

Peptid-PNA-Konjugate: gezielter Transport von Antisense-Therapeutika in Tumoren**

Walter Mier,* Ramon Eritja, Ashour Mohammed,
Uwe Haberkorn und Michael Eisenhut

Professor Harald zur Hausen gewidmet

Die systemische Toxizität ist eines der größten Probleme der Chemotherapie. Während die herkömmlichen Cytostatika auf alle proliferierenden Zellen wirken, ist mit neuartigen Therapieformen, insbesondere gentherapeutischen Verfahren, ein spezifischer Angriff auf Tumorzellen möglich. Die in diesen Therapieformen eingesetzten Wirkstoffe zeigen jedoch wegen ihres hohen Molekulargewichts ein ungünstiges pharmakokinetisches Verhalten, was Probleme beim klinischen Einsatz mit sich bringt. Daher hängt der Erfolg neuer Behandlungsmethoden von der Entwicklung der Vektorsysteme zum Transport von hochmolekularen Substanzen wie Antisense-Oligonucleotiden ab. Fortschritte können hierbei insbesondere durch chemische Modifikationen erzielt werden.^[1]

Somatostatin-Rezeptoren (SSTRs) finden sich in einer Vielzahl von Tumoren (z. B. Brusttumoren, kleinzelliges Bronchialcarcinom). Da das natürliche Peptid Somatostatin im Körper rasch enzymatisch abgebaut wird, wurden für den klinischen Einsatz stabilere Derivate entwickelt, von denen das erfolgreichste Octreotid ist.^[2] Dieses Peptid kann durch Bindung an die SSTRs Endocytose induzieren und dank der breiten Substratspezifität dieser Rezeptoren ankonjugierte Substanzen in das Zellinnere schleppen. Dass dies zum Transport von Tumortheraeutika genutzt werden kann, wurde in vitro bereits für Konjugate des Spindelgiftes Taxol belegt.^[3]

Da es bis heute nicht gelingt, Antisense-Oligonucleotide gezielt in Tumorzellen zu transportieren, stellte sich die Frage, ob sich SSTR-affine Peptide auch als Carrier für Oligonucleotide eignen. Als Oligonucleotid-Zielsequenz wurde eine Anti-*bcl-2*-Sequenz^[4] ausgewählt.^[5] Die für das Targeting benötigten Peptid-Nucleinsäure-Konjugate sind mit den Methoden der Festphasensynthese relativ schwer zugänglich. Die Standardmethoden zum Aufbau von Oligonucleotiden

[*] Dr. W. Mier, Dr. A. Mohammed, Prof. Dr. U. Haberkorn
Universitätsklinikum Heidelberg
Radiologische Klinik, Abteilung Nuklearmedizin
Im Neuenheimer Feld 400, 69120 Heidelberg (Deutschland)
Fax: (+49) 6221-56-5473
E-mail: walter_mier@med.uni-heidelberg.de

Prof. Dr. R. Eritja
Centro de Investigación y Desarrollo C.S.I.C.
Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona (Spanien)

Prof. Dr. M. Eisenhut
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ei 130/15-1) gefördert.

und Peptiden sind nicht kompatibel, folglich werden diese Konjugate bevorzugt durch postsynthetische Konjugation erhalten. Wir hatten kürzlich über Phosphorothioat-Oligonucleotide berichtet, die über eine Thiolgruppe am 5'-Ende mit einem Maleimido-modifizierten SSTR-affinen Peptid verknüpft waren.^[6] Die Konjugate wiesen eine hohe Hybridisierungsaffinität und eine hohe Affinität zu SSTRs auf. Trotz der erfolgversprechenden Eigenschaften *in vitro* konnten wir nun im Tierversuch keine signifikante Anreicherung in Tumoren finden.^[7]

