

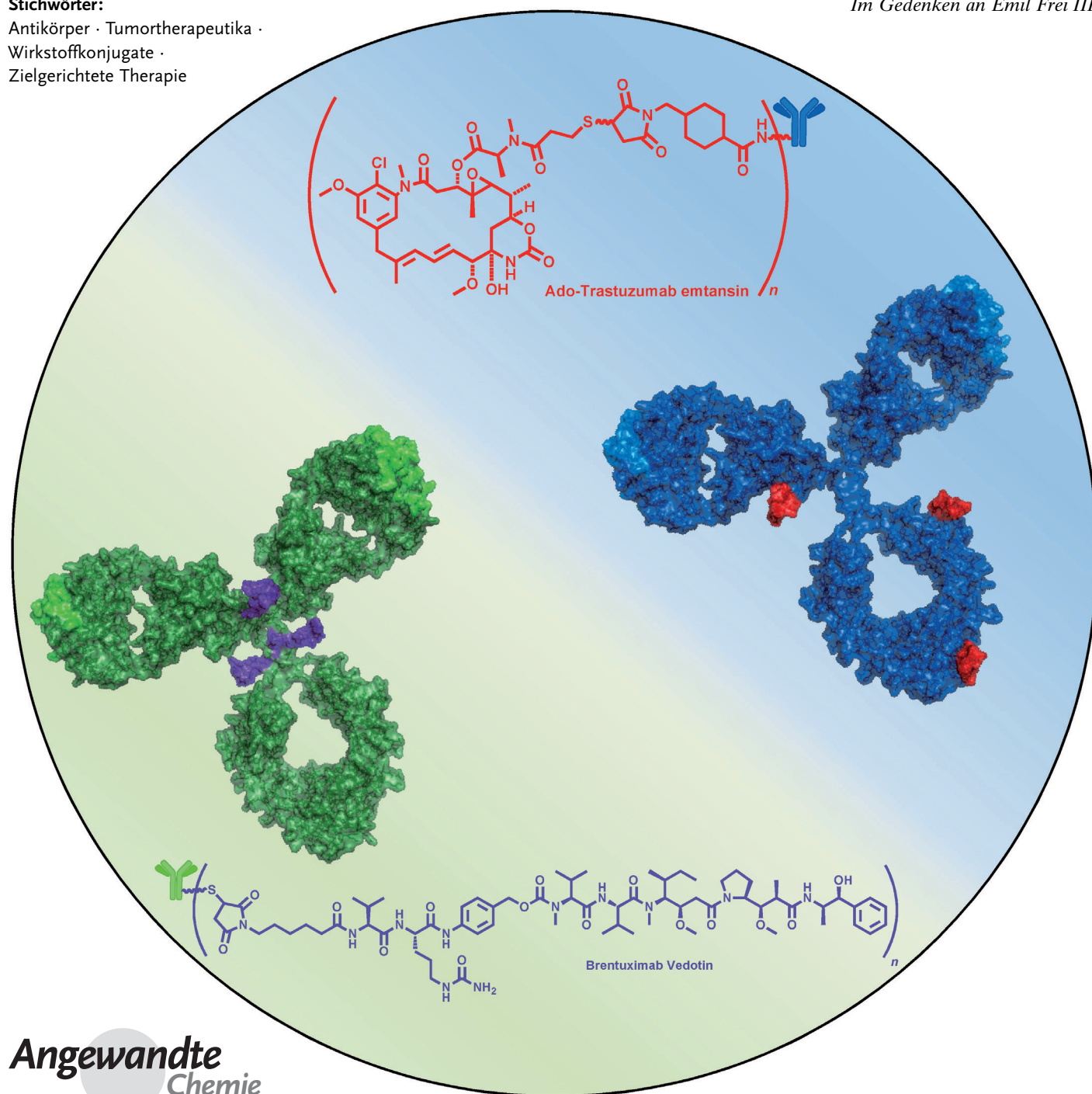
Antikörper-Wirkstoff-Konjugate: ein neues Konzept in der Krebstherapie

Ravi V. J. Chari,* Michael L. Miller und Wayne C. Widdison

Stichwörter:

Antikörper · Tumortheraeutika ·
Wirkstoffkonjugate ·
Zielgerichtete Therapie

Im Gedenken an Emil Frei III



Herkömmliche Chemotherapeutika gegen Krebs gehen oft mit einer systemischen Toxizität im Patienten einher. Einen alternativen, tumorselektiven Behandlungsansatz bieten monoklonale Antikörper gegen Antigene oder Krebszellen. Allerdings sind die meisten monoklonalen Antikörper nicht wirksam genug, um allein für sich therapeutisch aktiv zu sein. Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) verwenden Antikörper, um eine potente cytotoxische Verbindung selektiv zu Tumorzellen zu befördern, und erhöhen so die therapeutische Breite chemotherapeutischer Wirkstoffe. Die kürzlich erfolgte Zulassung zweier ADCs, Brentuximab Vedotin und Ado-Trastuzumab Emtansin, zur Krebsbehandlung hat dem Forschungsinteresse auf diesem Gebiet weiteren Schub verliehen. Dieser Aufsatz beschreibt, wie die Erkenntnisse aus Studien an den ADCs der ersten Generation zu erfolgreichen Verbesserungen aller Komponenten – Antikörper, cytotoxische Verbindung und Linker – geführt haben. Die Ausgestaltung von in der klinischen Entwicklung befindlichen ADCs sowie Ergebnisse mechanistischer Studien und präklinischer und klinischer Tests werden diskutiert, ebenso wie neu aufkommende Technologien, die zu weiteren Fortschritten in diesen aufregenden Gebiet führen werden.

1. Einleitung

Im 20. Jahrhundert war die Chemotherapie oder die „Behandlung mit Chemikalien“ die vorherrschende Art der Krebstherapie.^[1,2] Der Einsatz von Chemotherapeutika basiert auf der Annahme, dass diese Substanzen bevorzugt schnellteilende Krebszellen abtöten, normale Zellen aber verschonen. Die ersten Chemotherapeutika, die im Menschen getestet wurden, waren Chlorambucil und Cyclophosphamid aus der Gruppe der Stickstoff-Senfgasverbindungen, die aufgrund ihrer DNA-alkylierenden Wirkung cytotoxisch sind. Auch wenn der Erfolg nur von kurzer Dauer war, löste er einen stetigen Strom neuer Tumortheraeutika mit verbesserter Aktivität aus. Die Erkenntnis, dass Folsäure das Wachstum von Krebszellen fördert, führte zur Synthese von Antifolaten wie Methotrexat als Chemotherapeutika. Angeregt durch die neu aufgeklärte DNA-Struktur wurden Substanzen entwickelt, die die DNA-Synthese störten und den Zelltod verursachten. Dazu gehörten Nucleosidanaloge wie Thioguanin, 5-Fluoruracil und Cytosinarabinosid (ara-C). Danach erschienen Substanzen wie Cisplatin auf der Bildfläche, die mit der DNA wechselwirken, sowie Antitumor-Antibiotika aus Bakterienfermentationen wie Actinomycin D und die Anthracycline. Wirkstoffe, die Tubulin angreifen (z. B. die Vincaalkaloide aus Pflanzen) wurden ebenfalls klinisch getestet.

Es gab zwar in den späten 1980er Jahren eine Fülle von Substanzen im Antitumor-Arsenal, doch litten sie alle unter einem Mangel an Wirksamkeit, weil die Tumorselektivität fehlte und auch normale Zellen abgetötet wurden, beispielsweise im Knochenmark und im Magen-Darm-Trakt. Die meisten Chemotherapeutika mussten fast in der maximal

tolerierten Dosis (MTD) eingesetzt werden, um einen therapeutisch signifikanten Effekt zu erzielen. Ein wichtiger Meilenstein der Chemotherapie war die Einführung des Konzepts von Wirkstoffkombinationen.^[3] Substanzen mit nicht-überschneidenden Toxizitätsprofilen und unterschiedlichen Wirkmechanismen konnten oft in voller Dosis mit daraus resultierenden additiven oder synergistischen Effekten und einer verbesserten Antitumor-Aktivität eingesetzt werden. So wurde die Mehrfachtherapie zur Standardbehandlung bei den meisten Krebsarten. Bei einer solchen intensiven Chemotherapie blieb die systemische Toxizität gegenüber dem Patienten ein gewichtiger Nachteil cytotoxischer Substanzen, und Heilung konnte nur bei wenigen Krebsarten erzielt werden.

