

Entwicklung zielgerichteter niedermolekularer zytotoxischer Wirkstoffverbindungen mit DNA-codierten chemischen Bibliotheken

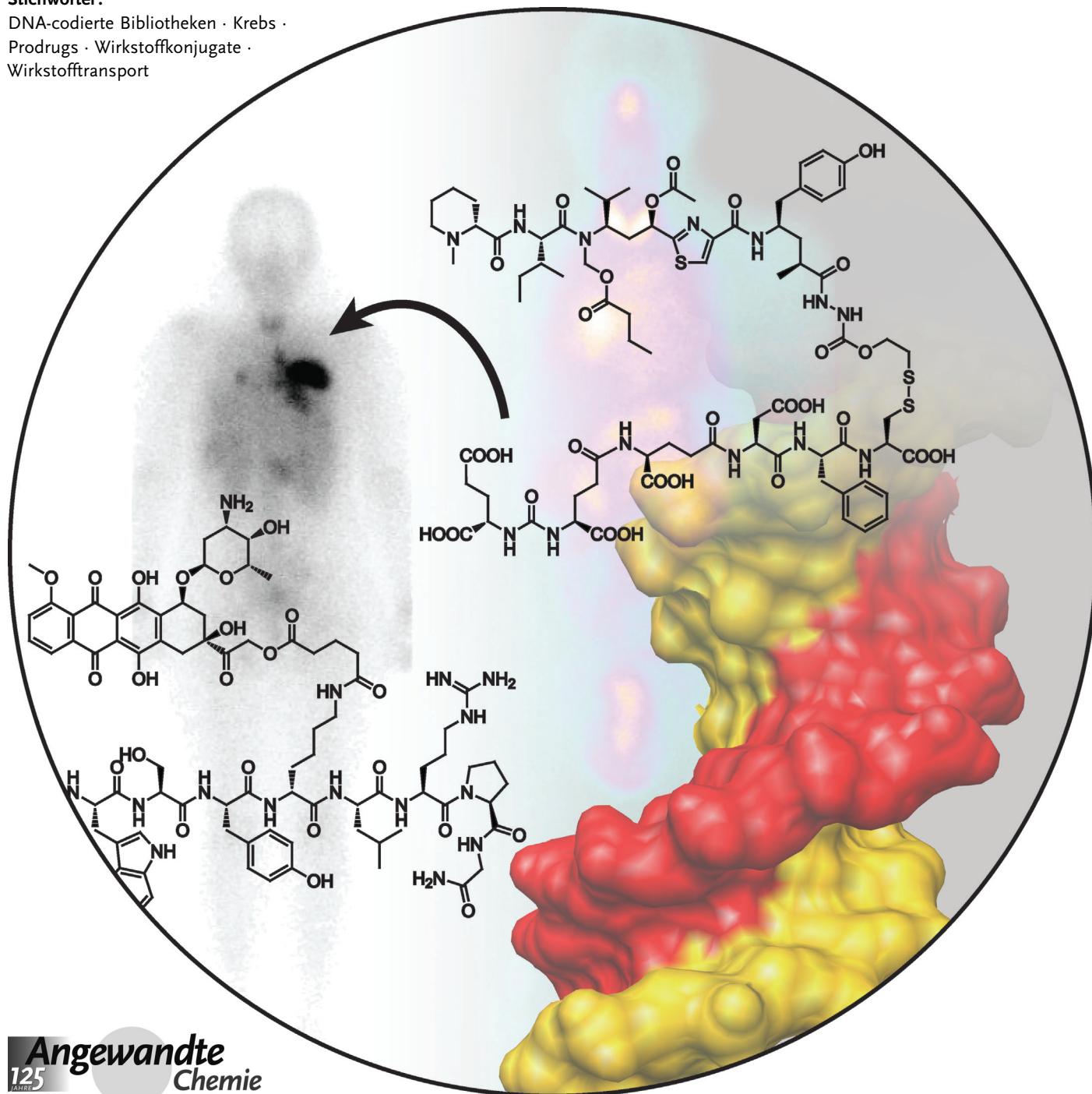
Nikolaus Krall, Jörg Scheuermann und Dario Neri*

Stichwörter:

DNA-codierte Bibliotheken · Krebs ·

Prodrugs · Wirkstoffkonjugate ·

Wirkstofftransport



Der zielgerichtete Transport von hochwirksamen zytotoxischen Substanzen in kranke Gewebe ist ein vielversprechender Ansatz zur Therapie von Krebs und anderen schweren Erkrankungen. In der Vergangenheit wurden vor allem Antikörper gegen krankheitsspezifische Marker als Trägersubstanzen eingesetzt. Seit einiger Zeit werden aber auch niedermolekulare organische Verbindungen für diese Aufgabe in Betracht gezogen. Entscheidend für die Entwicklung dieses Gebiets sind effiziente Methoden zur Identifikation hochaffiner Liganden für Proteine von pharmazeutischem Interesse. DNA-codierte Bibliothekstechnologien ermöglichen das Screening von Substanzbibliotheken enormer Größe. In diesem Aufsatz behandeln wir die Entwicklung von Wirkstofftransportsystemen auf Basis niedermolekularer Liganden und analysieren, wie innovative DNA-basierte Bibliothekstechnologien dieses Feld nachhaltig beeinflussen werden.

1. Einleitung

Zytotoxische Substanzen werden heutzutage routinemäßig zur medikamentösen Behandlung von Krebs und anderen schweren Erkrankungen wie Arthritis,^[1] Lupus^[2] und Multipler Sklerose^[3] eingesetzt. Idealerweise sollten Medikamente für diesen Einsatz nur kranke Zellen angreifen und gesundes Gewebe verschonen – in der Realität ist dies jedoch fast nie der Fall. Viele in der Krebsmedizin eingesetzte Medikamente unterbinden die Teilung rasch proliferierender Zellen und beeinflussen deshalb auch adulte, sich kontinuierlich regenerierendes Gewebe (z.B. Schleimhäute, Haarwurzeln und Knochenmark).^[4]

Ein weiteres Problem liegt in der Fähigkeit niedermolekularer Verbindungen, sich *in vivo* im erkrankten Gewebe anzulagern. Viele niedermolekulare zytotoxische Substanzen erreichen Tumorgewebe nicht oder nur in sehr geringen Dosen. Biodistributionsanalysen in Tumor-Mäusen haben z.B. gezeigt, dass nach intravenöser Verabreichung von Doxorubicin nur etwa 5–10% der Menge, die sich in gesunden Organen ablagert (normiert auf das Organgewicht), den Tumor erreichen.^[5] Ähnliche Beobachtungen wurden mit anderen Chemotherapeutika gemacht, z.B. mit ¹⁸F-markiertem 5-Fluoruracil,^[6] ³H-markiertem Paclitaxel^[7,8] und radioaktiven Pt^{II}-Derivaten (Abbildung 1 a und b).^[9]

Die Akkumulation niedermolekularer organischer Verbindungen in soliden Tumoren wird erschwert durch den hohen interstitiellen Druck im Tumorgewebe,^[10] irreguläre Vaskularisierung^[11,12] und die häufige Überexpression von Multiwirkstoffresistenz-Proteinen.^[13]

Es besteht deshalb ein großes Interesse, zielgerichtete zytotoxische Substanzen zu entwickeln, die sich selektiv im erkrankten Gewebe anlagern, gesundes Gewebe verschonen und so die mit herkömmlichen zytotoxischen Medikamenten verbundenen Probleme vermeiden.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1425
2. Natürliche niedermolekulare Trägersubstanzen und Analoga	1427
3. Validierte Targets für den Wirkstofftransport	1432
4. Identifikation von Transportliganden mit DNA-codierten Bibliotheken	1432
5. Zytotoxische Wirkstoffe und Linker	1437
6. Schlussfolgerungen und Ausblick	1438

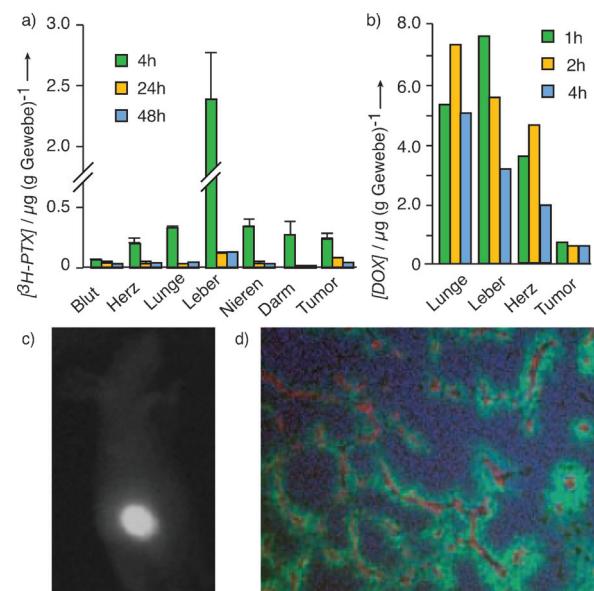


Abbildung 1. a) Gewebeverteilung von ³H-markiertem Paclitaxel (³H-PTX) in xenotransplantattragenden Mäusen.^[8] b) Gewebeverteilung von Doxorubicin (DOX) in xenotransplantattragenden Mäusen.^[5] c) Makroskopische Akkumulation eines Antikörpers gegen eine Spleiß-Isoform von Tenascin C in einem soliden Tumor. d) Fluoreszenzmarkiertes Trastuzumab (grün) wird außerhalb von Blutgefäßen (rot) im Tumor zurückgehalten. Wiedergabe mit Genehmigung der American Association of Cancer Research.^[34]

[*] N. Krall, Dr. J. Scheuermann, Prof. D. Neri

Departement für Chemie und Angewandte Biowissenschaften
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH Zürich)
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, CH-8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: neri@pharma.ethz.ch

1.1. Antikörper als Vehikel für den zielgerichteten Wirkstofftransport zytotoxischer Substanzen

Antikörper wurden schon früh als vielversprechende Trägersubstanzen für den zielgerichteten Transport von unterschiedlichen Wirkstoffen erkannt (Abbildung 2a).^[14,15] Menschliche monoklonale Antikörper können heutzutage gegen fast jedes beliebige Protein künstlich hergestellt

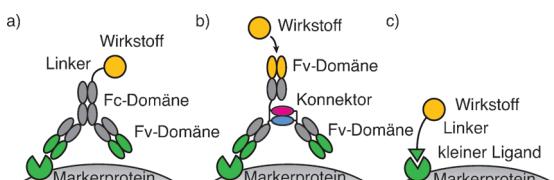


Abbildung 2. a) Direkter Transport eines Wirkstoffs (gelb) mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen ein Markerprotein (grün). b) Pretargeting mithilfe eines bispezifischen Antikörpers gegen ein Markerprotein (grün) und eines Wirkstoffs (gelb), verabreicht, nachdem der Antikörper aus gesunden Geweben ausgewaschen wurde. c) Direkter Transport eines Wirkstoffs (gelb) mit einem niedermolekularen Liganden gegen ein Markerprotein (grün).

werden^[16] und beeindruckende Akkumulationen in verschiedenen Gewebetypen erreichen, wie solide Tumoren (Abbildung 1c),^[17–21] Arthritis,^[22] Endometriose^[23] und Arteriosklerose.^[24]

Da zytotoxische Medikamente in der Regel auf Proteine innerhalb der Zelle wirken, wurde lange vermutet, dass Antikörper, welche die Fähigkeit haben, nach dem Andocken auf der Zelloberfläche in die Zelle aufgenommen zu werden und dort den Wirkstoff durch Spaltung eines labilen Linkers freizusetzen, für den zielgerichteten Wirkstofftransport am besten geeignet sind.^[14,15] Es ist neuerdings jedoch bekannt, dass Antikörper-Internalisierung nicht unbedingt für eine hohe Wirksamkeit notwendig ist. So konnte z. B. ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, spezifisch für ein extrazelluläres Matrixprotein und ausgestattet mit einem Disulfid-Linker, in einem Mausmodell einen starken Antitumor-Effekt erzielen.^[25,26]

Es ist derzeit noch nicht ausreichend geklärt, welche Antigene für die Entwicklung von therapeutischen Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten zu bevorzugen sind. Trotzdem hat die intensive Forschungsarbeit auf diesem Gebiet vor kurzem

zur Zulassung des Antikörper-Wirkstoff-Konjugats Adcetris zur Behandlung von Hodgkin-Lymphom geführt. Das Konjugat besteht aus dem CD30-spezifischen Antikörper Brentuximab und dem zytotoxischen Wirkstoff Monomethylauristatin, verbunden durch einen Protease-spaltbaren Linker.^[27–29] Mehr als 30 weitere Antikörper-Wirkstoff-Konjugate sind derzeit in den verschiedensten klinischen Entwicklungsphasen, mehrheitlich für onkologische Indikationen.^[14]

Das Konzept, Antikörper zum zielgerichteten Transport zytotoxischer Wirkstoffe in Tumorgewebe zu verwenden, ist bestechend einfach. Die praktische Implementierung birgt jedoch verschiedene Probleme: Antikörper weisen eine Reihe von Limitationen auf, was das Erreichen von Zellen innerhalb der Tumormasse betrifft. Die Stückgutkosten von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten sind außerdem sehr hoch, da für ihre Produktion hochreine Antikörper in Fermentationsprozessen sowie Wirkstoffe hergestellt und schließlich beide Komponenten in großen Mengen zu einem Konjugat zusammengefügt werden müssen.

Die Limitationen von Antikörpern als Trägersubstanzen werden im Detail in Abschnitt 1.2 besprochen. Sie sind eine starke Motivation, alternative Strategien für den zielgerichteten Wirkstofftransport zu untersuchen. Neuartige Trägersysteme sollen die erkrankten Zellen *in vivo* effizienter als Antikörper erreichen und einfacher herstellbar sein (z. B. durch organische Synthese).

1.2. Limitationen von Antikörpern als Transportsubstanzen für zytotoxische Wirkstoffe

Tumoren sind keineswegs homogene Ansammlungen identischer Zellen, und der Verlust der Expression gewisser Oberflächenantigene kommt häufig vor.^[30] Weiterhin wurde die „Antigen-Barrierefhypothese“ als größtes Hindernis einer homogenen Tumorenpenetration postuliert.^[31–33] Große Makromoleküle (z. B. Antikörper) können die Blutbahn mit nur geringer Effizienz verlassen und werden sofort von Antigenen auf perivaskulären Tumorzellen festgehalten.^[34] Dies verhindert, dass Tumorzellen in größerem Abstand vom nächsten Blutgefäß erreicht werden (Abbildung 1d).

Die Fähigkeit monoklonaler Antikörper, Tumoren gezielt zu erreichen, wurde intensiv in Mausmodellen mithilfe radioaktiv markierter Proteine untersucht. Ähnliche Studien



Nikolaus Krall schloss an der University of Cambridge mit einem M.Sc. in Chemie ab. Er ist zurzeit Doktorand in der Gruppe von Prof. Dario Neri an der ETH Zürich (Schweiz) und arbeitet an der Entwicklung zielgerichteter Wirkstofftransportsysteme auf Basis niedermolekularer Liganden für die Krebstherapie.



Jörg Scheuermann studierte Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg (Deutschland) und der ETH Zürich (Schweiz). Während seiner Doktorarbeit bei Prof. Dario Neri arbeitete er an der Identifikation neuer Liganden gegen Marker der Angiogenese. Er entwickelte später gemeinsam mit Prof. Neri DNA-Encoded Self-Assembling Chemical (ESAC) Libraries und arbeitet derzeit an seiner Habilitation im Bereich Antikörper-Wirkstoff-Konjugate und DNA-codierter chemischer Bibliotheken und deren Anwendung bei der Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe.

(z.B. mit Methoden der Nuklearmedizin oder durch die autoradiographische Analyse von Gewebeproben) werden mit einigen wenigen Ausnahmen in der Regel nicht im Rahmen der klinischen Entwicklung neuer Medikamente durchgeführt.^[35–38] Die bevorzugte Anreicherung von Antikörpern in erkranktem Gewebe zu fortgeschrittenen Zeitpunkten nach der intravenösen Verabreichung der Probe lässt einen leicht vergessen, dass die Mehrheit der verabreichten Moleküle ihr Ziel im Körper nicht erreicht. Fast alle passieren jedoch die Ausscheidungsorgane (Leber für intakte Antikörper, Nieren für kleine Antikörperfragmente).^[39] Die toxische Wirkung chemotherapeutischer Substanzen auf diese Körperteile kann deshalb einen entscheidenden Einfluss auf die erfolgreiche Entwicklung eines neuen antineoplastischen Medikaments haben (vgl. Zulassung von Oxaliplatin wegen geringerer Nephrotoxizität).^[40]

Die Verwendung kleinerer Antikörperformate als makromolekulares Transportsystem trägt nur unwesentlich zur Lösung der oben genannten pharmakokinetischen Probleme bei. Die meisten Antikörperformate extravasieren langsam. Ganze Immunglobuline können sich effizient in Tumorgewebe anreichern, weisen jedoch eine sehr lange Verweildauer in der Blutbahn auf.^[20,21,39] Kleinere Antikörperformate andererseits (z.B. scFv-Fragmente) werden schneller aus der Blutbahn ausgeschieden, erreichen dafür aber nur geringere Maximalkonzentrationen im Tumor.^[39,41]

Schlussendlich können auch vollkommen humanisierte Antikörper Unverträglichkeiten hervorrufen.^[42] Die Entwicklung einer Immunantwort auf den therapeutischen Antikörper kann dabei nicht nur Hypersensitivität im Patienten zur Folge haben, sondern auch die therapeutische Wirkung des Antikörpers unterbinden oder zumindest seine pharmakokinetischen Eigenschaften verändern.