Die Pharmakokinetik der Phosphorothioate wird offenbar durch starke unspezifische Wechselwirkungen beherrscht. Daher verwendeten wir nun in den hier beschriebenen Experimenten die metabolisch stabilen Peptidnucleinsäuren (PNAs).^[8] Die Konvergenz von PNA- und Peptidsynthese ermöglicht die schrittweise Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten am gleichen polymeren Träger. Sowohl die Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)- als auch die *tert*-Butoxycarbonyl(Boc)-Chemie sind für die Synthese von PNA-Oligomeren geeignet. Allerdings ist die Reinheit der mit Boc-Synthesechemie erhaltenen Produkte höher, da insbesondere während der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe Nebenreaktionen auftreten. Um die Synthese des Peptids mit der PNA-Synthese konvergent zu gestalten, musste der Peptidteil ebenfalls über Boc-Chemie aufgebaut werden. Die Synthese von PNA-Oligomeren gelingt mit Boc-Chemie in guten Ausbeuten, sodass diese Methode auch zur Synthese von PNA-Peptid-Konjugaten geeignet ist.^[9]

Als Peptidteil verwendeten wir das mit Octreotid nahezu identische Octreotat, welches am C-Terminus eine die Internalisierung begünstigende Carboxygruppe trägt (Abbildung 1 B). Boc-D-Phe-Cys(Acm)-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys(Acm)-Thr-PAM-Harz wurde mit einem modifizierten

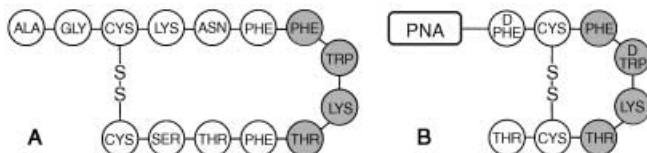
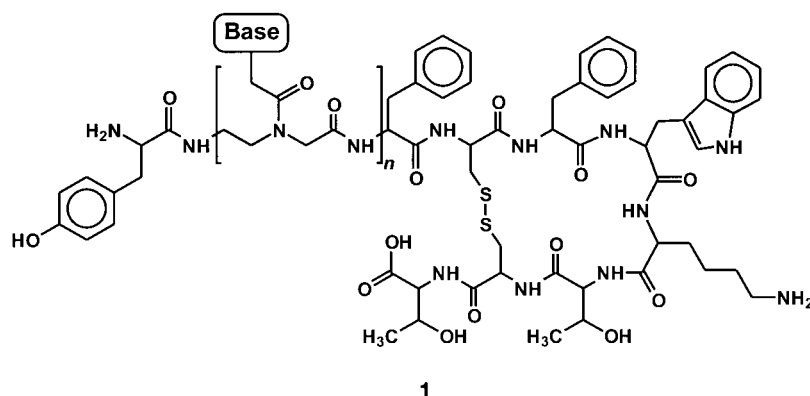


Abbildung 1. Vergleich von nativem Somatostatin (A) mit einem Konjugat aus einer PNA und Tyr³-Octreotat (B). Die für die Rezeptorbindung essenziellen Aminosäuren sind grau unterlegt.

In-situ-Neutralisationsverfahren^[10] mit HATU als Aktivator hergestellt. Die mit einem quantitativen Ninhydrintest bestimmte mittlere Kupplungsausbeute lag bei 99.1 %. Radioaktives Iod (¹²⁵I) wurde über einen Tyrosinrest am N-Terminus eingeführt, was zum Zielmolekül **1** führte (Basensequenz = Tyr-AGCGTG CGCCATCCC-Peptid).

In der Peptid- und PNA-Synthese können während der Kettenverlängerung sowohl intra- als auch intermolekulare Wechselwirkungen Aggregationen des wachsenden Oligomerstrangs bewirken. Dies kann zum Kollabieren des Harzes und damit zu schlechten Kupplungsausbeuten führen. Diese Tendenz nimmt mit steigender Oligomerlänge zu. Folglich ist bei Synthesen langer Peptid-PNA-Konjugate das Auftreten



