

Ein Apoptose-induzierendes Heptamer, das effizient den Todesrezeptor 5 bündelt

Bernhard Valldorf, Heiko Fittler, Lukas Deweid, Aileen Ebenig, Stephan Dickgiesser, Carolin Sellmann, Janine Becker, Stefan Zielonka, Martin Empting, Olga Avrutina und Harald Kolmar*

Abstract: Multivalente Liganden von Todesrezeptoren sind vielversprechende tumorspezifische Wirkstoffe, da sie eine apoptotische Kaskade in Krebszellen induzieren. Hier beschreiben wir einen modularen Ansatz für den Aufbau von Konstrukten, die an den Todesrezeptor 5 („death receptor 5“, DR5) binden. In diesen Konstrukten sind mehrere Kopien gegen DR5 gerichteter Peptide (DR5TP) kovalent mit biomolekularen Gerüsten verknüpft. Mit dieser Strategie gelingt eine effiziente Oligomerisierung der Peptide in verschiedenen räumlichen Orientierungen durch enzymvermittelte Konjugationen oder rekombinante Produktion. Heptamere Konstrukte mit einem kurzen Gerüst (60–75 Reste) der C-terminalen Oligomerisierungsdomeine des humanen C4b-Bindeproteins zeigten eine bemerkenswert hohe proapoptotische Aktivität ($EC_{50}=3\text{ nm}$), wenn DR5TP an den Carboxyterminus ligiert wurde. Unsere Daten stützen die Ansicht, dass der Interligandabstand, die relative räumliche Orientierung und die Kopienzahl der rezeptorbindenden Module wesentliche Kriterien für die Rezeptoraktivierung und Zelltötung sind.

Der Begriff „Apoptose“ leitet sich aus dem Griechischen ab und bezieht sich auf den herbstlichen Blattfall. Er umschreibt eine programmierte Reihe von Ereignissen, die zum Zelltod führen. Im menschlichen Körper werden gealterte, geschädigte oder selbstreaktive Zellen durch Apoptose beseitigt. Dieser Zellsuizid kann durch bestimmte molekulare Auslöser induziert werden, bei denen DNA-Schäden und Zellstress interne Signale sind, die eine proapoptotische Kaskade aktivieren und zur Freisetzung von mitochondrialen apoptogenen Faktoren in das Zytosol führen.^[1] Als Folge wird die Apoptose-initiierende Protease Caspase-9 rekrutiert und durch den Apoptosom-Komplex aktiviert; so wird eine weitere Kaskade von „Exekutions“-Proteasen induziert (Caspase-3, -6 und -7), die die Lyse der Zelle verursacht.^[1a,2]

Alternativ zu intrinsischen Stimuli kann Apoptose auch durch die Bindung von externen Faktoren an Todesrezepto-

ren („death receptor“, DR) auf der Zelloberfläche ausgelöst werden. Signalgeber ist dabei eine ligandenvermittelte Rezeptoroligomerisierung. Diese bewirkt die Bildung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (DISC) und die Aktivierung von Caspase-8 und -10, die eine Kaskade von „Exekutions“-Caspasen auslösen. Unter den externen Faktoren ist der mit dem Tumornekrosefaktor (TNF) verwandte Apoptose-induzierende Ligand (TRAIL) von besonderer Bedeutung, da er durch die Bindung an Todesrezeptor 4 und 5 (DR4 und DR5) die Apoptose von Krebszellen fördert. Natives TRAIL ist ein Transmembranprotein vom Typ II mit homotrimerer Architektur. Es bindet die Apoptose-vermittelnden Rezeptoren DR4 und DR5 sowie die drei Decoy-Rezeptoren DcR1, DcR2 und Osteoprotegerin (OPG), die keine Apoptose induzieren.^[3] TRAIL löst speziell in Tumorzellen Apoptose aus, während gesunde Zellen und Gewebe verschont bleiben.^[4] Dies macht TRAIL und seine Rezeptoren zu vielversprechenden Kandidaten für die Krebstherapie.

