

DISS. ETH NO.: 15505

NOVEL APPROACHES FOR ANTI-ANGIOGENIC INTERVENTION

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

CHRISTINE PIOSSEK

Diplom-Biologin,
Johann Wolfgang Goethe-University, Frankfurt/M.

born, 17th October 1964

Citizen of Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. H. Hengartner, examiner
Prof. Dr. R. Zinkernagel, co-examiner
Prof. Dr. M. Kopf, co-examiner
Dr. M. F. Bachmann, co-examiner

2004

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung von Angiogenese-Inhibitoren basierend auf der detaillierten Kartierung der Bindestelle zwischen dem vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) und vascular endothelial growth factor (VEGF). Die VEGF/VEGFR-2 Interaktion ist essentiell für die Angiogenese, der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Nach Identifizierung der potentiellen Bindungsstelle zwischen VEGF und seinem Rezeptor VEGFR-2 mittels ortsadressierter Peptidbibliotheken wurde diese Information genutzt, um angiogenese-inhibierende Peptide zu entwickeln. Die bioaktiven Peptide wurden zusätzlich als Antigen in neuartigen, Virus abgeleiteten Vakzinformulierungen mit dem Ziel, eine starke Immunantwort gegen VEGFR-2 zu induzieren, eingesetzt.

Die Kartierung der potentiellen Bindungsstelle von VEGF mit VEGFR-2 wurde mit Hilfe zellulose-gebundener, überlappender Peptide von der extrazellulären Region des Rezeptors durchgeführt. Die detektierten Peptide bilden einen zusammenhängenden Bereich des VEGFR-2 (Aminosäuren 247-261) $^{247}\text{RTELNVGIDFNWEYPASK}^{261}$, der sich auf der dritten immunglobulin-ähnlichen Domäne befindet. Systematisches Ersetzen jeder Aminosäure des identifizierten Peptides mit dem kompletten Satz von L-Aminosäuren, zeigte den Verlust der Bindung zu VEGF nach Substitution der Asparaginsäure (Asp) in Position 255. Demnach kommt der Aminosäure Asp²⁵⁵ eine Schlüsselposition in der Wechselwirkung zwischen Peptid und VEGF zu, da diese durch keine andere Aminosäure ersetzbar ist. Monomere und dimere Varianten des VEGFR-2-Peptides binden an VEGF, inhibieren die VEGFR-2 Phosphorylierung, das Zellwachstum und die Zellmigration von Endothelzellen nach Stimulierung mit VEGF. Das dimere Peptid $(\text{RTELNVGIDFNWEYPAS})_2\text{K}$ hemmt die Bindung von VEGF mit extrazellulären VEGFR-2 Fragmenten mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 0.5 μM . Die durch VEGF stimulierte Autophosphorylierung von VEGFR-2, sowie die Proliferation und die Migration von mikrovaskulären Endothelzellen werden durch das monomere Peptid RTELNVGIDFNWEYPASK mit halbmaximalen Konzentrationen von 3-10, 0.1 und 0.1 μM inhibiert. Damit hemmen die VEGFR-2-Peptide sowohl die Bindung von VEGF, als auch die Signalübertragung sowie die biologische Aktivität, die durch VEGF/VEGFR-2 Interaktion vermittelt wird.

Zur Entwicklung Angiogenese inhibierender Leitstrukturen wurden zwei Ansätze verfolgt, um verschiedene intrinsische pharmakokinetische und pharmakodynamische Nachteile der gefundenen Peptide, wie z.B. eine schlechte orale Verfügbarkeit, kurze Halbwertszeiten im Serum und zu geringe Bindungsaffinitäten zu vermeiden.

Unter Verwendung der Spotsynthese Technologie wurden zuerst systematische D-Aminosäure-Substitutionsanalysen von den VEGFR-2 Peptiden durchgeführt. Die Einführung von D-Aminosäuren reduziert die Proteolyse und damit den metabolischen Umsatz der Peptide. Die identifizierten D,L-Peptide besitzen eine verbesserte Serumstabilität und eine höhere Bindungsaffinität. Analoge, die 4 D-Aminosäuren enthalten, inhibieren die Bindung von VEGF zu VEGFR-2 und die anschließende Autophosphorylierung bei nanomolaren Konzentrationen. Auch der Einsatz der modifizierten Peptide in einem Angiogenese Testsystem zeigte einen deutlichen, die Angiogenese inhibierenden Effekt *in vitro*.