Die begrenzte klinische Wirksamkeit der Krebsmedikamente, allein oder in Kombination, lässt sich auf die ungenügende therapeutische Breite der Verbindungen zurückführen, also die mangelnde Fähigkeit, genügend Tumorzellen abzutöten ohne ansonsten toxisch zu wirken. Einer Schätzung zufolge müssen mehr als 99 % der Tumorzellen abgetötet werden, um eine vollständige Remission zu erreichen, und noch wesentlich mehr für eine Entfernung des Tumors.^[3] Um die therapeutische Breite der Wirkstoffe zu verbessern, müsste entweder die Wirksamkeit der cytotoxischen Substanz

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3873
2. Zielgerichtete Therapien	3875
3. Die erste Generation der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate	3878
4. Verbesserte Antikörper-Wirkstoff-Konjugate: zentrale Erfordernisse	3879
5. Antimitotische Substanzen als ADC-Nutzlast	3880
6. DNA-wirksame Substanzen als ADC-Beladung	3890
7. Klinische Ergebnisse	3895
8. Neu aufkommende Technologien	3897
9. Zusammenfassung und Ausblick	3901

[*] Dr. R. V. J. Chari, Dr. M. L. Miller, Dr. W. C. Widdison
ImmunoGen, Inc.
830 Winter St, Waltham, MA 02451 (USA)
E-Mail: ravi.chari@immunogen.com
Homepage: <http://www.immunogen.com>

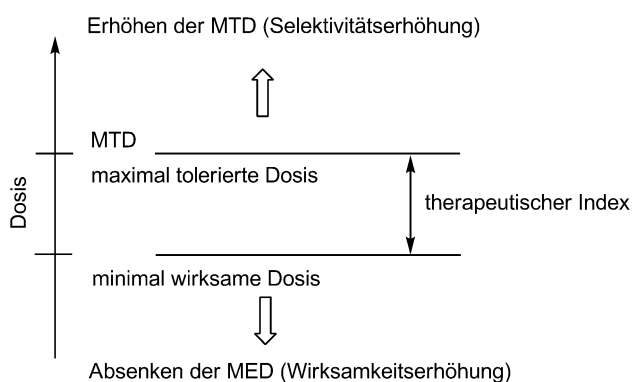


Abbildung 1. Ansatz zur Optimierung der therapeutischen Breite.

verbessert werden, um die minimale effektive Dosis (MED) zu erniedrigen, oder die Tumorselektivität müsste erhöht werden, um die maximal tolerierte Dosis anzuheben (Abbildung 1). Im Idealfall würde man eine Substanz entwickeln, die sowohl eine niedrigere MED als auch eine höhere MTD aufweist, sodass die therapeutische Breite insgesamt ansteigt.

Die Erkenntnis, dass viele Chemotherapeutika von natürlichen Quellen wie Pflanzen, marinen oder mikrobiellen Organismen abgeleitet sind, beflügelte die aktive Suche der Medizinalchemiker bei den Naturstoffen, um neue cytotoxische Verbindungen mit viel höherer Wirksamkeit als die bekannten Antitumorsubstanzen zu entdecken. Eine der ersten dieser Verbindungen, die viel Aufregung hervorrief, war Maytansin (**1**), ein makrocyclisches Molekül aus einer Verbindungsklasse, die Maytansinoide genannt wurde und die von Kupchan et al. aus dem äthiopischen Strauch *Maytenus ovatus* isoliert wurde.^[4,5] Maytansin erwies sich als starker Inhibitor der Tubulinpolymerisation und damit als hochpotenter Mitosehemmstoff.^[6] Es war eine der ersten Verbindungen, die Tumorzellen mit IC_{50} -Werten im pikomolaren Bereich abtöten, und war mehrere Größenordnungen giftiger als die klinisch eingesetzten Verbindungen wie Doxorubicin, Methotrexat oder 5-Fluoruracil. Maytansin wurde schnell in die klinische Erprobung gebracht. Nach den Phase-II-Studien wurde die Entwicklung jedoch wegen ungenügender Antitumor-Aktivität abgebrochen. Übereinstimmend mit der hohen In-vitro-Wirksamkeit war die MTD im Menschen (2 mg m^{-2}) viel niedriger als bei Chemotherapeutika wie Doxorubicin (Dosis: $60\text{--}75 \text{ mg m}^{-2}$).^[7] Die wichtigsten dosislimitierenden

Nebenwirkungen waren die Effekte auf den Magen-Darm-Trakt und periphere Neuropathie.

Daneben wurden noch einige andere potente Substanzen entdeckt und klinisch getestet, die mit Tubulin wechselwirken (Abbildung 2). Pettit und Mitarbeiter isolierten eine Familie cytotoxischer Peptide, die Dolastatine, aus der marinen schalenlosen Molluske *Dolabella auricularia*. Am besten untersucht sind die linearen Peptide Dolastatin 10 (**2a**) und Dolastatin 15 (**2b**).^[8,9] Wie Maytansin sind auch diese Verbindungen wirksame Hemmstoffe der Tubulinpolymerisation, und sie induzierten das Absterben von Krebszellen in vitro in pikomolaren Konzentrationen. In klinischen Phase-I-Studien ergab sich eine MTD von **2a** von 0.4 mg m^{-2} , was noch niedriger lag als bei Maytansin.^[10] Die dosislimitierende Toxizität wurde hauptsächlich durch hämatologische Effekte bestimmt, darunter auch Neutropenie und Granulocytopenie. In den klinischen Phase-II-Studien gegen eine Reihe von Tumorarten, darunter Melanome, Nierenkrebs, Sarkome und Brustkrebs, konnte kein klinischer Nutzen nachgewiesen werden, und die Entwicklung von Dolastatin 10 wurde beendet.^[11] Das Dolastatin-15-Analogon Cemadotin (**2c**) und das Analogon der nächsten Generation, Tasidotin (**2d**), das durch die Hydrolysebeständigkeit gegenüber Prolyloligopeptidasen metabolisch stabilisiert worden war, wurden ebenfalls klinisch getestet, hatten aber auch keine nennenswerte Aktivität. Der mangelnde therapeutische Nutzen dieser Verbindungen verhinderte nicht die Entwicklung einer anderen Klasse potenter Tubulinhemmer, der Cryptophycine, einer Familien von Makroliden aus der blaugrünen Alge *Nostoc* sp. (Cyanobakterien). Cryptophycin 1 (**3a**) war die Hauptkomponente des Algenextrakts, auf die der größte Anteil der Cytotoxizität zurückgeht. Das synthetische Analogon Cryptophycin 52 (**3b**), das an C6 der C-Untereinheit geminal dimethyliert ist, tötet Krebszellen in vitro in pikomolaren Konzentrationen ab und wurde in die klinische Entwicklung aufgenommen.^[12] Aber auch hier war die verabreichbare Dosis sehr niedrig (MTD von 1.5 mg m^{-2}), und eine ausreichende therapeutische Aktivität wurde nicht erreicht. So reihten sich die Cryptophycine bei den anderen hochwirksamen Tubulinhemmern ein, die die Hoffnung nicht erfüllten, dass sich eine höhere Wirksamkeit in einer besseren klinischen Aktivität widerspiegeln würde. Eine Ausnahme von diesem allgemeinen Trend ist die vor kurzem erfolgte Zulassung von Eribulinmesylat (**3c**) für die Behandlung von metastasierendem Brustkrebs. Dieser Wirkstoff ist ein voll-



Ravi V. J. Chari promovierte in Chemie an der University of Detroit. Es folgten ein Postdoktorat in Yale an der School of Medicine und der Wechsel an das Dana-Farber Cancer Institute der Harvard Medical School. 1988 begann er bei ImmunoGen seine Forschungen über Antikörper-Wirkstoff-Konjugate gegen Krebserkrankungen. Aktuell ist er dort Executive Director, Chemistry & Biochemistry.



Michael L. Miller erhielt seinen B.S. 1994 an der Memphis State University und promovierte 1998 an der University of Memphis. Nach einem Postdoktorat bei Professor Iwao Ojima an der State University of New York in Stony Brook wechselte er im Jahr 2000 an das Chemistry Department von ImmunoGen, wo er an der Entwicklung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten forscht.

synthetisches Analogon von Halichondrin, einem Tubulinpolymerisationshemmer aus dem marinen Schwamm *Halichondria okadai*.^[14]

Als der klinische Erfolg dieser cytotoxischen Verbindungen ausblieb, war nicht klar, ob dies eine Folge der extrem starken Wirkung war, die die Substanzen bereits bei niedrigen Dosen cytotoxisch werden ließ, oder des Wirkmechanismus, denn alle waren Hemmstoffe der Tubulinpolymerisation. Die Ergebnisse klinischer Tests wirksamer Verbindungen (Abbildung 3) mit einem anderen Mechanismus der Zelltötung sollten hier weiterhelfen. Die Isolierung und Strukturaufklärung des mikrobiellen Naturstoffs CC-1065 (**4a**), der stark cytotoxisch ist und sequenzselektiv in die kleine Furche der DNA bindet und diese alkylt, regte die Synthese weiterer einfacher Verbindungen an.^[15] Diese behielten die In-vitro-Wirksamkeit der Ausgangsverbindung gegen Tumorzellen im pikomolaren Bereich. Mehrere dieser Verbindungen, darunter Adozelesin (**4b**), eine Vorstufe von Carzelesin (**4c**), das noch wirksamere Dimer Bizelesin (**4d**) und das synthetische Duocarmycin-Analogon KW-2189 (**4e**) wurden klinisch am Menschen getestet.^[16–19] Diese DNA-Alkylantien erlitten dasselbe Schicksal wie die oben beschriebenen wirksamen Tubulinhemmer: Klinisch wurden nur sehr geringe Dosen toleriert (MTD von 0.001 mg m^{-2} für **4d** bis 0.4 mg m^{-2} für **4e**), und die Aktivität war unzureichend. Jüngst wurde mit dem Pyrrolobenzodiazepin-Dimer SJG-136 (**4f**) die klinische Phase I abgeschlossen, und zwar wiederum mit einem niedrigen MTD (0.045 mg m^{-2}).^[20] Die klinische Phase II läuft aktuell noch. Mit wenigen Ausnahmen erweitert die reine Verstärkung der Abtötungsleistung cytotoxischer Substanzen offenbar nicht die therapeutische Breite der Chemotherapie.