1.3. Gewebeverteilung und Eigenschaften niedermolekularer organischer Verbindungen

Wie schon in Abschnitt 1.1 besprochen, reichern sich niedermolekulare organische Verbindungen per se nicht bevorzugt in soliden Tumormassen an. Im Unterschied zu Antikörpern können sie jedoch Blutgefäße innerhalb von Sekunden durch Diffusion verlassen. Niedermolekulare Verbindungen können auch tief in Gewebe eindringen, z.B. im Fall von Hoechst 33342, wie die Färbung von Zellkernen tief



Dario Neri studierte Chemie an der Scuola Normale Superiore di Pisa (Italien) und promovierte an der ETH Zürich (Schweiz). Nach einem Postdoktorat am Medical Research Council (Cambridge, Großbritannien) kam er 1996 als Professor zurück an die ETH Zürich. Seine Forschungsarbeit gilt Strategien für den zielgerichteten Wirkstofftransport und der Entwicklung DNA-codierter chemischer Bibliotheken. Er ist Mitbegründer von Philogen, einer schweizerisch-italienischen Biotechnologiefirma, die mehrere Antikörpermedikamente in klinischen Studien hat.

im Tumorrinnen nach intravenöser Verabreichung des Farbstoffs zeigt.^[43]

Der mögliche Nutzen niedermolekularer Wirkstofftransportsysteme lässt sich am besten am Beispiel der Pre-Targeting-Strategie illustrieren. Bispezifische Antikörper, die einerseits ein Tumorantigen, andererseits einen Metallkomplex binden, werden intravenös verabreicht und lagern sich im Tumor an. Nachdem der Großteil der Antikörper aus der Blutbahn ausgeschieden wurde, wird der (meist radioaktiv markierte) Metallkomplex injiziert (Abbildung 2b).^[44,45]

Die vergleichende Biodistributionsanalyse eines radioaktiv markierten Antikörpers, der direkt einen Tumormarker bindet, und des entsprechenden Pre-Targeting-Ansatzes hat ergeben, dass in beiden Fällen die maximale Anreicherung von Radioaktivität im Tumorgewebe ähnlich hoch ist. Im Falle des Pre-Targeting-Ansatzes wird die maximale Konzentration im Tumor (gemessen als Prozent injizierte Dosis pro Gramm Organ, % ID g⁻¹) jedoch viel schneller erreicht. So können schon eine Stunde nach intravenöser Gabe des radioaktiven Metallkomplexes Tumor-zu-Organ-Selektivitäten von > 10:1 beobachtet werden.^[44]

Diese Befunde legen nahe, dass eine neue Klasse von zielgerichteten Wirkstofftransportsystemen – bestehend aus einem niedermolekularen Liganden für krankheitsrelevante Marker, einem spaltbaren Linker sowie einer zytotoxischen Substanz (Abbildung 2c) – die Limitationen von Antikörper-Wirkstoff Konjugaten überwinden kann. Es ist zu erwarten, dass derartige Moleküle die entsprechenden Zielgewebe schnell erreichen können, nicht vom Immunsystem erkannt werden und sich vergleichsweise einfach durch Methoden der organischen Synthese herstellen lassen werden.

2. Natürliche niedermolekulare Trägersubstanzen und Analoga

Die Suche nach kleineren Trägersubstanzen mit potenziell besseren pharmakokinetischen Eigenschaften für den Einsatz in Wirkstofftransportsystemen hat sich bis jetzt vor allem auf natürlich vorkommende Moleküle wie Peptidhormone^[46–49] und Vitamine^[50,51] konzentriert. Diese Liganden weisen oft sehr hohe Affinitäten für ihre natürlichen Rezeptoren auf und werden nach Bindung an der Zelloberfläche rasch durch einen rezeptorvermittelten Endozytosemechanismus aufgenommen.^[52,53]

Bei diesem Vorgang wird der Ligand-Rezeptor-Komplex von der Zelloberfläche in ein Vesikel abgeschnürt und verschmilzt anschließend mit dem frühen Endosom (Abbildung 3). Die therapeutische Nutzlast kann zu diesem Zeitpunkt durch reduktive Spaltung einer Disulfidbrücke oder durch die Hydrolyse einer säurelabilen Gruppe, bedingt durch einen niedrigeren pH-Wert im frühen Endosom, erfolgen. Alternativ kann das Wirkstoffkonjugat in das Lysosom sortiert werden, wo die Nutzlast durch die katalytische Wirkung von Proteasen, Esterasen oder wegen des weiter gesenkten pH-Werts freigesetzt werden kann. Schließlich muss der Wirkstoff das Endosom oder Lysosom durch passive Diffusion verlassen, um seine Wirkung auf Ziele im Zytosol oder Zellkern zu entfalten.^[54,55]

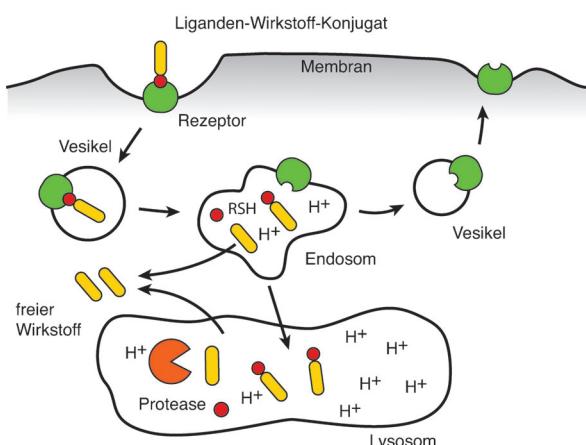


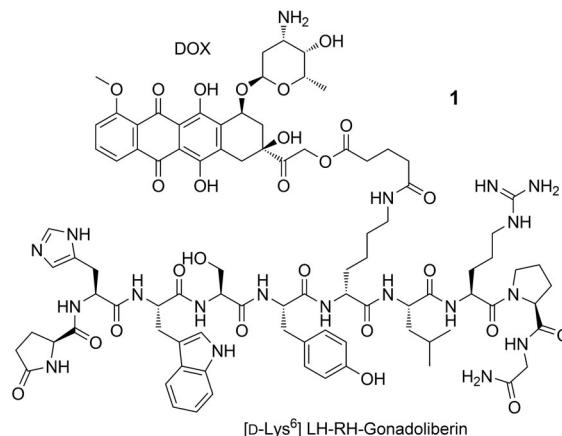
Abbildung 3. Aufnahmemechanismus und Aktivierung eines Liganden-Wirkstoff-Konjugats.

2.1. Kleine peptidbasierte Transportsysteme

Viele Rezeptoren für kleine Peptide sind auf verschiedenen Tumorzellen stark überexprimiert. Die dazugehörigen Liganden weisen in der Regel ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht als Antikörper (normalerweise zwischen 10–30 Aminosäuren) auf, sind gut wasserlöslich und wurden deshalb schon früh als Trägersysteme für den zielgerichteten Transport von Radionukliden und zytotoxischen Substanzen in Tumorgewebe vorgeschlagen.^[56,57]

Da natürliche Peptidliganden oft nur eine geringe Stabilität in der Blutbahn und sehr enge Rezeptorsubtyp-Spezifitäten aufweisen, wurden Derivate mit verbesserten Eigenschaften entwickelt. Oft kommen dabei nichtnatürliche Aminosäuren zum Einsatz.^[56] Mehrere radioaktiv markierte Peptide haben bis jetzt Eingang in die Humanmedizin gefunden und zeigen vielversprechende Eigenschaften als Tracer oder Radiotherapeutika. Sie weisen damit auf das große Potenzial dieser Ligandenklasse für den zielgerichteten Wirkstofftransport hin.^[58,59]

Bahnbrechende Arbeit auf dem Gebiet der Peptid-Wirkstoff-Konjugate wurde von Schally und Mitarbeitern geleistet. Sie zeigten, dass Derivate von Gonadoliberin für den zielgerichteten Transport der zytotoxischen Substanzen Cisplatin und [*trans*-Bis(salicylaldoximato)kupfer(II)] eingesetzt werden könnten.^[60] Später wurden Konjugate aus Somatostatin, Bombesin und Gonadoliberin als Liganden und Doxorubicin oder 2-Pyrrolinodoxorubicin als Wirkstoffe hergestellt. Meist wurden eine Lysin-Seitenkette oder die N-terminale Aminogruppe auf dem Peptid und ein primärer Alkohol auf dem Wirkstoff durch einen Glutaryl-Linker verbunden (Schema 1). In vitro bewahrten die Konjugate eine hohe Affinität für die entsprechenden Rezeptoren (Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich geschätzt mit der Cheng-Prusoff-Gleichung aus Kompetitionsexperimenten); die Zytotoxizität der Konjugate war jedoch nicht höher als jene der freien Wirkstoffe.^[61–63] In verschiedenen Mausmodellen menschlicher Tumoren hatten die Konjugate dagegen eine signifikant höhere wachstums-hemmende Wirkung und waren weniger toxisch als die un-



Schema 1. Das peptidbasierte Wirkstoffkonjugat AN-152 (1) bestehend aus [D-Lys⁶]-Gonadoliberin als Transportligand und Doxorubicin (DOX) als zytotoxische Nutzlast, verbunden über einen Glutaryl-Linker.

modifizierten Wirkstoffe.^[64–68] In Kontrollversuchen mit dem unmodifizierten Peptid wurde keine wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen, und die Wirkung des Konjugats konnte durch gleichzeitige Verabreichung eines Überschusses freien Peptids unterdrückt werden.^[64,68–70] Es kann erwartet werden, dass der Glutaryl-Linker mit einer Esterbindung zum Wirkstoff und einer Amidbindung zum Liganden vergleichsweise schwer zu spalten ist, jedoch wurden die Effizienz und der Mechanismus der Wirkstoff-Freisetzung in Tumorzellen nicht untersucht. Nichtsdestoweniger wurde kürzlich eine Phase-I-Studie zur Behandlung von Endometrium-, Ovarial-, Prostata- und Blasenkarzinom mit AN-152 (1), einem Gonadoliberin-Doxorubicin-glutaryl-ester-Konjugat, erfolgreich abgeschlossen.^[71]

Ähnliche Peptidliganden wurden auch als Konjugate mit anderen Wirkstoffen in vivo getestet. Die Gruppe von Komella beschrieb etwa ein Konjugat aus Docetaxylglutaryl-ester und Deslorelin, einem starken Gonadoliberinagonisten.^[72] Die Verbindung zum Liganden wurde in diesem Fall als Ester mit Serin hergestellt. Das Konjugat wies in vitro eine 15-mal höhere antiproliferative Wirkung gegen LNCaP und PC-3-humane Prostatakarzinomzellen ($IC_{50} = (0.29 \pm 0.03)$ bzw. (0.42 ± 0.06) nM) auf als Docetaxel ($IC_{50} = (4.47 \pm 0.93)$ bzw. (6.26 ± 1.24) nM) und zeigte eine bessere wachstumshemmende Wirkung in Mäusen mit PC-3-Tumoren als der freie Wirkstoff. Die Gruppe von Coy stellte Konjugate aus Camptothecin und Analoga von Somatostatin und Bombesin unter Verwendung von Carbamat-Linkern her.^[73,74] Im Falle von Somatosatin übten die resultierenden Moleküle in der Regel eine schwächere antiproliferative Wirkung als der freie Wirkstoff auf eine Reihe von humanen Krebszellen in vitro aus ($IC_{50} = 64.1$ nM–4.83 μM für die Konjugate gegenüber 3.10–259 nM für den freien Wirkstoff), was durch die hohe Stabilität der Linker bedingt sein könnte. Das Wachstum von Xenotransplantaten aus NCI-H69-humanen Lungentumorzellen in Nacktmäusen konnte jedoch gehemmt werden. CA20948-Bauchspeicheldrüsenkrebszellen von Ratten dagegen zeigten eine höhere Empfindlichkeit in vitro gegenüber dem Konjugat ($IC_{50} = 1.36$ –1.79 μM) als gegenüber

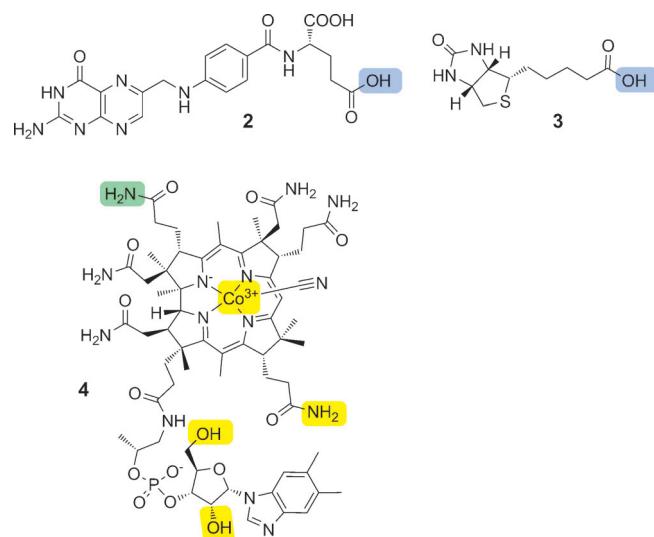
dem unmodifizierten Wirkstoff ($IC_{50} = 3.08 \mu\text{M}$). Im Fall von Bombesin zeigte das Konjugat CPT-L2-BA3 cytotoxische Wirkung gegen eine Reihe von humanen Krebszellen ($IC_{50} = 33 \text{ nM} - 2.7 \mu\text{M}$) und hemmte das Wachstum von NIH-H1299-Xenotransplantaten in Nacktmäusen.

Zusammengefasst haben Konjugate aus hoch wirksamen zytotoxischen Substanzen und Peptidliganden, die Tumormarker mit hoher Affinität binden, vielversprechende Resultate in einer Reihe von experimentellen Tumormodellen gezeigt. Konjugate mit Esterbindungen zwischen Peptid und Wirkstoff scheinen oft eine höhere Aktivität zu haben als solche mit stabileren Amid- und Carbamatbindungen. Eine systematische Analyse des für die Wirkstoff-Freisetzung verantwortlichen chemischen Mechanismus und der Fähigkeit, Peptid-Wirkstoff-Konjugate in Tumorgewebe *in vivo* tatsächlich in therapeutisch wirksamen Mengen zu erreichen, wurde bis jetzt jedoch noch nicht durchgeführt.

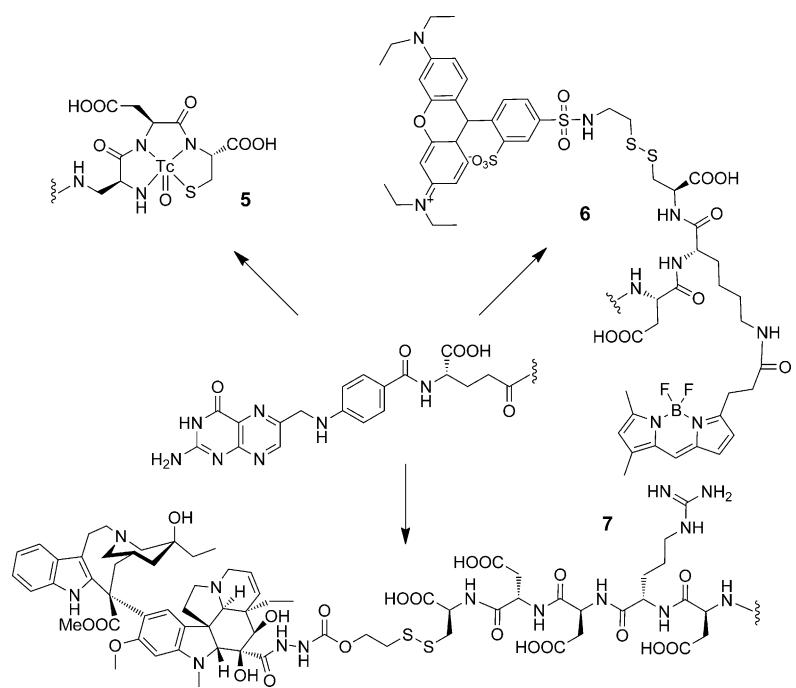
2.2. Vitaminbasierte Wirkstofftransportsysteme

Viele Tumoren haben wegen ihrer kurzen Zellteilungszyklen einen erhöhten Bedarf an Vitaminen wie Folsäure (**2**), Biotin (**3**) und Cobalamin (**4**; Schema 2), die für Biosynthese und Nahrungsmittel-Metabolismus notwendig sind.^[75] Die aktiven Transporter zur Aufnahme dieser Nährstoffe sind deshalb auf Tumorzelloberflächen oft überexprimiert und wurden für den zielgerichteten Transport verschiedener Wirkstoffe eingesetzt.^[50,54,55,76]

Am meisten Beachtung für den zielgerichteten Wirkstofftransport hat bis jetzt das System aus Folsäure (**2**) und dem Folsäurerzeptor (FR) erhalten. Folsäurekonjugate haben in der Regel hohe Bindungsaffinitäten für den FR ($K_D = 1-10 \text{ nM}$), der in vielen bösartigen Tumoren stark überexprimiert ist (z.B. bis zu 80 pmol (mg Membranproteine) $^{-1}$ in KB-Zellen^[78]) und Konjugate mit großer Geschwindigkeit in die Zelle aufnehmen kann (z.B. mit einer Geschwindigkeit von bis zu 3.4×10^5 Moleküle Zelle $^{-1}$ h $^{-1}$ in KB-Zellen^[79]). Liganden für radioaktive Metalle (z.B. **5**) und verschiedene Fluorophore (z.B. **6**) wurden mit **2** konjugiert, und ihre Ausbreitung in Modellorganismen wurde mithilfe verschiedener bildgebender Verfahren untersucht (Schema 3). Das folsäuregebundene Peptidgift Pseudomonas-Exotoxin PE38 (Zytotoxizität von bis zu $IC_{50} = 20 \text{ pm}$ im Falle des Disulfidkonjugats in FDHeLa-Zellen)^[87] und Konjugate mit den Naturproduktgiften Camptothecin ($IC_{50} = 10 \text{ nM}$ in KB-Zellen),^[88] Desacetylvinblastin ($IC_{50} = 11 \text{ nM}$ in KB-Zellen),^[89-91] dem Maytansinoid DM1 ($IC_{50} = 16 \text{ nM}$ in KB-Zellen),^[78] Tubulysin A und B ($IC_{50} = 7 \text{ nM}$ in KB-Zellen)^[92,93] und Mitomycin C ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$ in KB-Zellen)^[94,95] wurden als zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme untersucht. Auch mit **2** ummantelte liposomale Wirkstoffträ-



