24A) bzw. mit dem gegen ErbB2 gerichteten Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA (Abb. 3-24B) inkubiert. Als Kompetitoren wurden durch Vorinkubation jeweils im Überschuss (20 µg/well) die synthetischen Peptide **VLPKTLCGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGGS** (YPLG Motiv) sowie ein irrelevantes Kontrollpeptid (**SFLQDIQEV**) und PBS als Negativkontrollen eingesetzt. Erwartungsgemäß wurde im Fall der Negativkontrollen der überwiegende Teil der Zellen, die den jeweiligen Zielrezeptor der eingesetzten Immuntoxine an der Oberfläche exprimieren, im Versuchszeitraum abgetötet (ca. 15% bis 40%). Im Gegensatz zum Kontrollpeptid und der PBS Kontrolle konnte die Bindung und die zytotoxische Wirkung des Immuntoxins scFv(225)-ETA auf Renca-lacZ/EGFR Zellen jedoch durch Vorinkubation mit einem Überschuss der synthetischen Peptide (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) vollständig inhibiert werden. Dies bestätigt die Daten aus Konkurrenzexperimenten mit M13KE Bakteriophagen (siehe 3.5.2) und zeigt, dass die synthetischen Peptide (KTL Motiv und YPLG Motiv) in der Lage sind, durch Interaktion mit dem „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab dessen Bindung an das Antigen EGFR vollständig zu blockieren.

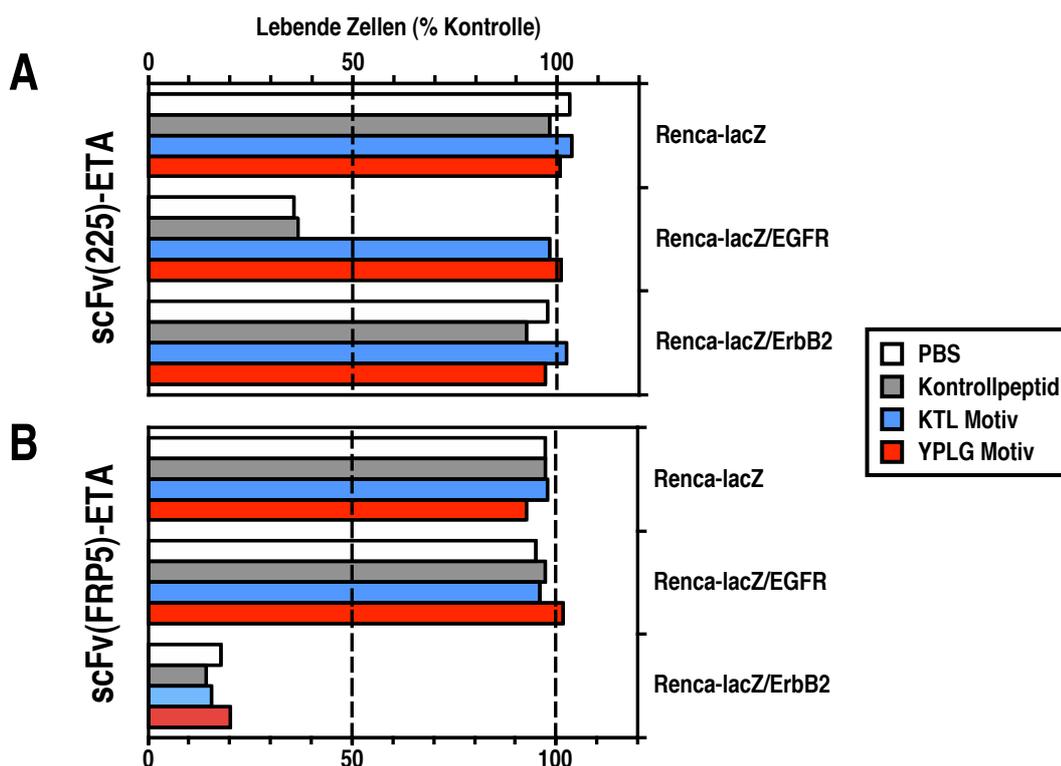


Abb. 3-24: Konkurrenz der Immuntoxine scFv(225)-ETA bzw. scFv(FRP5)-ETA durch synthetische Peptide (MTT-Zytotoxizitätsassay). (A) Im Überschuss eingesetzt verhindern die als Kompetitoren eingesetzten synthetischen Peptide (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) die Bindung der Zellerkennungsdomäne von scFv(225)-ETA an den Rezeptor auf EGFR-exprimierenden Renca-lacZ/EGFR Zellen. (B) Die Bindung der ErbB2-spezifischen Zellbindungsdomäne des als Kontrolle eingesetzten Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA an den Rezeptor auf ErbB2-exprimierenden Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wird nach Zugabe eines Überschusses der synthetischen Peptide nicht beeinflusst. Die Blockade der Zellbindungsdomäne ist spezifisch für das anti-EGFR „single-chain“ Antikörperfragment scFv(225).

3.7.3 Bindung von Antikörpern aus Kaninchenserum, gereinigten anti-Peptid Antikörpern und Cetuximab und Matuzumab an synthetische Peptide mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv

In ELISA Experimenten wurde die Bindung der anti-Peptid Kaninchenserum und der affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper an die zur Immunisierung eingesetzten synthetischen Peptide überprüft (siehe 3.7.1). Darüber hinaus wurde die Bindung der monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab an die Peptide untersucht. Zunächst wurden Verdünnungsreihen der Peptide **VLPKTLTCGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGGS** (YPLG Motiv) sowie eines Kontrollpeptides (**SFLQDIQEV**) in Bindungspuffer (0,1 M NaHCO₃; pH 8,6) hergestellt, und die Peptide wurden auf Mikrotiterplatten immobilisiert (0,005 µg/well bis 50 µg/well). Die Detektion erfolgte mit den jeweiligen affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörpern (Verdünnung 1:2.000), den monoklonalen anti-EGFR Antikörpern Cetuximab und Matuzumab, sowie mit dem anti-ErbB2 Antikörper Herceptin® (1 µg/ml) als Kontrolle. Gebundene Antikörper wurden mit den Sekundäntikörpern anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat bzw. anti-human IgG/HRP Konjugat nach Zugabe der HRP-Substratlösung ABTS (Roche) durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert.

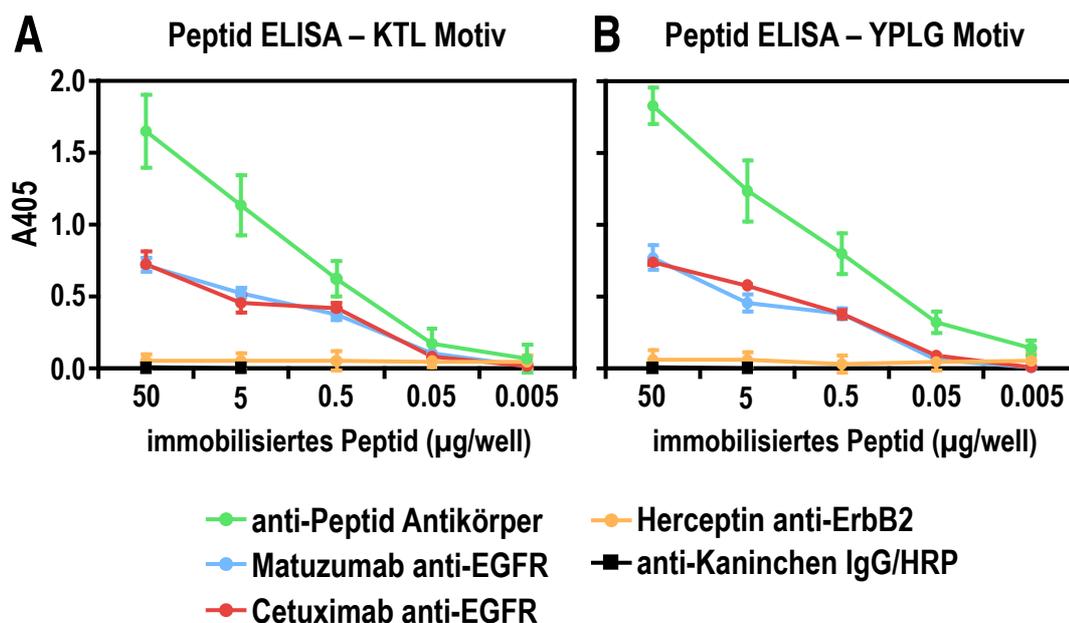


Abb. 3-25: ELISA Bindungstest von anti-Peptid Antikörpern und anti-EGFR Antikörpern an immobilisierte synthetische Peptide. Der eingesetzte anti-Peptid Antikörper (grün) stammt jeweils aus dem mit dem KTL Motiv Peptid immunisierten Versuchstier (A) bzw. aus dem mit dem YPLG Motiv Peptid immunisierten Versuchstier (B).

Die gereinigten anti-Peptid Antikörper zeigten konzentrationsabhängige Bindung an das jeweilige synthetische Peptid (Abb. 3-25). Die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab erkannten beide Peptide (KTL Motiv und YPLG Motiv) mit vergleichbarer Bindungsstärke. Dies bestätigt die in Phagen ELISA Experimenten (siehe 3.4.2) und Konkurrenzexperimenten mit

Immuntoxinen (siehe 3.5.2 und 3.7.2) beobachtete Kreuzreaktivität der Peptide mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv. Die Negativkontrollen Herceptin® anti-ErbB2 und die Sekundärantikörper-Kontrolle mit anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat zeigten erwartungsgemäß kein Bindungssignal. Auch der Test aller hier getesteten Antikörper-Kombinationen auf Bindung an das Kontrollpeptid lieferte lediglich Hintergrundsignale (Daten nicht gezeigt). Somit konnte in diesen Experimenten die selektive Bindung der affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper an das jeweilige synthetische Peptid gezeigt sowie die Kreuzreaktivität der monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab mit beiden untersuchten Peptiden (KTL Motiv und YPLG Motiv) bestätigt werden.

In weiteren ELISA Experimenten wurden Verdünnungsreihen (1:100 bis 1:1.000.000) der ungereinigten Kaninchenserum (anti-KTL Peptid und anti-YPLG Peptid) sowie die zugehörigen Präimmunseren auf Bindung an eine konstante Menge auf Mikrotiterplatten immobilisiertes KTL bzw. YPLG Peptid (1 µg/well) bzw. Kontrollpeptid getestet (Abb. 3-26 und Abb. 3-27). Während für die Präimmunseren und die PBS- sowie Peptidkontrollen erwartungsgemäß nur Hintergrundsignale detektiert wurden, konnte für die beiden getesteten anti-Peptid Seren Bindung an die immobilisierten Peptide gemessen werden (bis zu einer Verdünnung von 1:1.000 für anti-KTL Serum; bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 für anti-YPLG Serum). Die vergleichsweise schwache Bindung der Seren im Vergleich zu den affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörpern lässt sich aus dem relativ geringen Anteil spezifischer anti-Peptid Antikörper an der Gesamtpopulation der im Kaninchenserum enthaltenen Immunglobuline erklären. Auffällig bei dieser Serie von Experimenten war, dass die Seren jeweils Kreuzreaktivität für das jeweils andere Peptid zeigten und dieses mit vergleichbarer Affinität erkannten. Dieses Ergebnis war in dieser Form nicht vorherzusehen, da nur Spezifität für das jeweilige Peptid, mit dem das entsprechende Versuchstier immunisiert worden war, erwartet wird. Verwechslungen der Tiere oder der Peptidinjektionen konnten nach Rücksprache mit der Firma Davids Biotechnologie GmbH in Regensburg, die die Immunisierungen im Auftrag durchführte, ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die kreuzreaktive Bindung der Seren gegen beide getesteten Peptide auf Antikörper gegen den gemeinsamen C-Terminus der synthetischen Peptide (**CGGGS**) zurückzuführen.

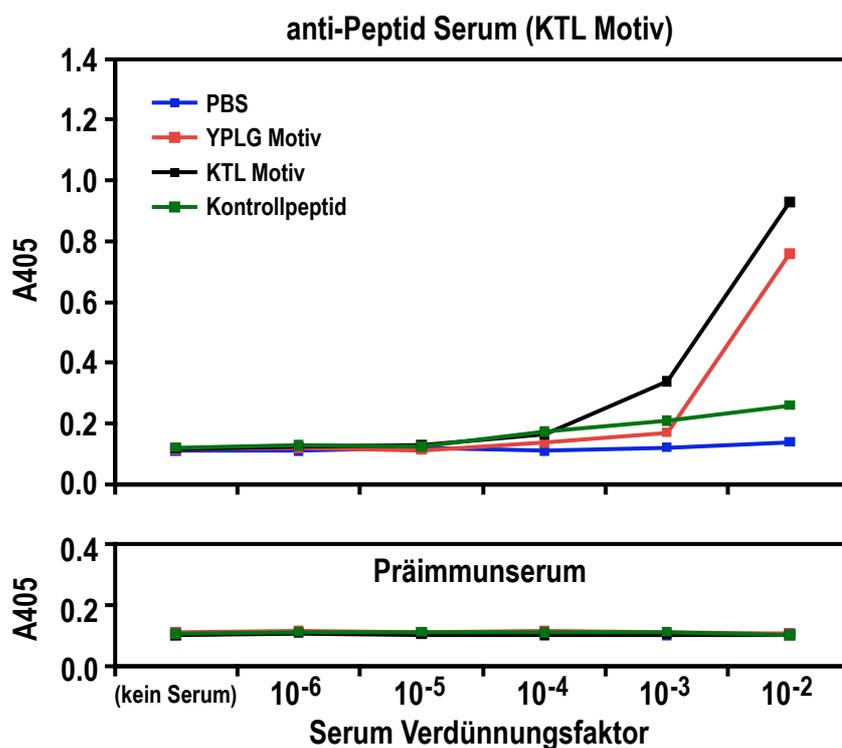


Abb. 3-26: ELISA Bindungstest von anti-KTL Peptid Serum mit immobilisierten synthetischen Peptiden. Die jeweils immobilisierten Peptide (bzw. PBS Kontrolle) sind in der Legende angegeben. Als Kontrolle wurde das irrelevante Peptid **SFLQDIQEV** eingesetzt. Die Bindung des Präimmunserums ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt.

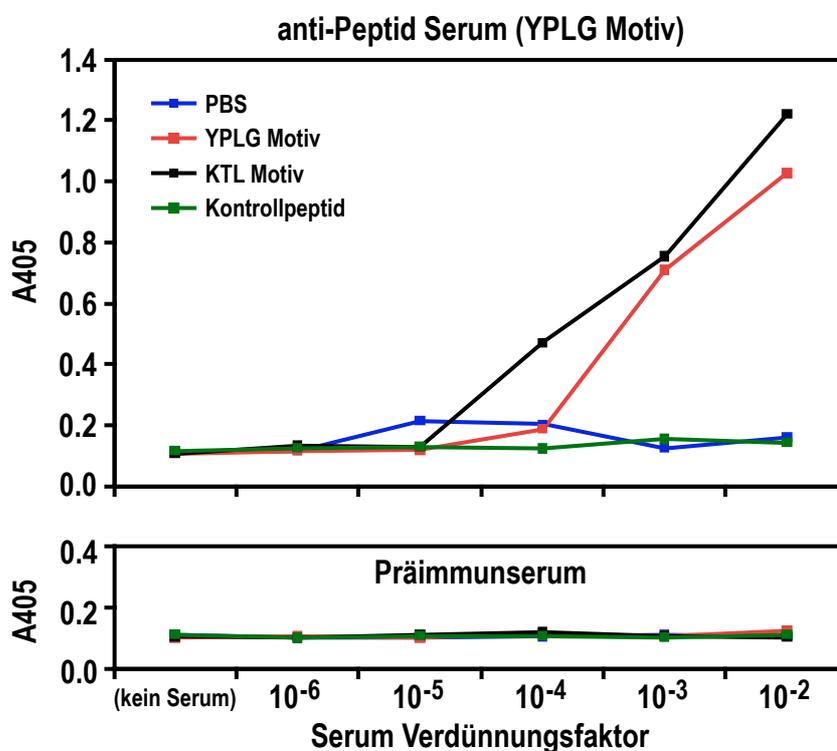


Abb. 3-27: ELISA Bindungstest von anti-YPLG Peptid Serum mit immobilisierten synthetischen Peptiden. Die jeweils immobilisierten Peptide (bzw. PBS Kontrolle) sind in der Legende angegeben. Als Kontrolle wurde das irrelevante Peptid **SFLQDIQEV** eingesetzt. Die Bindung des Präimmunserums ist im unteren Teil der Abbildung gezeigt.

3.8 Bindung von anti-Peptid Antikörpern an EGFR

3.8.1 Analyse der Bindung von anti-Peptid Antikörpern an EGFR auf Tumorzellen (FACS)

Die Bindung der gereinigten anti-Peptid Antikörper aus Immunisierungsexperimenten (siehe 3.7) an den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Zunächst wurde die Bindung an EGFR-exprimierende Renca-lacZ/EGFR Zellen und Renca-lacZ Kontrollzellen analysiert (Abb. 3-29). Darüber hinaus wurde untersucht, ob durch Vorinkubation der Zielzellen mit anti-Peptid Antikörpern die Bindung der monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab an Renca-lacZ/EGFR Zellen kompetiert werden kann (Abb. 3-30). In einem weiteren Experiment wurde die Bindung der anti-Peptid Antikörper an die EGFR-exprimierende humane Vulvakarzinom-Zelllinie A431 und die Kompetition der Bindung durch Zugabe der synthetischen KTL und YPLG Peptide im Vergleich zu einem Kontrollpeptid (**SFLQDIQEV**) analysiert (Abb. 3-31).

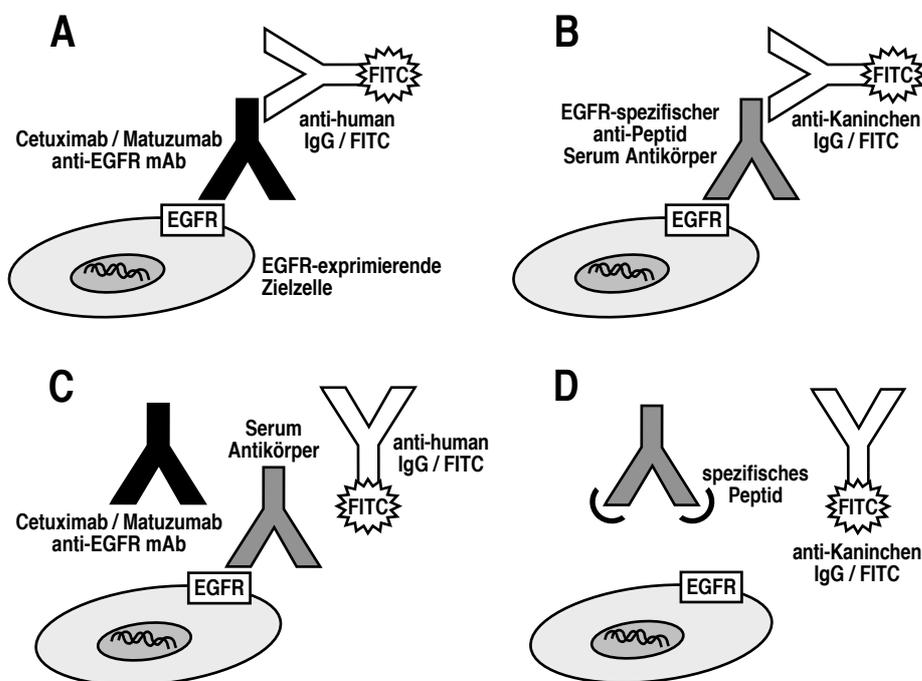


Abb. 3-28: Bindungsanalyse von anti-Peptid Antikörpern und monoklonalen anti-EGFR Antikörpern mittels Durchflusszytometrie (schematisch). (A) Nachweis der Bindung an den humanen EGFR auf der Zelloberfläche durch monoklonale anti-EGFR Antikörper bzw. EGFR-spezifische anti-Peptid Antikörper (B). (C) Kompetition von monoklonalen anti-EGFR Antikörpern durch Vorinkubation der Zielzellen mit anti-Peptid Antikörpern. (D) Kompetition von EGFR-spezifischen anti-Peptid Antikörpern durch Zugabe von synthetischen Peptiden.

Zunächst wurden semikonfluent wachsende Renca-lacZ, Renca-lacZ/EGFR und A431 Zellen gerettet, gezählt und in Aliquots zu je $7,5 \cdot 10^5$ Zellen/well auf 96-well Zellkulturplatten ausgesät. In einigen Experimenten wurden die Zielzellen mit anti-Peptid Antikörpern bzw. Präimmunserum vorinkubiert, um diese auf die Fähigkeit zur Kompetition der Bindung des nachfolgend zugegebenen Primärantikörpers zu

untersuchen. Die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab dienten als Positivkontrolle für die Detektion von EGFR auf der Zelloberfläche von Renca-lacZ/EGFR, Präimmunserum aus Kaninchen bzw. der monoklonale anti-ErbB2 Antikörper Herceptin® wurden als Negativkontrollen eingesetzt. Zur Detektion wurden je nach Probe anti-human IgG/FITC bzw. anti-Kaninchen IgG/FITC Konjugate verwendet (Abb. 3-28).

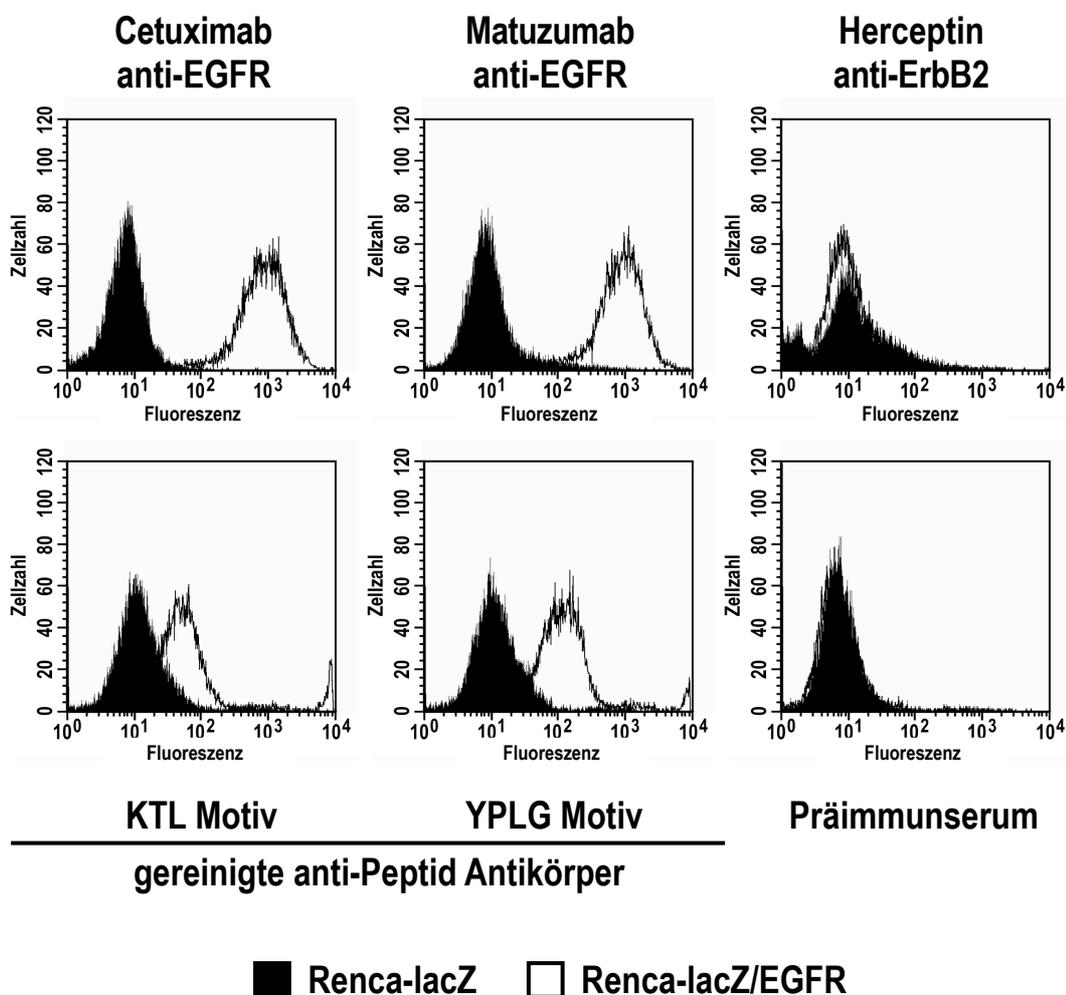


Abb. 3-29: Selektive Bindung von Cetuximab und Matuzumab anti-EGFR sowie der anti-Peptid Antikörper an EGFR-exprimierende Renca-lacZ/EGFR Zellen (FACS).

Die Bindungsdaten der Antikörper an Renca-lacZ/EGFR Zellen im Vergleich zu Renca-lacZ Zellen (ohne Einsatz von Kompetitoren) zeigen, dass die getesteten anti-Peptid Antikörper, die aus Immunisierungen von Kaninchen gegen das KTL Peptid bzw. das YPLG Peptid stammen (siehe 3.7.1), selektiv an den humanen Rezeptor an der Oberfläche von EGFR-exprimierenden Zellen binden (Abb. 3-29). Das Bindungssignal ist deutlich sichtbar, jedoch weniger ausgeprägt als bei den als Positivkontrollen eingesetzten monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab. Für das als Negativkontrolle eingesetzte Präimmunserum bzw. den monoklonalen anti-ErbB2 Antikörper Herceptin® wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen erwartungsgemäß kein stärkeres Bindungssignal detektiert.

