

## Wirkstoff-Ligand-Konjugate

# Verbesserte Strategien zur zielgerichteten Krebstherapie\*\*

Wolfgang Maison\* und John V. Frangioni\*

### Stichwörter:

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

Ein selektives Targeting von Tumorge-  
webe – oder jeder anderen Art von  
Gewebe im Körper – durch einen Wirk-  
stoff oder Marker erfordert eine hohe  
Stabilität dieser Substanz im Blut, aus-  
reichende Bioverfügbarkeit an der  
Wirkstelle, eine angemessene Kontakt-  
zeit mit dem Target, die effektive Auf-  
nahme durch das Zielgewebe unter Bei-  
behaltung der biologischen Aktivität  
und den zügigen Abtransport von nicht-  
gebundenem Wirkstoff. Seit etwa zwei  
Jahrzehnten sind Antikörper das Mittel  
der Wahl zur zielgerichteten Verabrei-  
chung von Kontrastmitteln und Chemo-  
therapeutika gegen Krebszellen. Anti-  
körper sind stabil im Blut, haben typi-

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

Trotz der generellen Verträglichkeit  
von Antibiotika und Chemotherapeuti-  
ka 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 Endozytose, wären daher  
wünschenswert.<sup>[2]</sup> Über ein beeindru-  
ckendes Beispiel für solche Strategien  
wurde im Zusammenhang mit dem  
Antitumor-Antibiotikum Calicheamicin  
berichtet: Durch Konjugation mit einem  
tumorspezifischen monoklonalen Anti-  
körper (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 intrazellu-  
läre Freisetzung von Calicheamicin er-  
möglicht (Abbildung 1),<sup>[4]</sup> ist das Kon-  
jugat ein potentes Tumortherapeuti-  
kum. Gemtuzumab Ozogamicin („gem-  
ozo“, Mylotarg), ein Konjugat aus ei-  
nem CD33-spezifischen mAb und Cali-  
cheamicin, das dieses Konzept der bi-

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

Eine Klasse potenter Chemothera-  
peutika mit komplexer Struktur sind die  
Taxane.<sup>[5]</sup> Über zwei neue Ansätze zur  
Verknüpfung von Taxanen mit mono-  
konalen Antikörpern, die die Cytotoxi-  
zität 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 Endozytose 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 Bedingun-  
gen über einen Methyldisulfanylalka-  
noyl(MDS)-Linker mit einem mAb,<sup>[8]</sup>  
der spezifisch für den epidermalen  
Wachstumsfaktor (EGFR) ist, ver-  
knüpft. EGFR wird bekanntermaßen  
in einigen menschlichen Plattenepithel-  
Krebsarten überexprimiert. Die Anti-  
EGFR-mAbs wurden mit N-Succinimi-  
dyl-4-(2-pyridylthio)pentanoat modifi-  
ziert und die resultierende 4-Pyridyldi-  
thiopentanoyl-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 Forschungsge-  
meinschaft und dem Fonds der Chemi-  
schen Industrie für finanzielle Unterstüt-  
zung. J.V.F. wird durch das Department of  
Energy (Office of Biological and Environ-  
mental Research), No. DE-FG02-  
01ER63188, den Clinical Scientist Deve-  
lopment Award der Doris Duke Charitable  
Foundation und von den National Insti-  
tutes 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 Bioengineer-  
ing), unterstützt.

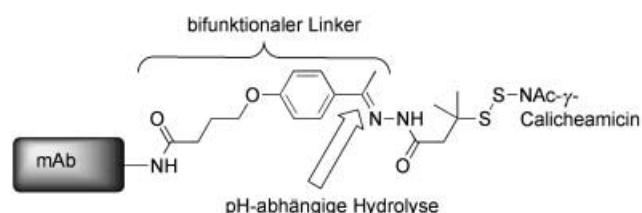
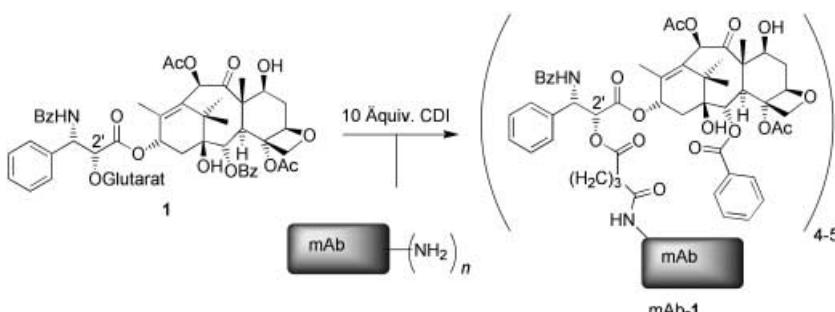


Abbildung 1. Ein pH-sensitiver bifunktionaler Linker zur Verknüpfung von Calicheamicin mit monoklonalen Antikörpern.