Schema 2. Geeignete Vitamine für zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme. Die funktionellen Gruppen auf Folsäure (**2**) und Biotin (**3**), die für die Konjugation mit Nutzlasten geeignet sind, wurden blau unterlegt.^[50,51,55] Nutzlasten, die an die gelb unterlegten Gruppen auf Cobalamin (**4**) gekuppelt sind, ermöglichen dem Konjugat, alle physiologisch relevanten Cobalamin-Transportproteine zu binden. Konjugation durch die grün unterlegten Gruppen ermöglicht die Herstellung Transcobalamin-I-spezifischer Konstrukte.^[76]



Schema 3. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertes Folsäurekonjugat EC20 (**5**)^[86] und Disulfid-FRET-Sonde **6**^[77] für mikroskopische Studien, Desacetylvinblastinhydrazid-Folsäure-Konjugat EC145 (**7**)^[89,91] für den zielgerichteten Wirkstofftransport in Folsäurerzeptor-exprimierende Tumoren.

ger^[96-98] und Immuntherapieansätze auf Basis folsäuregebundener Haptene wurden beschrieben.^[99] In diesem Fall konnte das Immunsystem eines Versuchstiers, das zuvor mit

Fluorescein immunisiert wurde, Tumorzellen angreifen, die Fluorescein-Folsäure-Konjugate gebunden hatten. Kürzlich wurde auch über duale Wirkstoffkonjugate aus **2**, Mitomycin C und Desacetylvinblastin berichtet.^[100] Infolge dieser intensiven Forschungsaktivitäten werden derzeit drei Folsäure-Wirkstoff-Konjugate und ein auf **2** basierendes Kontrastmittel in klinischen Studien untersucht.^[101,102] EC145 (**7**; IC₅₀ = 11 nm in KB-Zellen) wird derzeit in einer Phase-III-Studie an Patienten mit Ovarialkarzinom getestet (Schema 3). Die oben beschriebenen Moleküle wurden in einer Reihe exzellenter Übersichtsartikel näher behandelt.^[50,55,103] Wir werden uns deshalb in diesem Aufsatz auf die für unsere Diskussion relevantesten Ergebnisse konzentrieren.

Auf **2** basierende Radiopharmazeutika reichern sich nach intravenöser Gabe rasch in Tumoren an und werden schnell aus FR-negativen Geweben ausgewaschen. ¹¹¹Indium-Diethylentriaminpentaessigsäure(DTPA)-Folsäure wird in FR-abhängiger Weise von Tumorzellen in vitro aufgenommen und erreicht in xenotransplantattragenden Nacktmäusen nach intravenöser Gabe bereits nach 30 Minuten die maximale Tumorkonzentration.^[83] Absolute Anreicherungen im Tumor waren hoch (bis zu 10% ID g⁻¹) und stabil über 24 Stunden. Die Verbindung wurde in weniger als einer Stunde aus FR-negativen Geweben ausgeschieden, mit Ausnahme von Nieren und Blase, die über längere Zeit hinweg radioaktiv blieben. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Nieren einerseits die wichtigste Exkretionsroute für niedermolekulare Verbindungen sind, andererseits aber auch FR exprimieren und dadurch aktiv Folsäurekonjugate aufnehmen können.^[104] Es ist nicht bekannt, ob die Radiomarkierungsmethode die Aufnahme von Radioaktivität in den Nieren beeinflusst. Ähnliche Resultate wurden jedoch auch mit ^{99m}Tc-markierten Folsäurekonjugaten erzielt.^[81,84]

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Folsäurekonjugate war entscheidend für den experimentellen Nachweis, dass diese Klasse kleiner Wirkstofftransportsysteme Blutgefäße effizient verlassen kann. Ein Folsäure-Rhodamin-Konjugat wurde in vivo mithilfe von Multiphotonen-Mikroskopie untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Konstrukt rasch aus der Blutbahn in das umliegende Gewebe diffundieren und FR im Tumor innerhalb von nur 5 Minuten nach intravenöser Administration absättigen konnte. Nach periorbitaler oder intraperitonealer Verabreichung stieg diese Zeit auf < 30 bzw. < 100 Minuten. In derselben Studie wurde gezeigt, dass eine „Binding-Site-Barriere“ (siehe auch Abschnitt 1.3) zwar vorhanden, aber für die absolute Aufnahme des Moleküls im Tumor zumindest bei Sättigungskonzentrationen (300 nmol kg⁻¹) vernachlässigbar war.^[105] Diese Befunde verdeutlichen, dass niedermolekulare organische Verbindungen die Transportsysteme der Wahl sind, wenn rasche Akkumulation des Konjugats in erkranktem und schnelle Ausscheidung aus gesundem Gewebe erwünscht sind.

Die Entdeckung, dass aktivierte Makrophagen Folsäure (**2**) in einer FR-abhängigen Weise aufnehmen können,^[106] hat die Möglichkeit eröffnet, Entzündungsherde mit bildgebenden Verfahren darzustellen^[107] und möglicherweise Wirkstofftransportsysteme für die Behandlung für Arthritis, Schuppenflechte, Morbus Crohn, Arteriosklerose und anderen Krankheiten zu entwickeln, bei denen aktivierte Makro-

phagen eine wichtige Rolle spielen.^[108] Ähnliche Resultate waren zuvor für die Aufnahme von Biotin (**3**) in Infektionsherde berichtet worden.^[109]

Bei ersten Tierversuchen konnte eine vielversprechende Wirkung der Fluorescein-basierten Hapten-Immuntherapie gegen Arthritis festgestellt werden.^[110] In späterer Folge wurde ein Folsäure-Aminopterin-Konjugat beschrieben, das hohe Aktivität gegen adjuvansinduzierte Arthritis in Ratten aufwies.^[111] Ein Didemnin-B-Folsäure-Konjugat zeigte starke zytotoxische Wirkung und einen anti-TNF α -Effekt in RAW264.7-Makrophagen.^[112]

Erste Hinweise auf die Bedeutung der chemischen Natur des Linkers zwischen Folsäure und Wirkstoff kamen von Untersuchungen mit dem Folsäure-Pseudomonas-Exotoxin-PE38-Konjugat.^[87] Unter Verwendung einer spaltbaren Disulfidbrücke zeigte das Konstrukt eine um vier Größenordnungen stärkere zytotoxische Wirkung als unter Verwendung eines Thioesters als Linker. Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Folsäurekonjugaten wurde daraufhin direkt unter Verwendung einer Folsäure-FRET-Sonde **6** untersucht (FRET = Förster-Energietransfer).^[77] Es konnte gezeigt werden, dass die Sonde das Lysosom nie erreichte. Vielmehr konnte eine Reduktion der Disulfidbrücke schon im frühen Endosom beobachtet werden, wobei der Folsäure-FR-Komplex sofort wieder zur Zelloberfläche zurück sortiert wurde. Fluoreszenzbasierte pH-Messungen zeigten weiter, dass das Endosom nicht sauer genug war, um säurelabile Linker zu spalten.^[113] Der Vergleich zweier Folsäure-Desacetylvinblastin-Konjugate, die entweder über einen selbstauflösenden Disulfid-Linker oder einen säurelabilen Hydrazon-Linker miteinander verbunden waren, untermauerte diese Beobachtungen weiter.^[91] Während das disulfidbasierte Konjugat eine bemerkenswerte Aktivität hatte, hemmte das hydrazonbasierte Konjugat das Tumorwachstum nur schwach. In einem ähnlichen Versuch zeigte ein mit einer säurelabilen Esterbindung ausgestattetes Folsäure-Taxol-Konjugat eine schwächere Wirkung als der freie Wirkstoff.^[114]

Außer Folsäure wurde auch Cobalamin (**4**; Vitamin B₁₂), essenziell für die Biosynthese von Thymidin, als Ligand für den zielgerichteten Wirkstofftransport von zytotoxischen Substanzen in solide Tumoren untersucht.^[76] Zunächst wurden Experimente mit ⁵⁷Co-Vitamin B₁₂ als Radiotracer in murinen Krebsmodellen durchgeführt. Die klinische Entwicklung wurde jedoch wegen hoher Aufnahme in die Leber, die Bauchspeicheldrüse und die Nieren nicht weiter verfolgt.^[115] Später wurden Cobalaminkonjugate mit Chelatoren für radioaktive Metalle wie ^{99m}Tc und ¹¹¹In, die sich aufgrund geringerer Halbwertszeiten besser für den Einsatz im Menschen eignen würden, sowie Konjugate mit Cisplatin und einer säurelabilen Verbindung mit Colchicin hergestellt.^[116-119] Bei all diesen Ansätzen wurde Cobalamin (**4**) an funktionellen Gruppen modifiziert, die es dem Konjugat prinzipiell ermöglichen, alle physiologisch wichtigen Cobalamin-Transporter, nämlich Transcobalamin I (TCI, Haptocorrin), Intrinsischen Faktor (IF) und Transcobalamin II (TCII), zu binden. Erst später wurde erkannt, dass TCII und der TCII-Rezeptor für die Aufnahme von **4** in gesunde Gewebe verantwortlich waren, während TCI in vielen Tumoren überexprimiert war. Es wurden daher Cobalaminkonjugate herge-

stellt, die TCII nicht binden, jedoch eine hohe Affinität für TCI aufweisen. Diese Moleküle erreichten eine stark verbesserte Tumoranreicherung und eine geringere Aufnahme in gesunde Organe.^[120]

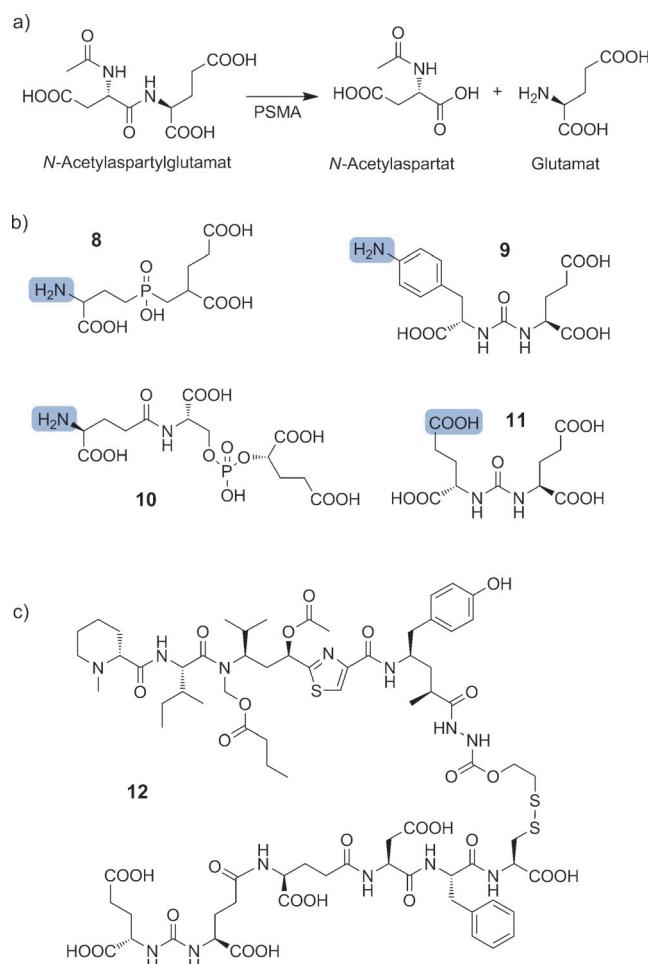
Ähnlich wie im Fall von Folsäure (**2**) und Vitamin B₁₂ (**4**) wurde kürzlich gezeigt, dass der Biotinrezeptor auf der Oberfläche verschiedener Krebszellen überexprimiert ist.^[75] Die Gruppe um Ojima beschrieb mehrere Konjugate aus Biotin (**3**) und Fluorescein, Cumarin, einem Taxoid-Fluorescein-Derivat und dem verbesserten Taxoid SB-T-1214.^[51] L1219FR-Zellen nahmen Biotin-Fluorescein-Konjugate effizient auf. Weiterhin konnte durch Aktivierung unterdrückter Fluoreszenz von Cumarin gezeigt werden, dass selbstauflösende Disulfid-Linker nach Aufnahme des Konjugats gespalten werden. Ein Biotin-Linker-Taxoid-Fluorescein-Konjugat wurde nach Aufnahme in die Zelle aktiviert, was als Grünfärbung der Mikrotubuli beobachtet werden konnte. Während das freie Taxoid eine niedrige nanomolare Zytotoxizität ($IC_{50} = 9.5\text{--}10.7\text{ nm}$) gegenüber Biotinrezeptor-positiven und -negativen Zellen aufwies, tötete das Konjugat selektiv Biotinrezeptor-positive Zellen mit einer dem freien Zytostatikum vergleichbaren Wirksamkeit ($IC_{50} = 8.8\text{ nm}$).

2.3. Substratanaloga

Prostataspezifisches Membranantigen (PSMA, auch bekannt als Glutamat-Carboxypeptidase II) ist ein bekannter Marker für Prostatakrebs und wurde auch in der Neovaskularisation einer Vielzahl solider Tumoren nachgewiesen.^[121,122] In einer Studie wurden PSMA-Konzentrationen von 292 bis 4.196 ng (mg Protein)⁻¹ auf der Zelloberfläche von fünf humanen Prostatakrebs-Biopsien gemessen.^[123] Ähnliche Niveaus wurden jedoch auch in gesundem Prostatagewebe nachgewiesen. Analoga von *N*-Acetylaspartylglutamat **8**–**11**, dem natürlichen Substrat von PSMA (Schema 4), sind Inhibitoren des Enzyms und wurden als Liganden für bildgebende Verfahren,^[124,125] den zielgerichteten Transport zytotoxischer Substanzen^[52,53,126,127] und für haptenbasierte Immuntherapie verwendet.^[128]

Das erste gegen PSMA gerichtete Ligand-Wirkstoff-Konjugat, bestehend aus einem harnstoffbasierten PSMA-Inhibitor, einem Glutaryl-Linker und Doxorubicin, wurde von Kozikowski und Mitarbeitern beschrieben.^[53] Das Molekül konnte die Bindung von radioaktiven Kompetitoren an PSMA verhindern. In vitro war die Zytotoxizität jedoch wesentlich geringer als jene von Doxorubicin (bei einer Konzentration von 5 μM wurde die Teilung von C4-2-Zellen nur zu 30% gehemmt). Dies könnte auf die hohe Stabilität des Linkers zurückzuführen sein.

Hochwirksame, gegen PSMA gerichtete Wirkstofftransportssysteme wurden seither von der Gruppe um Low beschrieben.^[52,126] Unter Verwendung von 2-[3-(1,3-Dicarboxypropyl)ureido]pentansäure (**11**, DUPA; $K_i = 8\text{ nm}$ gegen das isolierte Enzym^[52]) als Ligand wurde ein Konjugat mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) hergestellt, das LNCaP-Zellen binden und von einem anderen PSMA-Liganden verdrängt werden konnte. Entsprechende Resultate wurden mit DUPA-Rhodamin B in Aufnahmestudien erzielt.^[52] DUPA-



Schema 4. a) PSMA-katalysierte Spaltung von *N*-Acetylaspartylglutamat (NAAG) in *N*-Acetylaspartat und Glutamat.^[124] b) NAAG-Analoga als PSMA-Inhibitoren **8**–**11**; die Liganden werden für den zielgerichteten Transport von Wirkstoffen in solide Tumoren eingesetzt.^[52,53,124–128] Gruppen, welche die Kupplung an Wirkstoffe ermöglichen, sind blau unterlegt. c) Ein Konjugat des PSMA-Inhibitors DUPA (**12**) mit Tubulysin B, verbunden durch einen Peptid-Linker und einen selbstauflösenden Disulfid-Linker.^[52,126]

^{99m}Tc wurde als Radiotracer ($K_D = 14\text{ nm}$ gegen LNCaP-Zellen in vitro) untersucht. Die Substanz erzielte eine gute Anreicherung im Tumor (11.2% ID g⁻¹) und reicherte sich auch stark in den Nieren an (28.9% ID g⁻¹), was jedoch teilweise durch die Expression von PSMA in Mäusenieren erklärt werden kann.^[52] Schließlich konnte ein Konjugat aus Tubulysin B, einem selbstauflösenden Linker und DUPA (**11**) als Ligand **12** die Aufnahme von [³H]-Thymidin in LNCaP-Zellen in vitro wirksam blockieren ($IC_{50} = 3\text{ nm}$), und es wurde eine nachhaltige Schrumpfung der Tumormasse von LNCaP-Xenotransplantaten in Nacktmäusen ohne nennenswerte systemische Toxizität beobachtet.^[52] DUPA-Wirkstoff-Konjugate mit Desacetylvinblastin ($IC_{50} = 31\text{ nm}$), Camptothecin ($IC_{50} = 115\text{ nm}$), Verrucarin A ($IC_{50} > 1\text{ }\mu\text{M}$), Tubulysin H I, II und III ($IC_{50} = 5\text{--}24\text{ nm}$) und Didemnin B ($IC_{50} = 107\text{ nm}$) wurden untersucht und zeigten zum Teil hohe Zytotoxizitäten gegen LNCaP-Zellen.^[126] Ein therapeutischer Ansatz von Schultz und Mitarbeitern, der mit dem zielgerichteten

richteten Wirkstofftransport verwandt ist, soll hier ebenfalls erwähnt werden: Der PSMA-Ligand **11** wurde kovalent an die stark immunogene 2,4-Dinitrophenyl(DNP)-Gruppe gebunden. Das Konjugat wurde in immuninsuffiziente SCID-Mäuse injiziert, denen zuvor LNCaP-Tumoren implantiert worden waren, gefolgt von anti-DNP-Serum aus immunkompetenten Mäusen; dabei zeigte es Aktivität gegen das Tumorentransplantat in Abhängigkeit von NK-Zellen.^[128]