In einigen der in diesem Experiment untersuchten Proben wurden die Zellen mit gereinigten anti-Peptid Antikörpern vorinkubiert (ca. 20-facher Überschuss), bevor die primären Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab zugegeben wurden. Die Analyse der Bindungsdaten dieser Konkurrenzexperimente zeigt, dass durch die Vorinkubation mit anti-Peptid Antikörpern die erhaltenen Signale für die Bindung der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab im Vergleich zur direkten, nicht-kompetiterten Bindung dieser Antikörper deutlich reduziert waren (Abb. 3-30). Dies beweist, dass die Antikörperbindungsstellen am EGFR teilweise durch die Bindung der anti-Peptid Antikörper besetzt wurden und demonstriert deren Fähigkeit zur Konkurrenz der monoklonalen Antikörper. Bei Verwendung von Präimmenserum als Kontrolle während der Vorinkubation wurde die Bindung der monoklonalen anti-EGFR Antikörper hingegen nicht beeinflusst.

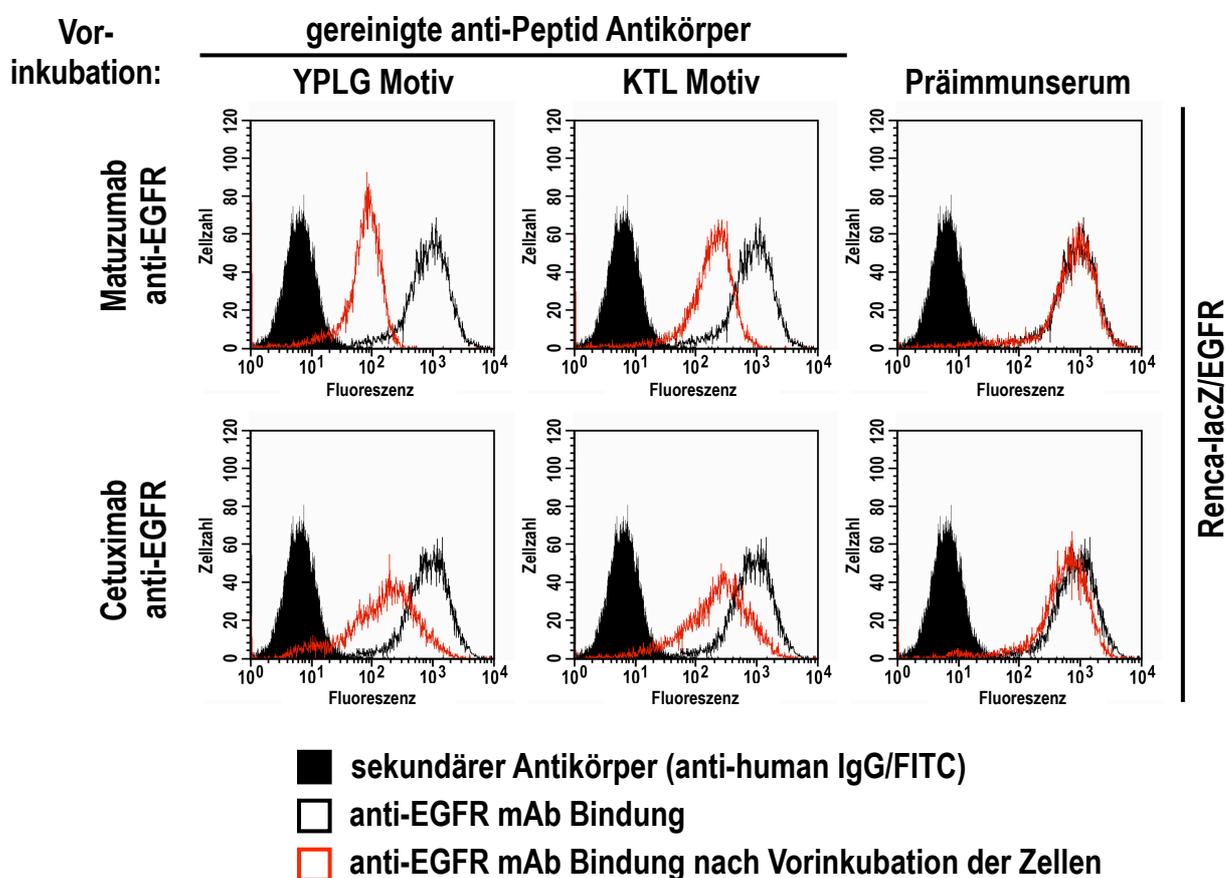


Abb. 3-30: Konkurrenz der Bindung von Cetuximab und Matuzumab an EGFR durch Vorinkubation der Zielzellen mit anti-Peptid Antikörpern (FACS).

In einem weiteren FACS Experiment wurde die Bindung der anti-Peptid Antikörper an EGFR-exprimierende A431 Zellen untersucht. Auch in diesem Experiment konnte die Bindung der anti-Peptid Antikörper an den humanen EGFR durch Detektion mittels anti-Kaninchen IgG/FITC Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Vorinkubation der anti-Peptid Antikörper mit den jeweiligen synthetischen Peptiden (YPLG Peptid bzw. KTL Peptid) führte zu einer deutlich sichtbaren Reduktion des Bindungssignals. Als Kontrolle wurde in parallelen Ansätzen ein unspezifisches Kontrollpeptid (**SFLQDIQEV**) während der Vorinkubation eingesetzt, welches keinen Einfluss auf die Bindung der anti-Peptid Antikörper zeigte (Abb. 3-31).

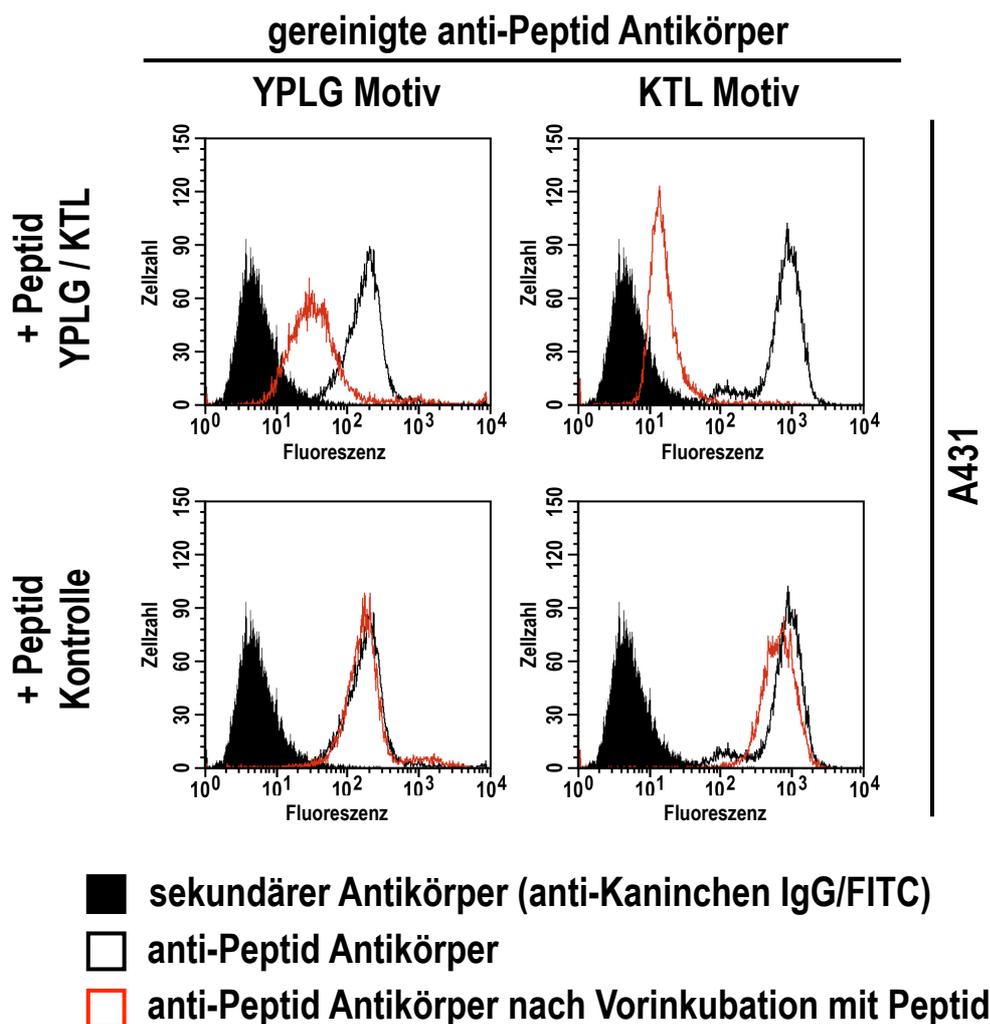


Abb. 3-31: Bindung von anti-Peptid Antikörpern an A431 Vulvakarzinomzellen und Konkurrenz mit synthetischen Peptiden (FACS). Peptide zur Konkurrenz wurden jeweils vor Zugabe der Primärantikörper im 4-fachen molaren Überschuss zu den Antikörpern zugegeben. Als Kontrollpeptid diente das irrelevante Peptid mit der Sequenz **SFLQDIQEV**.

Die Analyse der hier gezeigten Durchflusszytometrie Experimente ergab, dass die anti-Peptid Antikörper in der Lage sind, den humanen EGFR an der Oberfläche von EGFR-exprimierenden Zellen spezifisch zu erkennen und zu binden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Bindung die gleichzeitige Bindung der monoklonalen anti-EGFR Antikörpern Cetuximab und Matuzumab an EGFR verhindert. Diese Daten weisen nach, dass durch Immunisierung von Kaninchen mit den aus den vorangegangenen Screenings abgeleiteten Peptiden mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv eine endogene Immunantwort ausgelöst worden ist, die nicht nur die ursprünglichen Peptide erkennt, sondern dass dabei auch mit humanem EGFR kreuzreagierende Antikörper generiert wurden, die Bindungseigenschaften der monoklonalen anti-EGFR Antikörper nachbilden. Die eingesetzten Peptide mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv stellen daher tatsächlich Mimotope der Antigenbindungsstelle von Cetuximab bzw. Matuzumab dar. Zur weiteren Bestätigung und zur näheren Charakterisierung der hier beobachteten Bindung der anti-Peptid Antikörper wurden Immunfluoreszenz Experimente durchgeführt (siehe 3.8.2).

3.8.2 Visualisierung der Antikörperbindung in Immunfluoreszenz Experimenten (Konfokale Laser Scanning Mikroskopie – CLSM)

Zur Visualisierung der Bindung von anti-Peptid Antikörpern an den humanen EGFR wurden Immunfluoreszenz Experimente mit Renca-lacZ/EGFR Zellen durchgeführt, die den humanen EGFR stabil an der Zelloberfläche exprimieren (Schmidt *et al.*, 1999). Hierzu wurden semikonfluent wachsende Zellen in einer Dichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen/well auf 8-well Objektträger ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und es erfolgte die Inkubation mit anti-Peptid Antikörpern aus Kaninchen, bzw. den humanen monoklonalen anti-EGFR Antikörpern Cetuximab, Matuzumab und dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 (sc-101; Santa Cruz) als Positivkontrollen, und Präimmunsereum aus Kaninchen als Negativkontrolle. Nach den erforderlichen Waschschritten und der Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (anti-Kaninchen IgG/FITC, anti-human IgG/FITC, bzw. anti-Maus IgG/Alexa488) wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Propidiumiodid (PI)-haltigem Eindeckmedium behandelt. Hierbei wurde eine Überfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt, um neben dem Zellkern auch das Zytoplasma anzufärben und dadurch eine Visualisierung der gesamten Zellen zu erreichen (vierfacher Überschuss im Vergleich zu einer Kernfärbung mit PI). Die derart behandelten Proben wurden mit einem Leica TCS SL konfokalen Laser Scanning Mikroskop analysiert.

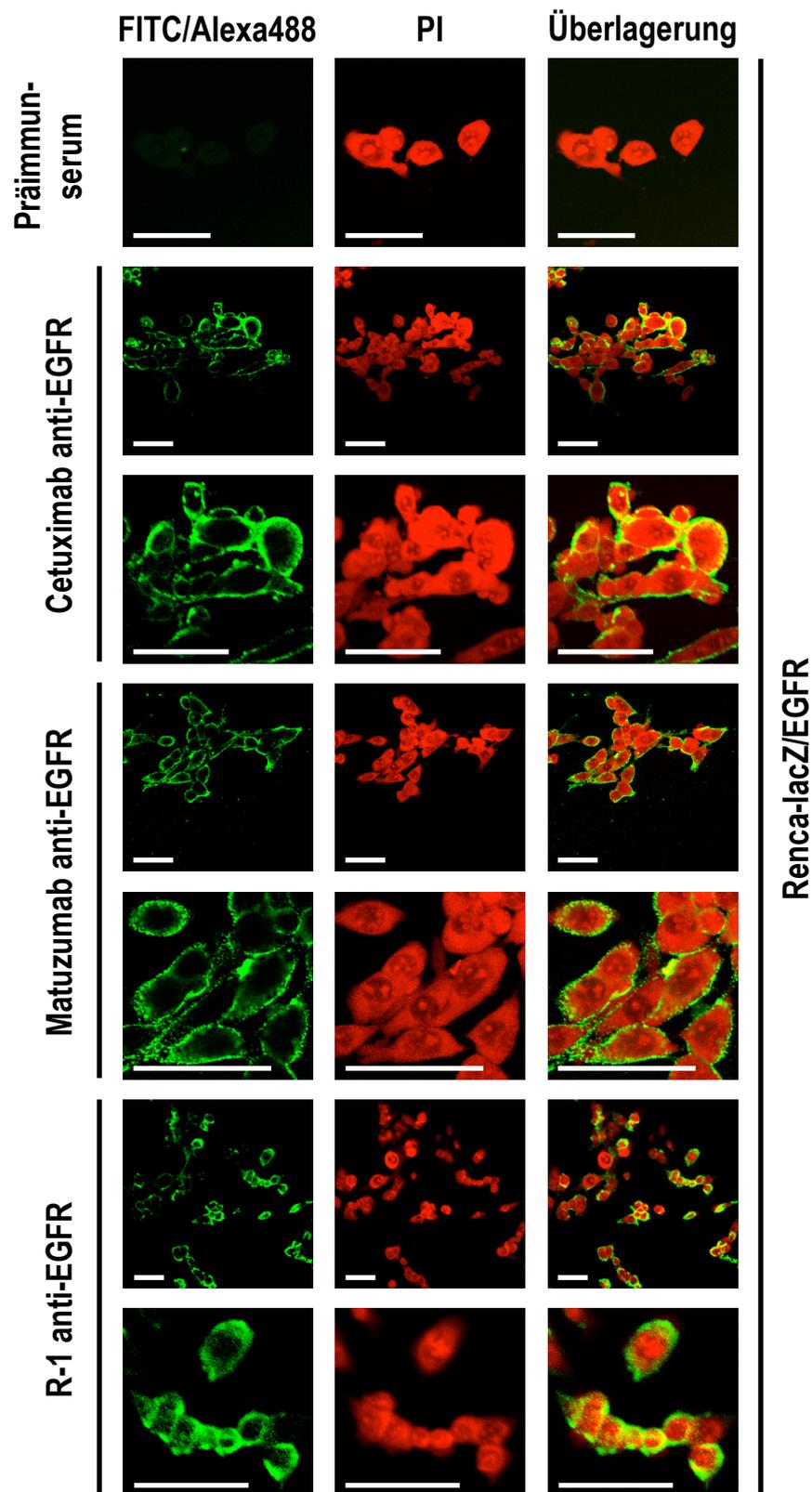


Abb. 3-32: Detektion des humanen EGFR an der Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR Zellen mit anti-EGFR Antikörpern (CLSM). Zur Detektion wurden die Sekundärantikörper anti-Kaninchen IgG/FITC, anti-human IgG/FITC bzw. anti-Maus IgG/Alexa488 verwendet. Der in den Abbildungen dargestellte Größenstandard entspricht 50 μm .

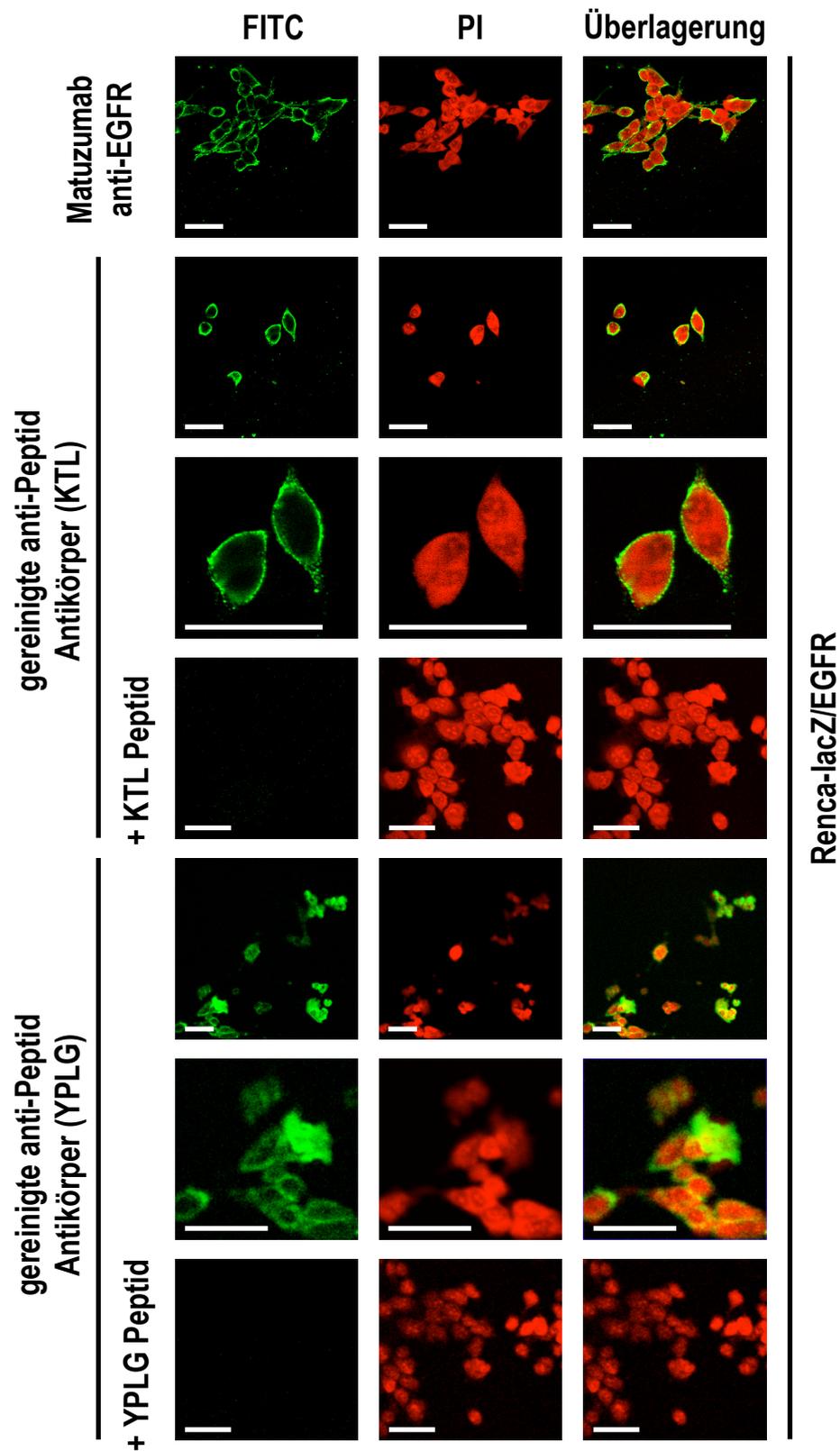


Abb. 3-33: Detektion des humanen EGFR an der Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR Zellen mit anti-Peptid Antikörpern (CLSM). Zur Detektion wurden die Sekundärantikörper anti-human IgG/FITC bzw. anti-Kaninchen IgG/FITC verwendet. Zum direkten Vergleich ist die positive Kontrollfärbung mit dem monoklonalen anti-EGFR Antikörper Matuzumab erneut gezeigt (vgl. Abb. 3-32). Der in den Abbildungen dargestellte Größenstandard entspricht 50 µm.

In den Kontrollfärbungen mit Cetuximab, Matuzumab sowie R-1 anti-EGFR konnte erwartungsgemäß der Rezeptor EGFR an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Abb. 3-32). Die Inkubation mit Präimmunserum aus Kaninchen führte lediglich zu einer schwachen Hintergrundfärbung. Beim Einsatz von anti-Peptid Antikörpern als Primärantikörper konnte EGFR ebenfalls an der Oberfläche der Renca-lacZ/EGFR Zellen nachgewiesen werden. Zugabe eines Überschusses der entsprechenden synthetischen Peptide zu den anti-Peptid Antikörpern vor Inkubation der Zellen führte zu einem vollständigen Verlust des spezifischen Signals (Abb. 3-33). Bei starker Vergrößerung von zwei Zellen im Falle der Immunfluoreszenzfärbung mit KTL-spezifischen anti-Peptid Antikörper wurde durch die Überlagerung von mehreren Aufnahmeebenen überprüft, wie sich die Färbung über die gesamten Zellkörper verteilte. Der EGFR wurde in granulären Strukturen nachgewiesen, die sich ausschließlich an der Zelloberfläche bzw. in der Nähe der Membran befanden (Abb. 3-34). Vermutlich handelt es sich bei diesen Strukturen um sog. „lipid rafts“ und/oder membrannahe Endosomen, die humanen EGFR enthalten.

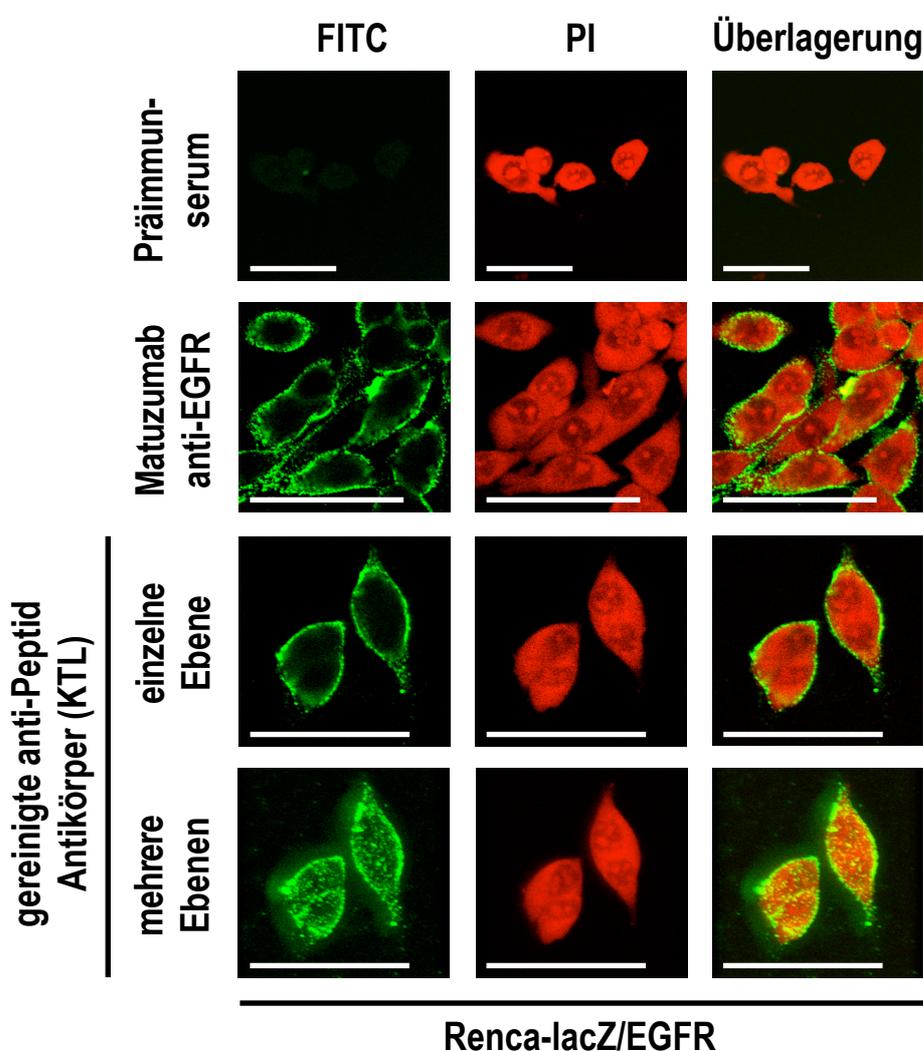


Abb. 3-34: Lokalisation des mit KTL Motiv anti-Peptid Antikörpern nachgewiesenen Signals in mehreren überlagerten Zellebenen (CLSM). Zur Detektion wurden die Sekundärantikörper anti-human IgG/FITC bzw. anti-Kaninchen IgG/FITC verwendet. Der in den Abbildungen dargestellte Größenstandard entspricht 50 µm.

In einer weiteren Reihe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde mittels Doppelfärbungen untersucht, ob für die Signale des murinen anti-EGFR Antikörpers R-1 (EGFR1; Waterfield *et al.*, 1982) und die anti-Peptid Antikörper Kolokalisation beobachtet werden kann. Dieser Antikörper erkennt ein Epitop in Ektodomäne II/CR1 von EGFR zwischen den Aminosäuren 176 und 294, und somit außerhalb der Epitope von Cetuximab und Matuzumab (Cochran *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu den therapeutischen Antikörpern ist R-1 nicht in der Lage, die EGFR Deletionsvariante EGFRvIII zu erkennen (Schmidt und Wels, unveröffentlicht). In diesen Experimenten wurden erneut Renca-lacZ/EGFR Zellen verwendet, allerdings wurde mit einer Kombination von R-1 anti-EGFR mit jeweils einem der beiden anti-Peptid Antikörper, bzw. mit Präimmenserum oder PBS als Negativkontrollen als Primärantikörper gefärbt und Bindung jeweils mit anti-Maus IgG/Alexa488 und anti-Kaninchen IgG/PE nachgewiesen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Experimenten wurden die Zellen hier weder fixiert noch permeabilisiert, und es wurde Eindeckmedium ohne Zugabe weiterer Farbstoffe verwendet.