Bisher wurden mehrere TRAIL-imitierende gegen DR4 oder häufiger gegen DR5 gerichtete Moleküle erzeugt, darunter mehrere monoklonale Antikörper.^[5] Um zytotoxische Aktivität zu erlangen, benötigen letztere als bivalente Binder zumindest in Zellkulturexperimenten ein sekundäres Vernetzungsmolekül, das die Oligomerisierung der Antikörper in vitro fördert.^[6] Außerdem wurde von rekombinant produziertem löslichem TRAIL, von DR4- oder DR5-spezifische TRAIL-Varianten, Einzelkettenantikörperfragmenten (scFvs), multimerisierten kameliden Einzeldomänenantikörpern („nanobodies“) und mehreren gegen DR5 gerichteten Oligopeptiden als Apoptoseauslöser berichtet (siehe Tabelle S4 in den Hintergrundinformationen).^[1a,7] Durch rekombinantes Screening wurde kürzlich ein gegen DR5 gerichtetes Peptid (DR5TP) identifiziert, das mit TRAIL um die Bindung an den Rezeptor konkurriert.^[8]

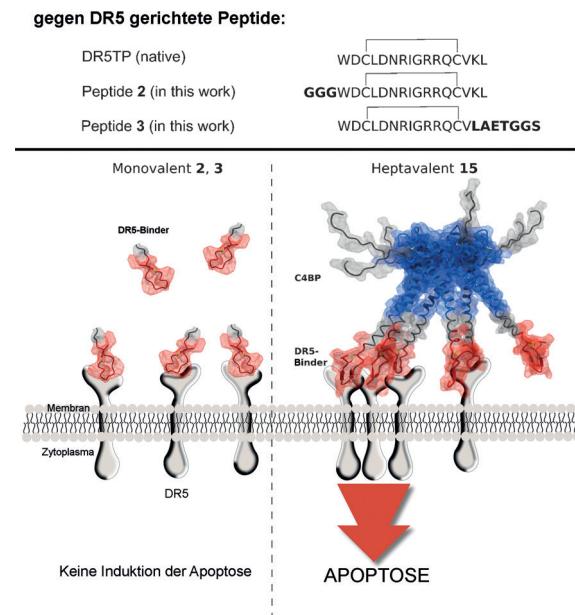
Dieses Pentadecapeptid enthält eine erweiterte DR5-Bindungsschleife, die durch eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinen stabilisiert wird (siehe Schema 1 und die Hintergrundinformationen).^[8] Solitäres DR5TP löst sogar in millimolaren Konzentrationen keine Apoptose in Krebszellen aus,^[9] während seine verlinkten bi- und trivalenten Derivate (Abbildung S1 A–D) diesen Prozess in DR5-positiven Zellen induzieren können.^[9] Interessanterweise zeigten hexavalente Moleküle mit Adamantangerüst (Abbildung S1 D) gegenüber des trivalenten Adamantan-Pendants keine Verbesserung der zytotoxischen Aktivität in zellulären Assays (Abbildung S1 B, Tabelle S4).^[10]

Hier berichten wir über DR5-spezifische Konstrukte, die Apoptose in Tumorzellen induzieren (Schema 1). Wir haben

[*] B. Valldorf, H. Fittler, L. Deweid, A. Ebenig, S. Dickgiesser, C. Sellmann, J. Becker, S. Zielonka, Dr. O. Avrutina, Prof. Dr. H. Kolmar
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität Darmstadt
Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt (Deutschland)
E-Mail: kolmar@biochemie.tud.de

Dr. M. Empting
Helmholtz Institute for Pharmacological Research Saarland (HIPS)
Universitätscampus E8 1, 66123 Saarbrücken (Deutschland)

