

A. THEORETISCHE EINFÜHRUNG

A.1 Einleitung

A.1.1 Biokonjugation

Das Resultat einer Biokonjugationsreaktion ist die kovalente Verknüpfung eines Proteins mit einem Kupplungspartner. Dies erfolgt mit dem Ziel, die Eigenschaften der beiden Bestandteile in die des entstehenden Konjugates einfließen zu lassen. Häufig vermittelt ein Konjugationspartner Spezifität einer Bindung, ein anderer sorgt für ein Detektionsmerkmal, eine gezielte Manipulation von Zielstrukturen oder auch Immobilität. Die sich ergebenden Eigenschaften der Konjugate können zu pharmakotherapeutischen, diagnostischen oder auch präparativen Zwecken genutzt werden. In der pharmakotherapeutischen Anwendung sind vielfältige Untersuchungen mit Antikörpern durchgeführt worden, deren Bindungsspezifität dabei ausgenutzt wird. Besonderes Interesse liegt hier auf der antineoplastischen Therapie. Gegen die Verwendung eines unkonjugierten Antikörpers spricht dabei die Tatsache, dass der Therapieerfolg oftmals durch eine fehlende Zytotoxizität nach Bindung an das Antigen oder ausbleibende Sekundäreffekte begrenzt ist. Ein möglicher Sekundäreffekt könnte eine Aktivierung des Komplementsystems durch den gebundenen Antikörper sein. Aus diesem Grund sind die Wirkungen der unkonjugierten Antikörper oftmals nicht kurativ. Um hier Abhilfe zu schaffen werden Konjugate aus Antikörpern und Toxinen oder Chelatbildnern für radioaktive Elemente eingesetzt (Wu (2005), Alley (2010)), die teilweise Marktreife erlangt haben. Im Sinne der Biokonjugation soll der Antikörper die Wirkung des Toxins an die erwünschten Zielstrukturen dirigieren und so Kollateralschäden begrenzen. Hinsichtlich eines verbesserten Drug targetings besteht die Möglichkeit, Linker zwischen den Antikörper und das Toxin einzufügen, die enzymatisch oder hydrolytisch gespalten werden können. Dies erfolgt in der Absicht, die Toxine z.B. nach einer Aufnahme in Zellen gezielt dort freizusetzen, wo die Wirkung erwünscht ist (Ducry 2010). Neben der Konjugation von einzelnen Molekülen an einen Antikörper ist auch denkbar, wirkstoffbeladene Nano- oder Mikropartikel mit

diesem zu verknüpfen. Wenn eine Freisetzung des Wirkstoffs aus den Partikeln gelingt und eine Bioverfügbarkeit der Konjugate gegeben ist, dann liegt in diesen Fällen ein deutlich vorteilhafteres Mengenverhältnis von Antikörper zu Wirkstoff vor. Des Weiteren können auch hydrophobe und instabile Wirkstoffe mit diesem Prinzip appliziert werden. Die Größe des Partikels ist ein starker Einflussfaktor auf das sich ergebende in-vivo Verhalten des Biokonjugates insgesamt. Es ist wiederum vor allem die antineoplastische Therapie, für welche intensiv an diesem Ansatz gearbeitet wird (Allen (2002), Liu (2007), Fahmy (2005)).

Am Beispiel eines Antikörpers als hochselektiven Bindeproteins kann durch die Konjugation an Fluoreszenzfarbstoffe in einer diagnostischen Fragestellung eine selektive Visualisierung von bestimmten Strukturen vorgenommen werden, die von Interesse sind. Hierunter können bestimmte Zellen (Bicho (2010)), Zellorganellen (Wallberg (2005)) oder auch pathogene Mikroorganismen (Osorio (2005)) fallen. Chan et al. (1998) entwickelten dieses Prinzip weiter, indem sie Nanopartikel mit Pigmentfarbstoffen herstellten (sog. Quantum dots), die eine wesentlich stärkere Toleranz gegenüber Ausbleichen durch Lichteinstrahlung aufweisen. Eine Vielzahl jüngerer Publikationen zu diesem Thema ist erschienen. Auch eine Konjugation von Antikörpern an Mikropartikel kann dadurch zu diagnostischen Zwecken angewendet werden, dass diese in Gegenwart des jeweiligen Antigens agglutinieren. Dieses Prinzip findet in sog. Latex-Agglutinations-Assays Verwendung und kann an wenig aufgereinigten Matrices verwendet werden. Es sind vielfältige weitere Anwendungen beschrieben