2. Zielgerichtete Therapien

Zielgerichtete Therapieansätze sollen spezifisch molekulare Zielstrukturen und Wege beeinflussen, die wichtig für die Proliferation der Tumorzellen sind. Diese Zielstrukturen werden bevorzugt intrazellulär oder auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert. Zielgerichtete Therapien haben das Potenzial, Verbindungen zu liefern, die selektiv cytotoxisch auf Tumorzellen wirken, dabei für den Wirt aber weniger toxisch sind, was die therapeutische Breite vergrößert. Entsprechende Arbeiten befassen sich überwiegend mit a) Inhibitoren der Rezeptor-Tyrosinkinasen, b) monoklonalen Antikörpern, c) Antikörper-Wirkstoffkonjugaten (ADCs; anti-

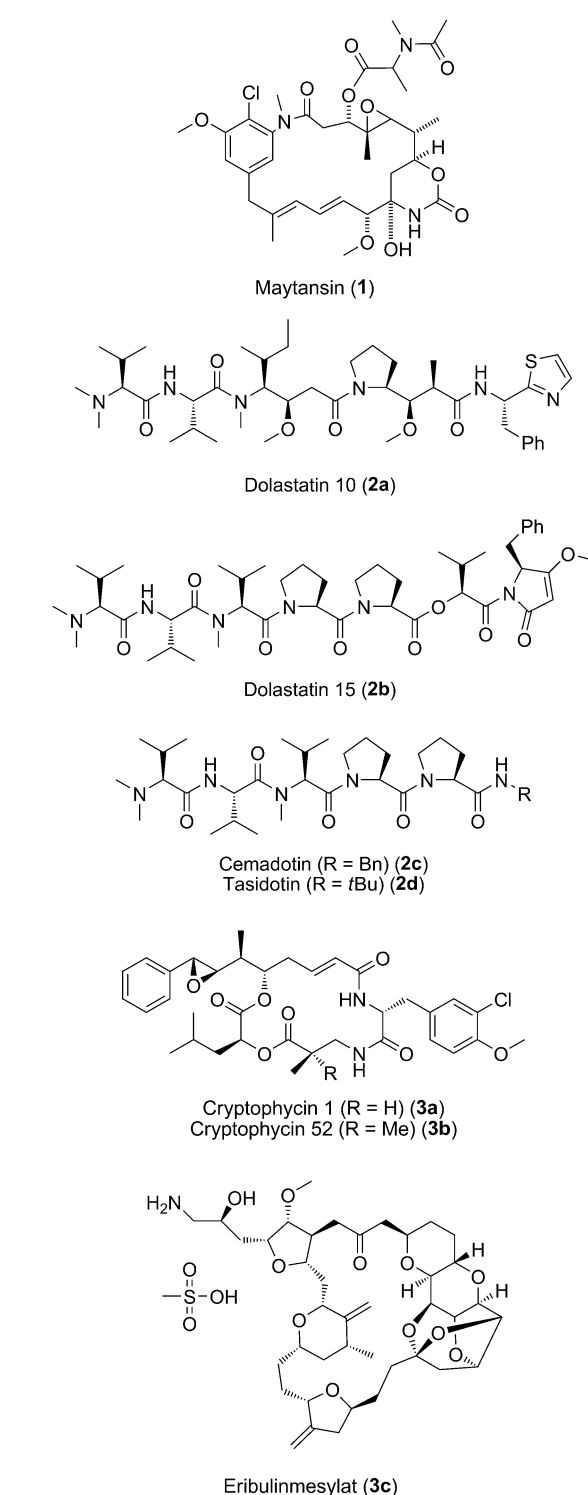


Abbildung 2. Strukturen tubulinbindender cytotoxischer Verbindungen.



Wayne C. Widdison promovierte 1991 in organischer Chemie bei Professor John E. Baldwin an der Syracuse University. Nach einem Postdoktorat in Stanford wechselte er 1993 an das Chemistry Department bei Immunogen, wo er aktuell Principal Scientist ist. Seine Forschungen befassen sich mit der Entwicklung von Maytansinoiden und Linkern für die Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten.

body-drug conjugates), d) Konjugaten aus niedermolekularen zielgerichteten Wirkstoffen und e) Antisense- und siRNA-Ansätzen. Der erste klinische Erfolg eines derartigen Therapieansatzes beflügelte diese Felder der Entwicklung von Tumortheraeutika. In dem Jahr von Oktober 2011 bis Oktober 2012 waren vier der sieben neu von der FDA zuge-

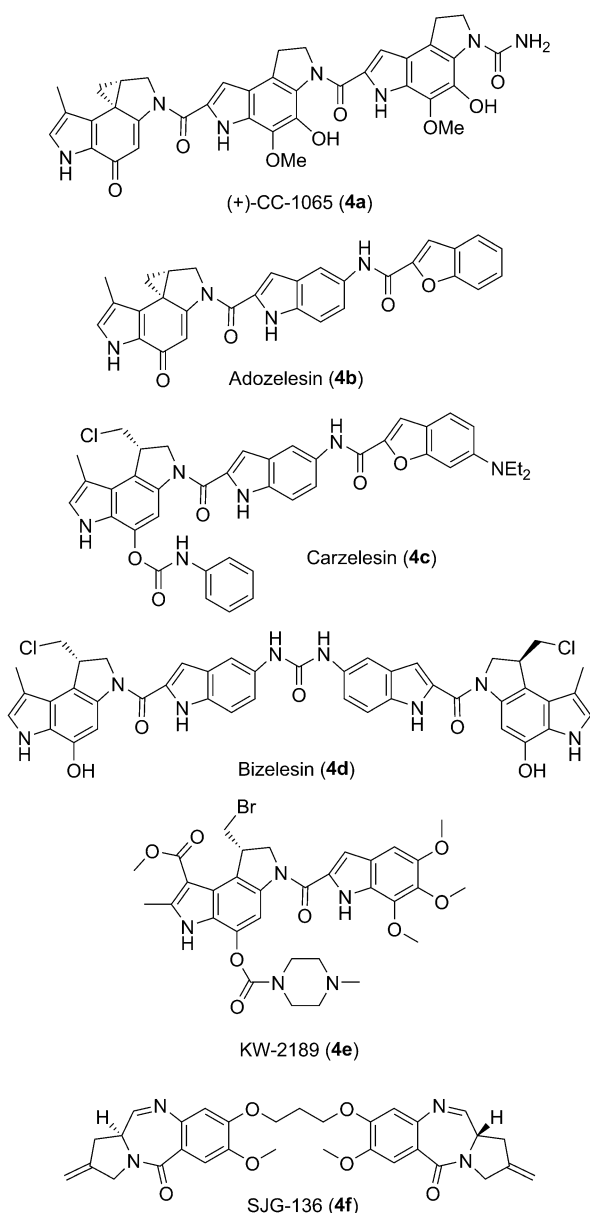


Abbildung 3. Strukturen DNA-alkylierender und -vernetzender cytotoxischer Verbindungen.

lassenen Tumortheraeutika zielgerichtete Substanzen, was die Hoffnungen auf diesen Ansatz weiter stärkt.

Zu den von Medizinalchemikern in der Krebsforschung am häufigsten bearbeiteten Zielstrukturen gehören die Tyrosinkinasen, Enzyme, die die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat auf ein Proteinsubstrat katalysieren. In Tumorzellen sind manche Tyrosinkinasen an Schlüsselpositionen nicht korrekt reguliert, wodurch es zur überschießenden Phosphorylierung der Zielproteine und andauernder Signalauslösung und Zellproliferation kommt. Zudem können Tyrosinkinasen in Tumorzellen überexprimiert werden oder in abweichenden (mutierten) Formen vorkommen, die das Wachstum der Krebszellen stimulieren.^[21,22] Die meisten dieser Kinaseinhibitoren sind heterocyclische Verbindungen, die mit ATP um die Bindung an

die aktive Konformation des Enzyms konkurrieren. Imatinib-mesylat war die erste Verbindung dieser Klasse, die 2001 von der FDA zur Behandlung chronisch myeloischer Leukämie (CML) zugelassen wurde. Imatinib war gegen das BCR-ABL-Protein gerichtet, ein mutiertes Fusionsprotein, das in den Leukämiezellen fast aller CML-Patienten vorkommt. Imatinib hemmt kompetitiv die Bindung von ATP an die BCR-ABL-Tyrosinkinase und hemmt spezifisch die Proliferation von CML-Zellen. Auf den Erfolg von Imatinib folgte zwei Jahre später die Zulassung von Gefitinib, einem selektiven Hemmstoff der Rezeptor-Tyrosinkinase des epidermalen Wachstumsfaktors. Bislang sind mindestens 20 Kinaseinhibitoren gegen verschiedene Tumorindikationen zugelassen. Viele der frühen Kinasehemmstoffe entfalten ihre cytotoxische Wirkung durch den Angriff auf eine spezifische Kinase. Um die Zahl der gehemmten Kinasen zu vergrößern, werden intensiv Hemmstoffe gesucht, die mehr als ein Zielprotein treffen. Es ist allerdings noch nicht klar, ob eine niedrigere Selektivität solcher Verbindungen verstärkte Nebenwirkungen mit sich bringt.