von Sequenzen, die die Aggregationsgefahr erhöhen (difficult sequences), zunehmend wahrscheinlich. Die Anwendung bekannter Synthesevorschriften^[11] führte nicht zum erhofften Erfolg, weswegen Lösungsmittel, Kupplungszeiten, der Cappingschritt und die Reaktionsbedingungen für Mehrfachkupplungen optimiert werden mussten. Die Verwendung von Ac₂O/Pyridin in DMF beim Cappingschritt erwies sich als essenziell. Zur Spaltung eventuell gebildeter Acetylcster wurde anschließend mit DMF/Piperidin gewaschen. Die Kupplungszyklen wurden mit fünf Äquivalenten der Boc-geschützten PNA-Monomere unter Verwendung von HATU als Aktivierungsreagens durchgeführt. Die exocyclischen Aminofunktionen der A-, C- und G-Monomere waren Benzyloxycarbonyl-geschützt. Der Kupplungszyklus ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Ab einer kritischen Oligomerlänge wurden bei der HPLC-Analyse von Aliquots stark abnehmende Kupplungsausbeuten beobachtet: Ab dem neunten Monomer, insbesondere bei Kupplungen von G-Monomeren, sanken sie auf etwa 50 %. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeiten und Mehrfachkupplung gelang es, auch an den kritischen Stellen Kupplungsausbeuten > 95 % zu erzielen. Unter den optimierten Bedingungen wurde das gewünschte Konjugat laut HPLC-Analyse in einer Ausbeute von ca. 75 % erhalten. Es gelang jedoch nicht, dieses Konjugat an der Festphase zu cyclisieren, da die Ti³⁺-Ionen Nebenreaktionen mit den

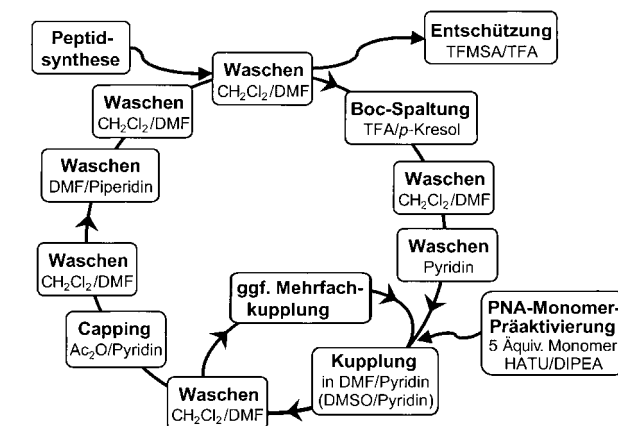
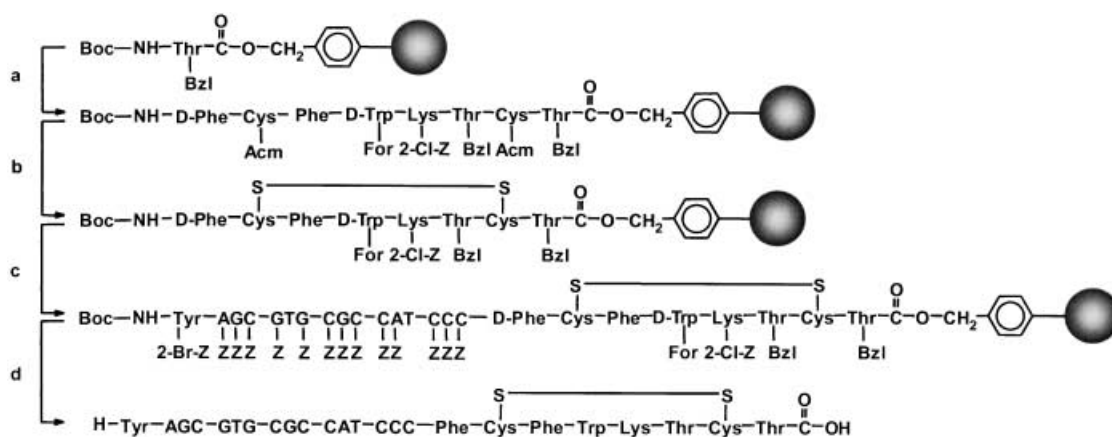


Abbildung 2. Syntheszyklus zur Konjugation des PNA-Teils unter Anwendung der Boc-Chemie. Die Abkürzungen sind in Schema 1 erklärt.