Präparative Anwendungen sind vor allem in der Affinitätschromatographie zu sehen, auch die Immobilisierung von Enzymen kann hier als Beispiel angeführt werden. Ein Beispiel aus dem pharmazeutischen Umfeld ist die Immobilisierung von Penicillin-Amidase bei der Herstellung von 6-Amino-penicillansäure (Lagerlof et al. (1976)).

Für die Konjugation sind reaktive Gruppen an beiden Reaktionspartnern notwendig. Es können bestehende funktionelle Gruppen ausgenutzt werden, oder auch Modifikationen durchgeführt werden. In dieser Arbeit werden Konjugationen von Antikörpern an Partikel behandelt. Sämtliche verwendeten Partikel besitzen eine

Oberflächenfunktionalisierung mit Carboxylgruppen. Von diesen ausgehend werden Aktivierungsreaktionen vorgenommen oder vorgeschaltete Modifikationen durchgeführt.

A.1.2 Orientierung der Anbindung

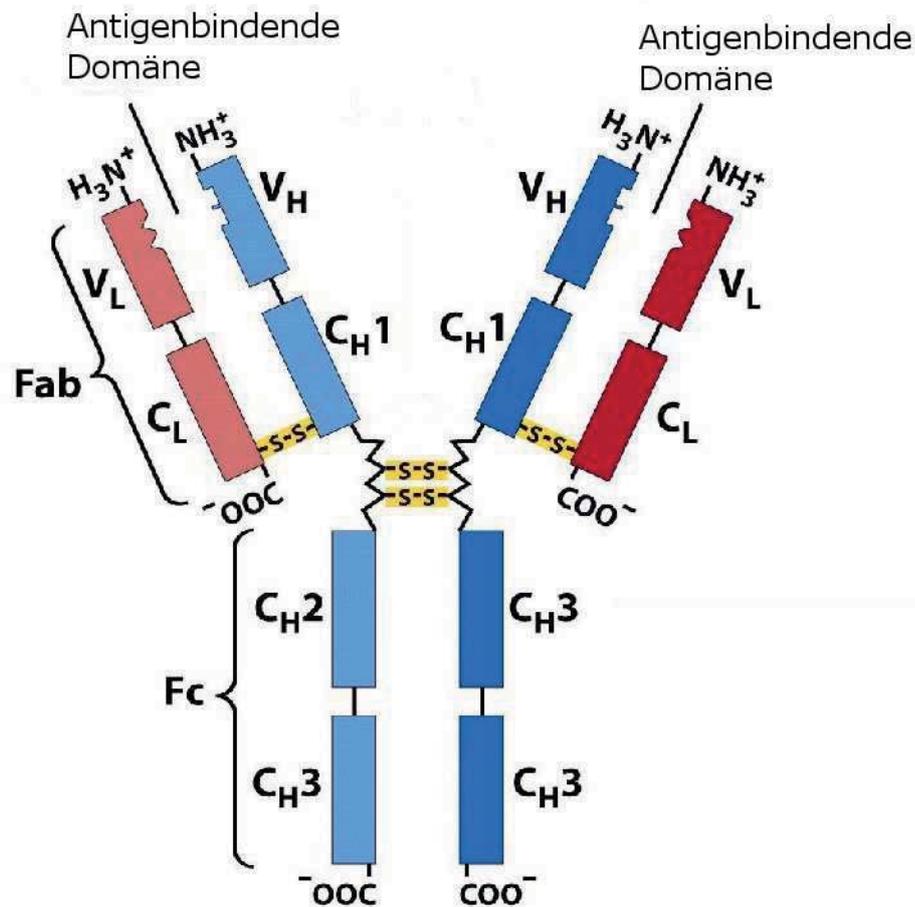


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines IgG Antikörpers. Der Antikörper besteht aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten. Die Ketten sind jeweils weiter in konstante (C) und variable (V) Regionen unterteilt. Die Anbindung an das Antigen erfolgt über die antigenbindenden Domänen (F_{ab}). Im Gegensatz zu den antigenbindenden Domänen, die sich zwischen Antikörpern desselben Subtyps stark unterscheiden, sind die konstanten Regionen (F_c) identisch. Letztere enthalten auch Polysaccharid-Seitenketten, welche für eine gerichtete Anbindung verwendet werden können. (Abbildung aus Lehninger, Principles of Biochemistry, 5. Auflage, 2008)

Bei einem Antikörper handelt es sich um ein Protein, dessen Bindungsaffinität zu seinem Erkennungsmotiv nicht in jeder Raumrichtung gleich stark ausgeprägt ist. Dies hängt mit dem asymmetrischen Aufbau des Moleküls zusammen. Eine Bindung an das Antigen kann nur über die antigenbindenden Domänen erfolgen. Für die Konjugation eines Antikörpers an ein Partikel gilt daher, dass die antigenbindenden Strukturen für das Antigen zugänglich bleiben und nicht an der Bindung zu dem Partikel beteiligt sein sollten. Ansonsten ergibt sich eine sterische Hinderung der Antikörper-Antigenbindung. Eine Konjugation ist demzufolge über die konstanten Regionen der schweren Kette zu bevorzugen. Die Anbindung