**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 Endozytose 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.

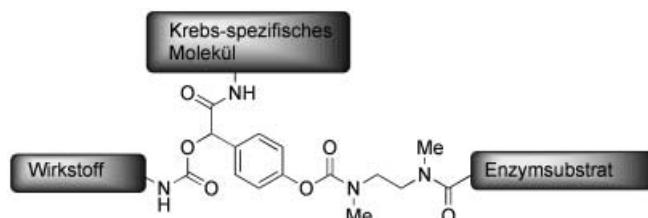
Ein sehr interessantes und universelles Linkersystem, das auf enzymatischer Aktivierung beruht, wurde kürzlich von Shabat et al. vorgestellt.<sup>[9]</sup> Kern dieses „chemischen Adapters“ ist eine 4-Hydroxymandelsäure-Einheit mit drei funktionellen Gruppen zur Verknüpfung mit einem dirigierenden krebspezifischen 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 Carbaminsäure 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 krebspezifisches Molekül, Etoposid als cytotoxisches Molekül und einem Substrat einer Retro-Aldol-Retro-Michael-Sequenz, die durch den Antikörper 38C2 als spaltendes Enzym kataly-

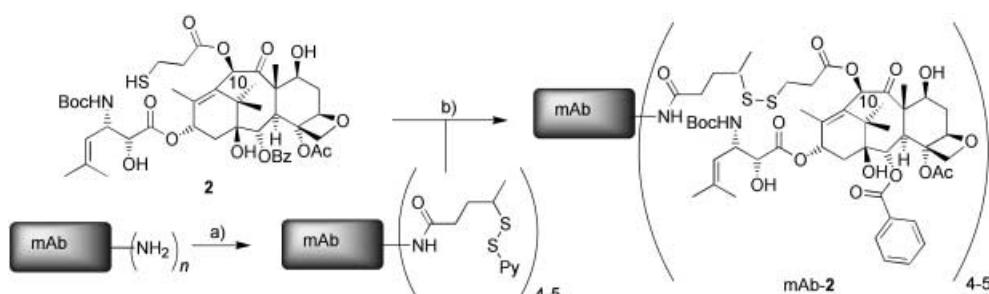
siert wird. Ein In-vivo-Test steht allerdings noch aus.

Die bislang genannten Strategien wurden zumeist auf monoklonale Antikörper angewendet, allerdings gehen deren Vorteile 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 multivalenlen 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.

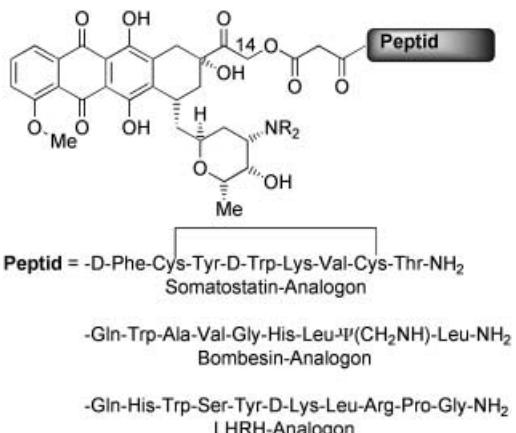


**Schema 2.** Konjugation von monoklonalen Antikörpern mit dem Taxan der zweiten Generation **2** (SB-T-110131; Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). a) *N*-Succinimidyl-4-(2-pyridyl)dithio)pentanoat, 50 mM Phosphatpuffer, 50 mM NaCl, pH 6.5, 2 mM EDTA, 90 min; b) 50 mM Phosphatpuffer, 50 mM NaCl, pH 6.5, 2 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), Neurotensin 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 Markierungsagentien,<sup>[14]</sup> und das  $^{111}\text{In}$ -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 Tumorthерапетика 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 Klärungseigenschaften 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. Upeslacs, 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. Künzter, 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. Janecka, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 3–17.

[15] E. P. Krenning, D. J. Kwekkeboom, W. H. Bakker, W. A. Breeman, P. P. Krooij, 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. 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.