3. Validierte Targets für den Wirkstofftransport

Ursprünglich basierten zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme meist auf spezifischen Bindern (in der Regel Antikörper) gegen Antigene, die selektiv auf erkrankten Zellen vorhanden und für den Binder zugänglich sind.^[129] Im Falle von Wirkstofftransportsystemen zur Behandlung von Tumorerkrankungen würde man typischerweise Antikörper gegen den extrazellulären Teil eines Membranproteins herstellen, das auf den Tumorzellen relativ zu normalem Gewebe überexprimiert ist. Neuerdings werden aber auch Teile der extrazellulären Matrix^[130,131] oder Marker für Angiogenese als Ziele für Wirkstofftransportsysteme in Betracht gezogen.^[132,133]

Der ligandenbasierte Wirkstofftransport in Tumoren wird oft erschwert durch spontanen Verlust der Antigenexpression^[30] und durch die Distanz zwischen Tumorzellen und dem nächstgelegenen Blutgefäß.^[34] Dagegen können Tumormarker in der Neovaskulatur und in der subendothelialen extrazellulären Matrix besser erreichbar, stärker exprimiert und genetisch stabiler sein, was wiederum einen effizienteren Wirkstofftransport und eine längere Verweildauer des Liganden auf der Zielzelle ermöglicht.^[18]

Auf dem Gebiet der Krebstherapie wurde eine Reihe von tumorassoziierten Enzymen mit tiefen Bindungstaschen für niedermolekulare organische Verbindungen beschrieben und als Ziele für Wirkstofftransportanwendungen mithilfe monoklonaler Antikörper validiert. Diese umfassen Carboanhydrase IX (ein Marker für Hypoxie, der auch in vielen Formen von Nierentumoren als Resultat von Mutationen im Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor überexprimiert ist),^[134,135] plazentale alkalische Phosphatase (ein exzenterer Marker für das Ovarialkarzinom),^[136] Matrix-Metalloproteinase-3^[137,138] und PSMA im Prostatakarzinom, um nur eine Auswahl aufzuzählen.^[121,122]

Validierte Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR und HER2/neu^[139] haben ihre katalytischen Domänen im Inneren der Zelle und sind deshalb weniger geeignet für Wirkstofftransportsysteme, die auf kleinen organischen Liganden basieren. Es wurde jedoch kürzlich ein Peptidmimetikum beschrieben, das eine Affinität mit submikromolarer Dissoziationskonstante für die extrazelluläre Domäne von HER2/neu aufweist.^[140] Die Identifikation von kleinen organischen Liganden, die spezifisch gegen Protein-Protein-Interaktionen gerichtet sind, ist dagegen ungleich schwieriger und ist angewiesen auf innovative Ansätze für das Design und Screening chemischer Bibliotheken.^[141]

Es sollte hier noch erwähnt werden, dass im Prinzip auch die selektive Expression bestimmter Enzyme (z.B. mit hy-

drolytischer Aktivität) zur gewebsspezifischen Aktivierung von Prodrugs in ihre zytotoxische Form eingesetzt werden kann. Diese Strategie ist sehr elegant und hat unserer Meinung nach ein großes Potenzial für die Entwicklung von selektiven Medikamenten. Dieses Gebiet liegt jedoch außerhalb des Fokus dieses Aufsatzes, wurde aber kürzlich detailliert behandelt.^[142]

4. Identifikation von Transportliganden mit DNA-codierten Bibliotheken

Die Fähigkeit, spezifische niedermolekulare organische Liganden für Markerproteine diverser Krankheiten (z.B. tumorspezifische Antigene) zu identifizieren, ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung einer neuen Klasse kleiner zielgerichteter Wirkstofftransportsysteme.

Der Entwicklungsprozess niedermolekularer organischer Verbindungen für pharmazeutische Anwendungen beginnt heutzutage oft mit Hochdurchsatz-Screenings großer Molekülbibliotheken (bis zu 1×10^6 Moleküle), gefolgt von medizinalchemischer Optimierung. Diese Herangehensweise ist sehr zeitintensiv und teuer und erfordert großen logistischen und verwaltungstechnischen Aufwand. Zudem ist es oft nicht möglich, Hits mit ausreichender Affinität besonders für „komplexe“ Targets wie Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren.^[143,144] Als Alternative dazu stehen Methoden des computergestützten Moleküldesigns sowie virtuelle Screening-Ansätze zur Verfügung.^[145]

Im Unterschied zu diesen Technologien stehen Selektionsmethoden (z.B. Antikörper-Phagen-Display), welche die Identifikation spezifischer Binder (z.B. Antikörper) gegen verschiedene Target-Klassen in relativ einfachen In-vitro-Verfahren ermöglichen. Von zentraler Bedeutung für diesen Ansatz ist eine stabile Verbindung zwischen dem potenziellen Binder („Phänotyp“) und der entsprechenden, meist in DNA codierten Identität des Moleküls („Genotyp“). Nach Inkubation einer Bibliothek mit immobilisiertem Antigen („Panning“) werden nicht bindende Moleküle weggeschwemmt und danach spezifische Binder eluiert. Die gebundene genetische Information wird durch Polymerasekettenreaktion (PCR) verstärkt und sequenziert, wodurch die Identität des Binders festgestellt werden kann.^[16] Der Vorteil solcher Ansätze wird durch die weitverbreitete Verwendung von Phagen-Display und ähnlichen Display-Methoden veranschaulicht.^[146,147]

In diesem Abschnitt wollen wir Methoden behandeln, die auf dem Prinzip einer stabilen Genotyp-Phänotyp-Verbindung basieren und für die Identifikation niedermolekularer Liganden, im Speziellen kurzer Peptide und nicht peptidischer niedermolekularer organischer Verbindungen, genutzt werden können. Da DNA in allen der folgenden Ansätzen als Träger der Identitätsinformation für Liganden fungiert, können diese Methoden als DNA-codierte chemische Bibliothekstechnologien zusammengefasst werden. Wir glauben, dass diese Methoden großes Potenzial zur Identifikation von Liganden für den zielgerichteten Wirkstofftransport haben. Zum einen benötigen sie keine teure Infrastruktur, die für ein Hochdurchsatz-Screening notwendig ist, und ermöglichen daher auch akademischen Institutionen und kleineren

Firmen, in diesem Feld zu arbeiten. Zweitens haben Liganden, die aus DNA-codierten Bibliotheken isoliert wurden, schon eine definierte Konjugationsstelle, die für den Wirkstofftransport unerlässlich ist.

Mit einigen DNA-codierten Bibliothekstechnologien wurden bereits Liganden ($M = 500\text{--}2000 \text{ g mol}^{-1}$) entdeckt, die sich selektiv *in vivo* in Tumoren anreichern können. Andere sind unserer Meinung nach äußerst vielversprechend, ein definitiver Nachweis ihrer Eignung muss aber noch erbracht werden.

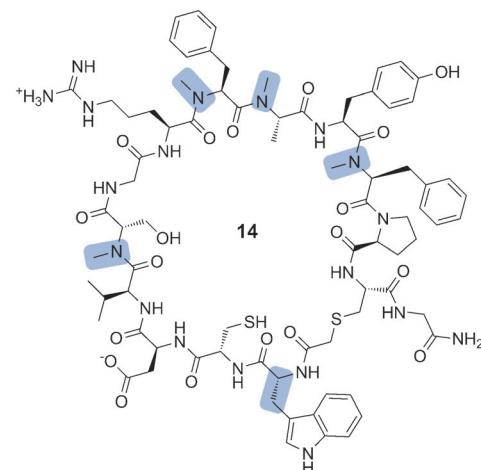
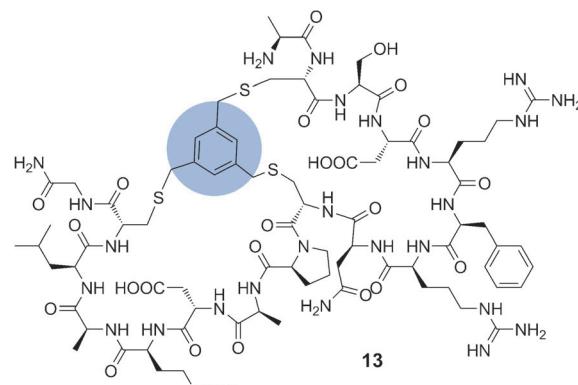
4.1. DNA-codierte Peptidbibliotheken

Die Verwendung von Phagen-Display für die Konstruktion von linearen Peptidbibliotheken ist weit verbreitet. Filamentöse Bakteriophagen (z. B. M13) können genetisch so verändert werden, dass sie fremde Aminosäuresequenzen als Fusion mit gewissen Hüllproteinen exprimieren, ohne dabei ihre Infektivität und Fortpflanzungsfähigkeit zu verlieren, wodurch eine stabile Genotyp-Phänotyp-Verbindung hergestellt wird.^[146,148] Diese Methode wurde für die Identifikation einer Reihe kleiner linearer Peptidliganden für verschiedene Tumormarker angewendet und kürzlich in einem Übersichtsartikel behandelt.^[149,150] Zwar hat dieser Ansatz oft Erfolg *in vitro* gezeigt, jedoch konnten nur wenige Peptide adäquate Tumoranreicherungen *in vivo* erzielen. Wenn quantitative Biodistributionen durchgeführt wurden, war die gemessene Akkumulation im Tumor sehr gering, und große Mengen des Peptids lagerten sich in Leber^[151] und Nieren an.^[149,152]

Nichtsdestoweniger wurden Peptide, die ursprünglich aus Phagen-Display-Bibliotheken stammen, für die Entwicklung von Wirkstoffkonjugaten verwendet und *in vivo* getestet. Ein Konjugat aus dem Integrin-bindenden Peptid RGD-4C und Doxorubicin wies eine geringere Toxizität und stärkere wachstumshemmende Wirkung auf als Doxorubicin in einem murinen Krebsmodell.^[153] Ein Konjugat eines EphA2-bindenden Peptids mit Paclitaxel unter Verwendung eines Ester-Linkers hatte in einer kürzlich erschienenen Studie eine stärkere Antitumorwirkung in Mäusen als das unmodifizierte Paclitaxel.^[154]

Andere Peptide zeigten gute Eigenschaften als Bestandteile von Tracern, was einen möglichen Einsatz als Liganden für Wirkstofftransportsysteme nahelegt. Das RMS-II-Peptid färbte z. B. selektiv die Lymph- und Blutgefäße in Rhabdomyosarkoma.^[155] Ein Peptid mit Bindungsaffinität für Hepsin, einen Marker für Prostatakrebs, konnte zusammen mit Farbstoffen für die Infrarot-Fluoreszenztomographie zur Darstellung von LNCaP-Tumoren in Mäusen eingesetzt werden.^[156] Das ^{64}Cu -1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure(DOTA)-Derivat des Peptids AE105 erreichte gute ($8.1\% \text{ ID g}^{-1}$) Anreicherungen in U87 MG Glioblastoma multiforme in Nagern.^[157,158]

Eine hohe Anreicherung in den Nieren und der Leber kann die *In-vivo*-Leistung von peptidbasierten Wirkstofftransportsystemen stark beeinträchtigen. Trotzdem zeigt die Erfahrung mit Analoga von Somatostatin und anderen Peptiden, dass eine effiziente und selektive Aufnahme des Konjugats in den Tumor möglich ist, sofern das entsprechende



Schema 5. Beispiele von Molekülen, die aus DNA-codierten Peptidbibliotheken isoliert wurden. Inhibitor des humanen Plasma-Kallikrein **13**^[164] und Akt2-Inhibitor **14**.^[175] Nichtnatürliche Strukturelemente sind blau hinterlegt.

Target-Protein zugänglich und in großen Mengen exprimiert ist sowie Liganden mit hoher Affinität zur Verfügung stehen.^[56] Der Fokus der Forschung liegt deshalb zunehmend auf konformativ eingeschränkten Peptiden (z. B. cyclischen Peptiden), die einen geringeren Entropieverlust bei der Bindung an einen Rezeptor in Kauf nehmen müssen. Phagen-Display von Peptiden, die durch Disulfidbrücken cyclisiert wurden,^[159–161] ermöglichte z. B. die Identifikation neuer RGD-Liganden für verschiedene Integrine^[162] oder eines Peptids, das sich selektiv in Lymphgefäßen anlagert.^[163] Winter, Heinis et al. entwickelten einen Ansatz, bei dem lineare Peptide, die Cys-Reste enthalten, mit einem reaktiven, trivalenten chemischen Gerüst cyclisiert werden (Abbildung 4a).^[164] Diese Methode ermöglichte es ihnen, hoch wirksame und spezifische Inhibitoren der humanen Plasmaform von Kallikrein, **13** (Schema 5; $K_i = 1.5 \text{ nM}$),^[164] und einen Inhibitor des urokinaseartigen Plasminogenaktivators (uPA; $K_i = 53 \text{ nM}$),^[165] einer Serin-Protease, die mit Tumorwachstum und Invasion in Verbindung gebracht wird, zu identifizieren. Kürzlich wurde auch ein verbesserter Kallikrein-Inhibitor ($K_i = 0.3 \text{ nM}$) beschrieben.^[166]

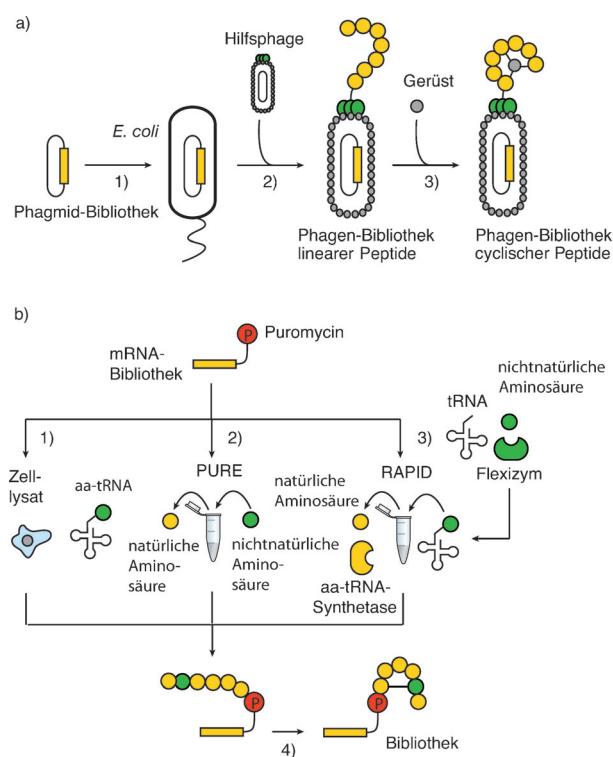


Abbildung 4. a) Konstruktion von Phagen-Display-Bibliotheken linearer und cyclischer Peptide in Bakterien.^[146,148,164] 1) Phagemid-Bibliotheken werden mit PCR zusammengestellt und in *E. coli* transfiziert. 2) Superinfektion mit einem Hilfsphagen ermöglicht die Expression phagengebundener Peptide. 3) Cyclisierung des phagengebundenen Peptids mit einem reaktiven chemischen Gerüst ergibt die Bibliothek. b) Synthese von Peptidbibliotheken, die nichtnatürliche Aminosäuren enthalten, mithilfe von mRNA-Display und In-Vitro-Translation.^[167] 1) Unter Verwendung von Zell-Lysat und Unterdrückung von Nonsense-Codons durch geeignete Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA).^[168,169] 2) Mithilfe von PURE.^[172-176] Nichtnatürliche Aminosäuren (grüne Kreise) können inkorporiert werden, indem natürliche Aminosäuren (gelbe Kreise) aus dem System entfernt und nichtnatürliche hinzugefügt werden, die von natürlichen aa-tRNA-Synthetasen auf tRNA geladen werden können. 3) Unter Verwendung von RAPID.^[172-176] Ausgewählte natürliche Aminosäuren (gelbe Kreise) und aa-tRNA-Synthetasen (gelbe ovale Formen) werden aus dem PURE-System entfernt, und tRNAs, beladen mit nichtnatürlichen Aminosäuren (grüne Kreise), werden hinzugefügt. Die Synthese der aa-tRNAs, die mit nichtnatürlichen Aminosäuren beladen sind, erfolgt durch „Flexizyme“ (grüne ovale Formen). 4) Cyclisierung der Peptide, z.B. durch die Seitenketten nichtnatürlicher Aminosäuren, ergibt die fertige Bibliothek.