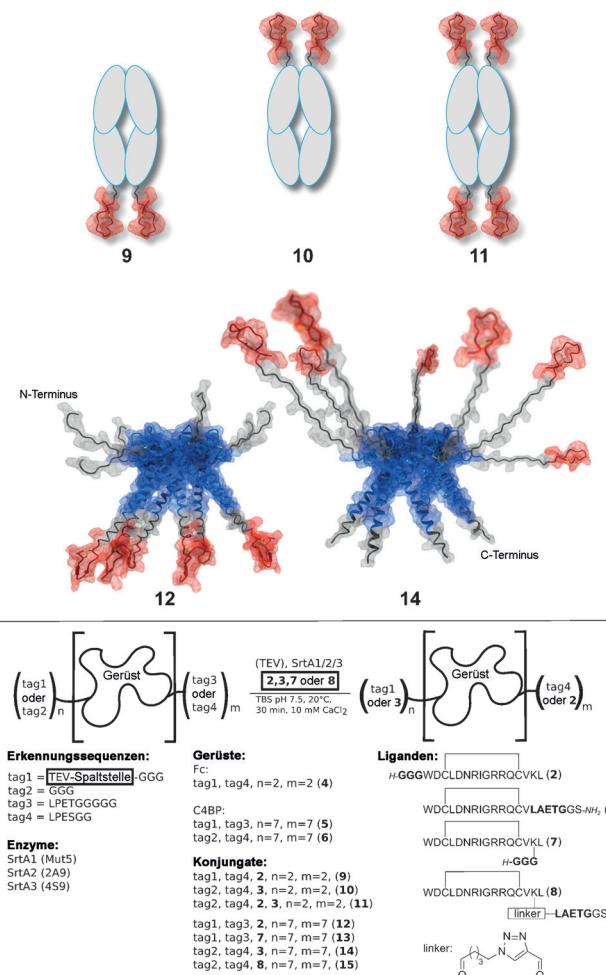
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511894> zu finden.



Schema 1. Bindung von DR5TP an DR5 auf Tumorzellen. Links: Monovalentes DR5TP (Sequenz angegeben) ist nicht in der Lage, Apoptose auszulösen. Rechts: DR5TP, gekuppelt an den C-Terminus von C4BP, bindet an DR5 mit siebenfacher Valenz und induziert Apoptose.

verschiedene makromolekulare Architekturen mit multiplen DR5-bindenden Motiven entworfen und diese durch gerüstunterstützte enzymvermittelte Konjugation assembliert (Schema 2). Als Bindeeinheit haben wir das disulfidverbrückte DR5TP ausgewählt (Schema 1 und 2), da dieses Peptid nicht an DR4, DcR1 oder DcR2 bindet.^[9] Das N-terminale Tryptophan, zwei Reste innerhalb der Disulfidschleife und der C-Terminus sind in diesem Peptid entscheidend für die Rezeptorbindung.^[8]

Die Kopienzahl der Liganden wurde durch das biomolekulare Templat festgelegt, das für die Oligomerisierung verwendet wurde (Schema 2). Zunächst kam der Fc-Teil humäner IgG als Gerüststruktur zum Einsatz, der bereits für die Di- und Tetramerisierung von Peptiden verwendet wurde.^[11] Dieses Gerüstmolekül hat wünschenswerte Antikörperattribute, z.B. eine verlängerte Plasmahalbwertszeit und eine hohe apparante Affinität aufgrund bivalenter Avidität. Als weitere Gerüststruktur für die Assemblierung von bis zu sieben DR5TP-Einheiten wurde die α -Kette der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne des humanen C4b-Bindeproteins verwendet^[12] (C4BP, Schema 1 und 2) – eine Plasmakomponente, die aufgrund fehlender Komplement-Kontrollproteine (CCP) ohne biologische Funktion ist.^[13] Dieses Konstrukt kann als Thioredoxin-Fusionsprotein bei spontaner Bildung von sieben Disulfidbrücken als stabile heptavalente Architektur rekombinant hergestellt werden (Abschnitt S1.4, Abbildung S4).^[12] Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Konjugation von biologisch aktiven Peptiden an dieses, aus sieben α -helikalen Einheiten mit jeweils 60 Resten bestehende Gerüst eine signifikant verlängerte Plasmahalbwertszeit der angefügten peptidischen Liganden erwarten lässt.^[12,14] Generell ist die Wahl des Oligomerisierungsgerüsts für die Rezeptoraktivierung ausschlaggebend,



Schema 2. In dieser Arbeit verwendete Gerüstmoleküle. Oben: schematische Darstellung der bi- und tetravalenten Fc-Konjugate **9**, **10** und **11** sowie der Heptaden **12** und **14**. Unten: Konjugation der synthetischen, auf DR5TP-basierten Liganden **2** und **3** an die Gerüste **4**, **5** und **6** durch Sortase-A-vermittelte Ligation. Für die N-terminale Ligatinen kann tag1 durch die TEV-Protease gespalten werden um tag2 freizulegen, der dann mit Peptid **3** durch SrtA2-Katalyse verknüpft werden kann.