Schema 1. Fließdiagramm der Synthese des Octreotat-PNA-Konjugats mithilfe der Boc-Chemie: a) Kupplungszyklen mit HATU/DIPEA/Boc-Abspaltung mit 5 % *p*-Kresol in TFA; b) $\text{Ti}(\text{TFA})_3$; c) Kupplungszyklen entsprechend Abbildung 3; d) TFA/*p*-Kresol/TFMSA. Acn = Acetamidomethyl, 2-Br-Z = 2-Brombenzyloxycarbonyl, 2-Cl-Z = 2-Chlorbenzyloxycarbonyl, Bzl = Benzyl, For = Formyl, Z = Benzyloxycarbonyl; TFA = Trifluoressigsäure, TFMSA = Trifluormethansulfonsäure, DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat.

Nucleobasen eingehen. Da der Verlauf der alternativen Luftoxidation, bedingt durch die Größe des Moleküls, nicht chromatographisch verfolgt werden kann, wurde das PNA-Oligomer am bereits cyclisierten Peptid aufgebaut. Schema 1 zeigt die Synthese des Octreotat-PNA-Konjugats aus dem durch Boc-Chemie hergestellten und mit $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ cyclisierten Peptid. Nach Konjugation der PNA-Monomere konnte ein einheitliches Produkt erhalten werden, das mit TFMSA in TFA mit *p*-Kresol als Abfangreagens geschützt wurde. Nach Fällung mit Diethylether und Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC wurde **1** in ca. 40 % Ausbeute isoliert.

Bindungsstudien mit den PNA-Konjugaten und Ratten-Kortex-Membranen ergaben, dass die Konjugate mit ähnlich hoher Affinität an SSTRs binden wie Octreotid, was durch die IC_{50} -Werte belegt wird (Octreotat-PNA-Oligomer 1.52, Octreotid 1.98 nM). Die Bestimmung der Schmelztemperaturen ergab, dass die PNA-Konjugate mit hoher Affinität mit komplementären Phosphodiester-DNA-Oligonucleotiden hybridisieren: Die Schmelztemperatur des Konjugats lag mit ca. 82 °C deutlich höher als die eines Phosphodiesterduplex der gleichen Sequenz ($T_m = 71.4$ °C). Dies spricht dafür, dass das PNA-Konjugat wegen seiner hohen Hybridisierungsaffinität als Antisense-Wirkstoff geeignet sein sollte.

Die Organverteilung wurde in Lewis-Ratten, die den SSTR-positiven Pankreastumor CA20948 trugen, untersucht (Abbildung 3). Das PNA-Konjugat und eine Kontroll-PNA mit der gleichen Sequenz wurden nach Entschützen und Abspalten von der Festphase mit der Chloramin-T-Methode^[12] selektiv am Tyrosinrest ^{125}I -markiert. Im Gegensatz zum Phosphorothioat-Konjugat wurde das ^{125}I -markierte PNA-Peptidkonjugat selektiv im Tumorgewebe angereichert. Das Peptid-PNA-Konjugat hat andere physikochemische Eigenschaften als Tyr³-Octreotid, was Faktoren wie die Interaktion mit Serumproteinen beeinflusst und durch die unterschiedliche Organaufnahme insbesondere in den Nieren, der Leber und den Lungen reflektiert wird. Die Modifikation der PNA durch den Peptidteil führte zu einer etwa zehnfach stärkeren Anreicherung im Tumorgewebe.

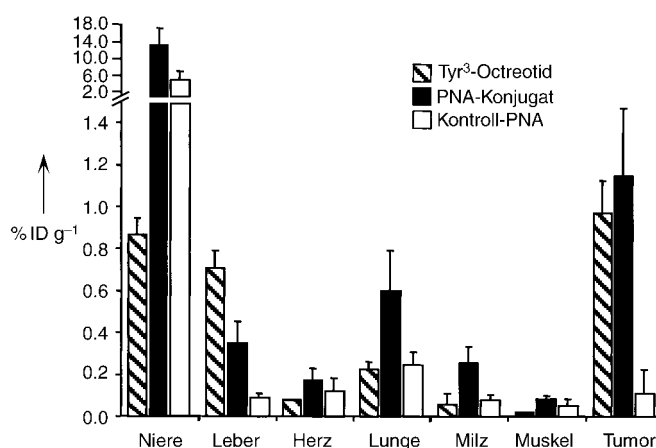


Abbildung 3. Organverteilungsdaten für tumortragende Lewis-Ratten, angegeben in Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe \pm Standardabweichung (% ID g⁻¹) 1 h nach intravenöser Injektion (Mittelwerte aus drei oder sechs Tieren, alle Substanzen mit ^{125}I markiert). Die Konjugation des Peptidteils führt zu einer deutlich höheren Akkumulation des PNA-Oligomers im Tumorgewebe (statistische Signifikanz im Student-t-Test: $p = 0.021$).