Erwartungsgemäß ist in allen Proben dieses Kolokalisationsexperimentes das Signal im FITC Kanal zu detektieren, das die Bindung des murinen anti-EGFR Antikörpers R-1 zeigt (Abb. 3-35 und Abb. 3-36). Die PBS bzw. Präimmenserum Kontrollen zeigen kein bzw. nur ein schwaches Hintergrundsignal im PE Kanal, welches nicht mit dem EGFR-Signal im FITC/Alexa488 Kanal überlagert. Für die beiden untersuchten affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper gerichtet gegen das KTL Motiv (Abb. 3-35) bzw. das YPLG Motiv (Abb. 3-36) konnte eindeutig eine Kolokalisation der Signale mit dem R-1 anti-EGFR Signal im FITC/Alexa488 Kanal nachgewiesen werden (gelbes Signal). Damit wurde bestätigt, dass die Bindung der anti-Peptid Antikörper an die Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR Zellen eindeutig auf die Interaktion mit humanem EGFR an der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Immunisierung von Kaninchen mit den synthetischen Peptiden **VLPKTLCGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGS** (YPLG Motiv) eine endogene, mit dem humanen EGFR kreuzreagierende Immunantwort induziert hat (siehe 3.7.1).

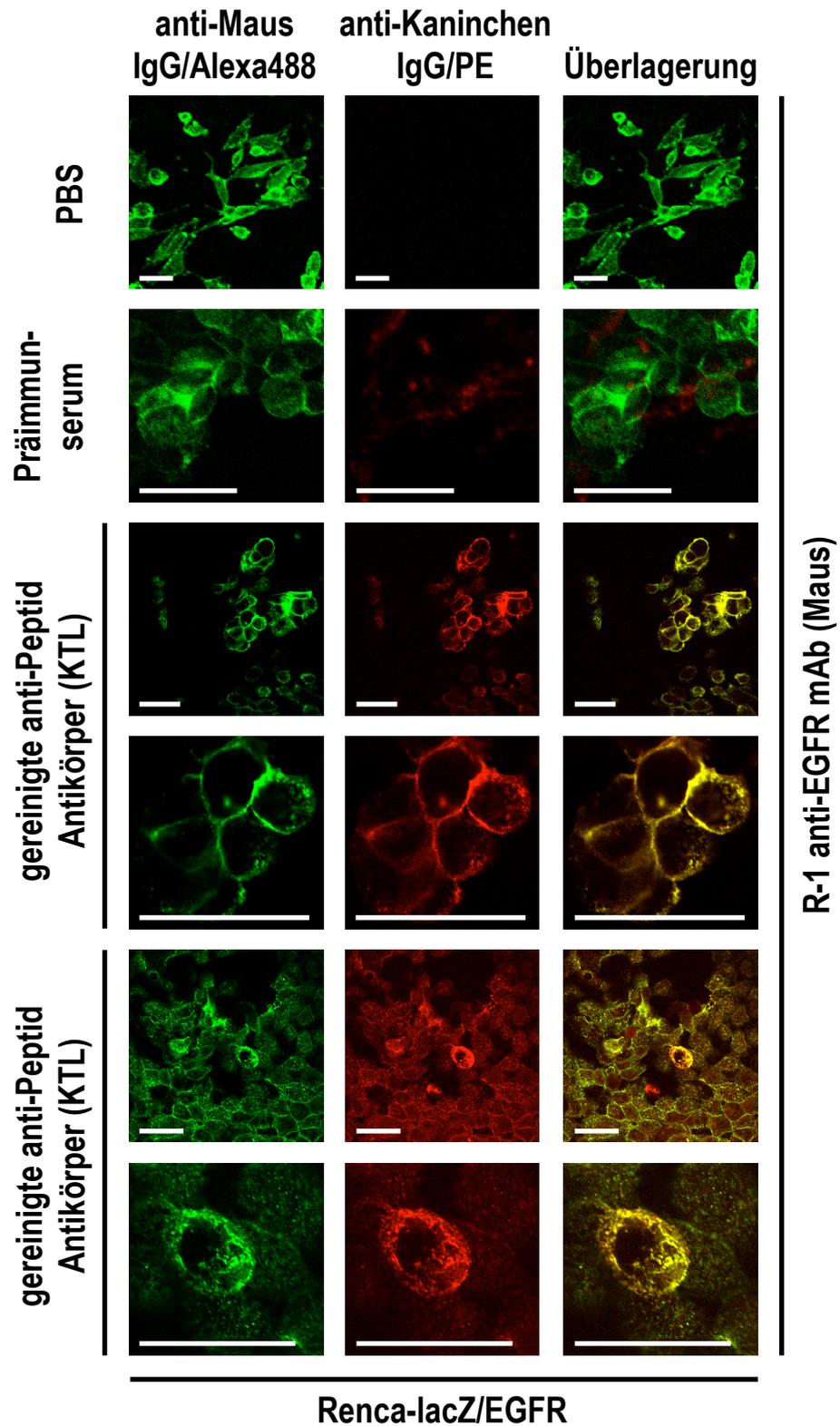


Abb. 3-35: Kolokalisation nach Bindung an Renca-lacZ/EGFR Zellen von anti-KTL Peptid Antikörpern mit dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 (CLSM). Zur Detektion wurden die Sekundärantikörper anti-Maus IgG/Alexa488 und anti-Kaninchen IgG/PE verwendet. Der in den Abbildungen dargestellte Größenstandard entspricht 50 μm .

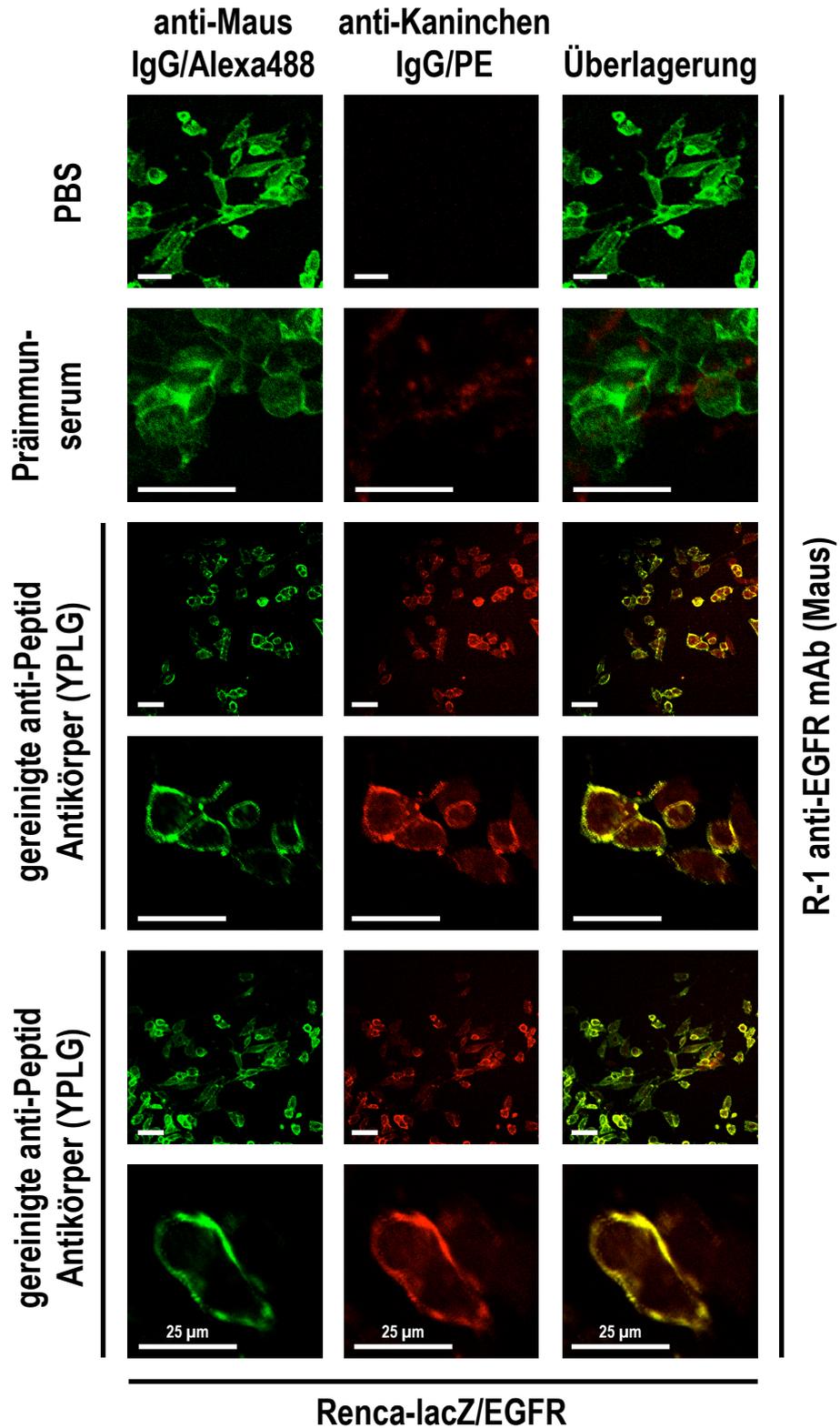


Abb. 3-36: Kolokalisation nach Bindung an Renca-lacZ/EGFR Zellen von anti-YPLG Peptid Antikörpern mit dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 (CLSM). Zur Detektion wurden die Sekundärantikörper anti-Maus IgG/Alexa488 und anti-Kaninchen IgG/PE verwendet. Der in den Abbildungen dargestellte Größenstandard entspricht 50 µm, sofern nicht anders angegeben.

3.8.3 Detektion von EGFR durch anti-Peptid Antikörper in Lysaten von Tumorzellen

In einem Western blot Experiment wurde untersucht, ob anti-Peptid Antikörper den humanen EGFR in Lysaten von Tumorzellen erkennen können. Hierzu wurden aus semikonfluent wachsenden Tumorzellen (Renca-lacZ/EGFR, A431, SKBR3, sowie Renca-lacZ, Renca-lacZ/ErbB2 und SKOV3 Kontrollzellen) zunächst Lysate hergestellt. Nach Gelelektrophorese und Transfer der Proteine auf PVDF Membranen wurden diese zur Detektion des EGFR Proteins mit den affinitätsgereinigten anti-KTL Peptid bzw. anti-YPLG Peptid Antikörpern inkubiert. Gebundene Primäantikörper wurden mit dem Sekundäantikörper anti-Kaninchen IgG/HRP Konjugat detektiert. Die mit dem ECL Chemolumineszenz Kit (Amersham Biosciences) entwickelten Membranen sind in Abb. 3-37 gezeigt.

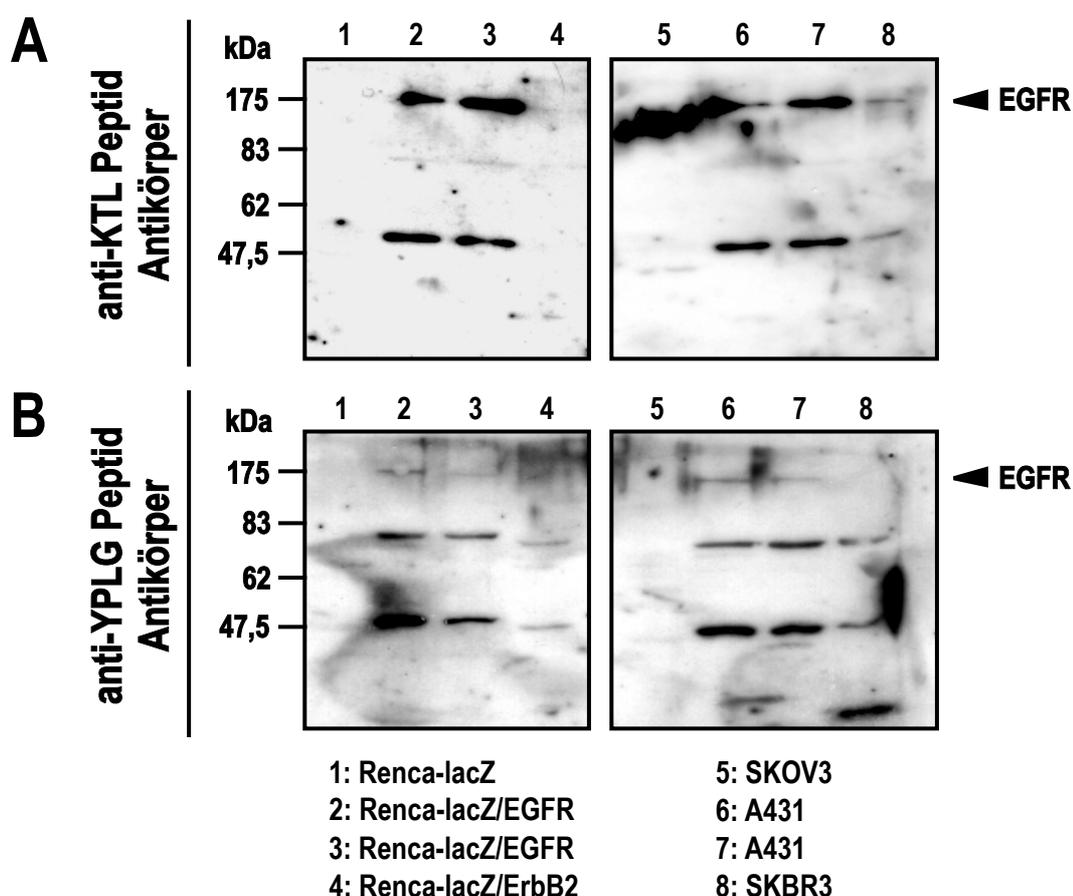


Abb. 3-37: Detektion von EGFR mit anti-Peptid Antikörpern in Tumorzelllysaten. (A) Detektion von EGFR im Western blot mit gereinigten anti-KTL Antikörpern (A) bzw. mit gereinigten anti-YPLG Antikörpern (B). Es wurden jeweils zwei Gelspuren mit Proben der Lysate von Renca-lacZ/EGFR und A431 Zellen beladen. Lysate der EGFR negativen Zelllinien Renca-lacZ, Renca-lacZ/ErbB2 und SKOV3 (Gelspuren 1, 4, 5) wurden als Kontrollen eingesetzt.

Mit beiden anti-Peptid Antikörperfraktionen (anti-KTL bzw. anti-YPLG) konnte in den Lysaten EGFR positiver Renca-lacZ/EGFR und A431 Zellen ein Protein detektiert werden, das sich an der für EGFR zu erwartenden Position befindet (EGFR: 170 kDa). Im Falle von SKBR3 Zellen ist nur bei Detektion mit anti-KTL Antikörper ein deutliches Signal dieser Größe zu erkennen. Allerdings sind die EGFR Signale

im Falle der Detektion mit anti-YPLG Antikörpern insgesamt sehr schwach (Abb. 3-37B) – eine Wiederholung der Blots mit einer höheren Konzentration der Primärantikörper verbesserte die Qualität der Signale jedoch nicht (Daten nicht gezeigt). In den EGFR negativen Kontrollzellen wurde diese Bande nicht detektiert – in der Gelspur des Lysates von SKOV3 im anti-KTL Antikörper Blot befindet sich knapp unterhalb von 170 kDa ein Artefakt, das von einer unzureichenden Sättigung der Membran mit Milchprotein in diesem Bereich stammt (Abb. 3-37A). Darüber hinaus wurden in den gezeigten Blots von beiden anti-Peptid Antikörpern weitere Banden detektiert, die einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa und ca. 50 kDa entsprechen. In dem mit anti-YPLG Antikörpern entwickelten Blot wurde in der Gelspur des SKBR3 Lysates eine weitere, dritte Nebenbande detektiert (Abb. 3-37B). Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um Degradationsprodukte von EGFR handelt, da in einem unabhängigen Immunoblot Aliquots der hier verwendeten Lysate, der mit dem murinen anti-EGFR Antikörper 29.1 entwickelt wurde, derartige Signale nicht beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EGFR von beiden anti-Peptid Antikörpern in Tumorzellen detektiert werden konnte, obgleich mit schwacher Intensität und bei Auftreten von Nebenbanden. Der Einsatz von anti-KTL Antikörpern lieferte stärkere Bandenintensitäten und weniger Hintergrundsignale im Vergleich zu anti-YPLG Antikörpern.

3.8.4 Kompetition der Bindung natürlicher EGFR-Liganden durch anti-Peptid Antikörper

Zur Untersuchung der Kompetition des natürlichen EGFR Liganden EGF durch anti-Peptid Antikörper wurde ein Immunoblot Experiment durchgeführt. A431 Zellen wurden über Nacht in DMEM Medium bei geringer Serumkonzentration kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Waschen mit PBS entfernt und die Zellen wurden für 10 min mit 2 µg/ml der anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab, gereinigten anti-Peptid Antikörpern (anti-KTL bzw. anti-YPLG), oder Präimmunserum bzw. PBS als Negativkontrollen vorinkubiert. Zur Stimulation des Rezeptors wurden 50 ng/ml humanes EGF zugegeben und die Ansätze wurden für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und Zelltrümmer durch scharfe Zentrifugation entfernt. Nach der Gelelektrophorese der Proben und dem Transfer auf eine PVDF Membran erfolgte die Detektion des phosphorylierten EGFR durch den murinen anti-Phosphotyrosin Antikörper 2C8 (sc-81529; Santa Cruz) bzw. der Nachweis des EGFR Gesamtproteins mit dem murinen anti-EGFR Antikörper 29.1 (Sigma-Aldrich). Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus IgG/HRP Konjugat (Sigma-Aldrich) verwendet. Die resultierenden Immunoblots sowie Quantifizierungen der Signale sind in Abb. 3-38 und Abb. 3-39 gezeigt. Die Signalintensitäten wurden aus den gemittelten Graustufenwerten mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms „ImageJ 1.42g“ der National Institutes of Health (NIH) densitometrisch quantifiziert (<http://rsweb.nih.gov/ij/>). Die dargestellten Werte sind als relatives Signal in Bezug auf die jeweilige Positivkontrolle (Stimulation des Rezeptors mit EGF ohne Kompetitor) angegeben. Bei der Bewertung der so erhaltenen Daten ist zu berücksichtigen, dass Artefakte auf den Immunoblots die ermittelten Signalstärken positiv und Bereiche maximaler Schwärzung auf dem aufgelegten Röntgenfilm die Werte negativ beeinflussen können.

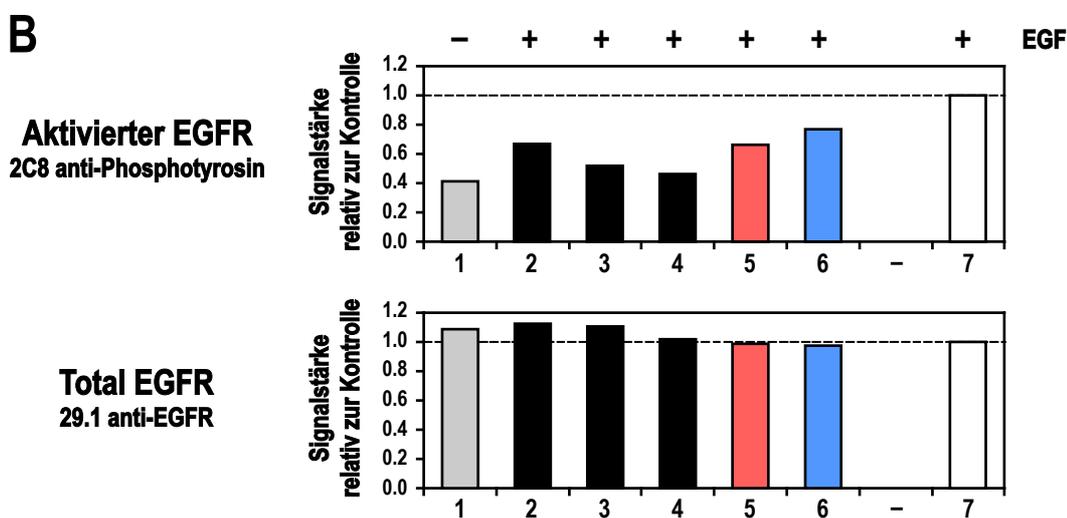
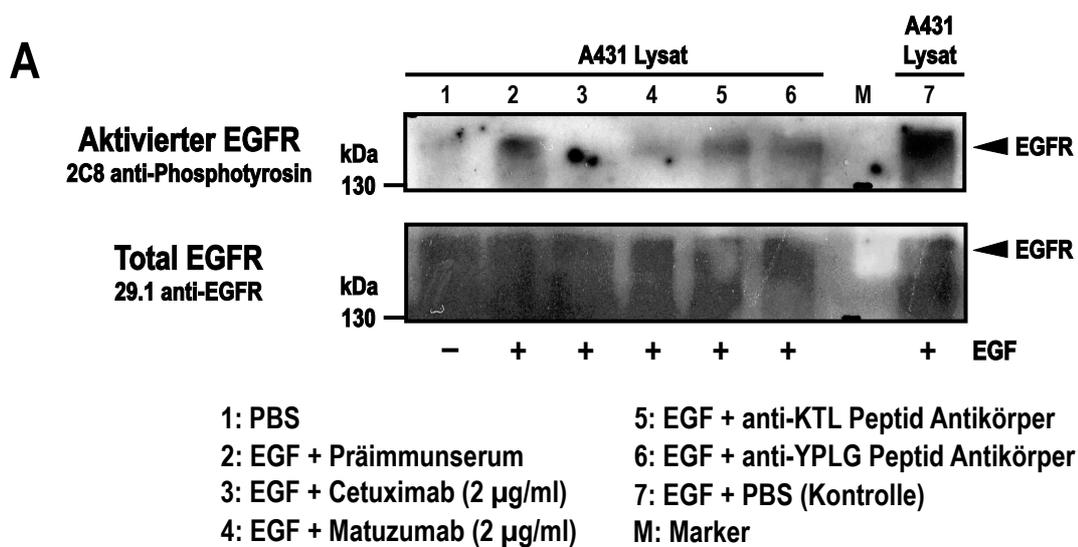


Abb. 3-38: Konkurrenz der EGF-induzierten Phosphorylierung von EGFR durch anti-Peptid Antikörper bzw. anti-EGFR Antikörper (I). (A) Immunoblot des phosphorylierten (obere Reihe) und des gesamten EGFR Proteins (untere Reihe) in Lysaten von A431 Zellen nach Vorinkubation mit unterschiedlichen Kompetitoren und nachfolgender Stimulation mit 50 ng/ml EGF. (B) Quantifizierung der Signalintensitäten relativ zur Positivkontrolle (weiß – Stimulation des Rezeptors mit EGF ohne Kompetitor; die zur Berechnung verwendeten mittleren Graustufenwerte wurden mit dem Analyseprogramm „ImageJ 1.42g“ ermittelt).

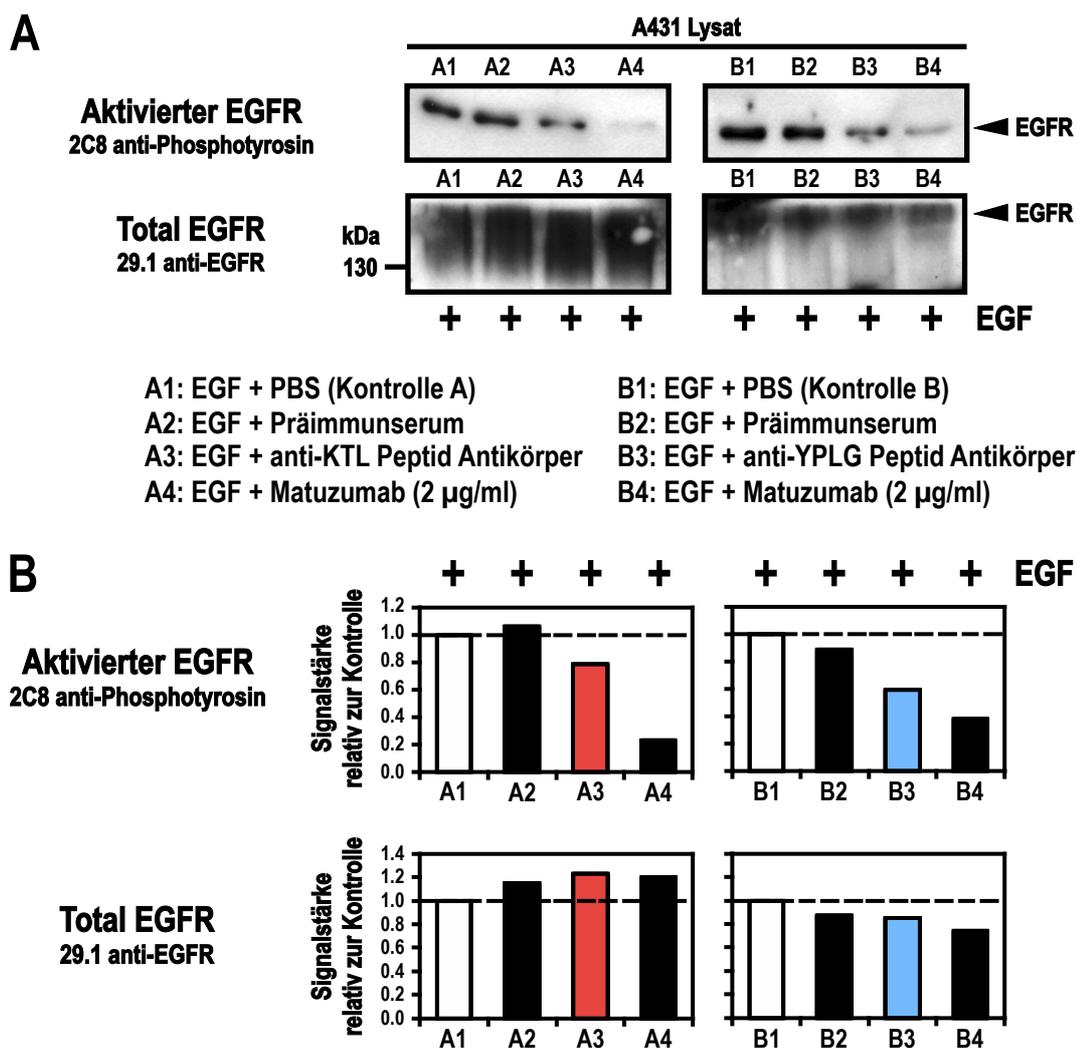


Abb. 3-39: Konkurrenz der EGF-induzierten Phosphorylierung von EGFR durch anti-Peptid Antikörper bzw. anti-EGFR Antikörper (II). (A) Immunoblot des phosphorylierten (obere Reihe) und des gesamten EGFR Proteins (untere Reihe) in Lysaten von A431 Zellen nach Vorinkubation mit unterschiedlichen Kompetitoren und nachfolgender Stimulation mit 50 ng/ml EGF. (B) Quantifizierung der Signalintensitäten relativ zur Positivkontrolle (weiß – Stimulation des Rezeptors mit EGF ohne Kompetitor; die zur Berechnung verwendeten mittleren Graustufenwerte wurden mit dem Analyseprogramm „ImageJ 1.42g“ ermittelt).

