

# Verbesserte Strategien zur zielgerichteten Krebstherapie\*\*

Wolfgang Maison\* und John V. Frangioni\*

## Stichwörter:

Bifunktionale Linker · Chemokonjugate · Peptide · Tumor-Targeting · Tumortheraeutika

**E**in selektives Targeting von Tumorgewebe – oder jeder anderen Art von Gewebe im Körper – durch einen Wirkstoff oder Marker erfordert eine hohe Stabilität dieser Substanz im Blut, ausreichende Bioverfügbarkeit an der Wirkstelle, eine angemessene Kontaktzeit mit dem Target, die effektive Aufnahme durch das Zielgewebe unter Beibehaltung der biologischen Aktivität und den zügigen Abtransport von nicht-gebundenem Wirkstoff. Seit etwa zwei Jahrzehnten sind Antikörper das Mittel der Wahl zur zielgerichteten Verabreichung von Kontrastmitteln und Chemotherapeutika gegen Krebszellen. Antikörper sind stabil im Blut, haben typi-

scherweise nanomolare Affinitäten zu ihrem Target und tolerieren die Konjugation mit Kontrastmitteln und Chemotherapeutika, da bindende und nicht-bindende Domänen in hinreichendem Abstand zueinander vorliegen.<sup>[1]</sup>

Trotz der generellen Verträglichkeit von Antibiotika und Chemotherapeutika büßt der Wirkstoff in konjugierter Form häufig an Cytotoxizität ein. Neue Strategien zur Freisetzung cytotoxischer Wirkstoffe, entweder nach der Bindung auf der Oberfläche von Krebszellen oder nach der Endocytose, wären daher wünschenswert.<sup>[2]</sup> Über ein beeindruckendes Beispiel für solche Strategien wurde im Zusammenhang mit dem Antitumor-Antibiotikum Calicheamicin berichtet: Durch Konjugation mit einem tumorspezifischen monoklonalen Antikörper (mAb) über eine Amidbindung wird das Konjugat zwar im Tumor akkumuliert, weist zunächst aber keine merkliche Cytotoxizität mehr auf.<sup>[3]</sup> Wird die Verknüpfung dagegen mit einem pH-sensitiven bifunktionalen Linker durchgeführt, der die intrazelluläre Freisetzung von Calicheamicin ermöglicht (Abbildung 1),<sup>[4]</sup> ist das Konjugat ein potentes Tumortheraeutikum. Gemtuzumab Ozogamicin („gem-ozo“, Mylotarg), ein Konjugat aus einem CD33-spezifischen mAb und Calicheamicin, das dieses Konzept der bi-

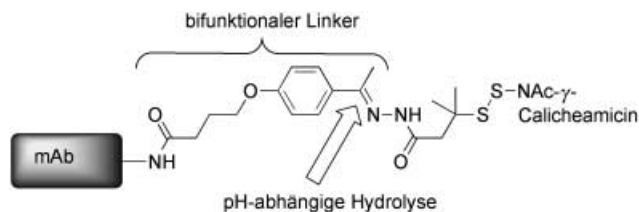
funktionalen Linker nutzt, ist bereits für die Behandlung akuter Leukämien erprobt.<sup>[4]</sup>

Eine Klasse potenter Chemotherapeutika mit komplexer Struktur sind die Taxane.<sup>[5]</sup> Über zwei neue Ansätze zur Verknüpfung von Taxanen mit monoklonalen Antikörpern, die die Cytotoxizität des Taxans erhalten, wurde vor kurzem berichtet. Im Konjugat mAb-1 (Schema 1) verbindet ein enzymatisch spaltbarer Glutaratester<sup>[6]</sup> den mAb mit der 2'-Position von Paclitaxel (Taxol). Nach der Endocytose des Paclitaxel-mAb-Konjugats setzen nichtspezifische zelluläre Esterasen Paclitaxel frei, das dann aus den Endosomen in das Cytosol diffundieren und dort seine biologische Wirkung entfalten kann.<sup>[7]</sup>