Die Anreicherung des Octreotat-PNA-Konjugats entspricht in allen Organen, außer der Niere, der des freien Peptids. Dies deutet darauf hin, dass die Peptid-PNA-Konjugate im Serum weniger unspezifisch assoziiert vorliegen als die Phosphorothioat-Konjugate und infolgedessen an den Rezeptor binden können. Die Spezifität der an der Aufnahme beteiligten Rezeptoren wird zudem dadurch belegt, dass durch Coinjektion von nichtmarkiertem Octreotid im Überschuss 79 % der Aufnahme in den Tumor inhibiert werden konnte.

Obwohl es eine Reihe erfolgversprechender In-vitro-Studien mit PNA-Konjugaten gibt,^[13] konnte bislang keine der beschriebenen Methoden auf das Targeting von Tumoren in vivo übertragen werden. Durch den Einsatz SSTR-affiner Carriermoleküle gelingt es erstmals, Oligonucleotide gezielt

in Tumorgewebe zu transportieren. Dies zeigt, dass das Targeting hochmolekularer Wirkstoffe mit rezeptorspezifisch bindenden Peptiden möglich ist.

Experimentelles

Festphasensynthesen wurden manuell im Batch-Verfahren mit Bocgeschützten Aminosäuren (Bachem, Deutschland) sowie PNA-Monomeren (Applied Biosystems, Deutschland) an PAM-Harz durchgeführt. Analytik und Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC erfolgten an LiChrosorb-RP-selectB-Säulen (Merck, Deutschland) mit Acetonitril/Wasser-Gradienten (0.1 % TFA) und durch Elektrospray-Ionisations (ESI)-Massenspektrometrie auf einem Finnigan MAT TSO 7000 System (Thermo Finnigan, USA). Das Radioisotop ^{125}I wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Deutschland) bezogen.

Synthese des Peptid-PNA-Konjugats: Zunächst wurde folgender Syntheszyklus zum Aufbau von H-D-Phe-cyclo[Cys-Phe-D-Trp(For)-Lys(2-Cl-Z)-Thr(Bzl)-Cys]-Thr(Bzl)-O-PAM durchlaufen: 100 mg Harz (initialer Beladungsgrad = 0.72 mmol g^{-1}) wurden zweimal 2 min mit 5 % *p*-Kresol in TFA geschüttelt und mit DMF gewaschen. Danach wurde ein 2 min in DMSO vorinkubiertes Gemisch aus 4 Äquiv. der Carbonsäure, 3.9 Äquiv. HATU und 10 Äquiv. Diisopropylethylamin (DIPEA) zugegeben, 5 min geschüttelt und wieder mit DMF gewaschen. Der Syntheszyklus zur Konjugation der PNA-Monomere an dieses Harz verlief wie folgt: a) zweimal 2 min Schütteln mit TFA/*p*-Kresol (95:5, v/v); b) 2 min Inkubation des PNA-Monomers mit 4.9 Äquiv. HATU und 10 Äquiv. DIPEA (Endkonzentration 0.1 M); c) Waschen mit DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v), danach mit Pyridin; d) 15 min Schütteln mit dem präaktivierten PNA-Monomer; e) Waschen mit DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v); f) 5 min Schütteln mit Ac_2O /Pyridin/DMF (1:10:10, v/v/v); g) Waschen mit DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v); h) 2 min Schütteln mit DMF/Piperidin (95:5, v/v); i) Waschen mit DMF/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v). Nach Kupplung von Boc-Tyr(2-Br-Z) wurde das Harz gewaschen und getrocknet. 30 mg des beladenen Harzes wurden mit 500 μL 5 % *p*-Kresol in TFA versetzt. Nach Zugabe von 50 μL TFMSA wurde 2 h geschüttelt, das Harz abfiltriert und das Rohprodukt mit Diethylether ausgefällt. Dieses wurde in Acetonitril/Wasser (1:1) aufgenommen und 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Reinigung erfolgte durch HPLC. Nach Lyophilisieren wurde H-Tyr-AGCGTGCGCCATCCC-D-Phe-cyclo[Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys]-Thr-OH als weißes Pulver in einer Gesamtausbeute von 16.8 mg (ca. 40 %) erhalten. Die Integrität und Reinheit des Konjugats wurde mit ESI-MS (m/z für $\text{C}_{216}\text{H}_{270}\text{N}_{96}\text{O}_{58}\text{S}_2$ ber.: 5203 g mol^{-1} , gef.: 5205 g mol^{-1} ($[M+H]^+$) und analytischer HPLC (Reinheit > 95 %) bestätigt. Die Kontroll-PNA (H-Tyr-AGCGTGCGCCATCCC-Lys- NH_2) wurde analog dem Peptid-PNA-Konjugat hergestellt.