In den gezeigten Immunoblots ist deutlich zu erkennen, dass die anti-KTL bzw. anti-YPLG Peptid Antikörper als Kompetitoren, sowie die als Positivkontrolle eingesetzten anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab die durch EGF induzierte Phosphorylierung des Rezeptors hemmen. Das als Negativkontrolle eingesetzte Präimmunserum aus Kaninchen zeigt in dem in Abb. 3-39 gezeigten Immunoblot keine Reduktion des Signals im Vergleich zur Referenz (EGF Zugabe ohne Kompetitor), in dem in Abb. 3-38 gezeigten Experiment wurde jedoch eine Reduktion der Signalstärke beobachtet. Trotz der sorgfältigen Sättigung freier Bindungsstellen auf den PVDF Membranen mit Magermilchpulver wurden auf den in Abb. 3-38 gezeigten Immunoblots deutliche Hintergrundsignale sowie einige Artefakte

detektiert, was zu Problemen bei der Quantifizierung der Daten führte. Auf der Grundlage der Daten beider Experimente lässt sich jedoch zusammenfassend sagen, dass die Bindung von EGF und die nachfolgende Aktivierung des Rezeptors durch Zugabe von anti-Peptid Antikörpern zumindest teilweise reduziert wurde.

Zur Bestätigung dieser Beobachtungen wurde in einem MTT-Zytotoxizitätsassay getestet, ob die anti-Peptid Antikörper in der Lage sind, die Bindung des natürlichen Liganden TGF α an EGFR zu kompetieren, wie es für die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab zu beobachten ist. Hierzu wurde analog zu den in Abschnitt 3.5.2 durchgeführten Experimenten (siehe dort) ein gegen EGFR gerichtetes, von Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (ETA) abgeleitetes rekombinantes Toxin verwendet, das als Zellbindungsdomäne das TGF α Peptid enthält (Schmidt *et al.*, 1996). Hierzu wurden A431 Zellen in 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. Als Kompetitoren wurden in einer Vorinkubation pro Ansatz das Toxin TGF α -ETA (50 ng/ml) mit anti-EGFR mAb Matuzumab (1 μ g/ml), gereinigten anti-Peptid Antikörpern (KTL Motiv bzw. YPLG-Motiv) bzw. Präimmunserum und PBS als Kontrollen inkubiert. Diese wurden für 30 min bei 37°C auf die Zellen gegeben, gefolgt von einem Waschschrift und weiteren Inkubations- und Lysesritten wie für die in Abschnitt 3.5.2 gezeigten MTT-Zytotoxizitätsassays bereits beschrieben. Als weitere Kontrollen wurde in getrennten Versuchsansätzen das gegen ErbB2 gerichtete Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA in gleicher Weise vorinkubiert und auf die A431 Zellen gegeben. Der Anteil überlebender Zellen nach Abschluss des Experimentes im Vergleich zur nur mit PBS behandelten Kontrolle (definiert als 100% überlebende Zellen) ist in Abb. 3-40 gezeigt.

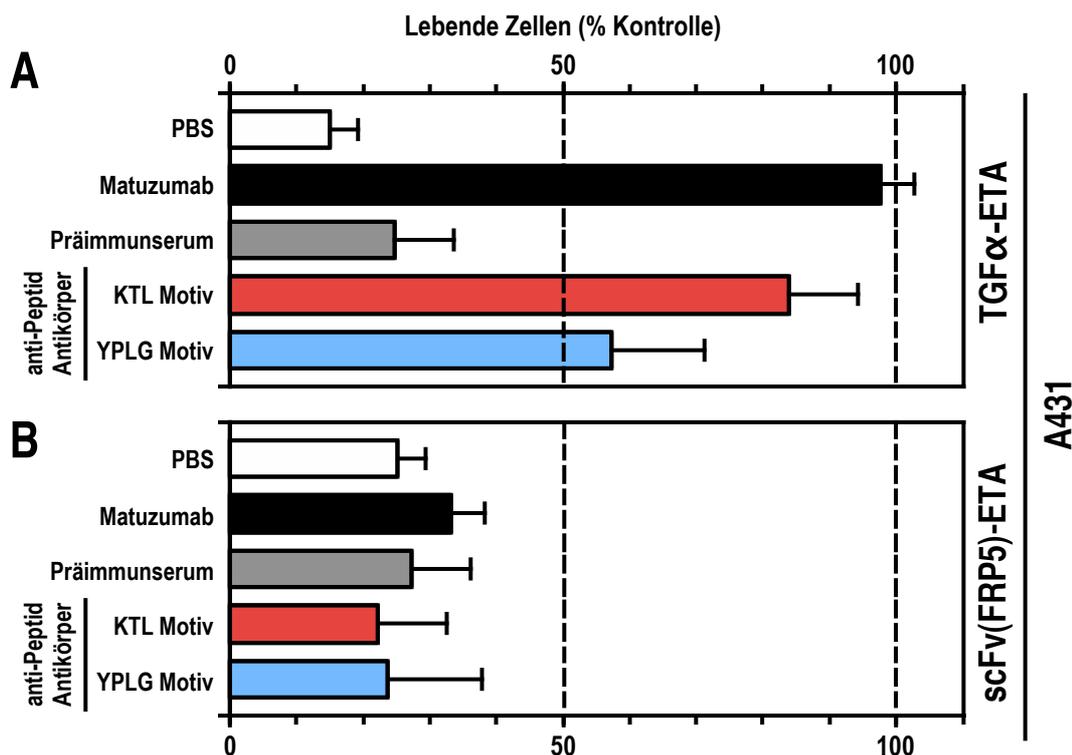


Abb. 3-40: Blockade der Zellbindung und Zytotoxizität des rekombinanten Toxins TGF α -ETA durch anti-Peptid Antikörper. (A) Die für EGFR exprimierende A431 Zellen zytotoxische Wirkung von TGF α -ETA (Schmidt *et al.*, 1996) kann durch Zugabe des anti-EGFR Antikörpers Matuzumab vollständig inhibiert werden. Für die anti-Peptid Antikörper (anti-KTL Motiv bzw. anti-YPLG Motiv) wurde in diesem Experiment eine partielle Protektion der Zellen beobachtet. **(B)** Bei Einsatz des gegen ErbB2 gerichteten scFv(FRP5)-ETA ist für keinen der hier getesteten Antikörper eine Kompetition des Immuntoxins und somit Protektion der Zellen zu beobachten.

Die in den Kontrollen beobachtete zytotoxische Wirkung von TGF α -ETA auf A431 Zellen (ca. 15% lebende Zellen) kann durch Zugabe des anti-EGFR Antikörpers Matuzumab vollständig inhibiert werden (Abb. 3-40A). Für die anti-Peptid Antikörper wurde eine partielle Protektion der Zellen beobachtet, wobei die anti-KTL Peptid Antikörper in diesem Experiment eine stärkere Kompetition der Bindung des rekombinanten Toxins zeigen (ca. 80% lebende Zellen) als die anti-YPLG Peptid Antikörper (ca. 50% lebende Zellen). Die hier beobachtete Kompetition der Bindung der Zellbindungsdomäne des Toxins TGF α -ETA ist selektiv, wie die Daten für das gegen ErbB2 gerichtete Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA zeigen (Abb. 3-40B).

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen die Fähigkeit der anti-Peptid Antikörper, die Bindung der natürlichen Liganden TGF α und EGF an EGFR zu kompetieren. Dies entspricht der Aktivität der parentalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die in dieser Arbeit generierten anti-Peptid Antikörper ähnliche Bindungsstellen am EGFR besetzen wie die parentalen anti-EGFR Antikörper (vgl. 3.8.1 und 3.8.2).

3.8.5 Bestimmung der Bindungsaffinitäten von anti-Peptid Antikörpern (Sättigungs-ELISA)

Um näherungsweise die Affinitäten der anti-Peptid Antikörper bzw. der monoklonalen anti-EGFR Antikörper bei Bindung an die synthetischen Peptide **VLPKTLGGGS** (KTL Motiv) und **ACKYPLGHQCGGS** (YPLG Motiv) und an EGFR zu bestimmen, wurden die Vertiefungen von 96-well Mikrotiterplatten über Nacht mit den synthetischen Peptiden (5 µg/well) bzw. gereinigter EGFR Ektodomäne (sEGFR; 100 ng/well; zur Verfügung gestellt von M. Jeschke und W. Weber) beschichtet und geblockt. In Verdünnungsreihen wurden die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab und der anti-ErbB2 Antikörper Herceptin® als Kontrolle, sowie affinitätsgereinigte anti-Peptid Antikörper auf Bindung an die immobilisierten Peptide und EGFR Ektodomäne getestet. Die Detektion erfolgte mittels entsprechender HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-human IgG/HRP bzw. anti-Kaninchen IgG/HRP) und Zugabe der HRP-Substratlösung ABTS (Roche). Die enzymatische Aktivität wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm bestimmt. Bindungskurven wurden mit der Datenanalyse-Software „GraphPad Prism 5“ (<http://www.graphpad.com/prism/>) erstellt (Abb. 3-41; Abb. 3-42). Die resultierenden Bindungsaffinitäten (K_D Werte) wurden aus diesen Bindungskurven durch nicht-lineare Regression mithilfe desselben Computerprogramms ermittelt (Tab. 3-43).

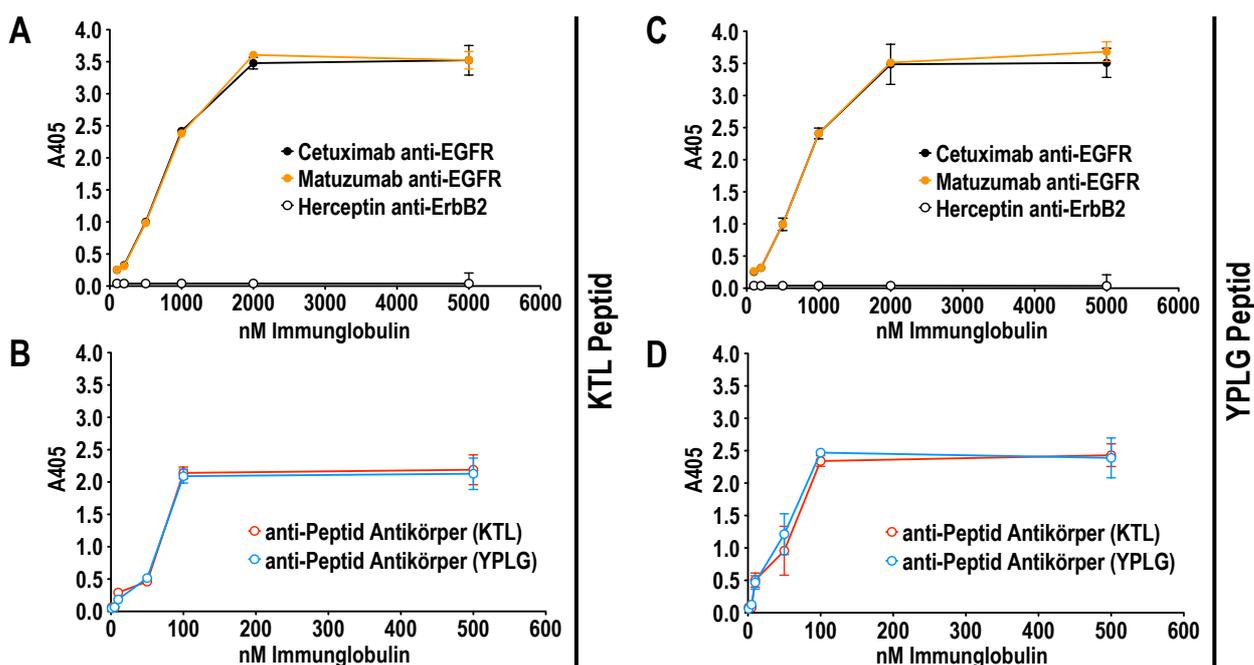


Abb. 3-41: Bindungskurven für anti-Peptid Antikörper und die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab nach Bindung an immobilisierte synthetische Peptide. Die Bindungsdaten für die monoklonalen anti-EGFR Antikörper (A, C) und die affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper (B, D) sind in separaten Graphen dargestellt. Die Teilabbildungen (A) und (B) zeigen die Bindungskurven für immobilisiertes KTL Peptid, in den Teilabbildungen (C) und (D) sind die Daten für immobilisiertes YPLG Peptid gezeigt.

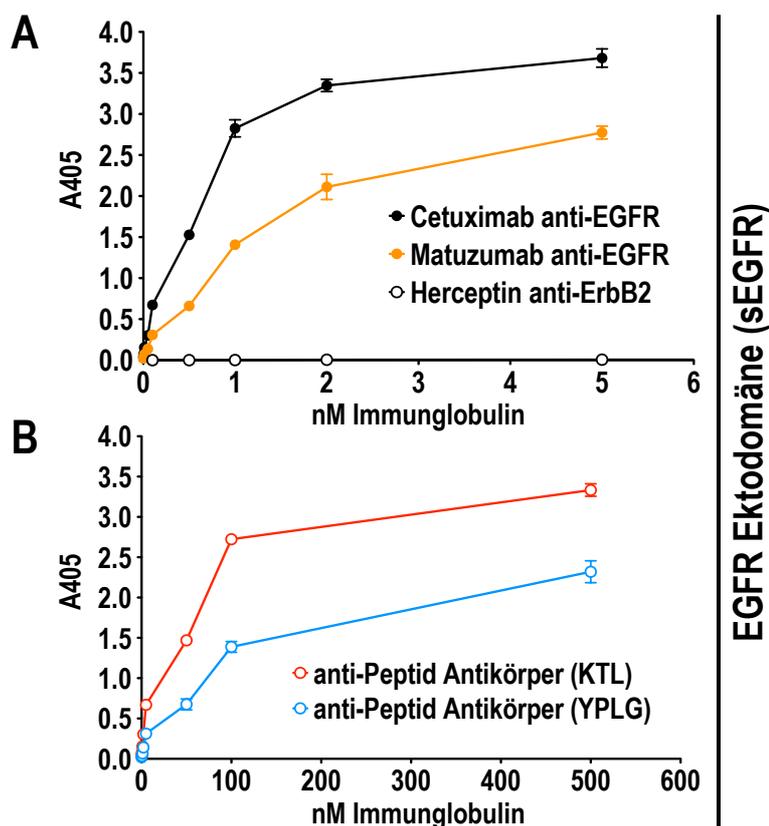


Abb. 3-42: Bindungskurven für anti-Peptid Antikörper und die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab nach Bindung an die immobilisierte EGFR Ektodomäne (sEGFR). Die Bindungsdaten für die monoklonalen anti-EGFR Antikörper (A) und affinitätsgereinigte anti-Peptid Antikörper (B) sind in separaten Graphen dargestellt.

Die ermittelten Bindungsaffinitäten der anti-Peptid Antikörper im Fall der jeweiligen synthetischen Peptide liegen im Bereich von 10^{-7} M (nanomolare Affinität). Die Bindung der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab an die Peptide ist um den Faktor 10 schwächer (10^{-6} M). Die Affinitäten der anti-EGFR mAbs zur EGFR Ektodomäne (sEGFR) liegen im nanomolaren bzw. oberen picomolaren Bereich (10^{-9} M bis 10^{-10} M) und entsprechen weitgehend den in der Literatur beschriebenen Werten (Mendelsohn und Baselga, 2003; Vanhoefler *et al.*, 2004). Die Bindungsaffinitäten der anti-EGFR mAbs Cetuximab und Matuzumab für das Zielprotein EGFR sind um den Faktor 100 bis 500 höher als die hier ermittelten Affinitäten der anti-Peptid Antikörper für die EGFR Ektodomäne. Die hier bestimmten Affinitäten der anti-Peptid Antikörper zu sEGFR liegen im oberen nanomolaren Bereich (10^{-7} M bis 10^{-8} M). Auch in diesem Experiment zeigten die anti-Peptid Antikörper Kreuzreaktivität für das jeweils andere Peptid mit vergleichbarer Bindungsstärke, was bereits bei der Überprüfung der Spezifitäten der anti-Peptid Seren für die synthetischen Peptide beobachtet worden war (vgl. 3.7.3). Der als Negativkontrolle eingesetzte anti-ErbB2 Antikörper Herceptin® zeigte in diesen Experimenten erwartungsgemäß keine Bindung an die immobilisierten Peptide bzw. sEGFR.

	Cetuximab anti-EGFR	Matuzumab anti-EGFR	anti-KTL Peptid	anti-YPLG Peptid	
KTL Peptid	$1,2 \cdot 10^{-6}$ M	$1,2 \cdot 10^{-6}$ M	$8,2 \cdot 10^{-8}$ M	$8,0 \cdot 10^{-8}$ M	K_D
	$5,2 \cdot 10^{-7}$ M	$5,8 \cdot 10^{-7}$ M	$6,2 \cdot 10^{-8}$ M	$5,8 \cdot 10^{-8}$ M	K _D StAbw
	4,772	4,836	2,723	2,648	Bmax
	0,802	0,889	0,711	0,661	Bmax StAbw
	0,94	0,93	0,85	0,86	R ²
YPLG Peptid	$1,2 \cdot 10^{-6}$ M	$1,3 \cdot 10^{-6}$ M	$5,6 \cdot 10^{-8}$ M	$4,4 \cdot 10^{-8}$ M	K_D
	$5,3 \cdot 10^{-7}$ M	$5,3 \cdot 10^{-7}$ M	$2,9 \cdot 10^{-8}$ M	$2,2 \cdot 10^{-8}$ M	K _D StAbw
	4,763	5,011	2,864	2,809	Bmax
	0,814	0,809	0,470	0,408	Bmax StAbw
	0,94	0,95	0,92	0,93	R ²
sEGFR	$6,6 \cdot 10^{-10}$ M	$1,8 \cdot 10^{-9}$ M	$5,1 \cdot 10^{-8}$ M	$1,3 \cdot 10^{-7}$ M	K_D
	$1,2 \cdot 10^{-10}$ M	$2,6 \cdot 10^{-10}$ M	$1,6 \cdot 10^{-8}$ M	$2,8 \cdot 10^{-8}$ M	K _D StAbw
	4,301	3,821	3,713	2,917	Bmax
	0,239	0,237	0,339	0,246	Bmax StAbw
	0,99	0,99	0,97	0,98	R ²
EGFR (Lit.)	$3,9 \cdot 10^{-9}$ M	$3,4 \cdot 10^{-10}$ M	–	–	K_D

Tab. 3-43: Quantifizierung der Affinitäten (K_D Werte) von anti-Peptid Antikörpern und monoklonalen anti-EGFR Antikörpern für synthetische Peptide und für die EGFR Ektodomäne (sEGFR). Die angegebenen Werte wurden durch nicht-lineare Regression aus den Bindungskurven mithilfe der Datenanalyse-Software „GraphPad Prism 5“ ermittelt. Als Referenz sind die in der Literatur beschriebenen Werte für die Affinitäten von Cetuximab (Mendelsohn und Baselga, 2003) und Matuzumab (Vanhoefer *et al.*, 2004) für den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR angegeben (unten). StAbw = Standardabweichung des Mittelwertes; Bmax = Absorptionswert (A405) bei maximaler Sättigung (extrapoliert); R² = Bestimmtheitsmaß der nicht-linearen Regression.

3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den Abschnitten 3.7 und 3.8 sind Experimente beschrieben, um die Wirkungsweise der in den vorangegangenen Versuchen identifizierten Peptidmotive KTL und YPLG als potentielle Mimotope von Cetuximab bzw. Matuzumab zu untersuchen. Peptide, die diese kurzen Sequenzmotive enthalten, zeigten in den vorangegangenen Experimenten kreuzreaktive Bindung an die anti-EGFR Antikörper und waren darüber hinaus in der Lage, die Bindung des Immuntoxins scFv(225)-ETA an EGFR exprimierende Zielzellen zu kompetieren (siehe 3.6).

Zwei Peptide mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv wurden ausgewählt und als KLH-gekoppelte synthetische Peptide zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. In MTT-Zytotoxizitätsassays wurde zunächst bestätigt, dass auch die synthetischen Peptide in der Lage sind, durch Kompetition der Bindung des gegen EGFR gerichteten Immuntoxins scFv(225)-ETA dessen zytotoxische Wirkung auf EGFR exprimierende Zellen zu verhindern (siehe 3.7.2). Die beobachtete Fähigkeit der Peptide zur Kompetition war spezifisch für das „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab, scFv(225), wie Kontrollexperimente mit dem gegen ErbB2 gerichteten Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA zeigten. Affinitätsgereinigte anti-Peptid Antikörper aus den durch Immunisierung generierten Kaninchenseren zeigten in ELISA Experimenten konzentrationsabhängige Bindung an die immobilisierten synthetischen Peptide (siehe 3.7.3). Die Bindung der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab an die synthetischen Peptide wurde in diesen Experimenten ebenfalls bestätigt. Im Gegensatz zu den Präimmunsereen zeigten auch die nicht aufgereinigten Kaninchenseren in ELISA Experimenten Bindung an die synthetischen Peptide, die aufgrund der geringeren Konzentration spezifischer anti-Peptid Antikörper im Vergleich zu den affinitätsgereinigten Fraktionen jedoch erst bei geringen Verdünnungen der Seren detektiert werden konnte.

Die Bindung der affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper an den humanen EGFR auf der Oberfläche EGFR exprimierender Tumorzellen wurde in FACS Experimenten analysiert (siehe 3.8.1). Für die gereinigten anti-Peptid Antikörper wurde Bindung an murine Renca-lacZ/EGFR Zellen detektiert, die den humanen EGFR auf der Oberfläche exprimieren. Im Gegensatz hierzu zeigten als Kontrolle eingesetztes Präimmunsereum bzw. der anti-ErbB2 Antikörper Herceptin® keine Bindung. Die beobachtete Bindung war spezifisch für den humanen EGFR, denn beim Einsatz der parentalen Kontrollzelllinie Renca-lacZ wurde keine Bindung beobachtet. Die anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab dienten in diesen Experimenten als Positivkontrollen. Die Bindung der anti-Peptid Antikörper an EGFR wurde darüber hinaus auch bei Verwendung humaner A431 Vulvakarzinomzellen beobachtet. Die Bindung konnte durch Vorinkubation der Antikörper mit einem Überschuss der entsprechenden synthetischen Peptide, nicht jedoch bei Verwendung eines irrelevanten Kontrollpeptides vollständig verhindert werden. In einer weiteren Serie von FACS Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Antikörper Cetuximab und Matuzumab an EGFR durch eine Vorinkubation von Renca-lacZ/EGFR Zellen mit den

gereinigten anti-Peptid Antikörpern, nicht jedoch durch Vorinkubation mit Präimmunserum deutlich reduziert werden konnte. Dies ist ein eindeutiger Nachweis der Fähigkeit der in Immunisierungsexperimenten generierten anti-Peptid Antikörper, die Bindungsstellen von Cetuximab und Matuzumab am EGFR zumindest teilweise zu besetzen. Diese Beobachtungen zeigen, dass es sich bei den zur Immunisierung eingesetzten Peptiden mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv um echte Mimetope handelt, die in der Lage sind, in Versuchstieren endogene Antikörper zu induzieren, deren Bindungsspezifität derjenigen der anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab entspricht.

In Immunfluoreszenz Experimenten wurde die Bindung der anti-Peptid Antikörper an Renca-lacZ/EGFR Zellen erneut überprüft und mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) visualisiert (siehe 3.8.2). In diesen Experimenten wurde für beide anti-Peptid Antikörper (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) Bindung an die Zelloberfläche bzw. membrannahe intrazelluläre Strukturen beobachtet, die der Lokalisierung der Bindungssignale der parallel getesteten anti-EGFR Antikörper Cetuximab, Matuzumab und dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 entsprach. Die Bindung der anti-Peptid Antikörper, nicht jedoch die Bindung des Kontrollantikörpers R-1, konnte durch Zugabe eines Überschusses der jeweiligen synthetischen Peptide verhindert werden, wie es in FACS Experimenten bereits beobachtet worden war (siehe oben). Als Kontrolle eingesetztes Präimmunserum zeigte kein Bindungssignal. In einer weiteren Serie von Immunfluoreszenz Experimenten wurden Renca-lacZ/EGFR Zellen gleichzeitig mit anti-KTL bzw. anti-YPLG Peptid Antikörpern aus Kaninchen sowie dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 inkubiert und diese mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern detektiert. Durch eine Überlagerung der Signale für die jeweiligen anti-Peptid Antikörper konnte eindeutig Kolokalisation mit dem Signal des Antikörpers R-1 nachgewiesen werden. Dies ist ein Beweis dafür, dass es sich bei der Bindung der anti-Peptid Antikörper an die Oberfläche von Renca-lacZ/EGFR um Bindung an den humanen EGFR handelt.