Ein anderer neu aufkommender zielgerichteter Therapieansatz ist der Einsatz niedermolekularer Substanzen, die selektiv an die Oberfläche von Tumorzellen binden und dort eine cytotoxische Komponente freisetzen.^[23] Am weitesten entwickelt ist ein Folat-Vinkaalkaloid-Konjugat. In diesem Konjugat bindet das tumorselektive Element, Folsäure, mit hoher Affinität an den Folatrezeptor, der auf der Oberfläche diverser Tumoren überexprimiert wird, insbesondere auf Eierstock- und nichtkleinzelligen Lungentumoren. Das Konstrukt besteht aus Folsäure, die über eine Disulfidbrücke und einen Pentapeptid-Spacer an Desacetylvinblastin-Monohydrazid gebunden ist. Das Folatkonjugat zeigte gute dosisabhängige Antitumor-Aktivität in einem Folatrezeptor-positiven Tumor-Xenograftmodell und war signifikant aktiver als das unkonjugierte Vinkaalkaloid. Die gleichzeitige Verabreichung eines Überschusses an unkonjugierter Folsäure hob die Aktivität des Konjugats auf und bestätigte damit die Tumorspezifität.^[24,25] Dieses Konjugat befindet sich gegenwärtig in fortgeschrittener klinischer Erprobung.

2.1. Monoklonale Antikörper in der Krebsbehandlung

Die Erkenntnis, dass Krebszellen spezifische molekulare Marker besitzen, die eine Rolle bei Wachstum und Progression der Tumoren spielen, hat neue Ansätze eröffnet, um diese Marker spezifisch zu adressieren. Die Marker, auch als Antigene bezeichnet, sind meist Zelloberflächenproteine, -glycoproteine oder -kohlenhydrate. Im Idealfall werden sie selektiv auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert und finden sich nur minimal in normalen Geweben. In vielen Fällen wird das Antigen überexprimiert oder liegt in mutierter Form auf den Tumorzellen vor. Die Immunisierung von Mäusen mit humanen Krebszellen oder gereinigtem Antigen induziert eine markerspezifische Antikörperreaktion im Serum dieser Tiere. Die Antikörper konnten zwar spezifisch das gewünschte Antigen binden, hatten aber oft nur einen niedrigen Titer und lagen als Gemisch mit nichtspezifischen Antikörpern vor. Die Entwicklung der Hybridoma-

Technik durch Köhler und Milstein im Jahr 1975^[26] brachte einen erheblichen Fortschritt, denn nun wurde die Produktion großer Mengen eines einzelnen gereinigten Antikörpers gegen das gesuchte Antigen möglich. Dazu werden antikörperproduzierende B-Lymphocyten aus Mäusen isoliert und durch Fusion mit einer Maus-Myelomzelllinie immortalisiert. Die daraus entstehenden klonalen Zellen, Hybridoma genannt, können in vitro in Zellkulturflaschen oder Bioreaktoren zur Produktion der spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb) gezüchtet werden. Die Effizienz der Tumorzellabtötung durch monoklonale Antikörper schwankt stark, je nachdem, welches Zielantigen angesprochen wird. Antikörper können das Absterben der Krebszellen über eine Reihe von Mechanismen auslösen, darunter a) immunvermittelte Funktionen wie antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC), b) komplementabhängige Cytotoxizität (CDC), c) antikörperabhängige Phagozytose, d) Störung der Tumorzell-Signalwege, die oft durch die Rezeptorblockierung verursacht wird, e) Abfangen zirkulierender Tumorzellen durch die direkte Bindung an den Antikörper, f) Apoptose und g) Immunmodulation der T-Zellfunktion.^[27,28]

Der erste klinische Versuch mit monoklonalen Antikörpern am Menschen wurde 1980 durchgeführt, als ein Lymphom-Patient mit dem murinen monoklonalen Antikörper AB 89 behandelt wurde.^[29] In den Folgejahren wurden klinische Studien mit verschiedenen Maus-mAbs durchgeführt. Dabei wurde das Problem offenbar, dass eine Immunantwort gegen die Maus-mAbs als Fremdprotein induziert wurde und humane anti-Maus-Antikörper (HAMA) gebildet wurden. Dadurch wurden die Mausantikörper schnell aus dem Kreislauf eliminiert. Technische Fortschritte mit rekombinanter DNA ermöglichten die Erzeugung angepasster Antikörper, in denen maustypische Proteinsequenzen der Antikörper durch solche ersetzt wurden, die natürlicherweise in humanen Antikörpern vorkommen, ohne die spezifische Bindung des Antikörpers an sein Antigen zu beeinträchtigen. In den ersten derartigen Konstrukten ersetzten die Molekularbiologen nur die gesamten konstanten Regionen der murinen Antikörper durch die entsprechenden Sequenzen humaner Antikörper, während die murinen variablen Domänen (Fv), die für die Antigenbindung verantwortlich sind, erhalten wurden (Abbildung 4). Diese „chimären“ Antikörper enthielten noch immer signifikante murine Sequenzanteile; weitere Fortschritte beim Anpassen der Antikörper ergaben neue „Humanisierungs“-Verfahren, die das Ersetzen muriner Fv-Sequenzen durch analoge humane Sequenzen erleichterten. Im humanisierten Antikörper blieben nur die entscheidenden Antigen-erkennenden murinen Reste erhalten, die innerhalb der Fv-Domänen die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs) ausmachen, während die übrigen Sequenzen durch humane Fv-Sequenzen ersetzt waren. Das Aufkommen der Phagen-

Displaytechnik und transgener Mäuse, die das humane Repertoire trugen, zeigten neue Wege für die Erzeugung rein humaner Antikörper auf, bei denen keine zusätzlichen Anpassungen für den Einsatz in der Humantherapie notwendig waren.^[30] Mit diesen Fortschritten konnte eine Immunantwort, wie sie gegen Mausantikörper induziert wurde, reduziert oder vermieden werden. Außerdem ist die Serum-Halbwertszeit der neuen Konstrukte deutlich länger ($T_{1/2}$ bis zu 3 Wochen) als die der murinen Gegenstücke (typischerweise 2 bis 3 Tage).

Der erste monoklonale Antikörper zur Krebsbekämpfung, Rituximab, wurde 1997 von der FDA zur Behandlung von Rückfällen oder bei Behandlungsresistenz von nicht fortgeschrittenem oder follikulären non-Hodgkin-Lymphom mit CD20-positiven B-Zellen zugelassen.^[31] Rituximab ist ein chimärer Antikörper, der an das CD20-Antigen bindet, das auf der Oberfläche der meisten B-Zell-Lymphome exprimiert wird. Danach wurden der anti-CD-52-Antikörper Alemtuzumab und der anti-CD20-Antikörper Ofatumumab für die Behandlung chronisch lymphatischer Leukämie zugelassen. Während diese drei zur Behandlung hämatologischer Entartungen zugelassenen Antikörper als Monotherapie eingesetzt wurden, zeigen die von der FDA zugelassenen Antikörper gegen solide Tumore oft nur mäßige Aktivität und werden typischerweise in Kombination mit Chemotherapeutika verabreicht. So werden die humanisierten Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab, die gegen das HER-2-Antigen gerichtet sind, das auf einem Teil der Mammakarzinome und einigen Magentumoren überexprimiert wird, oft gleichzeitig mit einer Chemotherapie appliziert. In ähnlicher Weise werden die anti-EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab und

Struktur von murinen und humanisierten Antikörpern

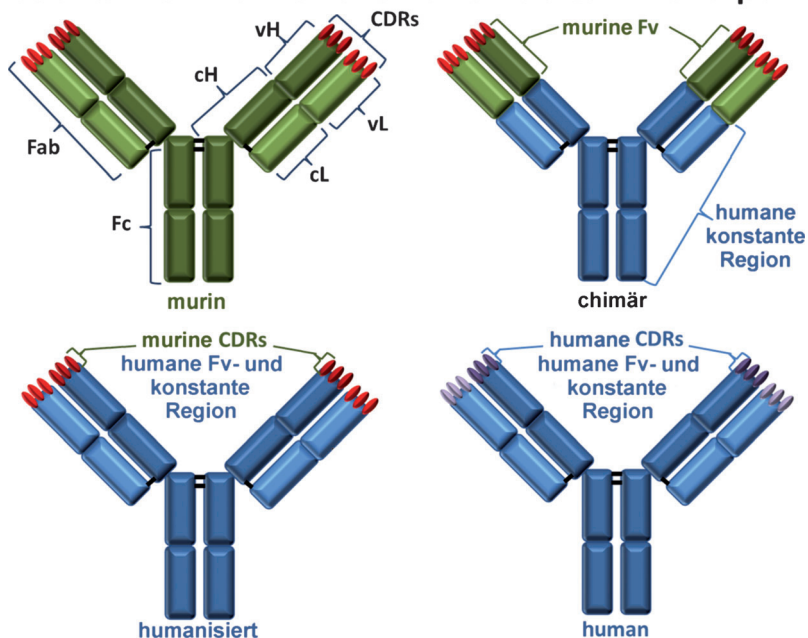


Abbildung 4. Eine schematische Darstellung von Maus- (grün), chimären, humanisierten und humanen (blau) Antikörpern. Die Antikörper-Subdomänen sind bezeichnet: Fab, Fc, schwere variable Kette (vH), leichte variable Kette (vL), schwere konstante Kette (cH), leichte konstante Kette (cL) und die komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs).