Auch wurden mehrere Ansätze, die auf In-vitro-Translationssystemen für die Konstruktion DNA-codierter Bibliotheken cyclischer Peptide basieren, beschrieben (Abbildung 4b). Hier wird die stabile Verbindung zwischen Phänotyp und Genotyp meist mithilfe von Puromycin hergestellt. Dieses stellt eine kovalente Bindung zwischen einem naszierenden Protein und der codierenden mRNA her.^[167]

Retikulozytenlysat aus Kaninchen konnte eine Bibliothek von ca. 1.2×10^{11} Peptiden übersetzen und mit der codierenden mRNA stabil verbinden, wobei die Cyclisierung durch Disulfidbrücken zwischen codierten Cysteinen erreicht wurde. Dadurch konnten Inhibitoren gegen α -Thrombin (K_i -Werte von bis zu 166 nm) identifiziert werden.^[168] Die Suppression

von Nonsense-Codons ermöglicht es weiterhin, nichtnatürliche Aminosäuren in einem derartigen System zu integrieren.^[169] Ein starker Inhibitor von Ga11 ($K_i = 2.1$ nm) konnte so isoliert werden. Um Bibliotheken zu konstruieren, die gleichzeitig mehrere nichtnatürliche Aminosäuren inkorporieren können, ist eine umfangreichere Reprogrammierung des genetischen Codes erforderlich. Die Gruppe um Szostak hat aus diesem Grund ein In-vitro-Translationsystem aus individuell aufgereinigten Komponenten zusammengestellt („in vitro translation system from purified components“, PURE) und mit mRNA-Display verbunden, um Bibliotheken zu synthetisieren, die mehrere nichtnatürliche Aminosäuren gleichzeitig enthalten können.^[170] Thrombin-Liganden mit K_D -Werten bis zu 4.5 nm wurden mit diesem System in mehreren Selektionsrunden entdeckt.^[171] Das am weitesten fortgeschrittene System für die Konstruktion von DNA-codierten Peptidbibliotheken, die eine große Zahl nichtnatürlicher Aminosäuren enthalten, ist das „random non-standard peptide integrated discovery“ (RAPID)-System von Suga et al. Basierend auf dem PURE-System liegt der große Vorteil bei RAPID in der Tatsache, dass die Aminoacyl-tRNA durch flexible Ribozyme (so genannte Flexizyme)^[172,173] synthetisiert wird, die tRNAs mit einer fast unbeschränkten Vielfalt an Aminosäuren beladen können.^[174] Aus einer Bibliothek auf Basis von Thioether-cyclisierten Peptiden wurden so starke (IC_{50} -Werte in der Größenordnung von 100 nm) und Isoform-selektive Inhibitoren gegen Akt2, 14 (Schema 5),^[175] sowie ein Binder der Ubiquitin-Ligase E6AP ($K_D = 0.60$ nm) isoliert.^[176]

Die in diesem Abschnitt besprochenen peptidbasierten codierten chemischen Bibliotheken scheinen die Fähigkeit zu haben, Binder gegen eine große Vielfalt an Targets hervorzubringen. Ihr Potenzial für die Identifikation von Liganden für Wirkstofftransportsysteme muss jedoch noch weiter überprüft werden. Da diese Technologien durch die biosynthetischen Möglichkeiten des Ribosoms beschränkt sind, müssen alternative Strategien für die Konstruktion von komplexeren und strukturell diversifizierten DNA-codierten Bibliotheken gefunden werden.

4.2. DNA-codierte Bibliotheken niedermolekularer organischer Verbindungen

1992 schlugen Brenner und Lerner in einem theoretischen Artikel vor, die Festphasensynthese von Peptiden durch parallel synthetisierte Oligonukleotide auf demselben Trägerpolymer zu codieren.^[177] Die Oligonukleotide wären in diesem Fall nur amplifizierbare „Strichcodes“ statt Gene für die Biosynthese gewesen. Diese Publikation markierte die Geburtsstunde von DNA-codierten chemischen Bibliotheken. Es dauerte jedoch ein Jahrzehnt, bis dieses Konzept praktisch umgesetzt wurde und die Möglichkeit eröffnete, chemische Bibliotheken von nie dagewesener Größe herzustellen und zu testen. Die schrittweise Split&Pool-Konstruktion der DNA-codierten Bibliotheken hat sich als besonders robuste Methode erwiesen und ist heutzutage weit verbreitet (Abbildung 5a).^[178-183] Dieser Ansatz umfasst die folgenden Schritte:^[184]

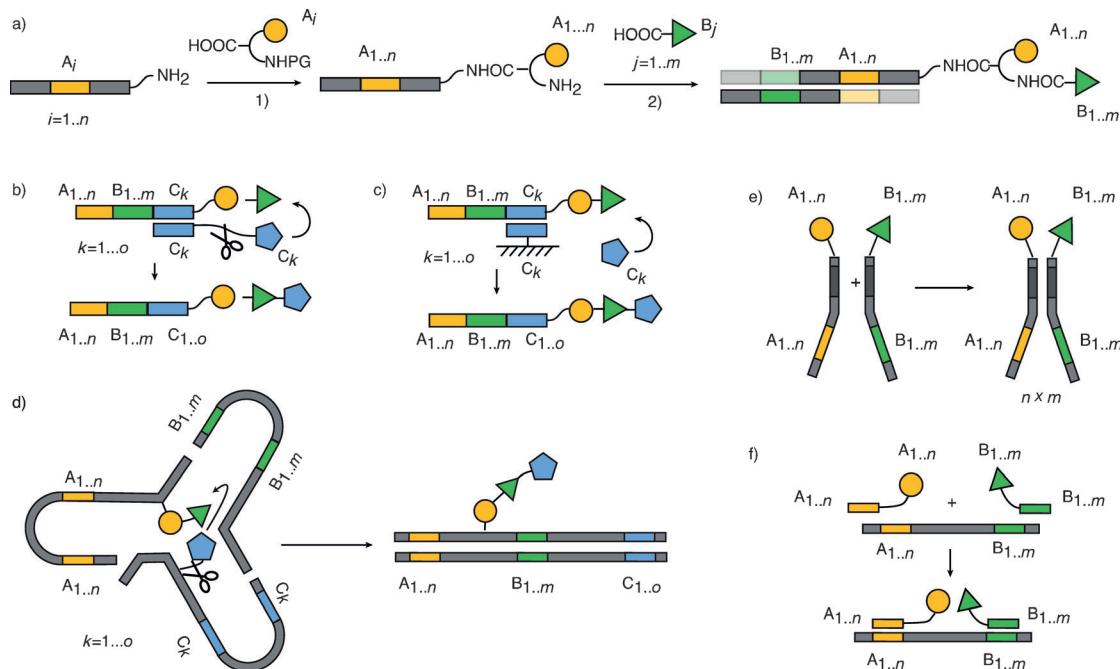


Abbildung 5. a) Synthese einer DNA-codierten Bibliothek durch sequenzielle Split&Pool-Synthese von Peptidbindungen. 1) Kopplung von Bausteinen A_i an Oligonukleotide, die für A_i codieren. Entschützen, Aufreinigen, Poolen und in *m* Aliquots aufteilen. 2) Für jedes Aliquot Kupplung mit Baustein B_j, DNA-Präzipitation und Codierung der Reaktion durch Klenow-Polymerisation. Poolen aller Reaktionen ergibt die fertige Bibliothek.^[184] b) DNA-Templatgesteuerte Bibliothekssynthese wie von Liu und Mitarbeitern beschrieben.^[186-189] DNA-gebundene Bausteine (z. B. C_k) bilden eine Doppelhelix mit komplementären Sequenzen auf dem Templatstrang. Die räumliche Nähe begünstigt eine Reaktion zwischen C_k und dem vorhergehenden Baustein. Abspaltung des Bausteins vom Trägerstrang und ein Aufarbeitungsschritt schließen den Reaktionszyklus ab. c) Bibliotheks-synthese durch DNA-Routing.^[190,191] Sub-Bibliotheken werden sequenziell auf Trägerpartikeln immobilisiert, die zum Codestrang komplementäre Sequenzen tragen. Jede immobilisierte Sub-Bibliothek wird mit dem entsprechenden Baustein gekuppelt, eluiert und mit den übrigen Bibliotheksteilen vermischt. Diese Methode erfordert auf einer Festphase verankerte komplementäre Oligonukleotide für alle Codesequenzen, die in der Bibliothek vorkommen. d) DNA-Templatbasierte Bibliothekskonstruktion in einem „Yokotoliter-Reaktor“.^[192] Hier bringt eine Dreiweg-Haarnadel-Kreuzung die Bausteine in räumliche Nähe und ermöglicht so eine Reaktion. e) „Encoded self-assembling chemical“ (ESAC)-Bibliotheken.^[193-197] Zwei Sub-Bibliotheken, die verschiedene Bausteine tragen, werden durch eine konstante Domäne hybridisiert und ermöglichen so die Konstruktion von qualitativ hochwertigen kombinatorischen Bibliotheken der Größe *n* × *m* aus zwei *n* und *m* Mitglieder umfassenden Sub-Bibliotheken. f) Bibliothekskonstruktion ähnlich zu ESAC, basierend auf DNA-Codesträngen und PNA-gekoppelten Bausteinen.^[198,199]

- Zunächst wird eine Kollektion chemischer Verbindungen an kurze Oligonukleotide gekuppelt, welche die jeweiligen Moleküle eindeutig identifizieren.
- Die Produkte des ersten Schritts werden gepoolt und anschließend äquimolar aufgeteilt.
- Der zweite Baustein wird an den ersten gekuppelt und die Reaktion auf dem Oligonukleotid codiert (z. B. durch Hybridisierung mit einem teilweise komplementären Oligonukleotid, gefolgt von Klenow-Polymerisation).
- Die Produkte des letzten Schritts werden gepoolt und ergeben die fertige DNA-codierte Bibliothek.

Die Schritte (b) und (c) können im Prinzip mehrmals wiederholt werden, um Bibliotheken aus mehreren Bausteinen und zwischen 10⁵ und 10⁹ codierten niedermolekularen Verbindungen zu erstellen. In der Praxis sind mehrere Split&Pool-Zyklen unweigerlich mit einer sinkenden Reinheit der Bibliothek verbunden, da sich unerwünschte Nebenprodukte anreichern. Außerdem ist trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung die Decodierung einer Bibliothek aus mehreren Millionen Molekülen noch immer sehr aufwändig und teuer.

Die Synthese von DNA-codierten chemischen Bibliotheken ist unweigerlich auf die Verfügbarkeit hoch effizienter Kupplungsreaktionen angewiesen, die kompatibel mit der Struktur der DNA sind und in der Gegenwart von Wasser ablaufen können. Diels-Alder-Reaktion, 1,3-dipolare Cu^I-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition, nucleophile aromatische Substitution, reduktive Aminierung und Peptidkupplungen wurden bis heute erfolgreich eingesetzt.^[182,183,185]

Eine Alternative zur manuellen Split&Pool-Synthese DNA-codierter chemischer Bibliotheken ist die DNA-templatbasierte Synthese (DTS). Bei dieser Strategie wird die DNA nicht nur als Identifikationscode des gebundenen Pharmakophors verwendet, sondern auch zur Programmierung der Syntheseschritte zur Bibliothekskonstruktion. Die Gruppe um Liu berichtete von einem Ansatz, der auf der Beobachtung basierte, dass chemische Reaktionen beschleunigt werden können, wenn DNA-gebundene Ausgangsstoffe durch Doppelstrangbildung in räumliche Nähe gebracht werden (Abbildung 5b). Niedermolekulare organische Verbindungen wurden an biotinylierte DNA-Fragmente („Donoren“) gekuppelt und konnten auf passende komplementäre DNA-Stränge („Akzeptoren“) übertragen werden. Die Do-

norfragmente wurden in der Folge abgespalten und mit Avidin-Trägerpartikeln entfernt.^[186–189]

Harbury et al. beschrieben eine Strategie, die als „DNA-Routing“ bezeichnet wird (Abbildung 5c).^[190,191] DNA-Sequenzen, die jedes Bibliotheksmitglied eindeutig repräsentieren, werden aus einzelnen Codesegmenten zufällig zusammengefügt. Untergruppen der Bibliothek können nun selektiv mithilfe der Codesegmente auf einer Festphase an komplementären DNA-Fragmenten immobilisiert und anschließend mit entsprechenden Bausteinen gekuppelt werden. Nach einem Waschschritt kann die DNA eluiert, gepoolt und im nächsten Syntheseschritt verwendet werden.

Hansen und Mitarbeiter haben beschrieben, dass DNA-Haarnadel-Y-Kreuzungen verwendet werden können, um geeignete chemische Donoren auf einen nahe gelegenen Akzeptor zu übertragen (Abbildung 5d).^[192]

Die bis jetzt besprochenen Strategien sind alle dadurch gekennzeichnet, dass ein einzelnes Molekül an einen DNA-Strang gekuppelt wird. Aus diesem Grund werden solche Bibliotheken auch als „single pharmacophore libraries“ bezeichnet. Als Alternative dazu wurden auch Bibliotheken aus zwei verschiedenen Molekülen auf zwei getrennten DNA-Strängen („dual pharmacophore libraries“) entwickelt. Unsere Gruppe entwickelte so genannte „encoded self-assembling chemical (ESAC) libraries“, die auf der spontanen kombinatorischen Zusammenstellung von codierten Sub-Bibliotheken durch DNA-Doppelstrangbildung beruhen (Abbildung 5e).^[193–197] Zu diesem Zweck werden zwei Molekülkollektionen an die 3' und 5'-Enden kurzer DNA-Stränge gekuppelt. Die DNA-Fragmente bestehen aus einer konstanten Hybridisierungssequenz und einer variablen Sequenz, welche die Identifizierung des gekuppelten Moleküls ermöglicht. Mischt man äquimolare Mengen aller DNA gebundenen Moleküle, stellt sich von selbst eine codierte kombinatorische Bibliothek zusammen, die alle möglichen Molekülkombinationen abdeckt. Da nur ein Schritt für die Synthese einer derartigen Bibliothek notwendig ist, können sehr große Bibliotheken von sehr hoher Qualität realisiert werden. Die Gruppe um Winssinger verfolgte einen konzeptionell ähnlichen Weg: In ihrem Ansatz wurden Moleküle an kurze PNA-Fragmente gekuppelt, die daraufhin mit einer DNA-Matrize hybridisieren konnten. Diese wurde im Anschluss direkt PCR-amplifiziert und danach sequenziert (Abbildung 5f).^[198,199] Bei beiden Methoden ermöglicht es die Flexibilität des Linkers, zwischen Molekül und codierendem DNA-Strang zwei potenzielle Bindungsstellen auf demselben Protein gleichzeitig zu erkunden. Von den resultierenden Bindern kann aufgrund des Chelateffekts eine hohe Affinität erwartet werden.^[197] Nach der Identifikation von zwei Bindern müssen diese, ähnlich wie bei fragmentbasierten Screening-Methoden, in ein Molekül zusammengeführt werden. Es sollte hier erwähnt werden, dass DNA-codierte chemische Bibliotheken nicht nur zur De-novo-Identifikation niedermolekularer organischer Verbindungen eingesetzt werden können, sondern auch als Hilfsmittel zur systematischen Erkundung des chemischen Bindungsraums rund um eine bekannte Leitstruktur („Affinitätsreifung“ oder „Lead-Expansion“).^[181]

DNA-codierte Bibliotheken werden heutzutage aktiv für die Auffindung von Hits und Leitstrukturen sowohl in der universitären als auch industriellen Forschung eingesetzt. Mehrere Binder und Inhibitoren für verschiedene pharmazeutisch interessante Proteine wurden bis jetzt so identifiziert.^[184] Unsere Gruppe hat kürzlich gezeigt, dass DNA-codierte Bibliotheken für die Identifikation von Liganden verwendet werden können, die sich selektiv in neoplastischem Gewebe anlagern. Carboanhydrase IX (CAIX) ist ein membrangebundenes Enzym, das in vielen soliden Tumoren überexprimiert ist, entweder als Antwort auf eine Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) oder wenn der Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor durch Mutationen deaktiviert wurde.^[200] Ein CAIX-Ligand **15** (Abbildung 6a; inhibiert die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat durch CAIX mit $IC_{50} = 260 \text{ nm}$),^[185] der aus einer 1×10^6 Moleküle umfassenden DNA-codierten Bibliothek isoliert wurde, konnte sich selektiv in einem Tumorentransplantat in Nacktmäusen anlagern (Abbildung 6b). Unsere und andere Gruppen arbeiten derzeit an verbesserten Wirkstofftransportsystemen, die hoch wirksame zytotoxische Substanzen in CAIX-exprimierende Tumoren liefern können.^[201,202]

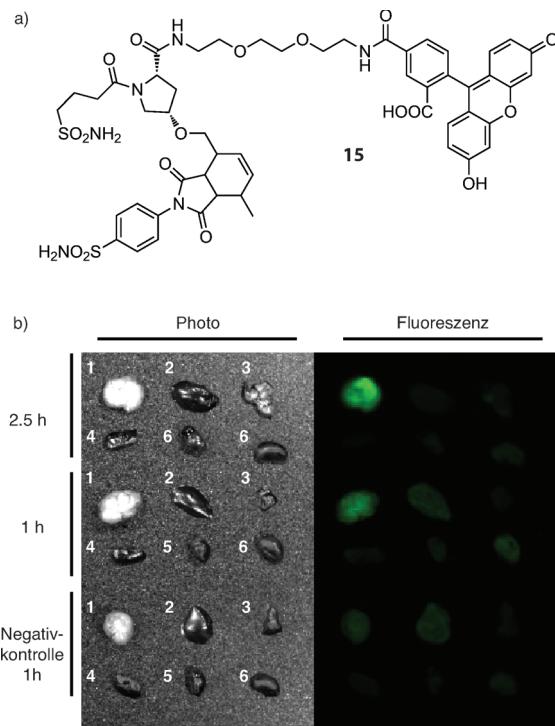


Abbildung 6. a) Das Fluoresceinkonjugat eines CAIX-Liganden **15**, der aus einer 1×10^6 Mitglieder umfassenden DNA-codierten chemischen Bibliothek isoliert wurde, reichert sich nach intravenöser Verabreichung in Mäusen in soliden Tumoren an. b) Photographien und Fluoreszenzbilder der extrahierten Organe. 1) Tumor, 2) Leber, 3) Lunge, 4) Milz, 5) Herz, 6) Nieren. Negativkontrolle = *N*-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethyl)carboxyfluoresceinamid).^[185]

Tabelle 1: Wachstumsinhibition- IC_{50} -Werte exemplarischer zytotoxischer Substanzen, welche die gängigsten Wirkstoff-Familien repräsentieren. Die IC_{50} -Werte für die gegen das Gift empfindlichste Zell-Linie (Minimum), die am wenigsten empfindliche Zell-Linie (Maximum) und der Median- IC_{50} -Wert sind angegeben.