In Immunoblot Experimenten wurde die Bindung der anti-Peptid Antikörper an EGFR in Tumorzelllysaten untersucht (siehe 3.8.3). In Lysaten von EGFR exprimierenden Zelllinien konnte ein Protein detektiert werden, dessen Größe dem humanen EGFR entspricht. Allerdings wurden in EGFR positiven Zellen auch unspezifische Bindungssignale detektiert. Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Vorinkubation von EGFR exprimierenden A431 Zellen mit den anti-Peptid Antikörpern die Bindung des natürlichen Peptidliganden EGF und somit die Aktivierung von EGFR beeinflusst (siehe 3.8.4). Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die durch Bindung von EGF ausgelöste Autophosphorylierung des Rezeptors durch Zugabe von anti-Peptid Antikörpern teilweise inhibiert werden kann, allerdings nicht in dem gleichen Ausmaß, wie dies für die als Positivkontrollen eingesetzten anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab beobachtet wurde. Darüber hinaus wurde in MTT-Zytotoxizitätsassays die Konkurrenz der Bindung des rekombinanten Toxins TGF α -ETA an EGFR exprimierende A431 Zellen untersucht. In diesen Experimenten konnte Konkurrenz des natürlichen Peptidliganden TGF α , der die Zellbindungsdomäne von TGF α -ETA bildet, durch Vorinkubation mit den

anti-Peptid Antikörpern nachgewiesen werden, die Zugabe des anti-EGFR Antikörpers Matuzumab war jedoch auch in diesen Experimenten effizienter.

Um eine näherungsweise Quantifizierung der Affinitäten der Bindung der anti-Peptid Antikörper und der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab an die zur Immunisierung eingesetzten synthetischen Peptide zu ermöglichen, wurden ELISA Experimente durchgeführt, bei denen die Bindung der Antikörper an immobilisierte Peptide (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) sowie die gereinigte extrazelluläre Domäne des humanen EGFR (sEGFR) bis in den Bereich der Sättigung gemessen wurde (siehe 3.8.5). Die aus den Bindungskurven berechneten Affinitätswerte zeigen, dass die anti-Peptid Antikörper an sEGFR im nanomolaren Bereich (10^{-7} M bis 10^{-8} M) binden und damit ca. 200-fach niedrigere Affinitäten für den Rezeptor aufweisen als für die affinitätsoptimierten anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab in der Literatur beschrieben ist. Die Affinitäten der anti-Peptid Antikörper für die synthetischen Peptide liegen ebenfalls im nanomolaren Bereich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem hier vorgestellten Screeningverfahren auf Basis einer Variante der „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) Methode (Benhar *et al.*, 2000) kreuzreaktive Peptidmimotope aus Phagenbibliotheken identifiziert werden konnten, die sowohl mit Cetuximab anti-EGFR als auch Matuzumab anti-EGFR interagieren können. Das ursprüngliche Ziel, eine exakte Lokalisierung der Epitope bis auf die Ebene der für die Antikörperbindung kritischen Aminosäuren anhand der selektierten Peptide zu ermöglichen, ist jedoch aufgrund der Diversität der Sequenzen nach den DIP Selektionen nicht erreicht worden. Durch Fokussierung auf kreuzreaktive Peptide, die in der Lage waren, in Konkurrenzexperimenten die Bindung von Cetuximab und Matuzumab an das Antigen EGFR zu kompetieren, konnten jedoch durch die hier beschriebenen Immunisierungsexperimente vielversprechende Kandidaten für die mögliche Entwicklung von Vakzinen identifiziert werden. Diese Peptide waren in der Lage, beim Einsatz als Peptidvakzine in Kaninchen die Produktion endogener Antikörper zu induzieren, deren Bindungseigenschaften bezüglich Antigenspezifität und Lage der Epitope den monoklonalen Antikörpern Cetuximab und Matuzumab entsprechen. Die gefundenen Peptide könnten durch Kombination der beiden Motive, Multimerisierung und Affinitätsoptimierung als Basis für zukünftige Peptidvakzine dienen, die eine starke endogene Immunantwort gegen den humanen EGFR auch in Tumorpatienten auslösen könnte.

4. Diskussion

4.1 Ausgangssituation und Zielsetzung

Der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) wird auf der Oberfläche vieler Tumoren epithelialen Ursprungs, darunter Kolonkarzinome sowie Tumoren des Kopf- und Halsbereiches, übermäßig stark exprimiert (Hynes und Lane, 2005; Yarden und Sliwkowski, 2001). Die Aktivierung dieser tumorassoziierten ErbB Rezeptortyrosinkinase trägt ursächlich zur malignen Transformation und zum weiteren Voranschreiten der Tumorerkrankung bei (Mendelsohn und Baselga, 2006). Der Einsatz des aus einem murinen Vorläufermolekül abgeleiteten chimären monoklonalen anti-EGFR Antikörpers Cetuximab bzw. des humanisierten Antikörpers Matuzumab ergänzend zur Chemotherapie von EGFR-positiven Tumoren epithelialen Ursprungs hat sich in der klinischen Anwendung (Cetuximab) bzw. in einer Reihe von klinischen Studien (Matuzumab) als effektiv zur Verbesserung der Therapieergebnisse erwiesen. Auch gegenwärtig werden klinische Studien unter Einsatz dieser Antikörper durchgeführt: Allein für das Jahr 2008 finden sich in der Online-Datenbank PubMed der amerikanischen National Institutes of Health (NIH) 19 Publikationen zu klinischen Studien unter Einsatz von Cetuximab (Adams *et al.*, 2008; Belani *et al.*, 2008; Bokemeyer *et al.*, 2008; Borghei *et al.*, 2008; Borner *et al.*, 2008; Cartwright *et al.*, 2008; Cascinu *et al.*, 2008; Gamucci *et al.*, 2008; Konner *et al.*, 2008; Locati *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Pessino *et al.*, 2008; Ramalingam *et al.*, 2008; Secord *et al.*, 2008; Sobrero *et al.*, 2008; Tahara *et al.*, 2008; Tol *et al.*, 2008; Vermorken *et al.*, 2008; Wilke *et al.*, 2008). Der Antikörper Cetuximab, der bereits zur Behandlung von EGFR-positiven metastasierenden Kolonkarzinomen (FDA: 02-2004 – EMEA: 07-2004) bzw. Tumoren des Kopf- und Halsbereiches (FDA: 03-2006 – EMEA: 04-2006) zugelassen ist, wird momentan auch auf Wirksamkeit beim Einsatz für andere Indikationen getestet, wie z.B. bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC; Borghei *et al.*, 2008; Belani *et al.*, 2008; Ramalingam *et al.*, 2008), Ovarialkarzinom (Konner *et al.*, 2008; Secord *et al.*, 2008) oder Pankreaskarzinom (Cascinu *et al.*, 2008). Der in der klinischen Entwicklung weit vorangeschrittene humanisierte Antikörper Matuzumab wird momentan ebenfalls auf eine lebensverlängernde Wirksamkeit bei diesen Indikationen in Kombination mit klassischen Chemotherapeutika getestet (Graeven *et al.*, 2006; Kollmannsberger *et al.*, 2006; Kuester *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2008; Seiden *et al.*, 2007).

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Bindungsstellen von Cetuximab und Matuzumab am EGFR nicht bekannt. In Immunoblot Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide Antikörper konformationelle Epitope erkennen, die für die Antikörperbindung intakte Disulfidbrücken und damit die native Raumstruktur des Rezeptors voraussetzen (siehe 3.2.1). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Peptiden, die mit den hypervariablen Regionen (CDR) der gegen den humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gerichteten therapeutischen monoklonalen Antikörper Cetuximab und Matuzumab interagieren, um Hinweise auf die Bindungsstellen dieser Antikörper zu

erhalten. Aufgrund des strukturellen Aufbaus der Epitope erschien es unwahrscheinlich, dass Bindungstests der Antikörper mit Rezeptorfragmenten abgeleitet aus der primären Aminosäuresequenz der EGFR Ektodomäne eine Identifizierung der zur Antikörperbindung beitragenden Aminosäuren ermöglichen würden. Daher wurde die Phage Display Methode gewählt, um aus Bibliotheken von Peptidtragenden M13 Bakteriophagen kurze Fusionspeptide zu identifizieren, die spezifisch mit den hypervariablen Regionen (CDR) von Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren. Derartige Peptide könnten Teile des realen Epitops der Antikörper auf dem EGFR strukturell in linearer Form nachbilden. Die Analyse der Aminosäuresequenzen solcher sogenannter Mimotope könnte wichtige Hinweise auf die Bindungsstellen der Antikörper liefern (Gomez-Roman *et al.*, 2002; Landry *et al.*, 2001; Vaisman *et al.*, 2000).

4.2 Selektion von spezifisch mit Cetuximab bzw. Matuzumab interagierenden Peptiden

Grundlage für die Auswahl der Phage Display Methode zur Selektion der Peptide waren experimentelle Daten, die zeigten, dass sowohl Cetuximab als auch Matuzumab räumlich komplexe, diskontinuierliche Epitope am Rezeptormolekül erkennen (siehe 3.2.1). Zur Identifizierung von mit diesen Antikörpern interagierenden Peptiden wurden Peptid-tragende Bakteriophagen aus unterschiedlichen Phagenbibliotheken auf Bindung an „single-chain“ Antikörperfragmente dieser Antikörper selektioniert. Die Anreicherung bindender Phagenklone erfolgte in drei alternierenden positiven und negativen Selektionsrunden unter Anwendung der „Delayed Infectivity Panning“ Methode (siehe 3.4.1; Benhar *et al.*, 2000). Ein Vorteil dieses Selektionsverfahrens gegenüber der in der vorangegangenen Diplomarbeit verwendeten klassischen Phage Display Methode mit immobilisierten Immnglobulinen ist die Abwesenheit der konstanten Regionen der Antikörper, die zur überwiegenden Selektion ungewünschter Peptide mit Affinität für die konstanten Bereiche der Zielstrukturen geführt hatte (Hartmann, 2002). Die Verwendung des DIP Expressionsvektors pIB-Tx ermöglicht die Expression funktionaler „single-chain“ Antikörperfragmente (scFv) an der Oberfläche von *E. coli* Bakterien (Benhar *et al.*, 2000) zum Einsatz in Biopanning Experimenten.

In den hier durchgeführten Screenings wurden jeweils drei positive und drei negative Selektionsrunden mittels DIP durchgeführt. Die Bindung der selektionierten Fusionspeptide an die parentalen monoklonalen Antikörper wurde in Phagen ELISA Experimenten überprüft (siehe 3.4.2). Die Analyse der Sequenzen der Fusionspeptide zeigte keine eindeutige Consensus-Sequenz, es wurden jedoch kurze, gemeinsame Sequenzmotive identifiziert, die sich in angereicherten Klonen aus allen hier verwendeten Phagenbibliotheken wiederfanden (siehe 3.4.3). Sowohl Phagenklone, die gegen das „single-chain“ Antikörperfragment von Cetuximab, scFv(225), selektioniert worden waren, als auch Phagenklone, die gegen das in dieser Arbeit konstruierte „single-chain“ Antikörperfragment von Matuzumab (siehe 3.3.2) selektioniert worden waren, weisen derartige gemeinsame Sequenzmotive auf. Die nach der Selektion nach wie vor große Diversität der gefundenen Peptidsequenzen stellte zunächst ein Problem dar, da ohne

einen funktionalen Test zur Bestätigung der Fähigkeit zur Antikörperkompetition keine qualitative Bewertung der gefundenen Sequenzen bzw. Sequenzmotive möglich war. Eine Alternative wäre die Durchführung weiterer Selektionsrunden gewesen, dessen Ziel eine Anreicherung von Peptiden höherer Affinität durch eine Erhöhung der Stringenz der experimentellen Bedingungen gewesen wäre. Dies kann durch Zugabe steigender Konzentration von Detergenzien, wie z.B. Tween[®]-20, während des Biopannings erreicht werden. Zur gezielten, präferentiellen Anreicherung kreuzreaktiver Peptide in den Phagenpools wäre eine Strategie denkbar, bei der die Phagenpools in positiven Selektionrunden zunächst auf Bindung an das bakteriell exprimierte „single-chain“ Antikörperfragment (scFv) von Cetuximab, und nachfolgend auf das Matuzumab scFv selektioniert würden (oder umgekehrt). Da die Existenz von für beide Antikörper kreuzreaktiven Peptide zu diesem Zeitpunkt der Arbeit jedoch nicht geklärt war und die Fragestellung zunächst nicht auf deren gezielte Anreicherung ausgerichtet war, wurden derartige Selektionen hier nicht durchgeführt.

Peptide mit Spezifität für die hypervariablen Regionen (CDR) der Antikörper wurden in Kompetitionsexperimenten unter Einsatz des EGFR-spezifischen Immuntoxins scFv(225)-ETA (Wels *et al.*, 1995, Azemar *et al.*, 2000) in MTT-Zytotoxizitätsassays identifiziert (siehe 3.5.2). Der überwiegende Teil der getesteten Peptide, die in Phagen ELISA Experimenten Bindung an die monoklonalen anti-EGFR Antikörper gezeigt hatten, war jedoch nicht in der Lage, die Bindung und nachfolgende zytotoxische Wirkung des Immuntoxins zu verhindern. Hieraus lässt sich schließen, dass es sich dabei um Peptide handelt, die an „Framework“ Bereiche der zur Selektion eingesetzten „single-chain“ Antikörperfragmente binden, nicht jedoch an die hypervariablen Regionen (CDR) von Cetuximab, die die Bindung von scFv(225) an das Antigen EGFR vermitteln. Unter den getesteten Peptiden wurden jedoch kreuzreaktive Peptide gefunden, welche mit beiden anti-EGFR Antikörpern, Cetuximab und Matuzumab, interagieren. Peptide, die die gemeinsamen Sequenzmotive KTL bzw. YPLG aufweisen, zeigten Konkurrenz der Bindung des Immuntoxins scFv(225)-ETA an EGFR-exprimierende Zellen. Die Existenz derartiger kreuzreaktiver Peptide deutete zu diesem Zeitpunkt der Arbeit auf ein identisches oder zumindest teilweise überlappendes Epitop der anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab hin. Ein wichtiges Experiment zur Bestätigung der hier beobachteten Kreuzreaktivität wäre ein analoges Experiment unter Einsatz eines Immuntoxins, dessen Zellbindungsdomäne aus dem in dieser Arbeit abgeleiteten „single-chain“ Antikörper von Matuzumab, scFv(E72K), besteht. Ein solches Konstrukt ist durch Austausch von scFv(225) im Expressionsplasmid pSW220 (Wels *et al.*, 1995) durch scFv(E72K) hergestellt und in *E. coli* exprimiert worden, die Aufreinigung des Proteins und nachfolgende MTT-Zytotoxizitätsassays konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr abgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der hier identifizierten Peptide mit zwischenzeitlich publizierten potentiellen Mimotopen für Cetuximab (Riemer *et al.*, 2005) ergab keine offensichtlichen Übereinstimmungen. In der genannten Publikation wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit eine selbstkonstruierte Phagenbibliothek (CL10) verwendet, die zyklisch restringierte Dodecapeptide enthielt

(L. Mazzucchelli, Locarno, CH). Über die ursprüngliche Diversität der dort verwendeten Bibliothek finden sich keine Angaben. Die Selektionen wurden nach dem klassischen Phage Display Biopanning Verfahren durchgeführt, bei dem Cetuximab auf einer Polystyroloberfläche immobilisiert wurde. Es ist daher fraglich, inwieweit in den selektionierten Peptiden Übereinstimmungen zu den in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen zu erwarten gewesen wären, da sowohl die Art der Phagenbibliothek, die eingesetzte Zielstruktur sowie die Selektionsmethode unterschiedlich sind. In der genannten Publikation ist ferner beschrieben, dass eine Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den dort identifizierten potentiellen Mimotopen in den Versuchstieren zur Bildung von Antikörpern führte, die mit EGFR interagieren. Grundlage für die Bildung von Antikörpern gegen das gleiche Antigen des zur Selektion eingesetzten monoklonalen Antikörpers nach Immunisierung mit Peptidmimotopen ist die von Jerne aufgestellte Theorie der anti-Idiotyp-Antikörper (Jerne, 1974). Nach dieser ist es möglich, dass das Immunsystem Antikörper gegen die antigenbindenden Oberflächenstrukturen der hypervariablen Regionen (CDR) von speziesfremden Immunglobulinen bilden kann. Da es umgekehrt wiederum möglich ist, dass gegen diese neu gebildeten anti-Idiotyp-Antikörper erneut Antikörper gegen deren CDR gebildet werden können, können diese anti-anti-Idiotyp-Antikörper wiederum die Spezifität des ursprünglichen Antikörpers aufweisen. Diese Theorie konnte mehrfach erfolgreich experimentell bestätigt werden und führte unter anderem zum erfolgreichen Einsatz im Labor generierter anti-Idiotyp Antikörper gegen Tumorantigene von B-Zell Lymphomen (Kwak *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1982) und des Melanoms (Mittelman *et al.*, 1990) in klinischen Studien.

Für den Fall, dass es sich bei den hier identifizierten Peptiden also um echte Mimotope und damit Abbilder der durch die Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab erkannten Oberflächenstrukturen auf dem EGFR handelt, könnten diese gemäß Jernes Theorie den Platz der anti-Idiotyp Antikörper einnehmen. Gegen diese Mimotope gebildete Antikörper würden wiederum in ihrer Bindungsspezifität anti-anti-Idiotyp Antikörpern von Cetuximab bzw. Matuzumab entsprechen und daher als Antigen den humanen EGFR erkennen. Erfolgreiche Anwendungen von Mimotopen zur Immunisierung gegen das ursprüngliche Antigen von Antikörpern sind in der Literatur mehrfach beschrieben (Delmastro *et al.*, 1997; Jensen-Jarolim *et al.*, 1998; Meola *et al.*, 1995; Partidos, 2000; Riemer und Jensen-Jarolim, 2007), darunter auch Mimotope des anti-ErbB2 Antikörpers Trastuzumab (Riemer *et al.*, 2004). Daher wurden zwei der in dieser Arbeit identifizierten, mit Cetuximab und Matuzumab kreuzreaktiven Peptide mit KTL Motiv bzw. YPLG Motiv ausgewählt, um mit diesen Immunisierungsexperimente in Kaninchen durchzuführen (siehe 3.7). Bei der Auswahl der zwei hierfür verwendeten Peptide wurden die experimentellen Daten aus Phagen ELISA und Konkurrenzexperimenten berücksichtigt. Ferner wurde der kurze Glycin-Serin Linker rekonstituiert, der eine flexible, kovalente Verbindung zum N-Terminus des Hüllproteins pIII von M13KE Bakteriophagen herstellt. Hierdurch sollte dessen möglichem Beitrag zur Bindung der Antikörper auch in den zur Immunisierung verwendeten, an das Immunadjuvanz „keyhole limpet hemocyanine“ (KLH) gekoppelten synthetischen Peptiden Rechnung getragen werden.

Die Analyse der Seren bzw. der aus den Seren affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper ergab, dass in den Versuchstieren eine endogene Immunantwort gegen den humanen EGFR generiert worden war: Die Spezifität der Bindung dieser Antikörper für EGFR konnte in voneinander unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen werden. Die Bindung der Antikörper an die Oberfläche von EGFR-exprimierenden Tumorzellen konnte mittels Durchflusszytometrie (siehe 3.8.1) sowie mittels Immunfluoreszenz Experimenten und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (siehe 3.8.2) nachgewiesen werden. Hierbei zeigten die affinitätsgereinigten anti-Peptid Antikörper darüber hinaus die Fähigkeit zur Konkurrenz der Bindung der monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab an EGFR durch Vorinkubation der Zielzellen. Dies weist nach, dass die Bindungsstellen von Cetuximab und Matuzumab von den anti-Peptid Antikörpern zumindest teilweise besetzt worden waren, wodurch das Bindungssignal der monoklonalen Antikörper im Vergleich zur Kontrolle ohne Vorinkubation deutlich reduziert wurde. Ferner ließ sich die Bindung der anti-Peptid-Antikörper an EGFR-exprimierende Zellen erwartungsgemäß durch Zugabe der synthetischen Peptide kompetieren. In Immunfluoreszenz Experimenten konnte Kollokalisierung mit dem murinen anti-EGFR Antikörper R-1 (Waterfield *et al.*, 1982) beobachtet werden, der ein Epitop in der EGFR Ektodomäne erkennt, das außerhalb der Epitope von Cetuximab und Matuzumab in der Ektodomäne II/CR1 lokalisiert ist (Cochran *et al.*, 2004). Durch die Verwendung dieses Antikörpers zum Nachweis der Kollokalisierung mit anti-Peptid Antikörpern sollte sichergestellt werden, dass sich die Antikörper nicht gegenseitig in ihrer Bindung behindern. Die Analyse der Zellfärbung mithilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie ergab, dass die Bindung ausschließlich an die Zelloberfläche bzw. membrannahe intrazelluläre Strukturen erfolgte, wobei es sich bei letzteren vermutlich um frühe Endosomen handelte, die durch Endozytose internalisierte EGFR Moleküle enthielten.

In Immunoblot Experimenten wurde von den Seren bzw. den gereinigten anti-Peptid Antikörpern ein Protein in Tumorzelllysaten in Immunoblots erkannt, das der Größe des humanen EGFR entspricht (siehe 3.8.3). Im Gegensatz zu den Durchflusszytometrie- und Immunfluoreszenzexperimenten zeigte sich, dass bei der Verwendung der anti-Peptid Antikörper als Primärantikörper in Immunoblots Probleme mit Hintergrundfärbungen und unspezifischen Banden auftraten. Da die Reinigung der anti-Peptid Antikörper aus den Kaninchenserum über eine Affinitätsäule erfolgte, deren Säulenmaterial kovalent mit den synthetischen Peptiden gekoppelt war (persönliche Kommunikation mit Michael Davids, Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg), sollte bei hinreichend guter Reinigung die Monospezifität für eben diese Peptide gewährleistet sein. Auffällig ist, dass die Hintergrundbanden in allen getesteten Lysaten auftraten, die ErbB Rezeptoren exprimieren. Die Identität der in den Immunoblots sichtbaren Nebenbanden konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Eine geeignete Methode hierfür wäre eine Untersuchung der aus Polyacrylamid-Gelen ausgeschnittenen Banden mittels Massenspektrometrie. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die induzierten anti-Peptid Antikörper in der Lage sind, die Bindung der natürlichen Peptidliganden EGF und TGF α an den humanen EGFR zu kompetieren, und dadurch die nachfolgende Aktivierung des Rezeptors durch Autophosphorylierung zu vermindern (siehe

3.8.4). Dies zeigt, dass die Epitope der anti-Peptid Antikörper in für die Bindung natürlicher EGFR Liganden kritischen Bereichen liegen und durch sterische Blockade oder Behinderung nötiger Konformationsänderungen von EGFR eine Aktivierung des Rezeptors verhindern können. Dies ist auch für die monoklonalen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab beschrieben (Fan *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2008). ELISA Experimente zur näherungsweise Bestimmung der Affinitäten der anti-Peptid Antikörper zeigten ebenfalls, dass Bindung an die extrazelluläre Domäne von EGFR erfolgen kann, wenn auch mit geringerer Bindungsstärke als durch die affinitätsoptimierten anti-EGFR Antikörper (siehe 3.8.5). Die ermittelten Werte entsprechen im Falle der Affinitäten von Cetuximab und Matuzumab zwar weitgehend den publizierten Literaturwerten, allerdings ist durch die Wahl des Sättigungs-ELISA als experimentelle Methode und durch die relativ geringe Zahl der bestimmten Datenpunkte die Bestimmung der K_D Werte durch nicht-lineare Regression fehlerbehaftet und stellt daher nur eine näherungsweise Quantifizierung dar. Sensitivere Nachweismethoden, die bei einer Fortführung dieser Arbeit eingesetzt werden könnten, wie z.B. die Verwendung radioaktiv markierter Proteine bzw. Messungen mittels „surface plasmon resonance“ (SPR/BIAcore), könnten zuverlässigere Werte liefern. Ferner konnte in diesen Sättigungs ELISA Experimenten die Bindung von Cetuximab und Matuzumab an beide untersuchte Peptide (KTL Motiv und YPLG Motiv) nachgewiesen werden. Wie schon zuvor bei Bindungstests gegen die synthetischen Peptide (siehe 3.7.2) wurde Kreuzreaktivität der anti-Peptid Antikörper für die beiden getesteten immobilisierten Peptide beobachtet. Dieses Ergebnis war in dieser Form nicht vorherzusehen, da nur Spezifität für das jeweilige Peptid, mit dem das entsprechende Versuchstier immunisiert worden war, erwartet wurde. Verwechslungen der Tiere oder der Peptidinjektionen konnten nach Rücksprache mit der Firma Davids Biotechnologie GmbH in Regensburg, die die Immunisierungen im Auftrag durchführte, ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die kreuzreaktive Bindung der Seren gegen beide getestete Peptide auf Antikörper gegen den gemeinsamen C-Terminus der synthetischen Peptide (**CGGGS**) zurückzuführen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die hier gezeigten experimentellen Daten nachweisen, dass es sich bei den beiden zur Immunisierung eingesetzten Peptide um echte kreuzreaktive Mimotope von Cetuximab bzw. Matuzumab handelt, die einen Teil der Epitope am Antigen EGFR nachbilden. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde unter Einbeziehung der im Laufe dieser Arbeit von anderen Arbeitsgruppen publizierten Kristallstrukturdaten im folgenden versucht, die mögliche Lage der von den Mimotopen nachgebildeten EGFR Oberflächenstrukturen *in silico* vorherzusagen.