Panitumumab mit Chemostatika zur Behandlung von kolorektalen, Kopf- und Nackentumoren kombiniert. Bevacizumab, ein antiangiogener Antikörper, der VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) bindet, wurde in Kombination mit einer Chemotherapie gegen eine Reihe solider Tumoren zugelassen. Eine solche Kombinationstherapie hat den Nachteil, dass die toxischen Nebenwirkungen des cytotoxischen Wirkstoffs erhalten bleiben. Vor kurzem wurde Ipilimumab, ein Antikörper, der das Immunsystem durch Bindung an CTLA-4 aktiviert, für die Behandlung fortgeschrittener Melanome zugelassen. Ipilimumab ist einer der wenigen Antikörper, die genügend Aktivität für eine Monotherapie gegen solide Tumoren aufweisen. In den 32 Jahren seit der klinischen Testung des ersten monoklonalen Antikörpers wurden bislang nur 8 Antikörper für die Krebstherapie zugelassen, und nur zwei Zelloberflächenantigene aus der Familie der ErbB-Rezeptoren (HER-2 und EGFR) wurden erfolgreich von Antikörpern bei der Behandlung solider Tumoren adressiert.

3. Die erste Generation der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate

Das Konzept der Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) entstand wegen der Notwendigkeit, die Tumorselektivität klinisch eingesetzter Antitumor-Verbindungen zu verbessern. Während die Rolle monoklonaler Antikörper bei der Krebstherapie noch genauer definiert werden musste, war bereits klar, dass viele Antikörper bevorzugt an Tumorzellen binden und daher als Vehikel für eine selektive Freisetzung des Antitumor-Wirkstoffs dienen können. In der ersten Serie von ADCs, die hergestellt und getestet wurden, wurden die Antitumor-Verbindungen Methotrexat, Vinblastin, Doxorubicin und Melphalan an monoklonale Antikörper gekuppelt. Dabei wurde schon früh festgestellt, dass die Art der Verbindungsgruppen zwischen monoklonalem Antikörper und Wirkstoff von Bedeutung ist. Nach Internalisierung in die Zielzelle sollte ein intrazellulärer Spaltungsmechanismus diese Verbindung trennen und die aktive Substanz freisetzen. Unter diesen Verbindungsgruppen befinden sich säurelabile Gruppen, die den sauren pH (≈ 5) des intrazellulären Endosoms benötigen, und enzymatisch spaltbare Gruppen, die von lysosomalen Enzymen wie Peptidasen und Esterasen abhängen.

Die In-vitro-Prüfung dieser Konjugate der ersten Generation an Tumorzelllinien der Zielzellen ergab in den meisten Fällen nur eine mäßige Aktivität, oft geringer als die der Ausgangssubstanzen. Eine gegen die Zielzelle spezifisch gerichtete Wirkung wurde in vitro selten nachgewiesen, wahrscheinlich, weil die Linker in diesen Konjugaten nicht passend waren. Dennoch setzten die Forscher die Tests auf Antitumor-Aktivität dieser Konjugate in humanen Xenograft-Modellen in Mäusen fort und fanden eine deutliche Anreicherung eines Antikörper-Methotrexat-Konjugats im Tumor. Innerhalb von 3 h nach Verabreichung waren 15 % der injizierten Konjugatdosis pro Gramm Tumor akkumuliert.^[32] Es galt nun herauszufinden, ob diese beeindruckende Lokalisierung des Konjugats im Tumor sich auch in einer signifikanten Antitumor-

Aktivität widerspiegeln würde. Die Aktivität von Vinblastin und Doxorubicin nach Konjugation an Antikörper über eine säurelabile Gruppe war tatsächlich besser als die der entsprechenden unkonjugierten Substanzen.^[33,34]

Diese ermutigenden präklinischen Versuche mündeten in die klinische Erprobung von vier Kandidaten (Abbildung 5).

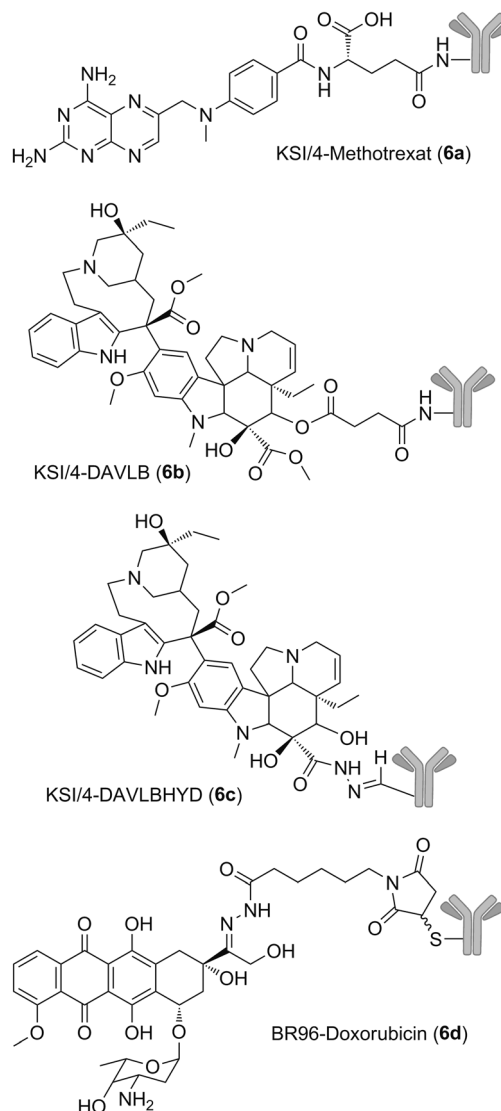


Abbildung 5. Strukturen der ersten ADCs.

Ein Konjugat des murinen Antikörpers KS1/4 mit dem cytotoxischen Methotrexat (**6a**), verbunden über eine Amidbindung, wurde in zwei klinischen Phase-I-Studien an Patienten mit NSCLC getestet.^[35] Die immunhistochemische (ICH) Färbung von Tumorbiopsien der Patienten nach der Behandlung erbrachte überzeugende Hinweise auf die Anreicherung der Konjugate im Tumor. Dennoch wurde in keiner der Studien ein überzeugender Nachweis eines therapeutischen Nutzens oder eines klinischen Ansprechens geführt. Da der Antikörper murinen Ursprungs war, induzierte das Konjugat in der Mehrzahl der Patienten eine Immunantwort, die anhand von HAMA im Serum innerhalb von drei Wochen

nach der Behandlung nachgewiesen werden konnte. Die Entwicklung der HAMA-Reaktion barg bei wiederholter Injektion das Risiko einer schnelleren Eliminierung des ADC aus dem Serum. Der murine KS1/4-Antikörper wurde auch über eine esteraselabile Hemisuccinat-Brücke (KS1/4-DAVLBH, **6b**) oder eine säurelabile Hydrazonbindung (KS1/4-DAVLBH, **6c**) an Desacetylvinblastin gekuppelt. Beide Konstrukte wurden klinisch getestet.^[36,37] Zusätzlich wurden in einer Unterstudie Patienten mit einem Adenokarzinom der Lunge oder des Dickdarm mit einer radioaktiv markierten Variante des Konjugats **6b** behandelt. Dieses markierte Konjugat erbrachte den eindeutigen Nachweis der Tumorkolonisation im Patienten. Dennoch wurde auch mit diesen Konjugaten keine therapeutische Aktivität beobachtet. Auch entwickelte die Mehrzahl der Patienten in diesen Studien eine Immunantwort gegen den Mausantikörper und gegen das Vinca-Alkaloid.

Anders als die oben beschriebenen Konjugate, deren Entwicklung nach der Phase I abgebrochen wurde, wurde das Antikörper-Doxorubicin-Konjugat BR96-Dox (**6d**), in dem Doxorubicin über eine säurelabile Hydrazonbindung an den chimären Antikörper BR96 gekuppelt war, in einer klinischen Phase-II-Studie an metastasierendem Brustkrebs getestet.^[38] In dieser randomisierten Studien wurden die Patienten entweder mit dem Konjugat **6d** oder mit freiem Doxorubicin behandelt. Das Toxizitätsprofil des Konjugats unterschied sich deutlich von dem des unkonjugierten Doxorubicins, was erwarten ließ, dass die Antikörper-vermittelte Verabreichung eine Veränderung der Verteilung des Wirkstoffs im Körper erreichen könnte. Doch trotz starker präklinischer Daten, in denen das konjugierte Doxorubicin sich gegenüber freiem Doxorubicin als überlegen erwiesen hatte, ließ sich mit dem Konjugat keine klinisch signifikante therapeutische Aktivität nachweisen. Obwohl BR96 ein chimärer Antikörper war, induzierte das Konjugat bei etwa 50 % der getesteten Patienten eine Immunreaktion.