Wirkstoff	Familie	Minimum	IC_{50} [M] Maximum	Median	getestete Zell-Linien	Lit.
Methotrexat ^[a]	Antifolate	2.4×10^{-8}	2.5×10^{-4}	7.3×10^{-8}	97	[203]
Doxorubicin ^[a]	Anthracycline	2.5×10^{-9}	1.3×10^{-5}	8.4×10^{-8}	85	[203]
Paclitaxel ^[a]	Taxoide	2.8×10^{-9}	1.6×10^{-6}	9.6×10^{-9}	94	[203]
Vinblastin ^[a]	Vincaalkaloide	2.5×10^{-10}	2.7×10^{-6}	6.4×10^{-10}	99	[203]
Maytansin ^[a]	Maytansinoide	1.2×10^{-9}	2.0×10^{-5}	3.3×10^{-9}	74	[203]
Dolastatin ^[a]	Dolastatine	3.2×10^{-11}	6.8×10^{-5}	7.1×10^{-10}	76	[203]
Auristatin PE ^[a]	Dolastatine	8.7×10^{-11}	1.0×10^{-5}	4.1×10^{-10}	60	[203]
–	Calicheamicine	$< 5.0 \times 10^{-11}$ in HeLa Zellen			1	[204]
SJG-136	Pyrrolobenzodiazepine	2.3×10^{-11}	5.0×10^{-6}	4.7×10^{-9}	8	[205]
Duocarmycin SA ^[b]	Duocarmycine	9.3×10^{-13}	5.7×10^{-9}	6.2×10^{-10}	15	[206]
Tubulysin D	Tubulysine	3.1×10^{-12}	6.7×10^{-10}	8.9×10^{-12}	4	[207]

[a] Der aktuelle Datensatz (03/2012) der Drug Screening Database des National Cancer Institute (NCI) wurde verwendet. Für jede Zell-Linie wurden die Durchschnittswerte aus allen Testergebnissen für den jeweiligen Wirkstoff errechnet. [b] Absolute IC_{50} -Werte wurden aus Abbildung 1 der entsprechenden Referenz abgeschätzt. Nur menschliche Krebszellen wurden in die Analyse einbezogen.

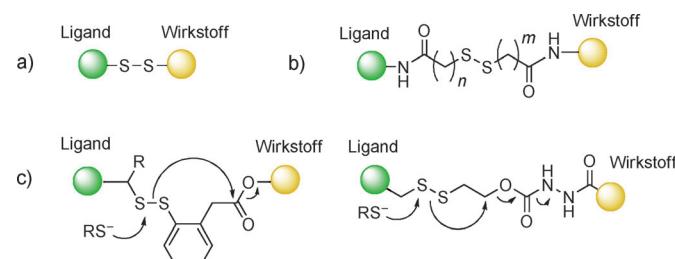
5. Zytotoxische Wirkstoffe und Linker

Zytotoxische Nutzlasten für den zielgerichteten Wirkstofftransport (Tabelle 1)^[203–207] sollten eine sehr hohe Aktivität aufweisen (die Zahl der Liganden-Wirkstoff-Konjugate, die an eine Zelle herangebracht werden kann, ist durch die Zahl der Antigene auf der Zelloberfläche limitiert) und müssen eine funktionelle Gruppe aufweisen, an der ein Linker angebracht werden kann. Die meisten zytotoxischen Wirkstoffe, die heutzutage zur Krebsbehandlung eingesetzt werden, wurden schon als Konjugate getestet, darunter Methotrexat,^[208] die Vincaalkaloide,^[90] Taxoide^[114,209] und Anthracycline.^[61–63] Trotz der vergleichsweise geringen Toxizität beruhten viele frühe Versuche auf Doxorubicin und seinen Derivaten sowie auf Methotrexat, da ihre chemische Struktur leicht eine Modifikation ermöglicht und die Medikamente in großen Mengen verfügbar waren.^[53,61–63,153] Heutzutage werden weit aktivere Nutzlasten bevorzugt. Die Tatsache, dass Liganden-Wirkstoff-Konjugate Prodrugs sind, macht es möglich, zytotoxische Substanzen zu nutzen, die in ihrer unmodifizierten Form viel zu giftig für den klinischen Einsatz wären. Die am weitesten verbreiteten Nutzlasten sind Dolastatinderivate wie Auristatine^[210,211] und Cemadotin,^[25,212] Maytansinoide,^[213,214] Calicheamicine,^[204,215] Pyrrolobenzodiazepine,^[216,217] Duocarmycine^[206,218] und Tubulysine.^[52,92,93,207,219]

Der zytotoxische Wirkstoff sollte stabil an den Transportliganden gebunden bleiben, während sich das Konjugat im Blutkreislauf befindet, und freigesetzt werden, sobald das Molekül sein Ziel erreicht. Linker-Technologien, die in Abhängigkeit vom pH-Wert,^[90,212,215] vom Redoxpotential^[25,77,220] und von bestimmten Enzymaktivitäten^[221,222] aktiviert werden, wurden beschrieben (Tabelle 2). Wenn entsprechende funktionelle Gruppen direkt auf Ligand und Wirkstoff vorhanden sind (z.B. Thiole), kann eine direkte Verbindung ohne Adaptoren („linkerless connection“) hergestellt werden, die eine rückstandslose („traceless“) Freisetzung des Wirkstoffs ermöglicht (Schema 6a).^[25,212] Wenn das nicht möglich ist, müssen spaltbare Linker als Adapter ein-

Tabelle 2: Gängige spaltbare Bindungen für die Konstruktion von Liganden-Wirkstoff-Konjugaten.

Bindung	Struktur	Spaltung
Amid		Hydrolyse
Ester		Hydrolyse
Carbamat		Hydrolyse
Hydrazon		Hydrolyse
Thiazolidin		Hydrolyse
Disulfid		Reduktion



Schema 6. a) Rückstandslose Disulfidverbindung zwischen Ligand und Wirkstoff.^[25] b) Disulfidadapter, der Aminogruppen auf Ligand und Wirkstoff verbindet.^[223] c) Selbstauflösende Linker mit Disulfiden als spaltbarer Bindung.^[226,226]

gesetzt werden, welche die funktionellen Gruppen auf dem Liganden und dem Wirkstoff miteinander verbinden (Schema 6b). In diesem Fall kann es dazu kommen, dass Ligand oder Wirkstoff mit kovalenten Modifikationen freigesetzt werden,^[223] was die Pharmakokinetik verändern oder eine Immunreaktion hervorrufen kann. Die meisten hier besprochenen Linker-Technologien wurden ursprünglich für den Einsatz in Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten konzipiert, lassen sich im Prinzip aber ohne Veränderung auch in anderen Wirkstofftransportsystemen einsetzen.

Erste Versuche mit zielgerichteten Wirkstofftransportsystemen basierten oft auf Linkern aus Dicarbonsäuren, die Hydroxy- oder Aminogruppen auf Liganden und Wirkstoffen als Ester oder Amide miteinander verbanden.^[61–63] Wenn solche Konstrukte das Lysosom erreichen, kann der Linker durch lysosomale Proteasen oder Esterasen gespalten werden. Auch Linker basierend auf Carbamaten wurden beschrieben.^[73] Der exakte Nachweis, welche Mechanismen für die Wirkstoff-Freisetzung verantwortlich sind und wie effizient diese ablaufen, fehlt jedoch oft. Es sollte dennoch darauf hingewiesen werden, dass Peptid-Wirkstoff-Konjugate, in denen Amid- oder Carbamatbindungen den Liganden mit der Nutzlast verbinden, oft weniger aktiv sind als die unmodifizierte Nutzlast.^[53, 73, 74, 224] Interessanterweise zeigten Antikörper-Wirkstoff-Konjugate auf Basis sehr stabiler Linker (z.B. über ein Maleimid an den Antikörper und ein Amid an den Wirkstoff gekuppelt) eine hervorragende Wirkung und wurden erfolgreich klinisch weiterentwickelt.^[220] Es wird vermutet, dass der gesamte Antikörper proteolytisch abgebaut wird, sobald er das Lysosom erreicht hat und so den Wirkstoff freisetzt. Moderne Peptid-Linker wie der Valin-Citrullin-Linker sind so gebaut, dass sie an einer spezifischen Stelle von lysosomalen proteolytischen Enzymen gespalten werden.^[221, 222]

Hydrazone sind säurelabil und werden im Lysosom und in gewissen Endosomen hydrolysiert.^[90, 215] Unsere Gruppe hat kürzlich die Verwendung von Thiazolidinen als hydrolytisch aktivierbaren rückstandslosen Verbindungen zwischen Ligand und Wirkstoff vorgeschlagen. In diesem Fall wird eine Nutzlast, die zwingend ein Aldehyd enthalten muss, reversibel an ein 1-Thio-2-aminoethyl-Motiv auf dem Transportliganden (z.B. ein N-terminales Cys auf verschiedenen Antikörperformaten) gebunden.^[212]

Es wird allgemein angenommen, dass Disulfide nach Internalisierung im Endosom reduktiv gespalten werden. Tatsächlich wurden auch direkte Belege für diesen Mechanismus erhalten.^[77] In ihrer einfachsten Form können Disulfide zwischen Thiolen auf dem Wirkstoff (z.B. Cemadotin-SH) und dem Transportliganden hergestellt werden^[25] und ermöglichen so eine rückstandslose Freisetzung der Nutzlast (Schema 6a). Bis jetzt wurden jedoch vor allem Alkyl-Linker mit Disulfidbrücken (Schema 6b) gebraucht.^[14, 15, 225] Die Kinetik der Wirkstoff-Freisetzung kann durch sterische Faktoren rund um die Disulfidbindung moduliert werden.^[220] Wenn der Wirkstoff es nicht zulässt, ohne Aktivitätsverlust ein nicht abspaltbares Adapterstück anzubringen, kann auf selbstauflösende Linker zurückgegriffen werden. Systeme auf Basis von 2-Mercaptoethylcarbonaten und -carbamaten^[126] oder 2-Mercaptophenylacetat^[226] sind bis jetzt zum Einsatz gekom-

men (Schema 6c). Die rückstandslose Freisetzung eines Wirkstoffs ist unserer Meinung nach jedoch zu bevorzugen, da die Selbstauflösung eines Linkers kein unmittelbarer Prozess ist.

Die genauen Bedingungen, denen ein Ligand-Wirkstoff-Konjugat nach Aufnahme in eine Zelle ausgesetzt ist, hängen stark vom Tumorantigen ab, das vom Transportliganden gebunden wird. Folsäurerzeptoren z.B. scheinen nicht in ein saures Endosom zu internalisieren oder das Lysosom zu erreichen.^[77, 113] Ähnlich scheint HER2-Internalisierung zu mindest in bestimmten Zell-Linien nicht die Bedingungen zu schaffen, welche die Spaltung von Disulfiden ermöglichen.^[227] Ein gutes Verständnis des endozytotischen Weges, dem das Antigen von Interesse folgt, scheint deshalb entscheidend für die korrekte Wahl einer Linker-Technologie zu sein.

6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Der ligandenbasierte, zielgerichtete Transport zytotoxischer Substanzen ist ein vielversprechender Ansatz zur pharmakologischen Therapie von Krebs und anderen schweren Erkrankungen. Niedermolekulare Verbindungen und Peptide, die sich als Transportliganden eignen, sind bereits verfügbar für eine Reihe interessanter Biomarker (z.B. tumorassoziierte Rezeptoren, Proteasen, Phosphatasen und Carboanhydrasen), und die jeweiligen Konjugate haben gezeigt, dass sie sich selektiv im Tumorgewebe anlagern und eine therapeutische Wirkung *in vivo* herbeiführen können.

Trotzdem gilt es noch viele Probleme zu lösen. Mit den heutigen Methoden ist es immer noch schwer, spezifische Liganden für eine Reihe der interessantesten zugänglichen Markerproteine (z.B. der veränderten extrazellulären Matrix) zu identifizieren. Im Falle von Antikörper-Phagen-Display wurde nachgewiesen, dass die Verwendung von Sub-Bibliotheken mit nur einigen Millionen Antikörpern normalerweise keine hochaffinen Binder liefert.^[228] Bibliotheken aus Milliarden von Antikörpern auf der anderen Seite bringen Binder gegen eine große Vielfalt an Targets hervor. Die Konstruktion und der Einsatz größerer DNA-codierter chemischer Bibliotheken wird die Leistungsfähigkeit dieser Technologie bei der Identifikation starker Liganden und der Entwicklung von Wirkstofftransportsystemen stark steigern.

Der direkte Vergleich von Antikörper-basierten Wirkstofftransportsystemen und den entsprechenden Pretargeting-Strategien zeigt einen enormen Vorteil niedermolekularer organischer Verbindungen gegenüber großen Makromolekülen auf, besonders was die Geschwindigkeit der Anreicherung in erkrankten Geweben und die Exkretion aus gesunden Organen anbelangt. Pretargeting-Technologien haben einen wichtigen Beitrag zum mechanistischen Verständnis von Wirkstofftransportsystemen geleistet, sind jedoch in der Praxis schwierig zu implementieren, da sie auf mindestens zwei Komponenten angewiesen sind und die zeitliche Abfolge ihrer intravenösen Verabreichung präzise eingehalten werden muss. Kleine zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme aus einem hochwirksamen Medikament, das direkt an einen kleinen organischen Liganden gekuppelt ist, versprechen effizienter und einfacher herstellbar zu sein.

Alle Moleküle, die in einen Patienten injiziert werden, müssen früher oder später aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Sofern keine Metabolisierung stattfindet, passieren fast 100 % eines verabreichten Medikaments irgendwann die Exkretionsorgane (vor allem Leber und Nieren). Der Schaden, der an diesen Stellen angerichtet wird, hängt von vielen Parametern ab, wie Anreicherungseffizienz in krankem Gewebe, Freisetzungskinetik und -mechanismus des Wirkstoffs sowie die dem Organ eigene Empfindlichkeit gegen ein Medikament. In der Zukunft wäre es wünschenswert, zielgerichtete Wirkstofftransportsysteme zu entwickeln, die während des Exkretionsprozesses deaktiviert werden (z.B. durch Esterasen in der Leber) und daher normale Organe verschonen können.

Derzeit wird intensiv an der Erforschung verschiedener zytotoxischer Wirkstoffe und Linker-Systeme gearbeitet. Viele hoch wirksame Zytostatika binden an Tubulin (und verhindern so die Zellteilung).^[229] Diese Moleküle haben jedoch nur eine geringe Wirkung gegen inaktive (also sich nicht teilende) Tumorzellen. Deshalb wird der Einsatz von spezifischen DNA-Alkylierungsmitteln und anderen Klassen zytotoxischer Substanzen zunehmend für pharmazeutische Anwendungen in Betracht gezogen. In manchen Fällen ist das biologische Target noch nicht vollkommen bekannt. So wurde zum Beispiel angenommen, dass die Duocarmycine vor allem DNA in der kleinen Furche alkylieren. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass sie auch Aldehyd-Dehydrogenasen binden können, die zu den am besten untersuchten Markern von Krebs-Stammzellen gehören.^[230–232]

Bei der Chemotherapie von Krebserkrankungen wird gemeinhin angenommen, dass die zytotoxischen Medikamente ihre größte Wirkung auf Tumorzellen ausüben. Im Prinzip könnte jedoch auch eine nachhaltige Antitumorwirkung durch die gezielte Zerstörung einer Subpopulation von Zellen hervorgerufen werden. In der Zukunft wird es von zentraler Bedeutung sein, zu verstehen, wie sich die Eigenschaften von Blutgefäßen modulieren lassen, welche Rolle Stammzellen in Tumorgeweben spielen und wie das Immunsystem in die Therapie eingebunden werden kann. Der Wirkungsmechanismus zielgerichteter Wirkstofftransportsysteme könnte in der Tat komplexer sein als das einfache Töten von Zellen, die das relevante Antigen exprimieren. Zusätzlich zu einer bekannten Wirkung des freigesetzten Giftstoffs auf benachbarte Tumorzellen^[233] könnte die Diffusion eines hoch wirksamen Zellgifts Endothelzellen beeinflussen und so möglicherweise die Blutversorgung des Tumors unterbinden und ihn so aushuntern.^[234] Eine Wirkung auf Leukozyten und Beeinflussung einer Untergruppe von Immunzellen, z.B. regulatorischer T-Zellen oder T-Lymphozyten, ist ebenfalls denkbar.

Schlussendlich glauben wir, dass die Verwendung nicht-invasiver bildgebender Verfahren (z.B. Positronenemissionstomographie) zunehmend an Bedeutung für die Überprüfung der Anreicherung zielgerichteter Wirkstofftransportsysteme im Zielgewebe gewinnen wird. Zusätzlich ermöglichen es derartige Methoden, Patienten auszuwählen, die einen hohen Nutzen von einer zielgerichteten Therapie zu erwarten haben. Die Fortschritte, die auf dem Gebiet großer kombinatorischer Bibliotheken stattfinden, werden unserer

Meinung nach einen großen Einfluss auf die Entwicklung neuer Krebstherapien haben. Viele der Targets, Linker und Wirkstoffe, die heutzutage mit Antikörpern als Transportliganden verwendet werden, lassen sich problemlos im Kontext vollsynthetischer Liganden-Wirkstoff-Konjugate einsetzen.

Wir danken Dr. Gonçalo Bernardes und Dr. Raphael Franzini für das kritische Lesen des Manuskripts und für ihre hilfreichen Kommentare.