4.3 Kristallstrukturen der Epitope von Cetuximab und Matuzumab / „Epitope Mapping“ von anti-Peptid Antikörpern *in silico*

Die in den vergangenen Jahren erfolgte Aufklärung der Strukturen der Ektodomänen der ErbB Rezeptoren (Bouyain *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2003; Cho und Leahy, 2002; Ferguson *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2006) lieferte wichtige Erkenntnisse zum Mechanismus der ligandeninduzierten Aktivierung dieser tumorassoziierten Proteine. Im Verlauf dieser Arbeit wurden auch die Bindungsstellen von Cetuximab und Matuzumab durch Ko-Kristallisation der Fab-Fragmente der Antikörper mit der extrazellulären Domäne von EGFR (Fab von Cetuximab) bzw. der isolierten Ektodomäne III/L2 (Fab von Matuzumab) aufgeklärt (Abb. 4-1; Abb. 4-2; Li *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2008). Die Kenntnis der Aminosäuren am Rezeptor, welche die Epitope dieser Antikörper bilden, lieferte wichtige Hinweise zum Wirkmechanismus dieser Tumorthapeutika.

Sowohl Cetuximab als auch Matuzumab binden an die inaktive, durch eine intramolekulare Interaktion autoinhibierte Konformation von EGFR und erkennen konformationelle Epitope, die ausschließlich von Aminosäuren gebildet werden, die in der globulären Ektodomäne III/L2 lokalisiert sind (Abb. 4-3). Die Bindung an die isolierte EGFR Ektodomäne III/L2 wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, indem dieses Rezeptorfragment an der Oberfläche von *E. coli* exprimiert und die Antikörperbindung in Spun Cell ELISA Experimenten getestet wurde (siehe 3.2.3). Das Epitop von Cetuximab überlappt mit den Bindungsstellen der natürlichen Peptidliganden EGF und TGF α , wodurch die Fähigkeit dieses Antikörpers zur Konkurrenz dieser Moleküle erklärt werden kann (Abb. 4-3; Li *et al.*, 2005). Das Epitop von Matuzumab liegt benachbart in der EGFR Ektodomäne III/L2, es gibt jedoch keine Überschneidungen mit Aminosäuren, die das Epitop von Cetuximab oder die Bindungsstelle der Peptidliganden bilden (Abb. 4-3; Schmiedel *et al.*, 2008). Die Interaktion von Matuzumab mit EGFR behindert weniger die Ligandenbindung, sondern verhindert vielmehr sterisch die konformationellen Umlagerungen des Rezeptors, die zur Interaktion mit einem weiteren ErbB Molekül nötig sind, um ein aktives, zur Signaltransduktion befähigtes Rezeptordimer zu bilden (Schmiedel *et al.*, 2008). Eine gleichzeitige Bindung von Cetuximab und Matuzumab an EGFR erscheint möglich, erste experimentelle Hinweise hierfür wurden erst vor kurzem publiziert (Kamat *et al.*, 2008).

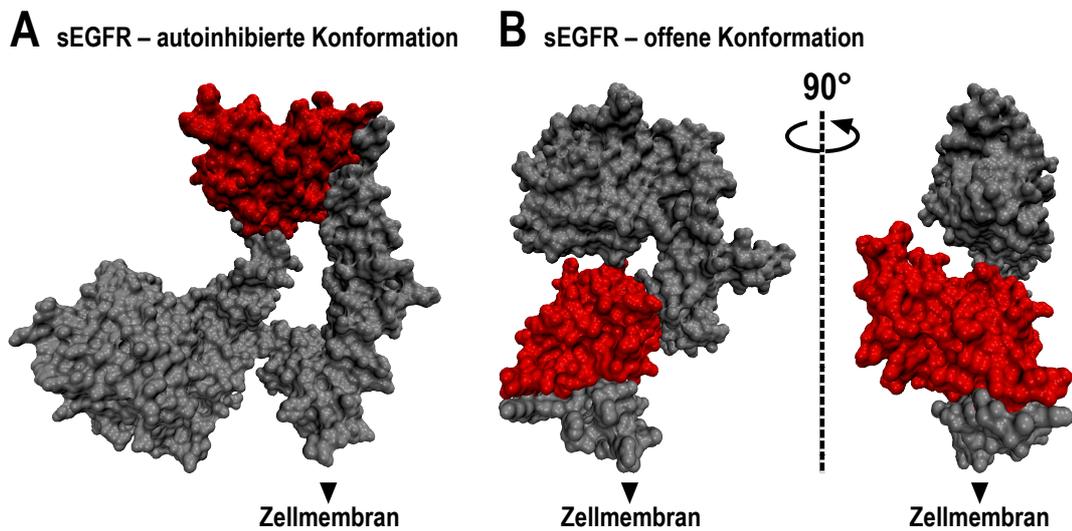


Abb. 4-1: Räumliche Lage der Ektodomäne III/L2 in der extrazellulären Domäne von EGFR. **(A)** Lage der Ektodomäne III/L2 (rot; EGFR AS 313-475) in der autoinhibierten Konformation der extrazellulären Domäne von EGFR (grau; basierend auf **1YY9**. **PDB**; Li *et al.*, 2005). **(B)** Lage der Ektodomäne III/L2 (rot; EGFR AS 313-475) in der offenen Konformation der extrazellulären Domäne von EGFR (grau; basierend auf **1IVO**. **PDB**; Ogiso *et al.*, 2002).

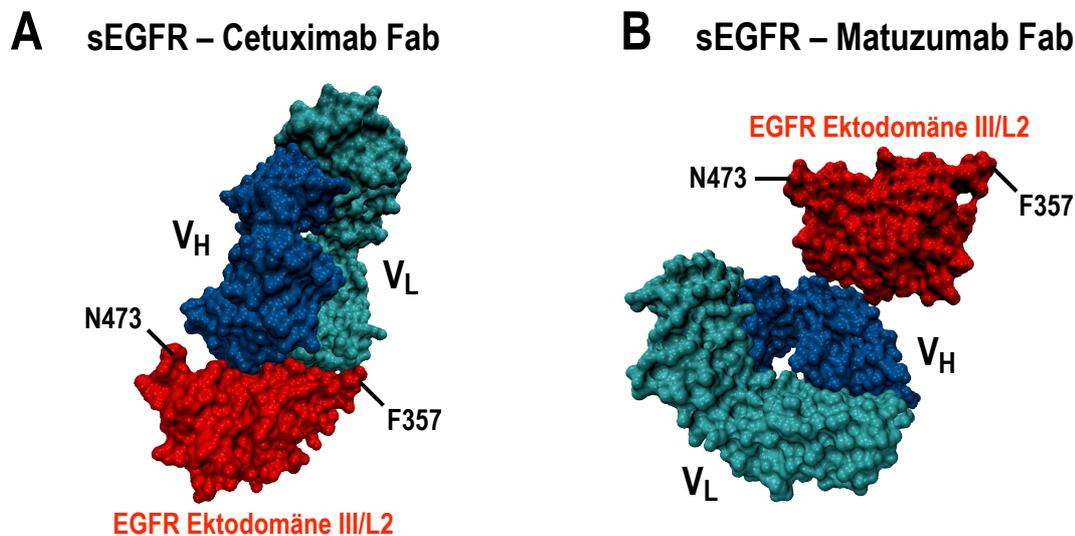


Abb. 4-2: Ko-Kristallstrukturen der Fab-Fragmente von Cetuximab und Matuzumab mit der EGFR Ektodomäne III/L2. **(A)** Ko-Kristallstruktur der Ektodomäne III/L2 von EGFR (rot) mit dem Fab-Fragment von Cetuximab (leichte Kette V_L: hellblau; schwere Kette V_H: dunkelblau; basierend auf **1YY9**. **PDB**; Li *et al.*, 2005). **(B)** Ko-Kristallstruktur der Ektodomäne III/L2 von EGFR (rot) mit dem Fab-Fragment von Matuzumab (leichte Kette V_L: hellblau; schwere Kette V_H: dunkelblau; basierend auf **3C09**. **PDB**; Schmiedel *et al.*, 2008). Die Ektodomäne III/L2 wurde in (A) und (B) derart im Raum gedreht, dass ein Vergleich der räumlichen Lage der Epitope möglich ist; als Orientierungshilfe ist die Lage der beiden Aminosäuren N473 und F357 angegeben.

EGFR Ektodomäne III/L2 (aus 1YY9 . PDB)

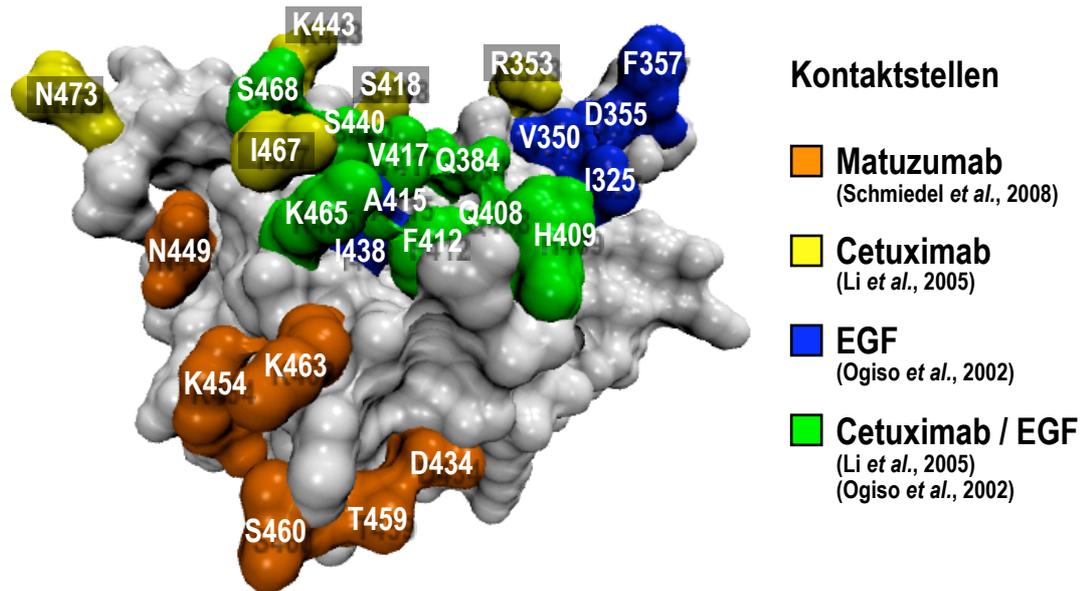


Abb. 4-3: Cetuximab und Matuzumab erkennen konformationelle Epitope in der EGFR Ektodomäne III/L2. Kontaktstellen von EGF (blau; nach Ogiso *et al.*, 2002), Cetuximab (gelb; nach Li *et al.*, 2005), Matuzumab (orange; nach Schmiedel *et al.*, 2008) in der EGFR Ektodomäne III/L2. Aminosäuren, die sowohl zu EGF als auch zu Cetuximab Kontakt aufnehmen, sind in grün dargestellt.

Die in dieser Arbeit gefundenen kreuzreaktiven Peptide und die in Immunisierungsexperimenten generierten anti-Peptid Antikörper, welche die Bindung der beiden Antikörper Cetuximab und Matuzumab an EGFR kompetieren, deuteten zunächst auf ein gemeinsames oder zumindest teilweise überlappendes Epitop dieser anti-EGFR Antikörper hin. Offensichtlich ist es trotz der klar von einander abgegrenzten Lage der Epitope von Cetuximab und Matuzumab möglich, mit der hier beschriebenen Variante der „Delayed Infectivity Panning“ Methode (Benhar *et al.*, 2000) unter Verwendung von „single-chain“ Antikörperfragmenten als Zielstruktur Peptide aus Phagenbibliotheken anzureichern, die mit beiden Antikörpern interagieren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es sich bei den gefundenen kreuzreaktiven Peptiden um vollkommen artifizielle Sequenzen handelt, die aufgrund der Selektionsmethode auf Affinität zu den scFv zufällig angereichert wurden. Da sich jedoch in einigen der gefundenen Peptide die gemeinsamen Sequenzmotive KTL bzw. YPLG wiederfanden, und zwar auch in unterschiedlichen Phagenbibliotheken, erscheint dies eher unwahrscheinlich (siehe 3.4.3). Die hier eindeutig nachgewiesene Konkurrenz der Bindung des „single-chain“ Antikörperfragmentes von Cetuximab an EGFR durch die synthetischen Peptide (siehe 3.5.2) sowie die Tatsache, dass die durch Immunisierung mit diesen Peptiden generierten anti-Peptid Antikörper die Bindung von Cetuximab und Matuzumab kompetieren (siehe 3.8.1), deuten eher darauf hin, dass es sich bei den gefundenen Peptiden um echte kreuzreaktive Mimotope handelt. Wenn die anti-Peptid Antikörper Strukturen am EGFR erkennen und binden, die nahe bei bzw. zwischen den Epitopen von Cetuximab und Matuzumab liegen, wäre eine sterische Konkurrenz beider Antikörper möglich.

Um Hinweise zur Beantwortung dieser Fragestellung zu erhalten, wurde mithilfe von *in silico* Vorhersagen der Lage der Peptide auf der Oberfläche von EGFR („Epitope Mapping“) analysiert, an welcher Stelle die anti-Peptid Antikörper Kontakt mit den durch die Peptidmimotope nachgebildeten Rezeptorstrukturen aufnehmen könnten. Hierzu wurden unter Verwendung des PepSurf Algorithmus *in silico* Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen der in den Immunisierungen eingesetzten Peptide (KTL Motiv und YPLG Motiv) mit der gesamten strukturell aufgeklärten Moleküloberfläche der autoinhibierten Ektodomäne von EGFR (**1YY9 . PDB**; Li *et al.*, 2005) gesucht. Hierzu wurde der Peptide Server der Bioinformatik Abteilung der G. S. Wise Faculty of Life Sciences, Universität Tel Aviv, Israel (<http://peptide.tau.ac.il>) genutzt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Software „VMD – Visual Molecular Dynamics“, entwickelt von der Theoretical and Computational Biophysics Group der University of Illinois, visualisiert (Humphrey *et al.*, 1996; <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

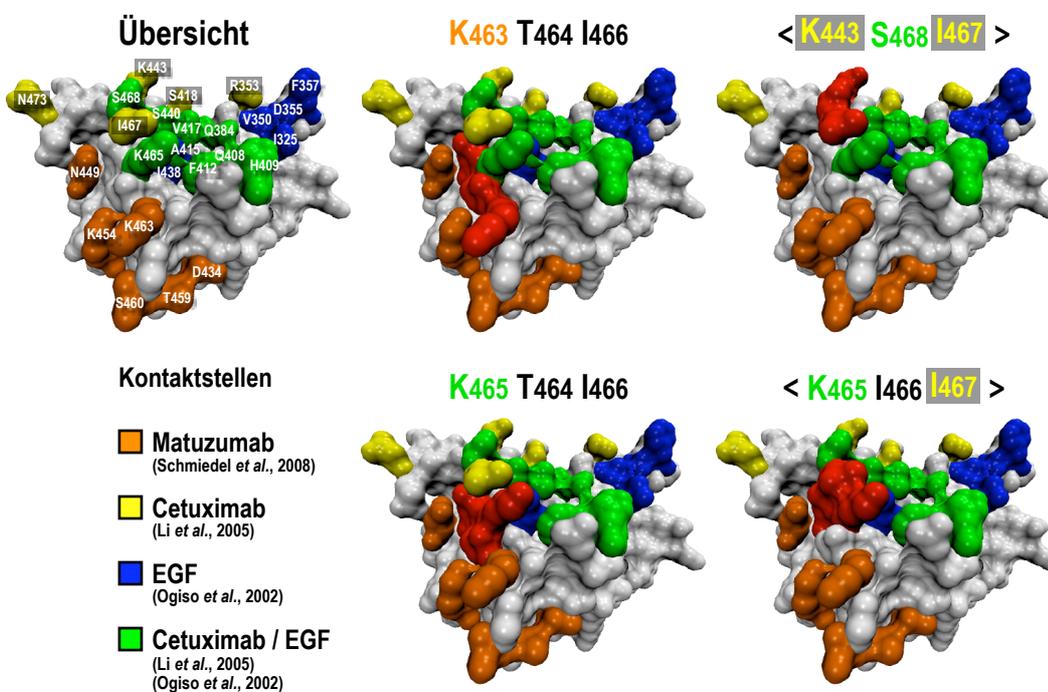


Abb. 4-4: „Epitope Mapping“ alternativer Bindungsstellen von anti-KTL Peptid Antikörpern (Auswahl). Die gezeigten Alternativen für die Lage der Epitope von anti-KTL Peptid Antikörpern wurden unter Anwendung des PepSurf Algorithmus *in silico* berechnet (Mayrose *et al.*, 2007a; Mayrose *et al.*, 2007b). Zum Vergleich ist die in Abb. 4-3 gezeigte Übersicht der publizierten Kontaktstellen von Cetuximab, Matuzumab und EGF erneut in verkleinerter Darstellung gezeigt (links oben). Die alternativen gefundenen Übereinstimmungen des KTL Motiv Peptides mit der Oberflächenstruktur von EGFR sind hervorgehoben (rot). Übereinstimmungen, deren Motiv in Klammern angegeben ist, wurden manuell durch einen „sequential walk“ aus den PepSurf Ergebnissen kombiniert.

Sämtliche gefundenen Übereinstimmungen für das KTL Motiv Peptid (in Abb. 4-4 in rot dargestellt) und das YPLG Motiv Peptid (in Abb. 4-4 in rot dargestellt) sind in der EGFR Ektodomäne III/L2 lokalisiert. Einige der gefundenen alternativen Übereinstimmungen weisen Überschneidungen mit Aminosäuren der EGFR Primärsequenz auf, die für die Bindung der Antikörper Cetuximab (Q408, H409, K443, K465, I467, S468) bzw. Matuzumab (K463) oder EGF (V350, Q408, H409, K465, S468) kritisch sind. Diese Übereinstimmungen sind in den Abb. 4-4 und Abb. 4-5 farblich hervorgehoben. Die Resultate für das KTL Peptid zeigen, dass die Mehrheit der vorhergesagten Bindungsstellen für anti-Peptid Antikörper an der Schnittstelle zwischen den Epitopen der beiden anti-EGFR Antikörper lokalisiert sind. Hierbei wurden alternative KTL- bzw. KTL-artige Motive auf der Rezeptoroberfläche gefunden, die als mögliche Übereinstimmungen mit der Peptidsequenz in Frage kommen und teilweise mit Aminosäuren aus den Epitopen von Cetuximab bzw. Matuzumab überlagern (Abb. 4-4). Eine manuelle Analyse auf Basis der durch den PepSurf Algorithmus ermittelten Ergebnisse zeigte, dass weitere, vom Computer hier nicht als Übereinstimmungen erkannte Aminosäuren mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften wie T/S und L/I in direkter Nachbarschaft auf der EGFR Oberfläche zu finden sind, die möglicherweise für das nachgebildete Epitop relevant sind (in Abb. 4-4 sind diese Motive in Klammern angegeben). Es ist denkbar, dass diese Bereiche durch das KTL Motiv Peptid nachgebildet werden und dass die kreuzreaktive Bindung des Peptides an Cetuximab und Matuzumab auf der direkt benachbarten räumlichen Lage zu den Epitopen dieser Antikörper basiert.

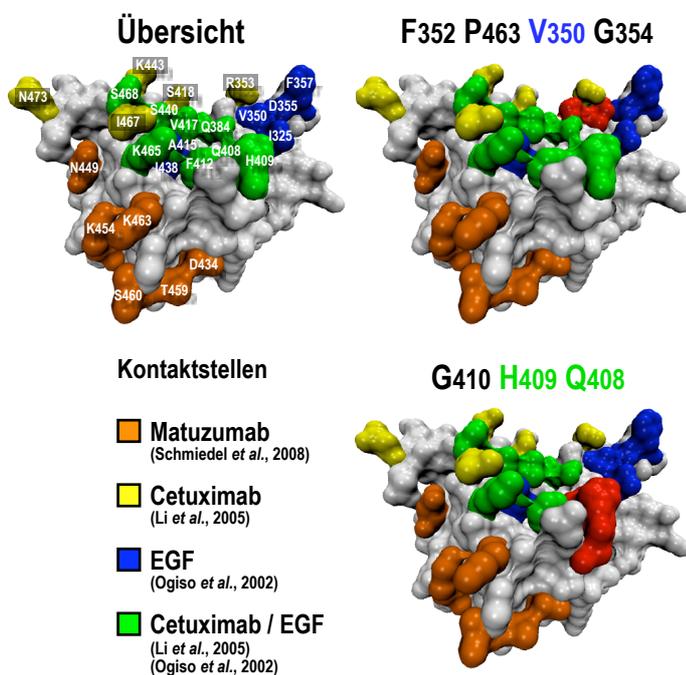


Abb. 4-5: „Epitope Mapping“ alternativer Bindungsstellen von anti-YPLG Peptid Antikörpern (Auswahl). Die gezeigten Alternativen für die Lage der Epitope von anti-YPLG Peptid Antikörpern wurden unter Anwendung des PepSurf Algorithmus *in silico* berechnet (Mayrose *et al.*, 2007a; Mayrose *et al.*, 2007b). Zum Vergleich ist die in Abb. 4-3 gezeigte Übersicht der publizierten Kontaktstellen von Cetuximab, Matuzumab und EGF erneut in verkleinerter Darstellung gezeigt (links oben). Die alternativen gefundenen Übereinstimmungen des YPLG Motiv Peptides mit der Oberflächenstruktur von EGFR sind hervorgehoben (rot).

Die Lage der gefundenen Übereinstimmungen für das YPLG Peptid war bei diesen Analysen räumlich weniger homogen. Die in Abb. 4-5 gezeigten gefundenen Übereinstimmungen für dieses Peptid sind im Bereich der Schnittstelle der Epitope von EGF und Cetuximab lokalisiert. Aufgrund der Lage der hier vorhergesagten Übereinstimmungen für das YPLG Motiv ist nicht umgehend ersichtlich, wie es zu einer Erkennung dieses Peptides durch Matuzumab kommen kann. Womöglich sind die strikten Parameter, die zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse bei den *in silico* Berechnungen mittels des PepSurf Algorithmus verwendet wurden, der Grund dafür, dass einige manuell gefundene Übereinstimmungen wie im Fall des KTL Peptides nicht erkannt wurden. Übereinstimmungen der Peptidsequenzen mit den exponierten Aminosäuren der EGFR Oberfläche, die weniger gut passend überlagern, könnten – auch im Fall der Resultate für das YPLG Peptid – aus diesem Grunde nicht entdeckt worden sein.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich für die Bindung der Antikörper Cetuximab und Matuzumab kritische Aminosäuren in ähnlicher Form in den identifizierten Peptid-Mimotopen wiederfinden. Alternative *in silico* berechnete Übereinstimmungen auf der EGFR Oberfläche deuten darauf hin, dass die in Immunisierungsexperimenten generierten anti-Peptid Antikörper Strukturen an der Oberfläche von EGFR erkennen könnten, die in der Ektodomäne III/L2 lokalisiert sind und in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den publizierten Bindungsstellen von Cetuximab bzw. Matuzumab liegen. Bindung der anti-Peptid Antikörper in diesem Bereich könnte zu einer sterischen Blockade der Erkennung der Epitope beider Antikörper führen, was die Fähigkeit der anti-Peptid Antikörper zu deren Kompetition, wie sie in FACS Experimenten beobachtet worden ist (siehe 3.8.1), erklären würde. Auch eine sterisch bedingte Kompetition der Bindung natürlicher EGFR Liganden wie EGF und TGF α , wie sie in dieser Arbeit beobachtet worden ist (siehe 3.8.4), erscheint durch die direkte Nachbarschaft der Bindungsstellen dieser Moleküle am EGFR möglich. Alternativ könnte ein ähnlicher Mechanismus, wie er für Matuzumab beschrieben wurde (Schmiedel *et al.*, 2008), dazu führen, dass die Bindung der anti-Peptid Antikörper die räumliche Umlagerung der EGFR Ektodomänen verhindert, die zur Ligandenbindung und nachfolgenden Dimerisierung mit einem weiteren ErbB Rezeptormonomer notwendig ist.