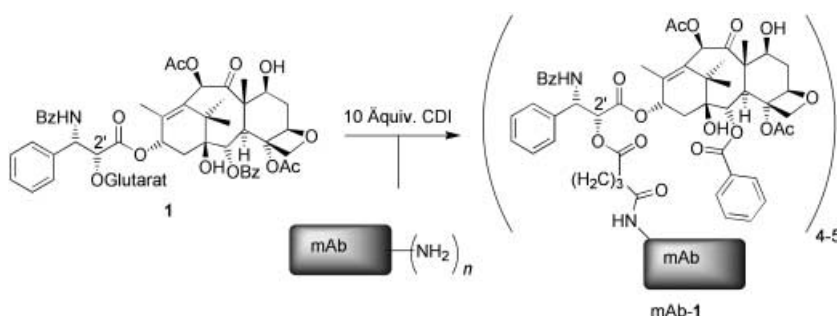
Wie in Schema 2 dargestellt, wurde das Taxan der zweiten Generation 2 (SB-T-110131, IDN5109, BAY59-8862) an Position 10 unter milden Bedingungen über einen Methyldisulfanylalkanoil(MDS)-Linker mit einem mAb,<sup>[8]</sup> der spezifisch für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) ist, verknüpft. EGFR wird bekanntermaßen in einigen menschlichen Plattenepithel-Krebsarten überexprimiert. Die Anti-EGFR-mAbs wurden mit *N*-Succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)pentanoat modifiziert und die resultierende 4-Pyridyldithiopentanoil-Gruppe im abschließen-

[\*] Dr. W. Maison  
Institut für Organische Chemie  
Universität Hamburg  
Martin-Luther-King-Platz 6  
20146 Hamburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 40-42838-2495  
E-mail: maison@chemie.uni-hamburg.de  
Dr. J. V. Frangioni  
Harvard Medical School  
Beth Israel Deaconess Medical Center  
SL-B05  
330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215  
(USA)  
Fax: (+1) 617-667-0981  
E-mail: jfrangio@bidmc.harvard.edu

[\*\*] W.M. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung. J.V.F. wird durch das Department of Energy (Office of Biological and Environmental Research), No. DE-FG02-01ER63188, den Clinical Scientist Development Award der Doris Duke Charitable Foundation und von den National Institutes of Health, No. R21/33 CA-88245 und R21 CA-88870 (National Cancer Institute) und R21/R33 EB-00673 (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering), unterstützt.



**Abbildung 1.** Ein pH-sensitiver bifunktionaler Linker zur Verknüpfung von Calicheamicin mit monoklonalen Antikörpern.



**Schema 1.** Konjugation des Paclitaxel-Derivats **1** mit monoklonalen Antikörpern. CDI = *N,N*-Carbonyldiimidazol.

den Schritt durch eine Disulfidbrücke mit dem Taxoid **2** verknüpft. Nach der Endocytose des Konjugats sollte die reduzierende Umgebung in der Zelle das Taxan freisetzen. Die Antitumoraktivitäten zweier Anti-EGFR-mAb-2-Konjugate (KS61-2 und KS77-2) wurden gegen menschliche Tumor-Xenograften in schwer immundefizienten Mäusen ermittelt.<sup>[8]</sup> Beide Konjugate wiesen eine bemerkenswert hohe Antitumoraktivität auf, und die nötigen Dosen des Konjugats waren nichttoxisch für die Mäuse.

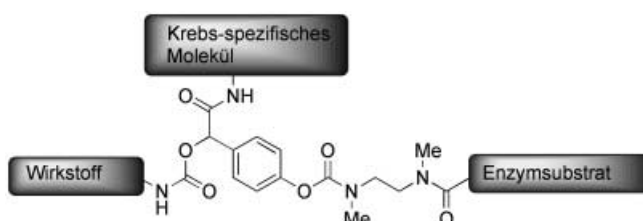
Ein sehr interessantes und universelles Linkersystem, das auf enzymatischer Aktivierung beruht, wurde kürzlich von Shabat et al. vorgestellt.<sup>[9]</sup> Kern dieses „chemischen Adapters“ ist eine 4-Hydroxymandelsäure-Einheit mit drei funktionellen Gruppen zur Verknüpfung mit einem dirigierenden krebspezifischen Molekül, einer zelltoxischen Gruppe und einem Enzymsubstrat (Abbildung 2). Das zugrundeliegende Konzept besteht aus drei Teilschritten: Das krebspezifische Molekül dirigiert das Konjugat zum Tumor, wo eine enzymatische Reaktion mit dem Enzymsubstrat in einer spontanen Folgereaktion die