da bei der Bindung an DR5 für eine effiziente Signalisierung des Zelltods die Valenz und die räumliche Anordnung der Liganden eine Schlüsselrolle zu spielen scheint.^[8–10] Daher wurden die beiden Gerüstmoleküle – die Fc-Antikörperdomäne **4** und die C4BP-Derivate **5** und **6** – mit zwei, vier oder sieben Kopien der auf DR5TP basierenden Liganden **2** und **3** versehen (Schema 2). Um die Bindeeinheiten in definierte Positionen am jeweiligen Gerüstmolekül anzubringen, wurden Enzym-Erkennungssequenzen eingefügt und die auf DR5TP basierenden Fragmente durch enzymkatalysierte Kopplung mit dem Gerüstprotein verknüpft (Schema 2). Hierfür wurden die Sortasen SrtA1-3 (Tabelle S1) verwendet, welche die Bildung einer Amidbindung zwischen einem N-terminalen Oligoglycin und einer C-terminalen LX_{ii}EX_{ii}G-Erkennungssequenz (X_{ii} = Ser, Thr) katalysieren (Schema 2, Abbildung S2).^[15] Die verwendeten Sortasen erkennen unterschiedliche Substratsequenzen, was eine gewisse Modularität bei der Ligandenanbringung ermöglichte (Sektion S1.6,

Abbildung S2, S3 und Tabelle S2). Dazu wurde das Fc-Gerüst so entworfen, dass zwei C- oder N-terminale Liganden (Konjugate **9**, **10**, Abbildung 2, Tabelle S3) oder 4 Liganden (jeweils zwei am C- und zwei am N-Terminus; Konstrukt **11**, Abbildung S3) angebracht werden konnten. Das C4BP-Gerüst wurde C- oder N-terminal mit sieben DR5-Bindemotiven beladen (Konstrukte **5**, **6**, **12–15**, Abbildung 2, Tabelle S3).

Die DR5-bindenden Liganden (Schema 2, Tabelle S3) wurden über Fmoc-SPPS hergestellt und anschließend disulfidverbrückt (**1–3**, **7** und **8**, Abbildung S9–14, Tabelle S3). Um den Einfluss der Verankerungsposition auf die Effizienz der enzymkatalysierten Kupplung und die biologische Aktivität zu untersuchen, wurde bei den Peptiden **7** und **8** die Konjugationsstelle in einer Lysinseitenkette installiert (Sektion S1.5 und S4).

Die kovalente Verknüpfung mit den Gerüstmolekülen **4–6** resultierte in der Bildung der oligomeren Konstrukte **9–15**. Die enzymvermittelten Reaktionen wurden mittels SDS-PAGE überwacht (Abbildung S15–S18), wobei sich für die Konstrukte **9–13** nach einer 30-minütigen Inkubation bei 22 °C ein quantitativer Umsatz zeigte (Abbildung S15–S17). Anschließend wurden die erzeugten Konjugate mittels Größenausschlusschromatographie isoliert. Die DR5-Bindung der multivalennten Konstrukte **9–13**, **16** und **17** sowie des biotinylierten Monomers **1** wurde mittels enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest untersucht (ELISA, Abbildung 1). In unseren Händen wies **1** für die Bindung an DR5 eine Disso-

ziationskonstante (K_d) von 240 nm auf (Abbildung 1A; Literaturwert K_d von 129 nm, ermittelt durch Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) für nichtmarkiertes Peptid).^[9] Verglichen mit **1** zeigte das bivalente Konjugat **9** mit den am C-Terminus des Fc-Fragments lokalisierten Peptidliganden eine fast dreifach verbesserte Affinität (K_d = 92 nm), während die Affinität des N-terminalen Gegenstücks **10** geringfügig verringert war und das tetravalente Konjugat **11** eine vergleichbare Affinität zeigte (K_d = 84 nm, Tabelle 1, Abbildung S5).

Tabelle 1: Bindungsaffinität (K_d) für DR5 und proapoptotische Potenz (EC_{50}) der synthetisierten Konstrukte.

Konstrukt	Konjugat	Valenz	K_d [nM]	EC_{50} [nM]
1	–	1	240	$>1 \times 10^6$
9	Fc-DR5TP	2	92	>1400
10	DR5TP-Fc	2	133	>1000
11	DR5TP-Fc-DR5TP	4	84	>1150
12	C4BP-DR5TP	7	25	12
13	C4BP-DR5TP	7	1061	>500
14	DR5TP-C4BP	7	–	>580
15	DR5TP-C4BP	7	–	n.d.
16	C4BP-DR5TP	7	23	3
17	DR5TP-C4BP	7	2100	>4000

Mit K_d = 25 nm wies das Konjugat **12** mit sieben am C-Terminus lokalisierten Kopien des Peptides **2** die stärkste Bindung an den DR5-Rezeptor auf (Abbildung 1, Tabelle 1).