Die hier durchgeführten *in silico* Vorhersagen der Epitope der in Immunisierungsexperimenten generierten anti-Peptid Antikörper deuten auf eine Bindung dieser Antikörper in Bereichen der Ektodomäne III/L2 hin, die auch für die Bindung der therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab relevant ist. Eine endgültige Klärung der realen Bindungsstellen könnten röntgenkristallographische bzw. NMR-Untersuchungen der Komplexe aus anti-Peptid Antikörpern mit EGFR, bzw. aus den synthetischen Peptiden mit Cetuximab bzw. Matuzumab liefern. Die hierzu nötigen Peptide bzw. Proteine liegen in unserer Arbeitsgruppe bereits vor, bzw. müssten im Fall von NMR-Untersuchungen mit geeigneten Isotopen markiert hergestellt werden. Derartige zeitaufwändige Untersuchungen waren im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr durchzuführen.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war zunächst, Peptide aus Phagenbibliotheken zu identifizieren, die mit den hypervariablen Regionen (CDR) der therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren, um dadurch Hinweise auf die Bindungsstellen dieser Antikörper zu gewinnen. Im Laufe der Arbeit wurden von anderen Arbeitsgruppen die Epitope dieser Antikörper durch Ko-Kristallisation der extrazellulären Domäne von EGFR mit den Fab-Fragmenten von Cetuximab (Li *et al.*, 2005) und später auch von Matuzumab (Schmiedel *et al.*, 2008) strukturell aufgeklärt. Die bis zu diesem Zeitpunkt in dieser Arbeit gewonnenen Hinweise zur Lage der Epitope, die auf die EGFR Ektodomäne III/L2 eingegrenzt werden konnte, waren mit den publizierten Ergebnissen konsistent. In „Delayed Infectivity Panning“ Experimenten selektionierte Peptide, die mit den „single-chain“ Antikörperfragmenten von Cetuximab bzw. Matuzumab interagieren, wurden auf Übereinstimmungen mit den publizierten Kontaktstellen überprüft, und deren Fähigkeit zur Blockade der Bindung eines gegen EGFR gerichteten Immuntoxins wurde evaluiert. Hierbei wurden Daten erhalten, die darauf hinweisen, dass bestimmte kurze gemeinsame Sequenzmotive in den Peptiden (KTL Motiv bzw. YPLG Motiv) sowohl von Cetuximab als auch von Matuzumab erkannt werden können. Die publizierten Kristallstrukturdaten zeigen hingegen, dass die Kontaktstellen dieser Antikörper am EGFR keine gemeinsamen, für die Bindung kritischen Aminosäuren besitzen (Li *et al.*, 2005; Schmiedel *et al.*, 2008). Die Existenz kreuzreaktiver Peptide, wie sie in den hier durchgeführten Phage Display Screenings gefunden wurden, stand daher zunächst im Widerspruch zu diesen Daten. Daraufhin wurde mit zwei ausgewählten kreuzreaktiven Peptiden durch Immunisierung von Kaninchen überprüft, ob diese in der Lage sind, eine humorale Immunantwort gegen den humanen EGFR auszulösen (siehe 3.7). Die Analyse der Seren bzw. affinitätsgereinigter anti-Peptid Antikörper zeigte, dass in den Versuchstieren endogene Antikörper gegen den humanen EGFR gebildet worden waren, wie hier in Durchflusszytometrie (siehe 3.8.1), Immunfluoreszenz (siehe 3.8.2) und Immunoblot Experimenten (siehe 3.8.3) gezeigt werden konnte.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass durch die hier angewandte Selektions- und Evaluationsstrategie die Ableitung von Peptidmimotopen der therapeutischen anti-EGFR Antikörper Cetuximab und Matuzumab möglich ist. Die Immunisierung von Versuchstieren mit diesen Peptiden führte zur Generierung endogener Antikörper gegen den humanen EGFR, die die gleiche Spezifität der ursprünglichen monoklonalen Antikörpern besitzen, wenn auch mit geringerer Affinität für das Antigen (siehe 3.8.5). Eine Fortführung der Arbeiten zur Optimierung der zur Immunisierung eingesetzten Peptide erscheint daher sinnvoll, um die Affinitäten der induzierten endogenen anti-EGFR Antikörper zu verbessern. Eine Anordnung der KTL und YPLG Sequenzmotive auf einem einzelnen, linearen Peptid sowie die Permutation der Aminosäuren in der direkten Nachbarschaft dieser Sequenzmotive könnte bei Einsatz in weiteren Immunisierungsexperimenten in einer Verbesserung der Affinitäten der endogen gebildeten anti-Peptid Antikörper resultieren. Darüber hinaus könnte durch eine Multimerisierung der Peptide, Darreichung als Ölemulsion oder Kopplung an Immunadjuvantien eine Verbesserung der

Halbwertszeit bei *in vivo* Experimenten erreicht werden, die in einer effizienteren Immunantwort resultieren könnte (Mutschler *et al.*, 2001). Derartige aus den hier gefundenen Leitstrukturen abgeleitete optimierte Peptide könnten zur Entwicklung von Vakzinen führen, die eine Alternative zur passiven Immunisierung mit monoklonalen anti-EGFR Antikörpern darstellen könnten (Otvos, 2008a; Partidos, 2000; Riemer und Jensen-Jarolim, 2007). Diese Behandlungen, die häufig wiederholt werden müssen, sind aufgrund der hohen Kosten für die Herstellung biologisch aktiver Proteine und deren Aufreinigung unter GMP-Bedingungen ausgesprochen kostenintensiv (Reilly *et al.*, 1995). Peptidvakzine besitzen zwar eine geringe Bioverfügbarkeit und extrem kurze Serumhalbwertszeiten, es gibt jedoch Maßnahmen, die diese Parameter deutlich verbessern können, wie z.B. die oben erwähnte Multimerisierung und andere galenische Stabilisierungsmaßnahmen (Mutschler *et al.*, 2001; Otvos, 2008b). Da die Peptide zur Vakzinierung eingesetzt werden sollen und nicht als systemisches Therapeutikum, muss deren Stabilität lediglich für eine hinreichend lange Zeit gewährleistet sein, die zum Auslösen einer Immunantwort nötig ist. Ferner können Peptide kostengünstig und voll synthetisch in großen Mengen unter GMP-Bedingungen hergestellt werden, wobei keine infektiösen Materialien bzw. Expressionsorganismen mit großem Aufwand entfernt werden müssen, bevor eine sichere Anwendung am Patienten durchgeführt werden kann. Synthetische Peptidvakzine besitzen darüber hinaus eine Reihe von Vorteilen, die sie für die klinische Anwendung interessant machen: Sie können als gefriergetrocknetes Pulver stabil für lange Zeiträume gelagert werden, sind einfach zu applizieren und können jederzeit an unterschiedliche immunogene Adjuvanzen zur Verstärkung der hervorgerufenen Immunreaktion gekoppelt werden. Eine Entwicklung von Resistenzen oder schweren Nebenwirkungen gegen Peptidvakzine ist nicht zu erwarten. Abgesehen von Immunreaktionen an der Injektionsstelle, z.B. bei i.v. oder s.c. Applikationen, wird im allgemeinen die wiederholte Gabe von Peptiden gut vertragen. Da durch die Vakzinierung eine genau definierte Immunantwort gegen ein bekanntes Antigen ausgelöst wird, ist durch einfache Blutentnahme und Analyse von Serumantikörpern im diagnostischen Labor eine einfache Überwachung des therapeutischen Effektes möglich.

Ein wichtiger Schritt bei der Fortführung der hier vorgestellten Arbeiten ist die Etablierung eines *in vivo* Experimentes zur Evaluation einer protektiven bzw. kurativen Wirkung der induzierten endogenen anti-Peptid Antikörper gegen EGFR-positive Tumoren nach Immunisierung. Ein geeignetes Modellsystem ist mit dem Renca-lacZ/EGFR Tumormodell in BALB/c Mäusen in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert (Maurer-Gebhard *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1999). Mit derartigen Experimenten könnte zudem die Frage beantwortet werden, ob das Auslösen der in dieser Arbeit beobachteten Immunantwort in Kaninchen gegen den humanen EGFR auch in anderen Spezies möglich ist. Ein erfolgreiches Beispiel der Generierung einer humoralen Immunantwort gegen den humanen EGFR in BALB/c Mäusen durch Immunisierung mit Peptid-Mimotopen ist bereits publiziert (Riemer *et al.*, 2005). Bei derartigen Experimenten muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei dem humanen EGFR, der stabil von Renca-lacZ/EGFR Zellen exprimiert wird, um ein Fremdanigen aus einem anderen Organismus handelt. Das Fehlen einer gegen das Selbstanigen EGFR gerichteten Immunantwort in Tumorpatienten ist ein

wichtiger Mechanismus, durch den sich EGFR positive Tumorzellen vor der Erkennung und Eliminierung durch zytotoxische Effektorzellen schützen. Sollte es in Zukunft möglich sein, im Menschen diese immunologische Toleranz gegenüber einem tumorassoziierten Selbstantigen wie EGFR mittels Induktion körpereigener Antikörper durch Peptidimmunisierung zu überwinden, wäre dies ein wichtiger Schritt zur Steigerung der Effizienz der Tumorthherapie. Allerdings könnte die Vakzinierung gegen ein körpereigenes, tumorassoziiertes Protein zu Autoimmunität gegen gesunde Zellen führen, die dieses Antigen exprimieren – daher sind vor zukünftigen *in vivo* Applikation am Patienten intensive Untersuchungen in geeigneten Tiermodellen nötig, sowie eine genaue Beobachtung und strenge Überwachung der Immunreaktionen des Patienten während der Behandlung. Für die Antikörper Cetuximab und Matuzumab, die ebenfalls Epitope am Selbstantigen EGFR erkennen, sind keine Probleme mit Autoimmunität beschrieben. Da die hier beschriebenen durch Immunisierung mit Peptidmimotopen induzierten Antikörper die selben bzw. direkt benachbarte Strukturen auf der Oberfläche von EGFR erkennen, ist es unwahrscheinlich, dass Autoimmunreaktionen ein Problem darstellen könnten. Die durch Vakzinierung ausgelöste Bildung endogener Antikörper gegen tumorspezifische oder tumorassoziierte Oberflächenmarker transformierter Zellen könnte es ermöglichen, die zur Behandlung nötige Dosis klassischer Chemotherapeutika zu reduzieren, und auf diese Weise deren unerwünschte Nebenwirkungen zu verringern.

5. Literatur

- Adams, C. W., Allison, D. E., Flagella, K., Presta, L., Clarke, J., Dybdal, N., McKeever, K. und Sliwkowski, M. X. (2006). Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 55(6), 717-27.
- Adams, R., Meade, A., Wasan, H., Griffiths, G. und Maughan, T. (2008). Cetuximab therapy in first-line metastatic colorectal cancer and intermittent palliative chemotherapy: review of the COIN trial. *Expert Rev Anticancer Ther* 8(8), 1237-45.
- Agus, D. B., Akita, R. W., Fox, W. D., Lewis, G. D., Higgins, B., Pisacane, P. I., Lofgren, J. A., Tindell, C., Evans, D. P., Maiese, K., Scher, H. I. und Sliwkowski, M. X. (2002). Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* 2(2), 127-37.
- Albanell, J., Codony, J., Rovira, A., Mellado, B. und Gascon, P. (2003). Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol* 532, 253-68.
- Albanell, J., Montagut, C., Jones, E. T., Pronk, L., Mellado, B., Beech, J., Gascon, P., Zugmaier, G., Brewster, M., Saunders, M. P. und Valle, J. W. (2008). A Phase I Study of the Safety and Pharmacokinetics of the Combination of Pertuzumab (rhuMab 2C4) and Capecitabine in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 14(9), 2726-31.
- Astsaturov, I., Cohen, R. B. und Harari, P. (2007). EGFR-targeting monoclonal antibodies in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 7(7), 650-65.
- Azemar, M., Schmidt, M., Arlt, F., Kennel, P., Brandt, B., Papadimitriou, A., Groner, B. und Wels, W. (2000). Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int J Cancer* 86(2), 269-75.
- Barbas, C. F., 3rd (1993). Recent advances in phage display. *Curr Opin Biotechnol* 4(5), 526-30.
- Barbas, S. M., und Barbas, C. F. (1994). Filamentous Phage Display. *Fibrinolysis* 8, 245-252.
- Bareschino, M. A., Schettino, C., Troiani, T., Martinelli, E., Morgillo, F. und Ciardiello, F. (2007). Erlotinib in cancer treatment. *Ann Oncol* 18 Suppl 6, vi35-41.
- Baselga, J. und Albanell, J. (2001). Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies. *Ann Oncol* 12 Suppl 1, S35-41.
- Belani, C. P., Schreeder, M. T., Steis, R. G., Guidice, R. A., Marsland, T. A., Butler, E. H. und Ramalingam, S. S. (2008). Cetuximab in combination with carboplatin and docetaxel for patients with metastatic or advanced-stage nonsmall cell lung cancer: a multicenter phase 2 study. *Cancer* 113(9), 2512-7.

- Benhar, I., Azriel, R., Nahary, L., Shaky, S., Berdichevsky, Y., Tamarkin, A. und Wels, W. (2000). Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display of antigen as Lpp-OmpA' fusions on live bacteria. *J Mol Biol* 301(4), 893-904.
- Bernard-Marty, C., Lebrun, F., Awada, A. und Piccart, M. J. (2006). Monoclonal antibody-based targeted therapy in breast cancer: current status and future directions. *Drugs* 66(12), 1577-91.
- Bier, H., Hoffmann, T., Hauser, U., Wink, M., Ochler, M., Kovar, A., Muser, M. und Knecht, R. (2001). Clinical trial with escalating doses of the antiepidermal growth factor receptor humanized monoclonal antibody EMD 72 000 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Cancer Chemother Pharmacol* 47(6), 519-24.
- Bokemeyer, C., Bondarenko, I., Makhson, A., Hartmann, J. T., Aparicio, J., de Braud, F., Donea, S., Ludwig, H., Schuch, G., Stroh, C., Loos, A. H., Zubel, A. und Koralewski, P. (2008). Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*.
- Borghaei, H., Langer, C. J., Millenson, M., Ruth, K. J., Litwin, S., Tuttle, H., Seldomridge, J. S., Rovito, M., Mintzer, D., Cohen, R. und Treat, J. (2008). Phase II study of paclitaxel, carboplatin, and cetuximab as first line treatment, for patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): results of OPN-017. *J Thorac Oncol* 3(11), 1286-92.
- Borner, M., Koeberle, D., Von Moos, R., Saletti, P., Rauch, D., Hess, V., Trojan, A., Helbling, D., Pestalozzi, B., Caspar, C., Ruhstaller, T., Roth, A., Kappeler, A., Dietrich, D., Lanz, D. und Mingrone, W. (2008). Adding cetuximab to capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a randomized phase II trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research SAKK. *Ann Oncol* 19(7), 1288-92.
- Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M. und Leahy, D. J. (2005). The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42), 15024-9.
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W. und Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12(3), 541-52.
- Carter, P., Presta, L., Gorman, C. M., Ridgway, J. B., Henner, D., Wong, W. L., Rowland, A. M., Kotts, C., Carver, M. E. und Shepard, H. M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10), 4285-9.
- Cartwright, T., Kuefler, P., Cohn, A., Hyman, W., Berger, M., Richards, D., Vukelja, S., Nugent, J. E., Ruxer, R. L., Jr., Boehm, K. A. und Asmar, L. (2008). Results of a phase II trial of cetuximab plus capecitabine/irinotecan as first-line therapy for patients with advanced and/or metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 7(6), 390-7.

- Cascinu, S., Berardi, R., Labianca, R., Siena, S., Falcone, A., Aitini, E., Barni, S., Di Costanzo, F., Dapretto, E., Tonini, G., Pierantoni, C., Artale, S., Rota, S., Floriani, I., Scartozzi, M. und Zaniboni, A. (2008). Cetuximab plus gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomised, multicentre, phase II trial. *Lancet Oncol* 9(1), 39-44.
- Cho, H. S. und Leahy, D. J. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 297(5585), 1330-3.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr. und Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421(6924), 756-60.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. und Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6(4), 443-6.
- Cochran, J. R., Kim, Y. S., Olsen, M. J., Bhandari, R. und Wittrup, K. D. (2004). Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *J Immunol Methods* 287(1-2), 147-58.
- Comis, R. L. (2005). The current situation: erlotinib (Tarceva) and gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 10(7), 467-70.
- Danielsen, A. J. und Maihle, N. J. (2002). The EGF/ErbB receptor family and apoptosis. *Growth Factors* 20(1), 1-15.
- Dawson, J. P., Berger, M. B., Lin, C. C., Schlessinger, J., Lemmon, M. A. und Ferguson, K. M. (2005). Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 25(17), 7734-42.
- Dawson, J. P., Bu, Z. und Lemmon, M. A. (2007). Ligand-induced structural transitions in ErbB receptor extracellular domains. *Structure* 15(8), 942-54.
- De Castro-Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., Casado Sáenz, E., Hernández Agudo, E., Feliu Batlle, J., González Barón, M. (2008). EGFR in colon cancer: a clinical review. *Clin Transl Oncol* 10(1), 6-13.
- Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R. und Galfre, G. (1997). Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine* 15(11), 1276-85.
- Druker, B. J. (2008). Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112(13), 4808-17.
- Fan, Z., Mendelsohn, J., Masui, H. und Kumar, R. (1993). Regulation of epidermal growth factor receptor in NIH3T3/HER14 cells by antireceptor monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 268(28), 21073-9.

- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J. und Lemmon, M. A. (2003). EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Mol Cell* 11(2), 507-17.
- Folkman, J. (2001). Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol* 28(6), 536-42.
- Francisco, J. A., Earhart, C. F. und Georgiou, G. (1992). Transport and anchoring of beta-lactamase to the external surface of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7), 2713-7.
- Freeman, D., Sun, J., Bass, R., Jung, K., Ogbagabriel, S., Elliot, G. und Radinsky, R. (2008). Panitumumab and cetuximab epitope mapping and in vitro activity. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium*.
- Gamucci, T., Nelli, F., Cianci, G., Grassi, G., Moscetti, L., Sperduti, I., Zeuli, M., Cortesi, E., D'Auria, G. und Pollera, C. F. (2008). A phase II study of cetuximab/irinotecan in patients with heavily pretreated metastatic colorectal cancer: predictive value of early specific toxicities. *Clin Colorectal Cancer* 7(4), 273-9.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W. und Ward, C. W. (2003). The Crystal Structure of a Truncated ErbB2 Ectodomain Reveals an Active Conformation, Poised to Interact with Other ErbB Receptors. *Mol Cell* 11(2), 495-505.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W. und Ward, C. W. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110(6), 763-73.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Frenkel, M. J., Bentley, J. D., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Cosgrove, L. J. und Ward, C. W. (1998). Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* 394(6691), 395-9.
- Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P. S., Nayak, A. R., Iverson, B. L. und Curtiss, R., 3rd (1997). Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol* 15(1), 29-34.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. und Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51(5), 1417-23.
- Gilbertson, R. J., Perry, R. H., Kelly, P. J., Pearson, A. D. und Lunec, J. (1997). Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma. *Cancer Res* 57(15), 3272-80.

- Gomez-Roman, V. R., Cao, C., Bai, Y., Santamaria, H., Acero, G., Manoutcharian, K., Weiner, D. B., Ugen, K. E. und Gevorkian, G. (2002). Phage-displayed mimotopes recognizing a biologically active anti-HIV-1 gp120 murine monoclonal antibody. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31(2), 147-53.
- Gorgoulis, V., Aninos, D., Mikou, P., Kanavaros, P., Karameris, A., Joardanoglou, J., Rasidakis, A., Veslemes, M., Ozanne, B. und Spandidos, D. A. (1992). Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas. *Anticancer Res* 12(4), 1183-7.
- Graeven, U., Kremer, B., Sudhoff, T., Killing, B., Rojo, F., Weber, D., Tillner, J., Unal, C. und Schmiegel, W. (2006). Phase I study of the humanised anti-EGFR monoclonal antibody matuzumab (EMD 72000) combined with gemcitabine in advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 94(9), 1293-9.
- Green, L. L. (1999). Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 231(1-2), 11-23.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57-70.
- Harari, P. M. (2004). Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11(4), 689-708.
- Harding, J. und Burtness, B. (2005). Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today (Barc)* 41(2), 107-27.
- Hartmann, C. (2002). Charakterisierung der Bindungsstelle antagonistischer Antikörper gerichtet gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor durch Phage Display. *Diplomarbeit am Fachbereich 14, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*.
- Holbro, T. und Hynes, N. E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 195-217.
- Holliger, P. und Riechmann, L. (1997). A conserved infection pathway for filamentous bacteriophages is suggested by the structure of the membrane penetration domain of the minor coat protein g3p from phage fd. *Structure* 5(2), 265-75.
- Huang, S., Armstrong, E. A., Benavente, S., Chinnaiyan, P. und Harari, P. M. (2004). Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 64(15), 5355-62.
- Hubbard, S. R. und Miller, W. T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19(2), 117-23.

- Hudziak, R. M., Lewis, G. D., Winget, M., Fendly, B. M., Shepard, H. M. und Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9(3), 1165-72.
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1), 33-8, 27-8.
- Hyland, S. (2003). Generierung und funktionelle Charakterisierung intrazellulärer Antikörperfragmente gerichtet gegen die zytoplasmatische Domäne von Wachstumsfaktor-Rezeptoren der ErbB-Familie. *Dissertation am Fachbereich 14, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main*.
- Hynes, N. E. und Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5(5), 341-54.
- Imai, K. und Takaoka, A. (2006). Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* 6(9), 714-27.
- Irish, J. C. und Bernstein, A. (1993). Oncogenes in head and neck cancer. *Laryngoscope* 103(1 Pt 1), 42-52.
- Jakobovits, A., Amado, R. G., Yang, X., Roskos, L. und Schwab, G. (2007). From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol* 25(10), 1134-43.
- Jerne, N. K. (1974). Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol (Paris)* 125C(1-2), 373-89.
- Johnston, S. R. und Leary, A. (2006). Lapatinib: a novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer. *Drugs Today (Barc)* 42(7), 441-53.
- Kamat, V., Donaldson, J. M., Kari, C., Quadros, M. R., Lelkes, P. I., Chaiken, I., Cocklin, S., Williams, J. C., Papazoglou, E. und Rodeck, U. (2008). Enhanced EGFR Inhibition And Distinct Epitope Recognition By EGFR Antagonistic MABS C225 And 425. *Cancer Biol Ther* 7(5).
- Kawamoto, T., Sato, J. D., Le, A., Polikoff, J., Sato, G. H. und Mendelsohn, J. (1983). Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(5), 1337-41.
- Kettleborough, C. A., Saldanha, J., Heath, V. J., Morrison, C. J. und Bendig, M. M. (1991). Humanization of a mouse monoclonal antibody by CDR-grafting: the importance of framework residues on loop conformation. *Protein Eng* 4(7), 773-83.

- Kew, T. Y., Bell, J. A., Pinder, S. E., Denley, H., Srinivasan, R., Gullick, W. J., Nicholson, R. I., Blamey, R. W. und Ellis, I. O. (2000). c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 82(6), 1163-70.
- Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Janne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M., Johnson, B. E., Eck, M. J., Tenen, D. G. und Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 352(8), 786-92.
- Kollmannsberger, C., Schittenhelm, M., Honecker, F., Tillner, J., Weber, D., Oechsle, K., Kanz, L. und Bokemeyer, C. (2006). A phase I study of the humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with paclitaxel in patients with EGFR-positive advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* 17(6), 1007-13.
- Konner, J., Schilder, R. J., DeRosa, F. A., Gerst, S. R., Tew, W. P., Sabbatini, P. J., Hensley, M. L., Spriggs, D. R. und Aghajanian, C. A. (2008). A phase II study of cetuximab/paclitaxel/carboplatin for the initial treatment of advanced-stage ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Gynecol Oncol* 110(2), 140-5.
- Kuester, K., Kovar, A., Lupfert, C., Brockhaus, B. und Kloft, C. (2008). Population pharmacokinetic data analysis of three phase I studies of matuzumab, a humanised anti-EGFR monoclonal antibody in clinical cancer development. *Br J Cancer* 98(5), 900-6.
- Kwak, L. W., Campbell, M. J., Czerwinski, D. K., Hart, S., Miller, R. A. und Levy, R. (1992). Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N Engl J Med* 327(17), 1209-15.
- Lammerts van Bueren, J. J., Bleeker, W. K., Brannstrom, A., von Euler, A., Jansson, M., Peipp, M., Schneider-Merck, T., Valerius, T., van de Winkel, J. G. und Parren, P. W. (2008). The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra- and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(16), 6109-14.
- Landry, R. C., Klimowicz, A. C., Lavictoire, S. J., Borisova, S., Kottachchi, D. T., Lorimer, I. A. und Evans, S. V. (2001). Antibody recognition of a conformational epitope in a peptide antigen: Fv-peptide complex of an antibody fragment specific for the mutant EGF receptor, EGFRvIII. *J Mol Biol* 308(5), 883-93.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21), 2947-8.
- Leahy, D. J. (2008). A molecular view of anti-ErbB monoclonal antibody therapy. *Cancer Cell* 13(4), 291-3.

- Li, S., Kussie, P. und Ferguson, K. M. (2008). Structural basis for EGF receptor inhibition by the therapeutic antibody IMC-11F8. *Structure* 16(2), 216-27.
- Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P. und Ferguson, K. M. (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7(4), 301-11.
- Lin, C. C., Calvo, E., Papadopoulos, K. P., Patnaik, A., Sarantopoulos, J., Mita, A. C., Preston, G. G., Mita, M. M., Rodon, J., Mays, T., Yeh, I. T., O'Rourke, P., Takimoto, C. H., Dancey, J. E., Chen, H. und Tolcher, A. W. (2008). Phase I study of cetuximab, erlotinib, and bevacizumab in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Locati, L. D., Bossi, P., Perrone, F., Potepan, P., Crippa, F., Mariani, L., Casieri, P., Orsenigo, M., Losa, M., Bergamini, C., Liberatoscioli, C., Quattrone, P., Calderone, R. G., Rinaldi, G., Pilotti, S. und Licitra, L. (2008). Cetuximab in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: A phase II study. *Oral Oncol*.
- Lynch, D. H. und Yang, X. D. (2002). Therapeutic potential of ABX-EGF: a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for cancer treatment. *Semin Oncol* 29(1 Suppl 4), 47-50.
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J. und Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350(21), 2129-39.
- Lyne, J. C., Melhem, M. F., Finley, G. G., Wen, D., Liu, N., Deng, D. H. und Salup, R. (1997). Tissue expression of neu differentiation factor/heregulin and its receptor complex in prostate cancer and its biologic effects on prostate cancer cells in vitro. *Cancer J Sci Am* 3(1), 21-30.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Parker, J. und Brock, T.D. (2003). Mikrobiologie (9. Auflage). *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*.
- Maurer, C. A., Friess, H., Kretschmann, B., Zimmermann, A., Stauffer, A., Baer, H. U., Korc, M. und Buchler, M. W. (1998). Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2. *Hum Pathol* 29(8), 771-7.
- Maurer-Gebhard, M., Schmidt, M., Azemar, M., Altenschmidt, U., Stocklin, E., Wels, W. und Groner, B. (1998). Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res* 58(12), 2661-6.
- Mayrose, I., Penn, O., Erez, E., Rubinstein, N. D., Shlomi, T., Freund, N. T., Bublil, E. M., Ruppin, E., Sharan, R., Gershoni, J. M., Martz, E. und Pupko, T. (2007a). Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics* 23(23), 3244-6.