Organverteilungsstudien: Eine Zellsuspension des CA20948-Tumors wurde in einer Nährlösung subcutan in die Nackenfalte von männlichen Lewis-Ratten appliziert. Nach etwa 10 Tagen waren Tumore mit einem Volumen von etwa 5 mL herangewachsen. Die Tiere erhielten in Gruppen von jeweils drei Tieren eine Injektion der ^{125}I -markierten Verbindung in die Schwanzvene. Nach 1 h wurden die Tiere getötet und die in den Organen enthaltene Aktivität im γ -Zähler bestimmt.

Eingegangen am 15. August 2002,

veränderte Fassung am 17. Januar 2003 [Z19978]

Stichwörter: Antisense-Wirkstoffe · Festphasensynthesen · Peptide · Peptidnucleinsäuren · Wirkstoff-Transport

- Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1949–1952; b) J. D. Hood, M. Bednarski, R. Frausto, S. Guccione, R. A. Reisfeld, R. Xiang, D. A. Cheres, *Science* **2002**, 296, 2404–2407.
- [2] W. Bauer, U. Briner, W. Doepfner, R. Haller, R. Huguenin, P. Marbach, T. J. Petcher, J. Pless, *Life Sci.* **1982**, 31, 1133–1140.
- [3] C. M. Huang, Y. T. Wu, S. T. Chen, *Chem. Biol.* **2000**, 7, 453–461.
- [4] Die Expression des Protoonkogens *bcl-2* setzt die Schwelle für die Einleitung der Apoptose in Tumorzellen herauf. Das Anti-*bcl-2*-Phosphorothioat-Oligonucleotid G3139 (Genasense) gehört zu den Antisense-Oligonucleotiden, deren klinische Entwicklung bereits am weitesten fortgeschritten ist.
- [5] L. Mologni, P. E. Nielsen, C. Gambacorti-Passerini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 264, 537–543.
- [6] W. Mier, R. Eritja, A. Mohammed, U. Haberkorn, M. Eisenhut, *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 855–860.
- [7] Die Aufnahme in den Tumor wurde unter den im Text beschriebenen Bedingungen untersucht. Das ^{32}P -markierte Konjugat reichte sich wie ein Phosphorothioat ohne Peptidteil bevorzugt in Leber, Nieren und Milz an.
- [8] a) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, 254, 1497–1500; b) E. Uhlmann, A. Peyman, G. Breipohl, D. W. Will, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2954–2983; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2796–2823.
- [9] S. K. Awasthi, P. E. Nielsen, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2002**, 5, 253–259.
- [10] L. P. Miranda, P. F. Alewood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1181–1186.
- [11] a) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.* **1995**, 1, 175–183; b) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.* **1997**, 49, 80–88.
- [12] F. C. Greenwood, W. M. Hunter, J. S. Glover, *Biochem. J.* **1963**, 89, 114–123.
- [13] Siehe z.B.: a) L. C. Boffa, S. Scarfi, M. R. Mariani, G. Damonte, V. G. Allfrey, U. Benatti, P. L. Morris, *Cancer Res.* **2000**, 60, 2258–2262; b) L. J. Branden, A. J. Mohamed, C. I. Smith, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 784–787.

[1] a) R. G. Cooper, R. P. Harbottle, H. Schneider, C. Coutelle, A. D. Miller, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2128–2132; *Angew.*