Dieses Konstrukt und die N-terminal funktionalisierte Variante konnten rekombinant in *E. coli*-Zellen produziert werden, was in den genetisch fusionierten Verbindungen **16** (C4BP-DR5TP) und **17** (DR5TP-C4BP) resultierte (Abbildung S17).

Die Dissoziationskonstante von 23.1 nm für **16** stimmt mit der des enzymatisch ligierten Moleküls **12** überein (Tabelle 1, Abbildung 1C). Dagegen zeigte N-terminal fusioniertes **17** wahrscheinlich aufgrund der unvorteilhaften Orientierung der Liganden eine stark beeinträchtigte Bindung (K_d = 2.1 μ M, Tabelle 1). Dafür spricht, dass die Konstrukte, bei denen die Sortase-Erkennungssequenz über die Lysinseitenkette (Peptide **7** und **8**) installiert wurde, eine beeinträchtigte Konjugationseffizienz an das Gerüst **6** zeigten und die resultierenden Konstrukte **13** und **15** eine geringe oder keine Affinität zu dem Rezeptor DR5 aufwiesen (Tabelle 1). Dies deutet darauf hin, dass die Orientierung der konjugierten Peptide eine wesentliche Rolle bei einer multivalennten Bindung spielt.

Die Fähigkeit zur Induktion von Apoptose wurde am Beispiel der Ko-

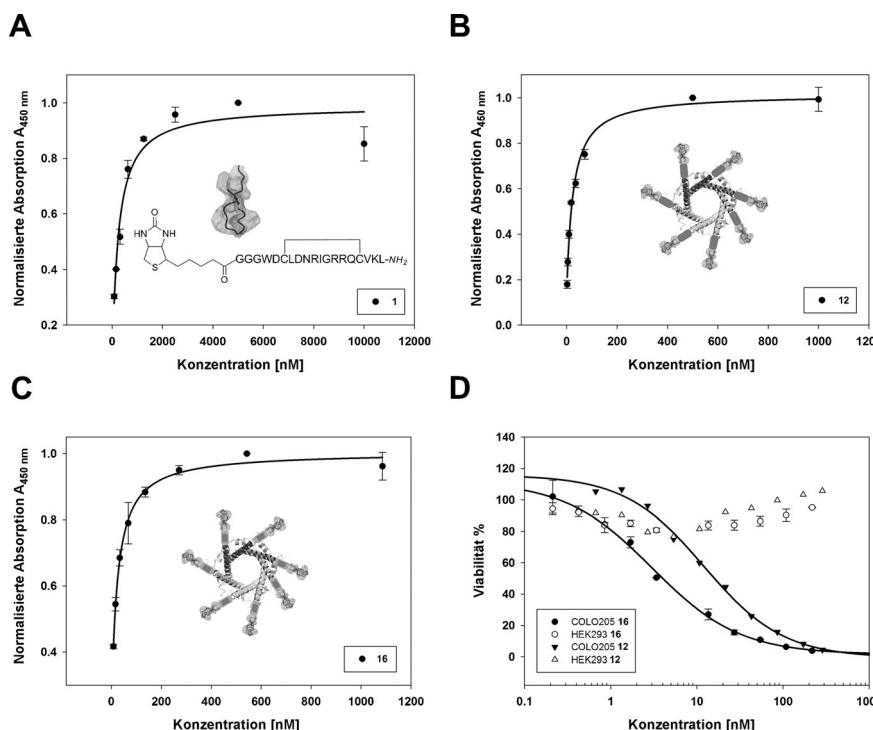


Abbildung 1: ELISA-Bindungsstudien und Zytotoxizitätsstudien. A) Bindung von monovalentem **1** an DR5 (K_d = 240 nm). B) Bindung des durch Sortase-A-Reaktion hergestellten heptavalenten Konstruktes **12** an DR5 (K_d = 25 nm). C) Bindung des Fusionsproteins **16** an DR5 (K_d = 23 nm). D) Zytotoxizität von **12** (EC_{50} = 12 nm) und **16** (EC_{50} = 3 nm) auf COLO205-Zellen. (HEK293-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet.)