Der zweiten Strategie liegt eine neuartige Vakzintechnologie zugrunde, die über den Einsatz von hochgradig geordneten Strukturen, wie z.B. virusähnlichen Partikeln, schwach immunogene Peptide in wirksame Immunogene umwandelt. Für die Vakzinformulierung wurden die VEGFR-2-Peptide an verschiedene Trägerpartikel gekoppelt. Immunisierungsversuche in Mäusen verursachen hohe IgG Titer gegen das gekoppelte Peptid und das gewonnene Serum reagiert stark mit dem murenen VEGF Rezeptor (VEGFR-2, KDR). Erste Experimente zur Testung des Vakzins in einem Nierentumormodell (RENCA) zeigten allerdings keine signifikante anti-tumorale Wirkung.

Die vorliegende Arbeit stellt zwei Erfolg-versprechende Ansätze vor, wie aus der detaillierten Kartierung eines Ligand/Rezeptor Bindebereichs (VEGF/VEGFR-2), neue Leitstrukturen zur Behandlung angiogenese-assoziiierter Erkrankungen gewonnen werden können.

SUMMARY

The aim of the present work was to develop anti-angiogenic lead compounds based on a detailed map of the binding site of vascular endothelial growth factor (VEGF) with its receptor (VEGFR-2). The interaction between VEGF and VEGFR-2 is essential for angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones. After identification of the potential binding site of VEGF to vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2), potent VEGFR-2 derived anti-angiogenic peptides were developed. At the same time VEGF-binding peptides were used as antigens for novel vaccine formulations directing the immune response against the VEGFR-2.

The potential binding site of VEGF with its receptor VEGFR-2 was identified using cellulose-bound overlapping peptides of the extracellular part of the receptor. The detected VEGF-binding peptides revealed a contiguous stretch $^{247}\text{RTELNVGIDFNWEYPASK}^{261}$, located on the third globular domain of VEGFR-2. A systematic replacement with the entire set of L-amino acids within the discovered peptide exhibit the loss of binding due to the substitution of aspartic acid in position 255 identifying Asp²⁵⁵ as the hydrophilic key residue in the peptide/VEGF interaction. Monomeric and dimeric VEGFR-2 derived peptides bind to VEGF₁₆₅, inhibit VEGFR 2 phosphorylation, cell growth and cell migration of endothelial cells. The dimerized peptide (RTELNVGIDFNWEYPAS)₂K inhibits VEGF binding with an IC₅₀ of 0.5 μM on extracellular VEGFR-2 fragments and 30 μM on human umbilical vein cells. VEGF stimulated autophosphorylation of VEGFR-2 as well as proliferation and migration of microvascular endothelial cells was inhibited by the monomeric peptide RTELNVGIDFNWEYPASK at a half-maximal concentration of 3-10, 0.1 and 0.1 μM , respectively. Thus the VEGFR-2 derived peptide inhibits binding, signaling as well as biological activity mediated by VEGF/VEGFR-2 interaction.

To overcome the intrinsic pharmacokinetic and pharmacodynamic problems of the found peptides such as poor oral availability, short half-lives in serum and low binding affinity, two approaches have been pursued. Systematic D-amino acid substitution of the VEGFR-2 derived peptide, using the spot synthesis technology was applied to render the peptides more stable to proteolysis and metabolism. The identified D,L-peptides possess improved serum-stability and binding affinity. D,L-peptide analogues containing 4 D-amino acids inhibit VEGF binding to VEGFR-2 and subsequent autophosphorylation at nanomolar concentrations. Testing of the peptides in a spheroid-based angiogenesis assay demonstrated a potent anti-angiogenic effect *in vitro*.

The second route takes advantage of novel vaccine technologies transforming poorly immunogenic peptides to potent immunogens using highly ordered arrays like virus-like particles as antigen carriers. The resulting vaccine formulations of VEGFR-2 derived peptide coupled to different carriers induced a strong IgG response against the coupled peptides and obtained sera strongly cross-reacted with the mature VEGF receptor (VEGFR-2, KDR). However, first experiments in a kidney tumor model (RENCA) did not show significant inhibition of tumor growth.

The present work demonstrates that the rational design of potent and stable anti-angiogenic peptide inhibitors from their parent receptors and development of novel vaccine formulations provide feasible routes to create leads for anti-angiogenic therapy.