Eingegangen am 13. Juni 2012
Online veröffentlicht am 7. Januar 2013

- [1] J. A. Wessels, S. M. van der Kooij, S. le Cessie, W. Kievit, P. Barerra, C. F. Allaart, T. W. Huizinga, H. J. Guchelaar, *Arthritis Rheum.* **2007**, *56*, 1765–1775.
- [2] M. N. Islam, M. Hossain, S. A. Haq, M. N. Alam, P. M. Ten Klooster, J. J. Rasker, *Int. J. Rheum. Dis.* **2012**, *15*, 62–68.
- [3] B. C. Kieseier, D. R. Jeffery, *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2010**, *3*, 277–291.
- [4] W. B. Pratt, R. W. Ruddon, W. D. Ensminger, J. Maybaum, *Anticanc. Drugs*, Oxford University Press, New York, **1994**.
- [5] K. Bosslet, R. Straub, M. Blumrich, J. Czech, M. Gerken, B. Sperker, H. K. Kroemer, J.-P. Gesson, M. Koch, C. Monneret, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195–1201.
- [6] Y. Abe, H. Fukuda, K. Ishiwata, S. Yoshioka, K. Yamada, S. Endo, K. Kubota, T. Sato, T. Matsuzawa, T. Takahashi, T. Ido, *Eur. J. Nucl. Med.* **1983**, *8*, 258–261.
- [7] A. Gangloff, W.-A. Hsueh, A. L. Kesner, D. O. Kiesewetter, B. S. Pio, M. D. Pegram, M. Beryt, A. Townsend, J. Czernin, M. E. Phelps, D. H. S. Silverman, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 1866–1871.
- [8] Q. Cao, Z.-B. Li, K. Chen, Z. Wu, L. He, N. Neamati, X. Chen, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 1489–1498.
- [9] Y. S. Kim, R. Song, D. Hyun Kim, M. J. Jun, Y. S. Sohn, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1753–1760.
- [10] V. P. Chauhan, T. Stylianopoulos, Y. Boucher, R. K. Jain, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 281–298.
- [11] P. Baluk, S. Morikawa, A. Haskell, M. Mancuso, D. M. McDonald, *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 1801–1815.
- [12] E. di Tomaso, D. Capen, A. Haskell, J. Hart, J. J. Logie, R. K. Jain, D. M. McDonald, R. Jones, L. L. Munn, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5740–5749.
- [13] R. O'Connor, *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 1267–1272.
- [14] S. C. Alley, N. M. Okeye, P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 529–537.
- [15] B. A. Teicher, R. V. Chari, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6389–6397.
- [16] G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, H. R. Hoogenboom, *Annu. Rev. Immunol.* **1994**, *12*, 433–455.
- [17] L. Tarli, E. Balza, F. Viti, L. Borsi, P. Castellani, D. Berndorff, L. Dinkelborg, D. Neri, L. Zardi, *Blood* **1999**, *94*, 192–198.
- [18] D. Neri, B. Carnemolla, A. Nissim, A. Leprini, G. Querze, E. Balza, A. Pini, L. Tarli, C. Halin, P. Neri, L. Zardi, G. Winter, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1271–1275.
- [19] S. S. Brack, M. Silacci, M. Birchler, D. Neri, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 3200–3208.
- [20] M. Moreau, O. Raguin, J. M. Vrigneaud, B. Collin, C. Bernhard, X. Tizon, F. Boschetti, O. Duchamp, F. Brunotte, F. Denat, *Bioconjugate Chem.* **2012**, Epub.
- [21] A. H. Brouwers, J. E. van Eerd, C. Frielink, E. Oosterwijk, W. J. Oyen, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *J. Nucl. Med.* **2004**, *45*, 327–337.
- [22] E. Trachsel, F. Bootz, M. Silacci, M. Kaspar, H. Kosmehl, D. Neri, *Arthritis Res. Ther.* **2007**, *9*, R9.

- [23] K. Schwager, F. Bootz, P. Imesch, M. Kaspar, E. Trachsel, D. Neri, *Hum. Reprod.* **2011**, *26*, 2344–2352.
- [24] M. Fiechter, K. Frey, T. Fugmann, P. A. Kaufmann, D. Neri, *Atherosclerosis* **2011**, *214*, 325–330.
- [25] G. J. Bernardes, G. Casi, S. Trussel, I. Hartmann, K. Schwager, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 965–968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 941–944.
- [26] E. Ostermann, P. Garin-Chesa, K. H. Heider, M. Kalat, H. Lamche, C. Puri, D. Kerjaschki, W. J. Rettig, G. R. Adolf, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4584–4592.
- [27] A. Gualberto, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2012**, *21*, 205–216.
- [28] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cerveny, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, J. A. Francisco, A. F. Wahl, D. L. Meyer, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778–784.
- [29] J. A. Francisco, C. G. Cerveny, D. L. Meyer, B. J. Mixan, K. Klussman, D. F. Chace, S. X. Rejniak, K. A. Gordon, R. DeBlanc, B. E. Toki, C. L. Law, S. O. Doronina, C. B. Siegall, P. D. Senter, A. F. Wahl, *Blood* **2003**, *102*, 1458–1465.
- [30] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [31] T. Saga, R. D. Neumann, T. Heya, J. Sato, S. Kinuya, N. Le, C. H. Paik, J. N. Weinstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8999–9003.
- [32] G. P. Adams, R. Schier, A. M. McCall, H. H. Simmons, E. M. Horak, R. K. Alpaugh, J. D. Marks, L. M. Weiner, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4750–4755.
- [33] S. I. Rudnick, J. Lou, C. C. Shaller, Y. Tang, A. J. Klein-Szanto, L. M. Weiner, J. D. Marks, G. P. Adams, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2250–2259.
- [34] M. S. Dennis, H. K. Jin, D. Dugger, R. H. Yang, L. McFarland, A. Ogasawara, S. Williams, M. J. Cole, S. Ross, R. Schwall, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 254–261.
- [35] E. C. Dijkers, T. H. Oude Munnink, J. G. Kosterink, A. H. Brouwers, P. L. Jager, J. R. de Jong, G. A. van Dongen, C. P. Schroder, M. N. Lub-de Hooge, E. G. de Vries, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *87*, 586–592.
- [36] J. Y. Wong, A. Raubitschek, D. Yamauchi, L. E. Williams, A. M. Wu, P. Yazaki, J. E. Shively, D. Colcher, G. Somlo, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2010**, *25*, 387–394.
- [37] S. Sauer, P. A. Erba, M. Petrini, A. Menrad, L. Giovannoni, C. Grana, B. Hirsch, L. Zardi, G. Paganelli, G. Mariani, D. Neri, H. Durkop, H. D. Menssen, *Blood* **2009**, *113*, 2265–2274.
- [38] M. Santimaria, G. Moscatelli, G. L. Viale, L. Giovannoni, G. Neri, F. Viti, A. Leprini, L. Borsi, P. Castellani, L. Zardi, D. Neri, P. Riva, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 571–579.
- [39] L. Borsi, E. Balza, M. Bestagno, P. Castellani, B. Carnemolla, A. Biro, A. Leprini, J. Sepulveda, O. Burrone, D. Neri, L. Zardi, *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 75–85.
- [40] F. Levi, B. Perpoint, C. Garufi, C. Focan, P. Chollet, P. Depresbrummer, R. Zidani, S. Brienza, M. Itzhaki, S. Iacobelli, F. Kunstlinger, J. Gastiaburu, J. L. Misset, *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A*, 1280–1284.
- [41] T. Olafsen, V. E. Kenanova, G. Sundaresan, A. L. Anderson, D. Crow, P. J. Yazaki, L. Li, M. F. Press, S. S. Gambhir, L. E. Williams, J. Y. Wong, A. A. Raubitschek, J. E. Shively, A. M. Wu, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5907–5916.
- [42] P. A. van Schouwenburg, G. M. Bartelds, M. H. Hart, L. Aarden, G. J. Wolbink, D. Wouters, *J. Immunol. Methods* **2010**, *362*, 82–88.
- [43] M. Cesca, R. Frapolli, A. Berndt, V. Scarlato, P. Richter, H. Kosmehl, M. D’Incalci, A. J. Ryan, R. Giavazzi, *Neoplasia* **2009**, *11*, 1155–1164.
- [44] F. G. van Schaijk, E. Oosterwijk, J. D. Molkenboer-Kuennen, A. C. Soede, B. J. McBride, D. M. Goldenberg, W. J. Oyen, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 495–501.
- [45] J. F. Gestin, A. Loussouarn, M. Bardies, E. Gautherot, A. Gruaz-Guyon, C. Sai-Maurel, J. Barbet, C. Curtet, J. F. Chatal, A. Faivre-Chauvet, *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 146–153.
- [46] A. Nagy, A. V. Schally, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11*, 1167–1180.
- [47] J. C. Reubi, *Endocr. Rev.* **2003**, *24*, 389–427.
- [48] A. V. Schally, A. Nagy, *Eur. J. Endocrinol.* **1999**, *141*, 1–14.
- [49] L. C. Sun, D. H. Coy, *Curr. Drug Delivery* **2011**, *8*, 2–10.
- [50] W. Xia, P. S. Low, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6811–6824.
- [51] S. Chen, X. Zhao, J. Chen, L. Kuznetsova, S. S. Wong, I. Ojima, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 979–987.
- [52] S. A. Kularatne, K. Wang, H.-K. R. Santhapuram, P. S. Low, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 780–789.
- [53] S. Jayaprakash, X. Wang, W. D. Heston, A. P. Kozikowski, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 299–302.
- [54] I. Ojima, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 108–119.
- [55] P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doornweerd, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 120–129.
- [56] M. Fani, H. R. Maecke, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2012**, *39*, S11–30.
- [57] A. V. Schally, J. B. Engel, G. Emons, N. L. Block, J. Pinski, *Curr. Drug Delivery* **2011**, *8*, 11–25.
- [58] V. Ambrosini, M. Fani, S. Fanti, F. Forrer, H. R. Maecke, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52S2*, 42S–55S.
- [59] M. M. Graham, Y. Menda, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52S2*, 56S–63S.
- [60] S. Bajusz, T. Janaky, V. J. Csernus, L. Bokser, M. Fekete, G. Srkalovic, T. W. Redding, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 6313–6317.
- [61] A. Nagy, P. Armatis, R. Z. Cai, K. Szepeshazi, G. Halmos, A. V. Schally, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 652–656.
- [62] A. Nagy, A. V. Schally, P. Armatis, K. Szepeshazi, G. Halmos, M. Kovacs, M. Zarandi, K. Groot, M. Miyazaki, A. Jungwirth, J. Horvath, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7269–7273.
- [63] A. Nagy, A. V. Schally, G. Halmos, P. Armatis, R. Z. Cai, V. Csernus, M. Kovacs, M. Koppan, K. Szepeshazi, Z. Kahan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 1794–1799.
- [64] J. B. Engel, A. V. Schally, G. Halmos, B. Baker, A. Nagy, G. Keller, *Endocr.-Relat. Cancer* **2005**, *12*, 999–1010.
- [65] A. M. Bajo, A. V. Schally, G. Halmos, A. Nagy, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 3742–3748.
- [66] K. Szepeshazi, A. V. Schally, A. Nagy, B. W. Wagner, A. M. Bajo, G. Halmos, *Cancer* **2003**, *98*, 1401–1410.
- [67] M. Koppan, A. Nagy, A. V. Schally, A. Plonowski, G. Halmos, J. M. Arencibia, K. Groot, *Prostate* **1999**, *38*, 151–158.
- [68] Z. Kahán, A. Nagy, A. V. Schally, F. Hebert, B. Sun, K. Groot, G. Halmos, *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 592–598.
- [69] J. B. Engel, A. V. Schally, G. Halmos, B. Baker, A. Nagy, G. Keller, *Cancer* **2005**, *104*, 1312–1321.
- [70] G. Keller, A. V. Schally, A. Nagy, G. Halmos, B. Baker, J. B. Engel, *Cancer* **2005**, *104*, 2266–2274.
- [71] G. Emons, M. Kaufmann, G. Gorchev, V. Tsekova, C. Grundker, A. R. Gunther, L. C. Hanker, M. Velikova, H. Sindermann, J. Engel, A. V. Schally, *Gynecol. Oncol.* **2010**, *119*, 457–461.
- [72] S. Sundaram, C. Durairaj, R. Kadam, U. B. Kompella, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 1655–1665.
- [73] L. Sun, J. A. Fuselier, D. H. Coy, *Drug Delivery* **2004**, *11*, 231–238.
- [74] T. W. Moody, L.-C. Sun, S. A. Mantey, T. Pradhan, L. V. Mackey, N. Gonzales, J. A. Fuselier, D. H. Coy, R. T. Jensen, J. Pharmacol. Exp. Ther. **2006**, *318*, 1265–1272.
- [75] G. Russell-Jones, K. McTavish, J. McEwan, J. Rice, D. Nowotnik, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1625–1633.
- [76] S. M. Clardy, D. G. Allis, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *Expert Opin. Drug Delivery* **2011**, *8*, 127–140.
- [77] J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J.-X. Cheng, P. S. Low, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13872–13877.

- [78] J. A. Reddy, E. Westrick, H. K. R. Santhapuram, S. J. Howard, M. L. Miller, M. Vetzel, I. Vlahov, R. V. J. Chari, V. S. Goldmacher, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6376–6382.
- [79] C. M. Paulos, J. A. Reddy, C. P. Leamon, M. J. Turk, P. S. Low, *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1406–1414.
- [80] C. Y. Ke, C. J. Mathias, M. A. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7421–7426.
- [81] C. J. Mathias, D. Hubers, P. S. Low, M. A. Green, *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 253–257.
- [82] C. J. Mathias, M. R. Lewis, D. E. Reichert, R. Laforest, T. L. Sharp, J. S. Lewis, Z.-F. Yang, D. J. Waters, P. W. Snyder, P. S. Low, M. J. Welch, M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 725–731.
- [83] C. J. Mathias, S. Wang, D. J. Waters, J. J. Turek, P. S. Low, M. A. Green, *J. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 1579–1585.
- [84] D. P. Trump, C. J. Mathias, Z. Yang, P. S. Low, M. Marmion, M. A. Green, *Nucl. Med. Biol.* **2002**, *29*, 569–573.
- [85] S. Wang, J. Luo, D. A. Lantrip, D. J. Waters, C. J. Mathias, M. A. Green, P. L. Fuchs, P. S. Low, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 673–679.
- [86] C. P. Leamon, M. A. Parker, I. R. Vlahov, L.-C. Xu, J. A. Reddy, M. Vetzel, N. Douglas, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1200–1210.
- [87] C. P. Leamon, I. Pastan, P. S. Low, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24847–24854.
- [88] W. A. Henne, D. D. Doornweerd, A. R. Hilgenbrink, S. A. Kularatne, P. S. Low, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5350–5355.
- [89] J. A. Reddy, R. Dorton, E. Westrick, A. Dawson, T. Smith, L.-C. Xu, M. Vetzel, P. Kleindl, I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4434–4442.
- [90] C. P. Leamon, J. A. Reddy, I. R. Vlahov, P. J. Kleindl, M. Vetzel, E. Westrick, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 1226–1232.
- [91] C. P. Leamon, J. A. Reddy, I. R. Vlahov, E. Westrick, N. Parker, J. S. Nicoson, M. Vetzel, *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1585–1592.
- [92] J. A. Reddy, R. Dorton, A. Dawson, M. Vetzel, N. Parker, J. S. Nicoson, E. Westrick, P. J. Klein, Y. Wang, I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1518–1525.
- [93] C. P. Leamon, J. A. Reddy, M. Vetzel, R. Dorton, E. Westrick, N. Parker, Y. Wang, I. Vlahov, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9839–9844.
- [94] C. P. Leamon, J. A. Reddy, I. R. Vlahov, M. Vetzel, N. Parker, J. S. Nicoson, L.-C. Xu, E. Westrick, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 803–811.
- [95] J. A. Reddy, E. Westrick, I. Vlahov, S. J. Howard, H. K. R. Santhapuram, C. P. Leamon, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 229–236.
- [96] R. J. Lee, P. S. Low, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3198–3204.
- [97] R. J. Lee, P. S. Low, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1995**, *1233*, 134–144.
- [98] Y. Rui, S. Wang, P. S. Low, D. H. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11213–11218.
- [99] Y. Lu, P. S. Low, *Cancer Immunol. Immunother.* **2002**, *51*, 153–162.
- [100] C. P. Leamon, J. A. Reddy, I. R. Vlahov, E. Westrick, A. Dawson, R. Dorton, M. Vetzel, H. K. Santhapuram, Y. Wang, *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 659–667.
- [101] J. Li, E. A. Sausville, P. J. Klein, D. Morgenstern, C. P. Leamon, R. A. Messmann, P. LoRusso, *J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *49*, 1467–1476.
- [102] G. M. van Dam, G. Themelis, L. M. Crane, N. J. Harlaar, R. G. Pleijhuis, W. Kelder, A. Sarantopoulos, J. S. de Jong, H. J. Arts, A. G. van der Zee, J. Bart, P. S. Low, V. Ntziachristos, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315–1319.
- [103] I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357–1369.
- [104] M. Fani, M. L. Tamia, G. P. Nicolas, E. Lasri, C. Medina, I. Raynal, M. Port, W. A. Weber, H. R. Maecke, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1136–1145.
- [105] E. Vlashi, J. E. Sturgis, M. Thomas, P. S. Low, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 1868–1875.
- [106] C. M. Paulos, M. J. Turk, G. J. Breur, P. S. Low, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1205–1217.
- [107] W. A. Henne, R. Rothenbuhler, W. Ayala-Lopez, W. Xia, B. Varghese, P. S. Low, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 1435–1440.
- [108] P. S. Low, A. C. Antony, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1055–1058.
- [109] E. Lazzeri, M. Manca, N. Molea, S. Marchetti, V. Consoli, L. Bodei, R. Bianchi, M. Chinol, G. Paganelli, G. Mariani, *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 606–614.
- [110] C. M. Paulos, B. Varghese, W. R. Widmer, G. J. Breur, E. Vlashi, P. S. Low, *Arthritis Res. Ther.* **2006**, *8*, R77.
- [111] Y. Lu, T. W. Stinnette, E. Westrick, P. J. Klein, M. A. Gehrke, V. A. Cross, I. R. Vlahov, P. S. Low, C. P. Leamon, *Arthritis Res. Ther.* **2011**, *13*, R56.
- [112] W. A. Henne, S. A. Kularatne, W. Ayala-López, D. D. Doornweerd, T. W. Stinnette, Y. Lu, P. S. Low, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 709–712.
- [113] J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J. X. Cheng, P. S. Low, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 462–468.
- [114] J. W. Lee, J. Y. Lu, P. S. Low, P. L. Fuchs, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 2397–2414.
- [115] D. A. Collins, H. P. Hogenkamp, *J. Nucl. Med.* **1997**, *38*, 717–723.
- [116] D. A. Collins, H. P. Hogenkamp, M. W. Gebhard, *Mayo Clin. Proc.* **1999**, *74*, 687–691.
- [117] S. Mundwiler, R. Waibel, B. Spingler, S. Kunze, R. Alberto, *Nucl. Med. Biol.* **2005**, *32*, 473–484.
- [118] S. Mundwiler, B. Spingler, P. Kurz, S. Kunze, R. Alberto, *Eur. J. Nucl. Med.* **2005**, *11*, 4089–4095.
- [119] J. D. Bagnato, A. L. Eilers, R. A. Horton, C. B. Grissom, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8987–8996.
- [120] R. Waibel, H. Treichler, N. G. Schaefer, D. R. van Staveren, S. Mundwiler, S. Kunze, M. Kuenzi, R. Alberto, J. Nuesch, A. Knuth, H. Moch, R. Schibl, P. A. Schubiger, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2904–2911.
- [121] S. S. Chang, D. S. O’Keefe, D. J. Bacich, V. E. Reuter, W. D. Heston, P. B. Gaudin, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 2674–2681.
- [122] D. A. Silver, I. Pellicer, W. R. Fair, W. D. Heston, C. Cordon-Cardo, *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 81–85.
- [123] R. L. Sokoloff, K. C. Norton, C. L. Gasior, K. M. Marker, L. S. Grauer, *Prostate* **2000**, *43*, 150–157.
- [124] T. Tsukamoto, K. M. Wozniak, B. S. Slusher, *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 767–776.
- [125] T. Liu, L. Y. Wu, M. R. Hopkins, J. K. Choi, C. E. Berkman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7124–7126.
- [126] S. A. Kularatne, C. Venkatesh, H.-K. R. Santhapuram, K. Wang, B. Vaitilingam, W. A. Henne, P. S. Low, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7767–7777.
- [127] S. A. Kularatne, Z. Zhou, J. Yang, C. B. Post, P. S. Low, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 790–800.
- [128] A. Dubrovska, C. Kim, J. Elliott, W. Shen, T.-H. Kuo, D.-I. Koo, C. Li, T. Tuntland, J. Chang, T. Groessl, X. Wu, V. Gorney, T. Ramirez-Montagut, D. A. Spiegel, C. Y. Cho, P. G. Schultz, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1223–1231.
- [129] Siehe Lit. [14].
- [130] M. Kaspar, L. Zardi, D. Neri, *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 1331–1339.
- [131] A. Naba, K. R. Clouser, S. Hoersch, H. Liu, S. A. Carr, R. O. Hynes, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, M111.014647.
- [132] D. Neri, R. Bicknell, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 436–446.
- [133] P. E. Thorpe, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 415–427.