Freisetzung des zelltoxischen Wirkstoffes bewirkt. Der Mechanismus dieser Freisetzung umfasst die enzymatische Spaltung des Enzymsubstrats, eine sich anschließende Eliminierung eines cyclischen Dimethylharnstoffderivats und die Bildung eines intermediären Chinonmethids, das die cytotoxische Gruppe als Carbinsäure freisetzt, die letztlich spontan decarboxyliert und den aktiven Wirkstoff freisetzt (Abbildung 2). Demonstriert wurde die Tauglichkeit des Konzepts in vitro mit einem Konjugat eines *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid(HPMA)-Copolymers<sup>[10]</sup> als krebsspezifisches Molekül, Etoposid als cytotoxisches Molekül und einem Substrat einer Retro-Aldol-Retro-Michael-Sequenz, die durch den Antikörper 38C2 als spaltendes Enzym kataly-

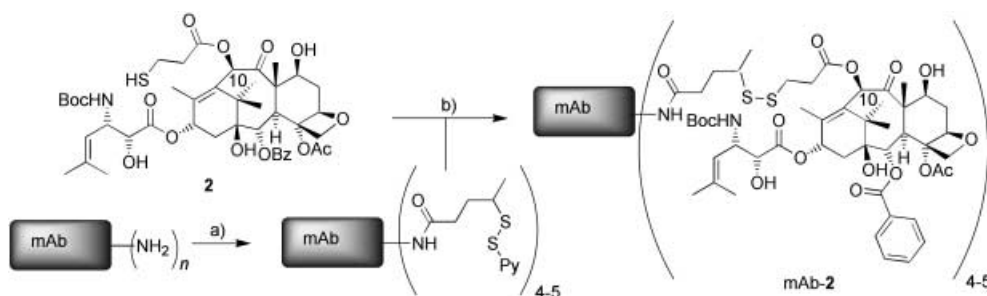
siert wird. Ein In-vivo-Test steht allerdings noch aus.

Die bislang genannten Strategien wurden zumeist auf monoklonale Antikörper angewendet, allerdings gehen deren Vorzüge mit dem Nachteil einer schlechten Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik einher. Immunglobulin G (IgG) z. B. hat ein Molekulargewicht ( $M_w$ ) von ca. 150 000 Da und einen hydrodynamischen Durchmesser ( $D_h$ ) von ca. 10.4 nm. Solche Makromoleküle benötigen mehr als 24 h zur Einstellung ihrer Gleichgewichtsverteilung zwischen dem intra- und extrazellulären Raum, weisen eine Halbwertszeit von drei Tagen auf und sind erst nach bis zu sieben Tagen vollständig aus dem Körper geklärt. Daneben verhindert der hohe hydrostatische Druck in vielen Tumoren die Penetration durch IgG.<sup>[11]</sup> Die hohe Affinität monoklonaler Antikörper zu ihren Targets beruht außerdem auf ihrem multivalenten Charakter, sodass die meisten univalenten Antikörper keine ausreichende Affinität für ein erfolgreiches In-vivo-Targeting haben.

Aufgrund dieser Einschränkungen geht der Trend dahin, Antikörper durch niedermolekulare Liganden zu ersetzen. Diese Liganden sind den Antikörpern konzeptuell ähnlich: Sie enthalten ebenso eine oder mehrere bindende Domänen zum Tumor-Targeting und eine