lorektalkrebszelllinie COLO205 untersucht (Abbildung 1). Monovalentes Peptid **2** löste sogar bei einer relativ hohen Konzentration von 1000 μM keine Apoptose aus. Auf C4BP-basierende Heptamere mit entweder C-terminal fusionierten oder ligierten DR5-Bindern vermittelten hingegen zytotoxische Aktivität (Abbildung 1D), während die N-terminal gekoppelten Konstrukte keine Apoptose induzierten. Interessanterweise war das rekombinant hergestellte Heptamer **16** potenter als das über Sortase-Konjugation hergestellte Heptamer **12** ($\text{EC}_{50} = 3 \text{ nM}$ bzw. 12 nM ; Abbildung 1D). Wie anzunehmen war, induzierten Konjugate mit verminderter Bindung an DR5 (**13**, **14**, **17**) in vitro keine Apoptose. Für die Fc-basierten bi- und tetravalenten DR5TP-Konstrukte (**9–11**) wurde überraschenderweise ebenfalls keine Apoptose-Signaltransduktion beobachtet, auch nicht bei Zugabe von vernetzenden Agentien (Protein G und Anti-Fc-IgG). Verbindung **12** hat verglichen mit den anderen heptameren Konstrukten die dichteste Packung von rezeptorbindenden Peptiden und induzierte die stärkste Reaktion. Dieser Befund legt die Spekulation nahe, dass die dichte, multivalente und lokale Gruppierung gegen DR5 gerichteter Peptide eine Voraussetzung für eine effiziente Rezeptoraktivierung ist.

Zusätzlich analysierten wir das potenteste Heptamer **16** in einem AnnexinV-FACS-Assay, das zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheidet (Abbildung 2A–D, Sektion S1.9). Dabei stellte sich heraus, dass in Gegenwart von **16** bereits innerhalb von 2 h bei 40% der untersuchten Zellen Apoptose auftrat (Abbildung 2C), während nach 3 h der Anteil an apoptotischen Zellen 70% betrug (Abbildung 2D). Allerdings wurden hierfür im Vergleich zu dem natürlichen Liganden TRAIL höhere Konzentrationen des DR5-bindenden Wirkstoffs benötigt (Abbildung S6).

Zusammenfassend kann durch die heptameren Konstrukte **12** und **16** auch ohne den Zusatz eines sekundären Antikörpers, der meist für die Vernetzung DR5- oder DR4-

spezifischer Antikörper benötigt wird, effizient Apoptose eingeleitet werden.^[6] Unseres Wissens konnte erstmals die zytotoxische Aktivität von DR5TP durch die Oligomerisierung auf rekombinanten Gerüstmolekülen deutlich verbessert werden. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Vernetzung von DR5 in erheblichem Maß von der Orientierung und der räumlichen Anordnung der Liganden an dem Gerüstprotein abhängt. In dieser Arbeit wurde mit dem humanen C4BP als Gerüstmolekül eine modulare Plattform für eine effiziente enzymvermittelte Oligomerisierung von Zielmolekül-bindenden Peptiden etabliert. Alternativ konnten die potentesten Kandidaten ohne Verlust ihrer biologischen Aktivität auch rekombinant hergestellt werden. Damit empfahlen sich C4BP-basierte Gerüstmoleküle als symmetrische, kompakte und stabile Plattform für die Verstärkung der biologischen Aktivität von kleinen Bindemolekülen, insbesondere wenn Multivalenz von besonderem Interesse ist (wie im Fall von Zielmolekülen, die Apoptose aufgrund der Vernetzung von Rezeptoren auslösen, z. B. DR4 und DR5). Für weitere Experimente mit C4BP-fusionierten alternativen DR5-Bindemolekülen siehe Abbildung S8.