in einer solchen Art und Weise wird bei der Betrachtung eines Antikörpers als gerichtete Anbindung bezeichnet. Ein Beispiel einer solchen Anbindungsstrategie ist eine Bindung über oxidierte Polysaccharid-Seitenketten. Neben dieser ist auch eine ungerichtete Anbindung möglich. Hierbei wird durch die Verwendung der entsprechenden Synthesestrategie keine Anbindung in einer bevorzugten Raumrichtung durchgeführt. Dies kann durch die Verwendung einer funktionellen Gruppe zur Konjugation an den Antikörper begründet sein, die an diesem ubiquitär vorkommt. Aminogruppen, die zur Synthese von Carbonsäureamidbindungen in der Carbodiimid-Synthese genutzt werden, sind ein Beispiel hierfür.

A.2 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist in ein Projekt zur Retardierung von ektoparasitiziden Wirkstoffen eingegliedert. Es wird mit dem Wirkstoff Flumethrin gearbeitet, welcher auch in sehr geringen Konzentrationen eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegen Ektoparasiten aufweist. Die Retardierung wird dadurch vorgenommen, dass der Wirkstoff in Mikropartikeln, wie in B.4 beschrieben, verkapselt ist. Antikörper, die spezifisch an Hundehaar, jedoch nicht an Menschen- und andere Tierhaare binden, sollen in einem Konjugationsprozess an funktionelle Gruppen der Partikeloberfläche gebunden werden. Hierbei kommen verschiedene Synthesestrategien zum Einsatz, die entweder in einer gerichteten oder ungerichteten Anbindung des Antikörpers resultieren. Die Evaluierung verschiedener Synthesestrategien ist ein Kernaspekt der Arbeit. Die gewonnenen Antikörper-Partikelkonjugate werden analytisch charakterisiert. Hierbei werden die zur Verfügung stehenden Möglichkeiten an chemisch-physikalischen und funktionellen Analysenmethoden ausgeschöpft. Die

erhaltenen Konjugate aus Antikörper und Partikeln werden topisch auf das Fell von Hunden aufgetragen. Es ist derzeit kein therapeutischer Ansatz, weder im human- noch veterinärmedizinischen Umfeld bekannt, welcher auf einem vergleichbaren Prinzip beruht. Eine klinische Untersuchung mit Antikörper-Partikelkonjugaten soll durchgeführt und differenziert diskutiert werden um die Machbarkeit dieses Ansatzes und die Stabilität der Antikörper in der Langzeitanwendung zu klären.