**Abbildung 2.** Ein chemisches Adaptersystem auf Basis von 4-Hydroxymandelsäure.

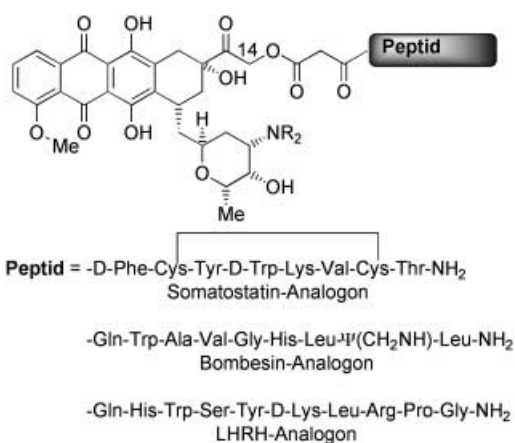


**Schema 2.** Konjugation von monoklonalen Antikörpern mit dem Taxan der zweiten Generation **2** (SB-T-110131; Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). a) *N*-Succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)pentanoat, 50 mM Phosphatpuffer, 50 mM NaCl, pH 6.5, 2 mM EDTA, 90 min; b) 50 mM Phosphatpuffer, 50 mM NaCl, pH 6.5, 2 mM EDTA, 1.7 Äquiv. **2**, 24 h.

nichtbindende Domäne zur Konjugation mit weiteren funktionellen Molekülen wie Kontrastmitteln oder Chemotherapeutika. Im Unterschied zu mAbs ermöglichen ihr niedriges Molekulargewicht und ihr geringer hydrodynamischer Durchmesser eine schnelle Klärung durch Nieren und Leber. Die Aufgabe bei der Entwicklung niedermolekularer Liganden besteht darin, sie „modular“ aufzubauen, sodass ihre Bindungsaffinität zum Target auch nach der Konjugation mit einem weiteren Molekül gleicher oder auch höherer Molekülmasse erhalten bleibt.

Natürliche Peptide binden ihre Rezeptoren meist hochspezifisch und mit Affinitäten, die oftmals im nanomolaren oder subnanomolaren Bereich liegen. Aufgrund der Tatsache, dass eine Reihe von Peptid-Rezeptoren auf der Oberfläche von menschlichen Krebszellen überexprimiert ist, sind Peptide attraktive Zielstrukturen für niedermolekulare Liganden in der Krebstherapie. Peptide wie Somatostatin, Substanz P, Gastrin, Bombesin, das  $\alpha$ -Melanocyt-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH), Neurenin und das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) sowie dessen Analoga<sup>[12]</sup> werden gegenwärtig als niedermolekulare Liganden in präklinischen und klinischen Studien erprobt.<sup>[13]</sup> Radioaktiv markierte Derivate dieser Peptide bilden eine wichtige Klasse von Markierungsreagentien,<sup>[14]</sup> und das <sup>111</sup>In-markierte Somatostatin-Analogon OctreoScan wird bereits im klinischen Bereich eingesetzt.<sup>[15]</sup>

Konjugate von Cytostatika mit niedermolekularen Liganden wurden ebenfalls erfolgreich für die Chemotherapie entwickelt.<sup>[16]</sup> Eine Reihe von Doxorubicin-Konjugaten mit Somatostatin, Bombesin und dem luteinisierenden Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) als dirigierenden Molekülen wurde entwickelt (Abbildung 3) und gegen unterschiedliche menschliche Krebszellen getestet. Zur Verknüpfung zwischen dem zelltoxischen Agens und dem dirigierenden Peptid wurde in diesem Fall der 14-*O*-Glutaryl-ester von Doxorubicin herangezogen, eine Struktureinheit, die aus potenten Tumorthérapeutika be-



**Abbildung 3.** Doxorubicin-Konjugate mit tumordirigierenden Peptiden.

kannt ist.<sup>[17]</sup> Viele der verwendeten Peptide können vorteilhaft durch Festphasensynthese hergestellt werden. Einige LHRH-Konjugate wurden intensiv in präklinischen Studien untersucht und sollen in naher Zukunft in die klinische Erprobung gehen.<sup>[16]</sup>

Das selektive Targeting maligner Zellen mit monoklonalen Antikörpern und niedermolekularen Liganden gewinnt zunehmend an Bedeutung in der Krebsbehandlung und -diagnostik. Für eine effektive therapeutische Anwendung sind dabei chemische Methoden essenziell, die den Wirkstoff in seiner bioaktiven Form in der richtigen subzellulären Umgebung freisetzen. Wir haben einige der neueren Strategien zur Verknüpfung von tumordirigierenden Molekülen und Cytostatika herausgehoben und einen Trend weg von Makromolekülen hin zu kompakteren dirigierenden Molekülen mit verbesserten Kläreigenschaften und Bioverfügbarkeiten aufgezeigt.