- [134] D. Neri, C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 767–777.
- [135] A. Thiry, J. M. Dogne, B. Masereel, C. T. Supuran, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 566–573.
- [136] C. Kosmas, H. P. Kalofonos, V. Hird, A. A. Epenetos, *Oncology* **1998**, *55*, 435–446.
- [137] S. Pfaffen, K. Frey, I. Stutz, C. Roesli, D. Neri, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2010**, *37*, 1559–1565.
- [138] S. Pfaffen, T. Hemmerle, M. Weber, D. Neri, *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 836–847.
- [139] P. Seshacharyulu, M. P. Ponnusamy, D. Haridas, M. Jain, A. K. Ganti, S. K. Batra, *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, 15–31.
- [140] B. W. Park, H. T. Zhang, C. Wu, A. Berezov, X. Zhang, R. Dua, Q. Wang, G. Kao, D. M. O'Rourke, M. I. Greene, R. Murali, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 194–198.
- [141] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 301–317.
- [142] K. Y. Choi, M. Swierczewska, S. Lee, X. Chen, *Theranostics* **2012**, *2*, 156–178.
- [143] P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–219.
- [144] L. M. Mayr, D. Bojanic, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2009**, *9*, 580–588.
- [145] P. H. Bernardo, J. C. Tong, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *800*, 25–31.
- [146] J. W. Kehoe, B. K. Kay, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 4056–4072.
- [147] A. Plückthun, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *805*, 3–28.
- [148] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [149] S. L. Deutscher, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3196–3211.
- [150] P. Laakkonen, K. Vuorinen, *Integr. Biosci.* **2010**, *2*, 326–337.
- [151] M. Rusckowski, S. Gupta, G. Liu, S. Dou, D. J. Hnatowich, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2007**, *22*, 564–572.
- [152] J. Zou, V. V. Glinsky, L. A. Landon, L. Matthews, S. L. Deutscher, *Carcinogenesis* **2005**, *26*, 309–318.
- [153] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *Science* **1998**, *279*, 377–380.
- [154] S. Wang, W. J. Placzek, J. L. Stebbins, S. Mitra, R. Noberini, M. Koolpe, Z. M. Zhang, R. Dahl, E. B. Pasquale, M. Pellecchia, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2427–2436.
- [155] H. Witt, K. Hajdin, K. Iljin, O. Greiner, F. K. Niggli, B. W. Schafer, M. Bernasconi, *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2026–2032.
- [156] K. A. Kelly, S. R. Setlur, R. Ross, R. Anbazhagan, P. Waterman, M. A. Rubin, R. Weissleder, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 2286–2291.
- [157] R. J. Goodson, M. V. Doyle, S. E. Kaufman, S. Rosenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7129–7133.
- [158] Z. B. Li, G. Niu, H. Wang, L. He, L. Yang, M. Ploug, X. Chen, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 4758–4766.
- [159] B. K. Kay, N. B. Adey, Y. S. He, J. P. Manfredi, A. H. Matargan, D. M. Fowlkes, *Gene* **1993**, *128*, 59–65.
- [160] L. B. Giebel, R. T. Cass, D. L. Milligan, D. C. Young, R. Arze, C. R. Johnson, *Biochemistry* **1995**, *34*, 15430–15435.
- [161] M. A. McLafferty, R. B. Kent, R. C. Ladner, W. Markland, *Gene* **1993**, *128*, 29–36.
- [162] E. Koivunen, B. C. Wang, E. Ruoslahti, *Biotechnology* **1995**, *13*, 265–270.
- [163] P. Laakkonen, K. Porkka, J. A. Hoffman, E. Ruoslahti, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 751–755.
- [164] C. Heinis, T. Rutherford, S. Freund, G. Winter, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 502–507.
- [165] A. Angelini, L. Cendron, S. Chen, J. Touati, G. Winter, G. Zanotti, C. Heinis, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 817–821.
- [166] V. Baeriswyl, H. Rapley, L. Pollaro, C. Stace, D. Teufel, E. Walker, S. Chen, G. Winter, J. Tite, C. Heinis, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1173–1176.
- [167] R. W. Roberts, J. W. Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12297–12302.
- [168] N. A. Raffler, J. Schneider-Mergener, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 69–79.
- [169] S. W. Millward, S. Fiacco, R. J. Austin, R. W. Roberts, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 625–634.
- [170] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751–755.
- [171] Y. V. G. Schlippe, M. C. T. Hartman, K. Josephson, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10469–10477.
- [172] H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 357–360.
- [173] Y. Goto, T. Katoh, H. Suga, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 779–790.
- [174] C. J. Hipolito, H. Suga, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 196–203.
- [175] Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 607–613.
- [176] Y. Yamagishi, I. Shoji, S. Miyagawa, T. Kawakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1562–1570.
- [177] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381–5383.
- [178] F. Buller, Y. Zhang, J. Scheuermann, J. Schäfer, P. Bühlmann, D. Neri, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1075–1086.
- [179] F. Buller, M. Steiner, J. Scheuermann, L. Mannocci, I. Nissen, M. Kohler, C. Beisel, D. Neri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4188–4192.
- [180] C. E. Dumelin, S. Trüssel, F. Buller, E. Trachsel, F. Bootz, Y. Zhang, L. Mannocci, S. C. Beck, M. Drumea-Mirancea, M. W. Seeliger, C. Baltes, T. Müggler, F. Kranz, M. Rudin, S. Melkko, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3240–3245; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3196–3201.
- [181] L. Mannocci, S. Melkko, F. Buller, I. Molnar, J. P. Bianke, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1836–1841.
- [182] M. A. Clark, R. A. Acharya, C. C. Arico-Muendel, S. L. Belyanska, D. R. Benjamin, N. R. Carlson, P. A. Centrella, C. H. Chiu, S. P. Creaser, J. W. Cuozzo, C. P. Davie, Y. Ding, G. J. Franklin, K. D. Franzen, M. L. Gefter, S. P. Hale, N. J. Hansen, D. I. Israel, J. Jiang, M. J. Kavarana, M. S. Kelley, C. S. Kollmann, F. Li, K. Lind, S. Mataruse, P. F. Medeiros, J. A. Messer, P. Myers, H. O'Keefe, M. C. Oliff, C. E. Rise, A. L. Satz, S. R. Skinner, J. L. Svendsen, L. Tang, K. van Vloten, R. W. Wagner, G. Yao, B. Zhao, B. A. Morgan, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 647–654.
- [183] M. Leimbacher, Y. Zhang, L. Mannocci, M. Stravs, T. Geppert, J. Scheuermann, G. Schneider, D. Neri, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7729–7737.
- [184] L. Mannocci, M. Leimbacher, M. Wichert, J. Scheuermann, D. Neri, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12747–12753.
- [185] F. Buller, M. Steiner, K. Frey, D. Mircsof, J. r. Scheuermann, M. Kalisch, P. Bühlmann, C. T. Supuran, D. Neri, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 336–344.
- [186] R. E. Kleiner, C. E. Dumelin, G. C. Tiu, K. Sakurai, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11779–11791.
- [187] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601–1605.
- [188] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961–6963.
- [189] B. N. Tse, T. M. Snyder, Y. Shen, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15611–15626.
- [190] S. J. Wren, P. B. Harbury, *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 331–349.
- [191] S. J. Wren, R. M. Weisinger, D. R. Halpin, P. B. Harbury, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13137–13143.
- [192] M. H. Hansen, P. Blakskjaer, L. K. Petersen, T. H. Hansen, J. W. Hojfeldt, K. V. Gothelf, N. J. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1322–1327.
- [193] S. Melkko, J. Scheuermann, C. E. Dumelin, D. Neri, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 568–574.

- [194] S. Melkko, Y. Zhang, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 4755–4758; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4671–4674.
- [195] C. E. Dumelin, J. Scheuermann, S. Melkko, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 366–370.
- [196] J. Scheuermann, C. E. Dumelin, S. Melkko, Y. Zhang, L. Mannocci, M. Jaggi, J. Sobek, D. Neri, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 778–785.
- [197] S. Melkko, C. E. Dumelin, J. Scheuermann, D. Neri, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 225–231.
- [198] M. Ciobanu, K. T. Huang, J. P. Daguer, S. Barluenga, O. Chaloin, E. Schaeffer, C. G. Mueller, D. A. Mitchell, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9321–9323.
- [199] J. P. Daguer, M. Ciobanu, S. Alvarez, S. Barluenga, N. Winsinger, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 625–632.
- [200] Siehe Lit. [135].
- [201] L. Dubois, N. G. Liewes, A. Maresca, A. Thiry, C. T. Supuran, A. Scozzafava, B. G. Wouters, P. Lambin, *Radiother. Oncol.* **2009**, *92*, 423–428.
- [202] V. Akurathi, L. Dubois, N. G. Liewes, S. K. Chitneni, B. J. Cleynhens, D. Vullo, C. T. Supuran, A. M. Verbruggen, P. Lambin, G. M. Bormans, *Nucl. Med. Biol.* **2010**, *37*, 557–564.
- [203] A. A. Rabow, R. H. Shoemaker, E. A. Sausville, D. G. Covell, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 818–840.
- [204] M. D. Lee, G. A. Ellestad, D. B. Borders, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 235–243.
- [205] S. J. Gregson, P. W. Howard, J. A. Hartley, N. A. Brooks, L. J. Adams, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, D. E. Thurston, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 737–748.
- [206] W. Wrasidlo, D. S. Johnson, D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 631–636.
- [207] T. Shibue, I. Okamoto, N. Morita, H. Morita, Y. Hirasawa, T. Hosoya, O. Tamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 431–434.
- [208] M. V. Pimm, J. A. Clegg, M. C. Garnett, R. W. Baldwin, *Int. J. Cancer* **1988**, *41*, 886–891.
- [209] 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. Chari, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5620–5623.
- [210] J. A. Francisco, C. G. Cerveny, D. L. Meyer, B. J. Mixan, K. Klussman, F. Chace, S. X. Rejniak, K. A. Gordon, R. Deblanc, B. E. Toki, C.-I. Law, S. O. Doronina, C. B. Siegall, P. D. Senter, A. F. Wahl, *Blood* **2012**, *102*, 1458–1465.
- [211] D. Dornan, F. Bennett, Y. Chen, M. Dennis, D. Eaton, K. Elkins, D. French, M. A. T. Go, A. Jack, J. R. Junutula, H. Koeppen, J. Lau, A. Rawstron, X. Shi, N. Yu, S.-f. Yu, P. Yue, B. Zheng, A. G. Polson, *Blood* **2012**, *114*, 2721–2729.
- [212] G. Casi, N. Huguenin-Dezot, K. Zuberbuhler, J. Scheuermann, D. Neri, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5887–5892.
- [213] H. A. Burris 3rd, J. Tibbitts, S. N. Holden, M. X. Sliwkowski, G. D. Lewis Phillips, *Clin. Breast Cancer* **2011**, *11*, 275–282.
- [214] X. Sun, W. Widdison, M. Mayo, S. Wilhelm, B. Leece, R. Chari, R. Singh, H. Erickson, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 728–735.
- [215] A. D. Ricart, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6417–6427.
- [216] C. J. Pepper, R. M. Hambly, C. D. Fegan, P. Delavault, D. E. Thurston, *Cancer Res.* **2004**, *136*, 4–10.
- [217] Siehe Lit. [205].
- [218] L. Ducry, B. Stump, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 5–13.
- [219] M. Sani, G. Fossati, F. Huguenot, M. Zanda, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3596–3599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3526–3529.
- [220] G. D. Lewis Phillips, G. Li, D. L. Dugger, L. M. Crocker, K. L. Parsons, E. Mai, W. A. Blattler, J. M. Lambert, R. V. Chari, R. J. Lutz, W. L. Wong, F. S. Jacobson, H. Koeppen, R. H. Schwall, S. R. Kenkare-Mitra, S. D. Spencer, M. X. Sliwkowski, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9280–9290.
- [221] S. O. Doronina, T. D. Bovee, D. W. Meyer, J. B. Miyamoto, M. E. Anderson, C. A. Morris-Tilden, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1960–1963.
- [222] M. S. K. Sutherland, R. J. Sanderson, K. A. Gordon, J. Andreyka, C. G. Cerveny, C. Yu, T. S. Lewis, D. L. Meyer, R. F. Zabinski, S. O. Doronina, P. D. Senter, C.-L. Law, A. F. Wahl, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 10540–10547.
- [223] S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee, C. G. Cerveny, S. C. Alley, D. L. Meyer, E. Oflazoglu, B. E. Toki, R. J. Sanderson, R. F. Zabinski, A. F. Wahl, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 114–124.
- [224] L.-C. Sun, L. V. Mackey, J. Luo, J. A. Fuselier, D. H. Coy, *Clin. Med. Oncol.* **2008**, *491*–499.
- [225] G. Casi, D. Neri, *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 422–428.
- [226] I. Ojima, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 628–635.
- [227] C. D. Austin, X. Wen, L. Gazzard, C. Nelson, R. H. Scheller, S. J. Scales, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17987–17992.
- [228] A. D. Griffiths, S. C. Williams, O. Hartley, I. M. Tomlinson, P. Waterhouse, W. L. Crosby, R. E. Kontermann, P. T. Jones, N. M. Low, T. J. Allison, T. D. Prospero, H. R. Hoogenboom, A. Nissim, J. P. L. Cox, J. L. Harrison, M. Zaccole, E. Gherardi, G. Winter, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3245–3260.
- [229] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253–265.
- [230] J. E. Visvader, G. J. Lindeman, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 755–768.
- [231] P. Marcato, C. A. Dean, C. A. Giacomantonio, P. W. K. Lee, *Cell Cycle* **2011**, *10*, 1378–1384.
- [232] T. Wirth, K. Schmuck, L. F. Tietze, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2928–2931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2874–2877.
- [233] N. M. Okeley, J. B. Miyamoto, X. Zhang, R. J. Sanderson, D. R. Benjamin, E. L. Sievers, P. D. Senter, S. C. Alley, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 888–897.
- [234] X. Huang, G. Molema, S. King, L. Watkins, T. S. Edgington, P. E. Thorpe, *Science* **1997**, *275*, 547–550.