4. Verbesserte Antikörper-Wirkstoff-Konjugate: zentrale Erfordernisse

Der ausbleibende klinische Erfolg der frühen ADCs, die alle bereits zugelassene Antitumorwirkstoffe als „Nutzlast“ trugen, dämpfte zunächst den Forschungseifer auf diesem Gebiet. Eine sorgfältige Analyse aller Komponenten dieser frühen ADCs ermöglichte aber dann die Identifizierung mehrerer Faktoren, die das Scheitern verursacht haben könnten.

4.1. Das cytotoxische Molekül

Eine wichtige Eigenschaft der frühen ADCs war das Fehlen einer ausreichenden Wirksamkeit *in vitro* und der Befund, dass die Konjugation diese Wirksamkeit im Vergleich zur unkonjugierten Ausgangsverbindung oft verringert. So wurde beispielsweise für Konjugat **6c** nur 1/8 der Wirkung des unkonjugierten Desacetylvinblastins bestimmt.^[33] Auch Konjugat **6d** brachte es nur auf 1/8 der Wirkung von Doxo-

rubicin.^[34] Die verringerte Aktivität nach der Konjugation lässt sich auf die verschiedenen Arten der Aufnahme der unkonjugierten und der konjugierten Substanz in die Zelle zurückführen. Eine hydrophobe Verbindung wie Vinblastin kann frei in die Zelle diffundieren und konzentriert sich an ihrem intrazellulären Ziel (Tubulin), wo sie den Zelltod verursacht. Die Anzahl der Moleküle eines moderat wirksamen cytotoxischen Wirkstoffs, die für eine effektive Abtötung von Zellen erforderlich ist, kann sehr hoch sein ($> 10^6$ Moleküle/Zelle). Der Transport des cytotoxischen Moleküls durch einen Antikörper wird durch zwei Faktoren begrenzt: a) die nur mäßige Anzahl von Antigenmolekülen auf der Zelloberfläche, an die der Antikörper binden kann (typischerweise $\approx 10^5$ Rezeptoren/Zelle) und b) die in manchen Fällen ineffiziente Internalisierung des zelloberflächen gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes und/oder die unzureichende intrazelluläre Freisetzung des aktiven Wirkstoffs. Damit ein ADC also therapeutisch wirksam sein kann, muss die Zahl der cytotoxischen Moleküle, die eine Zelle abtöten, unterhalb, möglichst sogar weit unterhalb der Zahl liegen, die der Antikörper in die Zelle liefern kann. Aufgrund dieser Berechnungen sind cytotoxische Moleküle mit einer Wirksamkeit im pikomolaren Bereich erforderlich. Auch Dosimetrieuntersuchungen mit radioaktiv markierten Antikörpern ergaben, dass die Aufnahme durch den Tumor ziemlich niedrig war (zwischen 0.003 und 0.01 % der injizierten Dosis je Gramm Tumor).^[39] Neben der hohen Aktivität wird oft übersehen, dass cytotoxische Moleküle für ADCs unbedingt stabil und relativ gut löslich im wässrigen Milieu des Antikörpers sein müssen. Eine weitere Herausforderung ist die notwendige chemische Modifikation des Wirkstoffs, um funktionelle Gruppen einzuführen, über die die Konjugation mit den Antikörpern abläuft. Position und Art der Modifikation müssen sorgfältig ausgewählt werden, um die Wirksamkeit der Ausgangsverbindung zu erhalten.

4.2. Die Verbindungsgruppen (Linker)

Für die ersten ADCs, die in die klinische Erprobung kamen, wurde der Wirkstoff (Methotrexat oder Desacetylvinblastin), der eine Carboxylgruppe trägt, nur mit dem Antikörper in wässriger Lösung in Gegenwart des Kupplungsreagens EDC (*N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid) gemischt, damit sich mit Aminogruppen des Antikörpers Amidbindungen ausbilden konnten. Da die Antikörper Aminosäuren mit freien Carboxylgruppen (Aspartat, Glutamat) und freien Aminogruppen (Lysin) tragen, kann es durch EDC auch zu intra- und intermolekularen Amidbindungen zwischen Aminosäuren des Antikörpers kommen. Es gab zu dieser Zeit auch noch keine analytischen Möglichkeiten, um die biochemischen Charakteristika dieser Konjugate vor der klinischen Testung zu bestimmen. Die erste Verbesserung der Linkerentwicklung erfolgte, als klar wurde, dass dieser nach der Internalisierung des ADC in die Zielzelle gespalten werden sollte, um die aktive Wirkstoffkomponente freizusetzen. In zwei der ADCs, die klinisch eingesetzt wurden, war der Wirkstoff (Desacetylvinblastin-Hydrazid und Doxorubicin)

über säurelabile Hydrazonbindungen an den Antikörper gebunden, um den sauren pH (≈ 5) in Endosomen und Lysosomen auszunutzen. Bei Inkubation der ADCs in saurem Puffer konnte eine effiziente Freisetzung des Wirkstoffs nachgewiesen werden. Bei Inkubation der ADCs unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4, 37°C) wurde der Wirkstoff zeitabhängig langsam freigesetzt.^[33] Eine vorzeitige Abspaltung des Wirkstoffs in die Blutbahn kann Ursache für eine systemische Toxizität und eine geringere therapeutische Breite sein. Eine effektive Planung des Linkers, so die Schlussfolgerung, muss also eine Balance zwischen einer guten Stabilität während mehrerer Tage Verweildauer im Serum und einer effizienten Spaltung nach dem Transport in die Zielzelle herstellen.

4.3. Der Antikörper

Die Schlüsselfunktion des Antikörpers ist, bevorzugt die Antigene auf der Zielzelle zu binden und so die angekuppelte cytotoxische Substanz am Tumor anzureichern. Idealerweise sollte der Antikörper gegen Oberflächenantigene gewählt werden, die in hoher Kopienzahl ($> 10^5$ /Zelle) exprimiert werden. Außerdem sollte das Antigen homogen auf allen Zellen des Tumors exprimiert werden (was sich durch ICH-Färbungen von Tumorbiopsien nachweisen lässt). Die angestrebte Bindungsaffinität des Antikörpers wird kontrovers diskutiert. Eine hohe Affinität ($K_D < 1$ nm) kann zwar eine gute Tumorlokalisierung sicherstellen, doch deuten einige In-vivo-Untersuchungen darauf hin, dass Antikörper mit niedrigerer Affinität solide Tumoren besser durchdringen können.^[40] Die Bedeutung dieser Untersuchungen in Mäusen mit subkutanen Xenografts humaner Tumoren ist unklar. Neben der Bindung an die Oberfläche der Tumorzelle ist die Internalisierung des Antikörper-Antigen-Komplexes ein wichtiger Faktor, weil dabei die angekuppelte Nutzlast intrazellulär freigesetzt werden kann. Diese Internalisierung, auch rezeptorvermittelte Endocytose genannt, hängt von der Art des Antigens ab. Bei einigen Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) ist bekannt, dass sie gut internalisiert werden.^[41] Daher ist die Internalisierungseffizienz ein wichtiger Faktor, der bei der Auswahl eines Zielantigens für ADCs berücksichtigt werden muss. Auch wenn der ADC-Ansatz keinen Antikörper erfordert, der selbst funktionell aktiv ist, könnte eine solche Eigenschaft des Antikörpers aber zusätzlichen therapeutischen Nutzen mit sich bringen. Das Problem der Immunogenität, das mit murinen Antikörpern in den frühen ADCs auftrat, lässt sich mit „humanisierten“ oder vollständig humanen Antikörpern, die inzwischen verfügbar sind, umgehen.

5. Antimitotische Substanzen als ADC-Nutzlast

Mikrotubuli-angreifende Verbindungen sind antimitotisch, denn sie hindern die Kernspindel daran, die Chromosomen zu trennen; außerdem verändern sie die Architektur des Zellskeletts und verursachen so den Zelltod.^[42] Die

Vinca-Alkaloide (z.B. Vincristin und Vinblastin) gehören zu dieser Verbindungsgruppe, die die normale Bildung und Dynamik der Mikrotubuli unterbrechen, während die Taxoide (z.B. Paclitaxel und Docetaxel) eine veränderte Mikrotubulistruktur stabilisieren und so den normalen Abbau während der Zellteilung stören.^[43] Wegen ihrer Wirkung auf die Mitose sind antimitotische Substanzen besonders toxisch gegenüber Krebszellen, die sich normalerweise schneller teilen als die meisten Nicht-Krebszellen. Allerdings können auch schnellteilende Nicht-Krebszellen wie die Zellarten im Darm, in den Haarfollikeln und die myeloischen Zellen abgetötet werden; so entstehen Übelkeit, Haarverlust und Myelosuppression als bekannte Nebenwirkungen. Antimitotische Verbindungen, die mit der Mikrotubuli-Dynamik wechselwirken, beeinträchtigen auch die Funktion peripherer Neuronen, wodurch Neuropathie entsteht.^[44,45]

Die meisten monoklonalen Antikörper und ADCs für die Krebsbehandlung sind gegen Antigene gerichtet, die auf der Oberfläche der Tumorzellen überexprimiert werden. Diese Antigene werden allerdings oft auch auf gesunden Zellen exprimiert, wenn auch in geringerem Ausmaß. Außerdem können verschiedene Arten nicht-tumorer Zellen den Antikörper oder ADC auch durch unspezifische Pinocytose oder über Zelloberflächen-Fc-Rezeptoren aufnehmen.^[46] Es wäre daher wünschenswert, eine cytotoxische Komponente zu haben, die eine gewisse inhärente Selektivität beim Abtöten von Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen hat. Der Einsatz antimitotischer Substanzen als ADC-Bestandteil kann dieses Ziel annähernd erreichen, da die Verbindungen gegenüber sich langsam oder nicht teilenden gesunden Zellen, die dem Konjugat ebenfalls ausgesetzt sein können, weniger toxisch sind.