- [1] R. O. Dillman, *Cancer Invest.* **2001**, *19*, 833–841.
- [2] F. M. Huennekens, *Adv. Enzyme Regul.* **1997**, *37*, 77–90.
- [3] Zu den Ergebnissen einer Phase-2-Studie des cytotoxischen Immunkonjugats CMB-401 (hCTM01-Calicheamicin) in Patienten mit Platin-sensitivem wiederholt auftretendem Epithel-Gebärmutter-Carcinom, siehe: S. Y. Chan, A. N. Gordon, R. E. Coleman, J. B. Hall, M. S. Berger, M. L. Sherman, C. B. Eten, N. J. Finkler, *Cancer Immunol. Immunother.* **2003**, *52*, 243–248.

- [4] Die pH-Stabilität des Hydrazons kann durch die Wahl des Linkers gesteuert werden, wobei *para*-substituierte Acetophenon-Derivate, wie das in Abbildung 1 dargestellte, die besten Ergebnisse liefern: Sie sind stabil bei 37°C in Puffer von pH 7.4 (Simulation der Blutzirkulation) und werden bei pH 4.5 (lysosomale Bedingungen) schnell hydrolysiert. P. R. Hamann, L. M. Hinman, I. Hollander, C. F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H.-R. Tsou, J. Upešlacis, D. Shochat, A. Mountain, D. A. Flowers, I. Bernstein, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 47–58.
- [5] Struktur-Aktivitäts-Studien mit Taxanen der zweiten Generation: I. Ojima, J. C. Slater, E. Michaud, S. D. Kuduk, P.-Y. Bounaud, P. Vrignaud, M.-C. Bissery, J. Veith, P. Pera, R. J. Bernacki, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3889–3896.
- [6] a) N. F. Magri, D. G. I. Kingston, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 298–301; b) H. M. Deutsch, J. A. Glinski, M. Hernandez, R. D. Haugwitz, V. L. Narayanan, M. Suffness, L. H. Zalkow, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 788–792.
- [7] V. Guillemard, H. U. Saragovi, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 694–699.
- [8] I. Ojima, X. Geng, X. Wu, C. Qu, C. P. Borella, H. Xie, S. D. Wilhelm, B. A. Leece, L. M. Bartle, V. S. Goldmacher, R. V. J. Chari, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5620–5623.
- [9] A. Gopin, N. Pessah, M. Shamis, C. Rader, D. Shabat, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 341–346; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 327–332.
- [10] HPMA-Copolymere akkumulieren durch einen Effekt der Angiogenese, der eine erhöhte Permeabilität und Retention bewirkt, in Tumoren: H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori, *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 271–284.
- [11] R. K. Jain, *Int. J. Radiat. Biol.* **1991**, *60*, 85–100.
- [12] Eine kürzlich beschriebene Synthese von modularen Dipeptid-Mimetika: W. Maison, D. Küntzer, D. Grohs, *Synlett* **2002**, 1795–1798.
- [13] M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, *Curr. Med. Chem. Anti Cancer Agents* **2001**, *1*, 71–93.
- [14] Synthese radioaktiv markierter Peptide zur Krebsdiagnose: J. Fichna, A. Janicka, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 3–17.
- [15] E. P. Krenning, D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, W. A. Breeman, P. P. Kroonj, H. Y. Oei, M. van Hagen, P. T. Postema, M. de Jong, J. C. Reubi, *Eur. J. Nucl. Med.* **1993**, *20*, 716–725.
- [16] A. V. Schally, A. Nagy, *Life Sci.* **2003**, *72*, 2305–2320.
- [17] A. Nagy, A. Plonowski, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 829–834.