- Mayrose, I., Shlomi, T., Rubinstein, N. D., Gershoni, J. M., Ruppin, E., Sharan, R. und Pupko, T. (2007b). Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res* 35(1), 69-78.
- Mendelsohn, J. und Baselga, J. (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 21(14), 2787-99.
- Mendelsohn, J. und Baselga, J. (2006). Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol* 33(4), 369-85.
- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R. und Galfre, G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *J Immunol* 154(7), 3162-72.
- Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R. und Levy, R. (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 306(9), 517-22.
- Mittelman, A., Chen, Z. J., Kageshita, T., Yang, H., Yamada, M., Baskind, P., Goldberg, N., Puccio, C., Ahmed, T., Arlin, Z. und et al. (1990). Active specific immunotherapy in patients with melanoma. A clinical trial with mouse antiidiotypic monoclonal antibodies elicited with syngeneic anti-high-molecular-weight-melanoma-associated antigen monoclonal antibodies. *J Clin Invest* 86(6), 2136-44.
- Molina, M. A., Codony-Servat, J., Albanell, J., Rojo, F., Arribas, J. und Baselga, J. (2001). Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* 61(12), 4744-9.
- Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L. und Wong, A. J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55(23), 5536-9.
- Murthy, U., Basu, A., Rodeck, U., Herlyn, M., Ross, A. H. und Das, M. (1987). Binding of an antagonistic monoclonal antibody to an intact and fragmented EGF-receptor polypeptide. *Arch Biochem Biophys* 252(2), 549-60.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. und Schäfer-Korting, M. (2001). Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*.
- Naidu, R., Yadav, M., Nair, S. und Kutty, M. K. (1998). Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 78(10), 1385-90.
- Ogata, M., Fryling, C. M., Pastan, I. und FitzGerald, D. J. (1992). Cell-mediated cleavage of Pseudomonas exotoxin between Arg279 and Gly280 generates the enzymatically active fragment which translocates to the cytosol. *J Biol Chem* 267(35), 25396-401.

- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M. und Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110(6), 775-87.
- Olver, I. N. (2008). Trastuzumab as the lead monoclonal antibody in advanced breast cancer: choosing which patient and when. *Future Oncol* 4(1), 125-31.
- Otvos, L., Jr. (2008a). Peptide-based drug design: here and now. *Methods Mol Biol* 494, 1-8.
- Otvos, L., Jr. (2008b). Synthesis of a multivalent, multi-epitope vaccine construct. *Methods Mol Biol* 494, 263-73.
- Paez, J. G., Janne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M. J., Sellers, W. R., Johnson, B. E. und Meyerson, M. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304(5676), 1497-500.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., Mardis, E., Kupfer, D., Wilson, R., Kris, M. und Varmus, H. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(36), 13306-11.
- Parmley, S. F. und Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73(2), 305-18.
- Parmley, S. F. und Smith, G. P. (1989). Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol* 251, 215-8.
- Partidos, C. D. (2000). Peptide mimotopes as candidate vaccines. *Curr Opin Mol Ther* 2(1), 74-9.
- Pastan, I. und FitzGerald, D. (1991). Recombinant toxins for cancer treatment. *Science* 254(5035), 1173-7.
- Pedersen, M. W., Thykjaer, T., Orntoft, T. F., Damstrup, L. und Poulsen, H. S. (2001). Profile of differentially expressed genes mediated by the type III epidermal growth factor receptor mutation expressed in a small-cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* 85(8), 1211-8.
- Pessino, A., Artale, S., Sciallero, S., Guglielmi, A., Fornarini, G., Andreotti, I. C., Mammoliti, S., Comandini, D., Caprioni, F., Bennicelli, E., Andretta, V., Siena, S. und Sobrero, A. (2008). First-line single-agent cetuximab in patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 19(4), 711-6.
- Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M. und Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57(20), 4593-9.

Presta, L. G., Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K. und Meng, Y. G. (2002). Engineering therapeutic antibodies for improved function. *Biochem Soc Trans* 30(4), 487-90.

Ramalingam, S., Forster, J., Naret, C., Evans, T., Sulecki, M., Lu, H., Teegarden, P., Weber, M. R. und Belani, C. P. (2008). Dual inhibition of the epidermal growth factor receptor with cetuximab, an IgG1 monoclonal antibody, and gefitinib, a tyrosine kinase inhibitor, in patients with refractory non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase I study. *J Thorac Oncol* 3(3), 258-64.

Rao, S., Starling, N., Cunningham, D., Benson, M., Wotherspoon, A., Lupfert, C., Kurek, R., Oates, J., Baselga, J. und Hill, A. (2008). Phase I study of epirubicin, cisplatin and capecitabine plus matuzumab in previously untreated patients with advanced oesophagogastric cancer. *Br J Cancer*.

Reilly, R. M., Sandhu, J., Alvarez-Diez, T. M., Gallinger, S., Kirsh, J. und Stern, H. (1995). Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin Pharmacokinet* 28(2), 126-42.

Riechmann, L. und Holliger, P. (1997). The C-terminal domain of TolA is the coreceptor for filamentous phage infection of *E. coli*. *Cell* 90(2), 351-60.

Riemer, A. B. und Jensen-Jarolim, E. (2007). Mimotope vaccines: epitope mimics induce anti-cancer antibodies. *Immunol Lett* 113(1), 1-5.

Riemer, A. B., Klinger, M., Wagner, S., Bernhaus, A., Mazzucchelli, L., Pehamberger, H., Scheiner, O., Zielinski, C. C. und Jensen-Jarolim, E. (2004). Generation of Peptide mimics of the epitope recognized by trastuzumab on the oncogenic protein Her-2/neu. *J Immunol* 173(1), 394-401.

Riemer, A. B., Kurz, H., Klinger, M., Scheiner, O., Zielinski, C. C. und Jensen-Jarolim, E. (2005). Vaccination with cetuximab mimotopes and biological properties of induced anti-epidermal growth factor receptor antibodies. *J Natl Cancer Inst* 97(22), 1663-70.

Rivera, F., Vega-Villegas, M. E., Lopez-Brea, M. F. und Marquez, R. (2008). Current situation of Panitumumab, Matuzumab, Nimotuzumab and Zalutumumab. *Acta Oncol* 47(1), 9-19.

Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z. und Koprowski, H. (1987a). Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects. *Cancer Res* 47(14), 3692-6.

Rodeck, U., Herlyn, M. und Koprowski, H. (1987b). Interactions between growth factor receptors and corresponding monoclonal antibodies in human tumors. *J Cell Biochem* 35(4), 315-20.

Rodeck, U., Williams, N., Murthy, U. und Herlyn, M. (1990). Monoclonal antibody 425 inhibits growth stimulation of carcinoma cells by exogenous EGF and tumor-derived EGF/TGF- α . *J Cell Biochem* 44(2), 69-79.

- Ross, J. S. und Fletcher, J. A. (1998). The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy. *Oncologist* 3(4), 237-252.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F. und Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19(3), 183-232.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2), 211-25.
- Schmidt, M., Hynes, N. E., Groner, B. und Wels, W. (1996). A bivalent single-chain antibody-toxin specific for ErbB-2 and the EGF receptor. *Int J Cancer* 65(4), 538-46.
- Schmidt, M., Maurer-Gebhard, M., Groner, B., Kohler, G., Brochmann-Santos, G. und Wels, W. (1999). Suppression of metastasis formation by a recombinant single chain antibody-toxin targeted to full-length and oncogenic variant EGF receptors. *Oncogene* 18(9), 1711-21.
- Schmidt, M., Vakalopoulou, E., Schneider, D. W. und Wels, W. (1997). Construction and functional characterization of scFv(14E1)-ETA - a novel, highly potent antibody-toxin specific for the EGF receptor. *Br J Cancer* 75(11), 1575-84.
- Schmiedel, J., Blaukat, A., Li, S., Knochel, T. und Ferguson, K. M. (2008). Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* 13(4), 365-73.
- Secord, A. A., Blessing, J. A., Armstrong, D. K., Rodgers, W. H., Miner, Z., Barnes, M. N., Lewandowski, G. und Mannel, R. S. (2008). Phase II trial of cetuximab and carboplatin in relapsed platinum-sensitive ovarian cancer and evaluation of epidermal growth factor receptor expression: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 108(3), 493-9.
- Seiden, M. V., Burris, H. A., Matulonis, U., Hall, J. B., Armstrong, D. K., Speyer, J., Weber, J. D. und Muggia, F. (2007). A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum-resistant ovarian and primary peritoneal malignancies. *Gynecol Oncol* 104(3), 727-31.
- Shields, R. L., Namenuk, A. K., Hong, K., Meng, Y. G., Rae, J., Briggs, J., Xie, D., Lai, J., Stadlen, A., Li, B., Fox, J. A. und Presta, L. G. (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 276(9), 6591-604.
- Shintani, S., Funayama, T., Yoshihama, Y., Alcalde, R. E. und Matsumura, T. (1995). Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 95(1-2), 79-83.

- Smith, G. P. und Scott, J. K. (1993). Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 217, 228-57.
- Sobrero, A. F., Maurel, J., Fehrenbacher, L., Scheithauer, W., Abubakr, Y. A., Lutz, M. P., Vega-Villegas, M. E., Eng, C., Steinhauer, E. U., Prausova, J., Lenz, H. J., Borg, C., Middleton, G., Kroning, H., Luppi, G., Kisker, O., Zubel, A., Langer, C., Kopit, J. und Burris, H. A., 3rd (2008). EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(14), 2311-9.
- Socinski, M. A. (2007). Antibodies to the epidermal growth factor receptor in non small cell lung cancer: current status of matuzumab and panitumumab. *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 2), s4597-601.
- Stamos, J., Sliwkowski, M. X. und Eigenbrot, C. (2002). Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 277(48), 46265-72.
- Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D. und Collins, V. P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(21), 8602-6.
- Tahara, M., Shirao, K., Boku, N., Yamaguchi, K., Komatsu, Y., Inaba, Y., Arai, T., Mizunuma, N., Satoh, T., Takiuchi, H., Nishina, T. und Sakata, Y. (2008). Multicenter Phase II study of cetuximab plus irinotecan in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin and fluoropyrimidines. *Jpn J Clin Oncol* 38(11), 762-9.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 2, Unit 2 3.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22), 4673-80.
- Thorburn, A., Thorburn, J. und Frankel, A. E. (2004). Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis* 9(1), 19-25.
- Tol, J., Koopman, M., Rodenburg, C. J., Cats, A., Creemers, G. J., Schrama, J. G., Erdkamp, F. L., Vos, A. H., Mol, L., Antonini, N. F. und Punt, C. J. (2008). A randomised phase III study on capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab with or without cetuximab in first-line advanced colorectal cancer, the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). An interim analysis of toxicity. *Ann Oncol* 19(4), 734-8.
- Vaisman, N., Nissim, A., Klapper, L. N., Tirosh, B., Yarden, Y. und Sela, M. (2000). Specific inhibition of the reaction between a tumor-inhibitory antibody and the ErbB-2 receptor by a mimotope derived from a phage display library. *Immunol Lett* 75(1), 61-7.

- Vanhoefer, U., Tewes, M., Rojo, F., Dirsch, O., Schleucher, N., Rosen, O., Tillner, J., Kovar, A., Braun, A. H., Trarbach, T., Seeber, S., Harstrick, A. und Baselga, J. (2004). Phase I study of the humanized antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22(1), 175-84.
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N. und Hitt, R. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359(11), 1116-27.
- Von Pawel, J., Park, K., Pereira, J. R., Szczesna, A., Yu, C., Ganul, V. L., Krzakowski, M., Roh, J. K., Pilz, K. und Pirker, R. (2006). Phase III study comparing cisplatin/vinorelbine plus cetuximab versus cisplatin/vinorelbine as first-line treatment for patients with epidermal growth factor (EGFR)-expressing advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) (FLEX). *J Clin Oncol, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part 1 24*(No. 18S (June 20 Supplement) - ID 7109).
- Wainberg, Z. und Hecht, J. R. (2006). Panitumumab in colon cancer: a review and summary of ongoing trials. *Expert Opin Biol Ther* 6(11), 1229-35.
- Wainberg, Z. A. und Hecht, J. R. (2007). Panitumumab in colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 7(7), 967-73.
- Wang, Y., Fei, D., Vanderlaan, M. und Song, A. (2004). Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* 7(4), 335-45.
- Waterfield, M. D., Mayes, E. L., Stroobant, P., Bennet, P. L., Young, S., Goodfellow, P. N., Banting, G. S. und Ozanne, B. (1982). A monoclonal antibody to the human epidermal growth factor receptor. *J Cell Biochem* 20(2), 149-61.
- Weiner, L. M. (2006). Fully human therapeutic monoclonal antibodies. *J Immunother* 29(1), 1-9.
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31(6), 637-43.
- Wells, A. (2000). Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res* 78, 31-101.
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B. und Hynes, N. E. (1995). EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer* 60(1), 137-44.
- Wels, W., Groner, B. und Hynes, N. E. (1996). Intervention in receptor tyrosine kinase-mediated pathways: recombinant antibody fusion proteins targeted to ErbB2. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 3), 113-28.

- Wels, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B. und Hynes, N. E. (1992). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res* 52(22), 6310-7.
- Werner, S. und Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83(3), 835-70.
- Wilke, H., Glynne-Jones, R., Thaler, J., Adenis, A., Preusser, P., Aguilar, E. A., Apro, M. S., Esser, R., Loos, A. H. und Siena, S. (2008). Cetuximab plus irinotecan in heavily pretreated metastatic colorectal cancer progressing on irinotecan: MABEL Study. *J Clin Oncol* 26(33), 5335-43.
- Wilson, D. R. und Finlay, B. B. (1998). Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* 44(4), 313-29.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. und Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12, 433-55.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S. und Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7), 2965-9.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. und Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Xia, W., Lau, Y. K., Zhang, H. Z., Xiao, F. Y., Johnston, D. A., Liu, A. R., Li, L., Katz, R. L. und Hung, M. C. (1999). Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 5(12), 4164-74.
- Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P. und Davis, C. G. (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 38(1), 17-23.
- Yarden, Y. und Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2), 127-37.
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. und Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 125(6), 1137-49.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ABTS	2,2'-Azinobis-3-ethylbenzthiazolin-sulfat
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität ("antibody-dependent cellular cytotoxicity")
Akt	Protein Kinase B / Akt
APC	antigenpräsentierende Zelle ("antigen presenting cell")
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-triphosphat
Bad	Bcl-2 assoziierter Todespromotor ("Bcl-2 associated death promoter")
Bcl-2	B-Zell CLL/Lymphom Protein 2
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum ("bovine serum albumin")
BTC	Betacellulin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDC	komplementabhängige Zytotoxizität ("complement-dependent cytotoxicity")
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ("complementary DNA")
CDR	hypervariable Regionen der Fv-Fragmente eines Antikörpers ("complementarity determining regions")
CLL	chronische lymphatische Leukämie ("chronic lymphocytic leukemia")
cm	Zentimeter
Da	Dalton
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DIP	"Delayed Infectivity Panning" - Variante der Phage Display Methode
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium ("Dulbecco's modified Eagle's medium")
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure ("double-stranded DNA")
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Chemolumineszenz ("enhanced chemoluminescence")
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ("epidermal growth factor")
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ("epidermal growth factor receptor")
EGTA	Ethylenglycol-bis(oxyethylennitril)-tetraessigsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ("enzyme-linked immunosorbent assay")
EMA	Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency)
engl.	englisch
EPR	Epiregulin
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär-Signal regulierte Kinase ("extracellular signal-regulated kinase")
ETA	Exotoxin A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fab	Fab-Fragment eines Antikörpers
FACS	fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie ("fluorescence activated cell sorting")
Fc	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
Fc γ R	Immunglobulin G Fc-Rezeptor (Fc-gamma-Rezeptor)
FCS	fötales Kälberserum ("fetal calf serum")
FDA	Food and Drug Administration (Behörde des Gesundheitsministeriums der USA)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
Fv	variables Fragment eines Antikörpers
g	Gramm / Erdbeschleunigung
GAP	GDPase aktivierendes Protein ("GDPase activating protein")
GDP	Guanosin-diphosphat
GDPase	Guanosin-diphosphatase
GMP	Gute Herstellungspraxis ("good manufacturing practice")
GrB	Granzym B
GTP	Guanosin-triphosphat
h	Stunden
HAMA	humaner anti-Maus Antikörper ("human anti-mouse antibody")

HB-EGF	Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor ("heparin binding epidermal growth factor")
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ("human epidermal growth factor receptor")
HRP	Meerrettich-Peroxidase ("horse radish peroxidase")
i.d.	intradermal
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase ("c-Jun N-terminal kinase")
JNKK	c-Jun N-terminale Kinase Kinase ("c-Jun N-terminal kinase kinase")
k	Kilo- (10^3)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
L, l	Liter
L-Gln	L-Glutamin
μ	micro- (10^{-6})
m	Meter bzw. milli- (10^{-3})
M	mol pro Liter / molar
M13	filamentöser Bakteriophage M13 (Wildtyp)
M13K07	filamentöser Bakteriophage M13 (Typ "Helferphage")
M13KE	filamentöser Bakteriophage M13 (mit pIII-Fusionspeptid)
mAb	monoklonaler Antikörper ("monoclonal antibody")
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein ("mitogen activated protein")
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase ("mitogen activated protein kinase")
max.	maximal
MCS	Klonierungskassette eines Vektors ("multiple cloning site")
MEK	MAP-Kinase / ERK-Kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ("major histocompatibility complex")
min	Minuten
mind.	mindestens
mM	Millimol pro Liter / millimolar

MMP	Matrix-Metalloproteinase
mod.	modifiziert
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTT	Thiozolylblau Tetrazoliumbromid
n	nano- (10^{-9})
neg.	negativ
nm	Nanometer
NMR	kernmagnetische Resonanz ("nuclear magnetic resonance")
NRG	Neuregulin
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom ("non-small cell lung cancer")
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ORF	offener Leserahmen ("open reading frame")
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer ("phosphate buffered saline")
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaquebildende Einheiten ("plaque forming units")
PI3K	Phosphatidylinositol-3-phosphat-Kinase
pIII	Genprodukt des Gens III von Bakteriophage M13 (Protein III)
PKC	Protein Kinase C
PLC _γ	Phospholipase C gamma
PMSF	Phenylmethansulfonyl-fluorid
pos.	positiv
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pVIII	Produkt des Gens VIII von Bakteriophage M13 (Protein VIII)
pY	Phosphotyrosin
rcf	relative Zentrifugalkraft ("relative centrifugal force")
red.	reduzierend
rel.	relativ
RF DNA	replikative (doppelsträngige) Form der DNA von Bakteriophage M13
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
s	Sekunden
S6K	ribosomale S6 Kinase
scFv	"single-chain" Fv Antikörper-Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecyl sulphate")
Shp2	"Src homology domain containing protein tyrosine phosphatase 2"
s.o.	siehe oben
SPR	Oberflächenplasmonresonanz ("surface plasmon resonance")
SSB	Einzelstrang-DNA bindende Proteine ("single-stranded DNA binding proteins")
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure ("single-stranded DNA")
Stat	"signal transducer and activator of transcription"
s.u.	siehe unten
TAA	tumorassoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TBS	Trispuffer ("Tris buffered saline")
TCR	T-Zell Rezeptor ("T-cell receptor")
TEMED	N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
TGF α	transformierender Wachstumsfaktor alpha ("transforming growth factor alpha")
TK	Tyrosinkinase
TM	Transmembranregion
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor ("tumor necrosis factor")
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ("vascular endothelial growth factor")
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor ("vascular endothelial growth factor receptor")
vgl.	vergleiche
V _H	variabler Teil der schweren Kette eines Antikörpers

V _L	variabler Teil der leichten Kette eines Antikörpers
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen ("volume per volume")
w/v	Masse pro Volumen ("weight per volume")
well	Vertiefung einer Mikrotiterplatte (engl.)
X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)-beta-D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die Unterstützung bedanken, die ich im Laufe meines Studiums und während der Durchführung meiner Doktorarbeit von meinen Freunden, Kollegen, Verwandten und Bekannten erhalten habe.

Beginnen möchte ich mit meinen Eltern Erika und Wolfgang sowie meiner Schwester Danaë, die stets ein offenes Ohr für mich hatten – besonders in schwierigen Zeiten – in denen sie mir immer zur Seite standen. Ich fand stets Unterstützung für meine Pläne und eine Anlaufstelle, bei der so manches Problem und mancher Frust abgeladen werden konnte. Das beste, was mir während meiner Doktorarbeit passiert ist, war jedoch ohne Zweifel, die richtige Frau fürs Leben zu finden. Seitdem fiel mir so manches leichter, auch im Beruf.

Großer Dank gilt meinen Kollegen am Georg-Speyer-Haus, insbesondere den ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der gesamten Arbeitsgruppe Wels – Dr. Markus Biburger, Ute Burkhardt, Dr. Benjamin Dälken, Thorsten Geyer, Dr. Ulrike Giesübel, Dr. Stephen Hyland, Robert Jabulowsky, Dr. Vera Jakobi, Hayat Mahmud, Nina Müller, Dr. Tina Müller, Pranav Oberoi, Dörthe Pferdenges, Dr. Florian Rohrbach, Christiane Sahn, Annemarie Schimpf, Dr. Kurt Schönfeld, Dr. Arjen Sloots, Barbara Uherek, Dr. Christoph Uherek, Dr. Robert Weth – die mir stets mit Ratschlägen zur Seite standen. Besonders dankbar bin ich Stephen Hyland und Thorsten Geyer, die mich als Betreuer während der Diplomarbeit bzw. hilfsbereiter Labornachbar wieder aufgemuntert haben, wenn es irgendwo hakte. Besonders danken möchte ich Christian Brendel für die Unterstützung bei CLSM-Experimenten. Für die hilfreichen Tips zur Phage Display Methode danke ich Christoph Königs und Michael Humbert. Für wertvolle Ratschläge und aufmunternde Worte danke ich Dr. Miryam Ducasse, Dr. Klaus Lehmen und Dr. Robert Pick.

Nicht zuletzt gelten mein Dank und Respekt Prof. Dr. Winfried Wels, der mir die Anfertigung meiner Diplom- und meiner Doktorarbeit am Georg-Speyer-Haus ermöglichte, sowie unserem Direktor Prof. Dr. Bernd Groner. Für die Cobetreuung meiner Doktorarbeit möchte ich mich darüber hinaus bei Dr. Ursula Dietrich bedanken. Ich bedanke mich bei der Firma Merck KGaA in Darmstadt für die interessante Zusammenarbeit im Rahmen unseres Kooperationsprojektes, insbesondere bei Dr. Andree Blaukat.

Darüber hinaus möchte ich meinen Professoren und Lehrern an der Universität Frankfurt am Main danken, die mich während des Studiums betreuten. Besonders erwähnen möchte ich aus Ihren Reihen Prof. Dr. Bernd Ludwig, dem mein Dank für die Betreuung meiner Arbeit seitens der Fakultät gilt.

Abschließend sei allen Freunden und Verwandten in Frankfurt, Schaumburg, Berlin und anderswo gedankt, die mir auf die eine oder andere Weise unterstützend zur Seite gestanden haben.

Veröffentlichungen

Hartmann, C. (2002)

„Charakterisierung der Bindungsstelle antagonistischer Antikörper gerichtet gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor durch Phage Display“

Diplomarbeit am Fachbereich 14, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Groner, B., **Hartmann, C.** und Wels, W. (2004)

„Therapeutic antibodies“

Curr Mol Med 2004 Aug;4(5):539-54

Hartmann, C., Benhar, I., Blaukat, A. und Wels, W. (2009)

„Identification of cross-reactive peptide mimotopes of therapeutic anti-epidermal growth factor receptor antibodies cetuximab and matuzumab“ (Arbeitstitel)

in Vorbereitung

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Cord Hartmann
Geburtsdatum	17.10.1976
Geburtsort	Bückeberg, Niedersachsen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch



Schulbildung

1989 – 1996	Gymnasium Adolfinum Bückeberg
-------------	-------------------------------

Zivildienst

09/1996 – 09/1997	Seniorenzentrum Haus Sonnenhof in Obernkirchen
-------------------	--

Studium

10/1997 – 09/1999	Grundstudium Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
-------------------	--

11/1999	Vordiplom (Diplom-Biochemiker Vorprüfung) - Gesamtnote „sehr gut“ Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie, Tierphysiologie
---------	--

10/1999 – 04/2002	Hauptstudium Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
-------------------	--

04/2002	Diplom (Diplom-Biochemiker-Hauptprüfung) - Gesamtnote „sehr gut“ Prüfungsfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie, Zellbiologie
---------	--

seit 06/2002	Promotion am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winfried Wels
--------------	---

Akademische Lehrer

E. Bamberg, J. Bereiter-Hahn, J. Engels, K.-D. Entian, H. Fasold, J. Feierabend, U. Gerhardt, C. Griesinger, U. Günther, B. Kolbesen, A. Kröger, B. Ludwig, L. Nover, H. Osiewacz, W. Pläßmann, R. Prinzinger, J. Rheinlaender, H. Rüterjans, J. Soppa, A. Starzinski-Powitz, W. Wels, C. Winter, H. Zimmermann