Die Maytansinoide und Auristatine besitzen als mikrotubulibindende Substanzen die gewünschte hohe Wirksamkeit für ADCs. Vertreter beider Klassen wurden bereits erfolgreich als toxische Komponenten in klinisch zugelassenen ADCs verwendet und werden in zahlreichen weiteren klinisch getestet.

5.1. Maytansinoide als ADC-Nutzlast

Maytansin (1) ist ein Benzoansamakrolid, das erstmalig 1972 von Kupchan et al. aus der Rinde des äthiopischen Strauchs *Maytenus ovatus* isoliert wurde.^[4] Maytansin und die Maytansinoide im Allgemeinen binden in der Nähe der Bindestelle der Vinca-Alkaloide an Tubulin. Wahrscheinlich ist die Affinität für die Tubulineinheiten an den Enden der Mikrotubuli hoch, während sie für Bindestellen in den übrigen Bereichen der Mikrotubuli geringer ist.^[47] Die Bindung unterdrückt den Umbau der Mikrotubuli und arretiert die Zelle damit in der G2/M-Phase, die daher letztlich die Apoptose einleitet.

Maytansin wurde ausführlich am Menschen getestet, konnte aber in tolerierbaren Dosen keinen therapeutischen Nutzen erbringen.^[48] Die ungewöhnlich hohe cytotoxische Aktivität macht die Maytansinoide jedoch zu interessanten Kandidaten für einen Antikörper-vermittelten Einsatz. Zudem erfüllt Maytansin weitere zentrale Kriterien einer

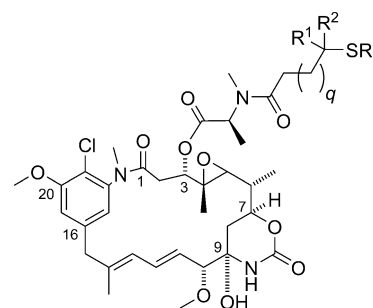
Nutzlast für ADCs, wie eine gute Stabilität und eine vernünftige Löslichkeit in wässrigem Milieu. Maytansin besitzt allerdings keine leicht zugängliche funktionelle Gruppe, über die man die Verbindung zum Antikörper herstellen kann.

5.1.2. Die Entwicklung kuppelbarer Maytansinoide

Die Maytansinoide sollten so an die Antikörper gekuppelt werden, dass das Konjugat im Serum stabil ist, in den adressierten Zellen aber gespalten werden kann. Disulfidbrücken erfüllen diese Bedingung: Sie können von Thiolen im Cytoplasma von Zellen gespalten werden, denn dieses enthält hohe Konzentrationen an freiem Thiol, hauptsächlich in Form von Glutathion (1–10 mM),^[49] während Blut viel geringere Konzentrationen an freiem Thiol enthält ($\approx 5 \mu\text{M}$).^[50] Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) an Maytansinoiden ergaben, dass mehrere Pharmakophore erforderlich sind, um die Cytotoxizität *in vitro* zu erhalten.^[51] Das Carbinolamid an C9 und die Doppelbindungen an C11 und C13 sind für die Aktivität erforderlich. Auch der Verlust des Epoxidrestes vermindert die Aktivität. Die C3-Ester-Seitenkette war für die biologische Aktivität erforderlich, aber ihre Struktur konnte ohne Wirkungsverlust variiert werden. Weil die C3-Position für Modifikationen zugänglich ist, wurden hier neue Esterseitenketten eingebaut, die eine terminale Thiolgruppe trugen, damit die Verbindung an die Antikörper gekuppelt werden kann.^[52]

Maytansinol (**7b**) ist das Hydrolyseprodukt von **1** nach Spaltung des C3-Esters. Maytansinol kann mit verschiedenen

Seitenketten verestert werden, um die gewünschten Maytansinoide herzustellen. Es wurden Totalsynthesen von **7b** beschrieben, die sich möglicherweise an die Herstellung thioltragender Maytansinoide anpassen lassen.^[53–55] Schwierig wäre dabei jedoch, die Stereochemie an verschiedenen Positionen zu erhalten; außerdem sind die Gesamtausbeuten vielstufiger Synthesen meist niedrig. Thioltragende Maytansinoide wie DM1 (**7d**) werden daher meist semisynthetisch hergestellt. Das Vorprodukt, Ansamitocin P-3 (**7a**), wird durch Fermentation des Mikroorganismus *Actinosynnema pretiosum* gewonnen (Abbildung 6).^[52] Die kontrollierte Reduktion von **7a** mit $\text{LiAl}(\text{OMe})_3\text{H}$ führt zum Maytansinol (**7b**). Die Veresterung mit einer Carbonsäure, die ein Disulfid enthält, in Gegenwart des Kupplungsreagens EDC und Zinkchlorid als Lewis-Säure liefert die Maytansinoid-Disulfide **7c**, **7f** und **7h**, die mit Dithiothreitol (DTT) zu den gewünschten thioltragenden Maytansinoiden reduziert werden (Abbildung 7, **7d**, **7e**, **7g**).



- DM1, **7d** ($q = 0, R^1, R^2, R^3 = \text{H}$)
DM1-SMe, **7c** ($q = 0, R^1, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{SMe}$)
DM3, **7e** ($q = 1, R^1 = \text{Me}, R^2, R^3 = \text{H}$)
DM3-SMe, **7f** ($q = 1, R^1 = \text{Me}, R^2 = \text{H}, R^3 = \text{SMe}$)
DM4, **7g** ($q = 1, R^1, R^2 = \text{Me}, R^3 = \text{H}$)
DM4-SMe, **7h** ($q = 1, R^1, R^2 = \text{Me}, R^3 = \text{SMe}$)

Abbildung 7. Maytansine und thiolhaltige Maytansinoide.

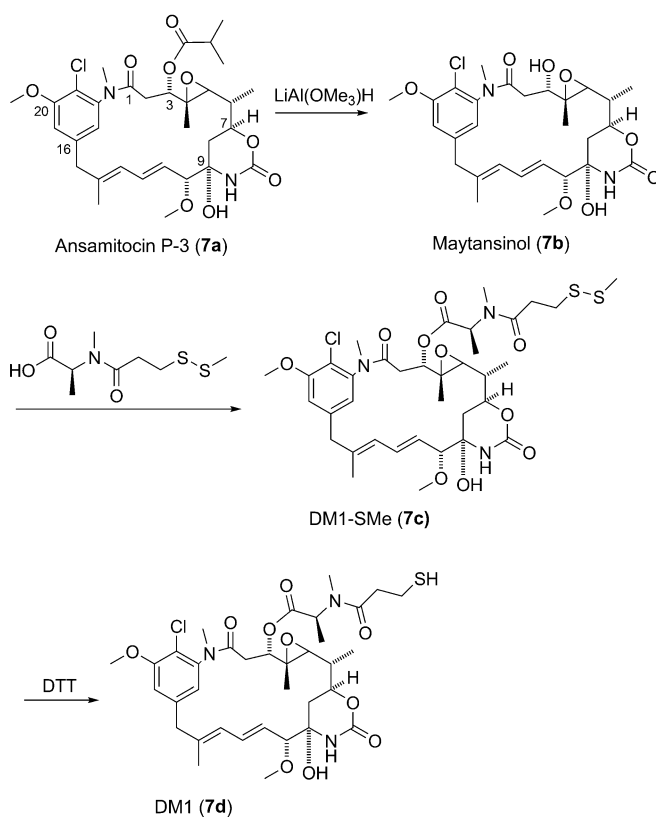


Abbildung 6. Semisynthese von DM1 aus Ansamitocin P-3.

Die *In-vitro*-Cytotoxizität der Maytansinoide wird normalerweise nicht mit Verbindungen bestimmt, die einen Thiolrest tragen, denn diese Verbindungen können mit Komponenten des Zellkulturmediums wie Cystin Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen eingehen. Stattdessen werden Maytansinoid-Disulfidderivate für die Messungen benutzt. Die Maytansinoide DM1-SMe (**7c**), DM3-SMe (**7f**) und DM4-SMe (**7h**) haben mit IC_{50} -Werten von 0.029 nM, 0.011 nM bzw. 0.0011 nM Wirkungen gegenüber KB-Zellen, die ähnlich oder besser als die von Maytansin ($\text{IC}_{50} = 0.024 \text{ nM}$) sind. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die SK-Br-3-Zelllinie veröffentlicht.