Kürzlich wurden Apoptose-induzierende, gegen DR5 gerichtete, oligomere „Nanobodies“ entwickelt, die sich von kameliden Einzeldomänenantikörpern ableiten (EC_{50} in subpikomolaren Bereich; Tabelle S4).^[7b] Allerdings wurde eine klinische Studie aufgrund unerwarteter Lebertoxizität vorzeitig beendet.^[16] Mehrere Faktoren können hierzu beigetragen haben, wie Immunogenität der „Nanobodies“ oder – bedingt durch die erhöhte DR5-Expression auf Hepatozyten in Kombination mit der hohen Potenz des Wirkstoffs – ein unerwünschtes Einleiten der Apoptose von Leberzellen.^[7b, 16] Diese Befunde zeigen an, dass die Feinabstimmung der biologischen Aktivität und die Unterdrückung der Immunogenität beim Design von Apoptose-induzierenden Wirkstoffen der nächsten Generation in besonderem Maße berücksichtigt werden muss. Es wird interessant sein zu klären, ob unser modularer Ansatz neue Wege für die Entwicklung von wirksamen und sicheren Modulatoren des Tumorwachstums eröffnen kann.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch das DFG-Schwerpunktprogramm 1623 und die NANOKAT-Förderung FKZ:0316052D des BMBF unterstützt.

Stichwörter: Apoptose · C4BP · Oligomerisierung · TRAIL imitierende Peptide · Todesrezeptor 5

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5085–5089
Angew. Chem. **2016**, *128*, 5169–5173

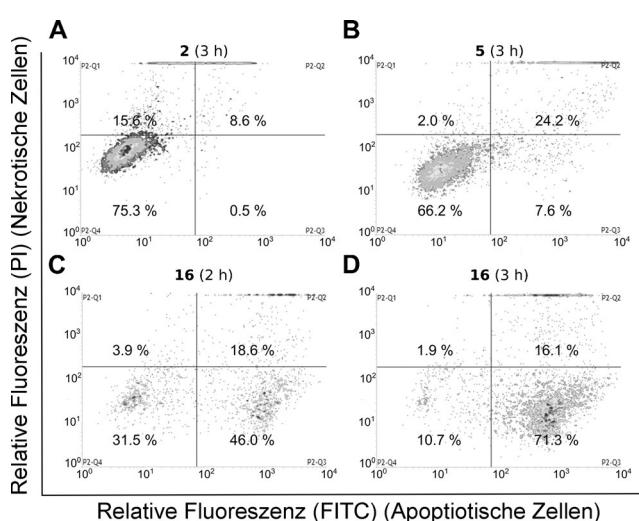


Abbildung 2. AnnexinV-FITC und Propidiumiodid-Färbung von COLO205-Zellen. A) Zellen, die mit monovalentem Peptid **2** für 3 h inkubiert wurden. B) Zellen, die mit dem heptavalenten Gerüst **5** für 3 h behandelt wurden. C,D) Zellen, die mit dem Fusionsprotein **16** inkubiert wurden, nach 2 h bzw. 3 h. (Negativkontrolle: HEK293-Zellen, Abbildung S7.)

[1] a) B. Li, S. J. Russell, D. M. Compaan, K. Totpal, S. A. Marsters, A. Ashkenazi, A. G. Cochran, S. G. Hymowitz, S. S. Sidhu, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 522–536; b) J. M. Adams, S. Cory, *Science* **1998**, *281*, 1322–1326; c) C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, X. Wang, *Cell* **2000**, *102*, 33–42; d) D. R. Green, *Cell* **2000**, *102*, 1–4; e) A. Hunt, G. Evan, *Science* **2001**, *293*, 1784–1785; f) A. M. Verhaagen, P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E.

Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, D. L. Vaux, *Cell* **2000**, *102*, 43–53.

[2] a) D. Acehan, X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang, C. W. Akey, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 423–432; b) D. R. Green, J. C. Reed, *Science* **1998**, *281*, 1309.

[3] a) J. Lemke, S. von Karstedt, J. Zinngrebe, H. Walczak, *Cell Death Differ.* **2014**, *21*, 1350–1364; b) A. Almasan, A. Ashkenazi, *Cytokine Growth Factor Rev.* **2003**, *14*, 337–348; c) Z. Mahmood, Y. Shukla, *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 887–899.

[4] a) R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore, A. Ashkenazi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12687–12690; b) S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C.-P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, *Immunity* **1995**, *3*, 673–682; c) H. Walczak, R. E. Miller, K. Arialil, B. Gliniak, T. S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, *Nat. Med.* **1999**, *5*, 157–163; d) A. Ashkenazi, R. C. Pai, S. Fong, S. Leung, D. A. Lawrence, S. A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A. E. McMurtrey, A. Hebert, *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 155.

[5] M. W. den Hollander, J. A. Gietema, S. de Jong, A. M. Walenkamp, A. K. Reyners, C. N. Oldenhuis, E. G. de Vries, *Cancer Lett.* **2013**, *332*, 194–201.

[6] a) J. D. Graves, J. J. Kordich, T. H. Huang, J. Piasecki, T. L. Bush, T. Sullivan, I. N. Foltz, W. Chang, H. Douangpanya, T. Dang, J. W. O'Neill, R. Mallari, X. Zhao, D. G. Branstetter, J. M. Rossi, A. M. Long, X. Huang, P. M. Holland, *Cancer Cell* **2014**, *26*, 177–189; b) S. Bouralexis, D. Findlay, A. Evdokiou, *Apoptosis* **2005**, *10*, 35–51.

[7] a) C. Gieffers, M. Kluge, C. Merz, J. Sykora, M. Thiemann, R. Schaal, C. Fischer, M. Branschädel, B. A. Abhari, P. Hohenberger, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 2735–2747; b) H. A. Huet, J. D. Gowney, J. A. Johnson, J. Li, S. Bilic, L. Ostrom, M. Zafari, C. Kowal, G. Yang, A. Royo, M. Jensen, B. Dombrecht, K. R. Meerschaert, J. A. Kolkman, K. D. Cromie, R. Mosher, H. Gao, A. Schuller, R. Isaacs, W. R. Sellers, S. A. Ettenberg, *mAbs* **2014**, *6*, 1560–1570.

[8] Y. M. Angell, A. Bhandari, M. N. De Francisco, B. T. Frederick, J. M. Green, K. Leu, K. Leuther, R. Sana, P. J. Schatz, E. A. Whitehorn, in *Peptides for Youth*, Springer, Berlin, **2009**, S. 101–103.

[9] V. Pavet, J. Beyrath, C. Pardin, A. Morizot, M. C. Lechner, J. P. Briand, M. Wendland, W. Maison, S. Fournel, O. Micheau, G. Guichard, H. Gronemeyer, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1101–1110.

[10] G. Lamanna, C. R. Smulski, N. Chekkat, K. Estieu-Gionnet, G. Guichard, S. Fournel, A. Bianco, *Chemistry* **2013**, *19*, 1762–1768.

[11] F. Maaß, J. Wüsteheube-Lausch, S. Dickgießer, B. Valldorf, M. Reinwarth, H. U. Schmoldt, M. Daneschdar, O. Avrutina, U. Sahin, H. Kolmar, *J. Peptide Sci.* **2015**.

[12] T. Hofmeyer, S. Schmelz, M. T. Degiacomi, M. Dal Peraro, M. Daneschdar, A. Scrima, J. Van Den Heuvel, D. W. Heinz, H. Kolmar, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 1302–1317.

[13] M. T. Libyh, D. Goossens, S. Oudin, N. Gupta, X. Dervillez, G. Juszczak, P. Cornillet, F. Bougy, B. Reveil, F. Philbert, *Blood* **1997**, *90*, 3978–3983.

[14] a) D. Christiansen, P. Devaux, B. Réveil, A. Evlashev, B. Horvat, J. Lamy, C. Rabourdin-Combe, J. H. Cohen, D. Gerlier, *J. Virol.* **2000**, *74*, 4672–4678; b) X. Dervillez, A. Hüther, J. Schuhmacher, C. Griesinger, J. H. Cohen, D. von Laer, U. Dietrich, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 330–339; c) E. Shinya, X. Dervillez, F. Edwards-Levy, V. Duret, E. Brisson, L. Ylisastigui, M. Levy, J. Cohen, D. Klatzmann, *Biomed. Pharmacother.* **1999**, *53*, 471–483.

[15] a) I. Chen, B. M. Dorr, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11399–11404; b) B. M. Dorr, H. O. Ham, C. An, E. L. Chaikof, D. R. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 13343–13348.

[16] K. Papadopoulos, R. Isaacs, S. Bilic, K. Kentsch, H. Huet, M. Hofmann, D. Rasco, N. Kundamal, Z. Tang, J. Cooksey, A. Mahipal, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2015**, *75*, 887–895.

Eingegangen am 23. Dezember 2015
Online veröffentlicht am 15. März 2016