5.1.3. Herstellung von ADCs mit Maytansinoiden

Maytansinoid-ADCs oder Antikörper-Maytansinoid-Konjugate (AMCs), in denen die Maytansinoide über Disulfidbrücken an Antikörper gebunden sind, werden im Allgemeinen aus einem monoklonalen Antikörper, einem heterodifunktionellen Linker und einem thiolhaltigen Maytansinoid

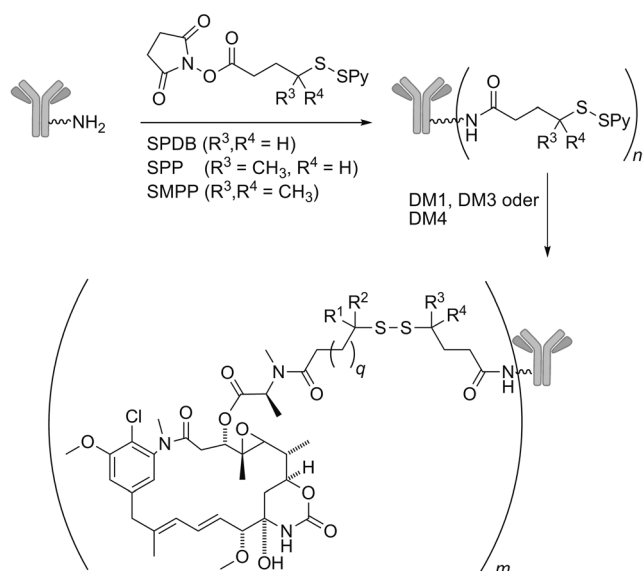


Abbildung 8. Konjugation der Maytansinoide an Antikörper über Disulfid-Linker.

gebildet (Abbildung 8).^[52] Lysine des Antikörpers werden mit dem aktivierten Ester eines heterodifunktionellen Linkers zu einem modifizierten Antikörper umgesetzt, der ein reaktives Disulfid enthält. Der Grad der Modifikation kann über die Einstellung der molaren Äquivalente des zugegebenen Linkers gesteuert werden. Meist werden etwa 3 bis 4 Lysine an einem Antikörpermolekül modifiziert. Der modifizierte Antikörper wird mit einem thioltragenden Maytansinoid versetzt, das 2-Thiopyridin unter Bildung des Konjugats verdrängt. Die Bindungsstärke der Disulfidbrücke kann variiert werden, indem man Maytansinoide oder Linker mit sterisch gehinderten oder ungehinderten Thiolen verwendet. Man kann AMCs auch herstellen, indem man zuerst die thioltragenden Maytansinoide mit dem Linker in hochkonzentrierter Lösung umsetzt und das Zwischenprodukt dann mit dem Antikörper in wässriger Lösung zur Reaktion bringt. Diese zweite Methode bietet besonders Vorteile zur Herstellung von AMCs mit sterisch stark gehinderten Disulfidbrücken. AMCs mit Thioesterverbindungen werden durch Umsetzen des Antikörpers mit einem difunktionellen Linker aus einem

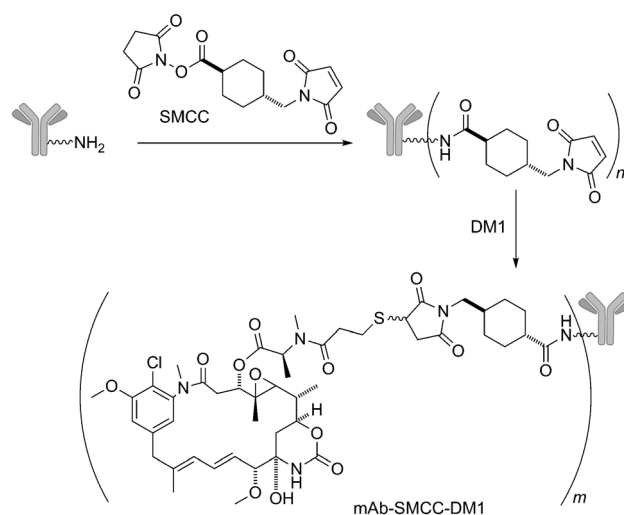


Abbildung 9. Konjugation der Maytansinoide an Antikörper über Maleimid-Linker.

aktivierten Ester und einer Maleimidogruppe, beispielsweise SMCC, und der anschließenden Reaktion des modifizierten Antikörpers mit dem thiolhaltigen Maytansinoid produziert (Abbildung 9).

Um zu bestimmen, wie die sterische Hinderung der Disulfidbrücke die Pharmakokinetik beeinflusst, wurden verschiedene Konjugate des humanisierten C242-Antikörpers hergestellt.^[56] Jedes Konjugat wurde bei pH 6.5 und 37 °C mit DTT inkubiert und die relative Geschwindigkeit der thiolinduzierten Maytansinoid-Freisetzung *in vitro* gemessen. Wie erwartet, wurde aus den stärker gehinderten Disulfidkonjugaten Maytansinoid langsamer freigesetzt als aus den weniger gehinderten (Tabelle 1). Das am stärksten gehinderte AMC **8g** setzte das Maytansinoid mehr als 22000-mal langsamer frei als **8a**, das am wenigsten gehinderte Konjugat.

5.1.4. In-vitro-Cytotoxizität von AMCs

Die In-vitro-Cytotoxizität einer Auswahl von Konjugaten des huC242-Antikörpers gegen das CanAg-Antigen mit Maytansinoiden unter Verwendung verschiedener Disulfid-Linker und eines nicht-spaltbaren Thioether-Linkers (Tabel-

Tabelle 1: Effekt der sterischen Hinderung auf die Linker-Stabilität von huC242-AMCs.^[a]

mAb-Seite		Substituenten		<i>q</i>	ADC	Disulfid-Hinderung	Disulfidreduktion, Geschw. ^[b] (<i>k</i> [M ⁻¹ min ⁻¹])	Relative Stabilität	In-vivo-PK <i>t</i> _{1/2} [h]
R1	R2	DM-Seite R3	R4						
H	H	H	H	0	8a	0:0	14	1	15
Me	H	H	H	0	8b	1:0	2	7	47
Me	Me	H	H	0	8c	2:0	0.8	16	n.b.
H	H	Me	Me	1	8d	0:2	1.0	14	87
Me	H	Me	H	1	8e	1:1	0.8	170	n.b.
Me	H	Me	Me	1	8f	1:2	0.014	980	218
Me	Me	Me	Me	1	8g	2:2	< 0.00064	> 22000	n.b.
H	H	Me	H	1	8h	0:1	n.b.	n.b.	n.b.
–	–	–	–	–	8i	thioether	n.b.	n.b.	n.b.

[a] –: Kein Disulfid vorhanden; n.b.: nicht bestimmt. [b] Disulfidreduktion durch DTT bei pH 6.5, 37 °C. Die Strukturen der Disulfid-AMCs sind in Abbildung 8 dargestellt.

le 1) wurde gegen antigen-positive COLO205-Zellen getestet.^[56] Alle Konjugate waren unabhängig von der Linkerstruktur hoch wirksam mit IC_{50} -Werten zwischen 3.5 und 15 μ M; die Spaltung der Disulfidbrücke ist also nicht nötig, um die Zellen in vitro abzutöten. Gegenüber antigen-negativen Zellen waren die AMCs nur wenig aktiv, was die Antigen-Spezifität der Cytotoxizität belegt. Ein Test zur Abtötung benachbarter Zellen wurde durchgeführt, wobei eine repräsentative Gruppe von huC242-Konjugaten mit verschiedenen Linkern mit antigen-negativen Zellen (Namalwa-Zellen) in Gegenwart unterschiedlich vieler antigen-positiver Zellen (COLO205) inkubiert wurde. Die AMCs mit den Disulfidbrücken konnten die antigen-negativen Zellen („Bystander“-Zellen) abtöten, solange genug antigen-positive Zellen anwesend waren (Abbildung 10). AMCs mit einer sterischen

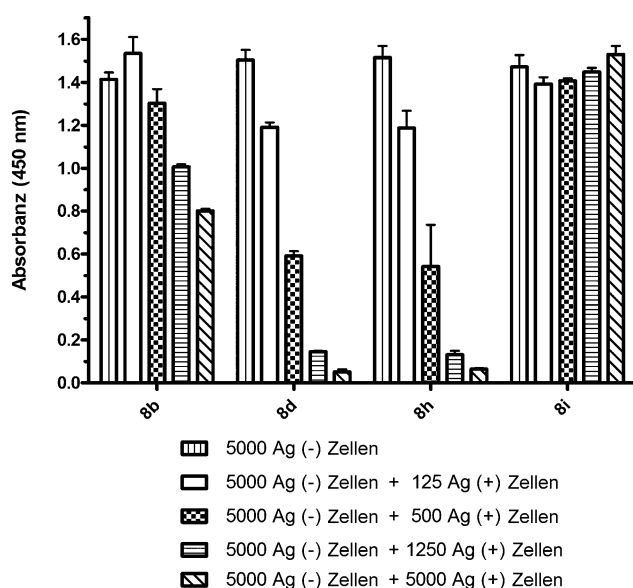


Abbildung 10. Der Effekt der AMC-Bindung auf das Abtöten von Bystander-Zellen. Die Absorption bei 450 nm ist ein Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen. Die Zellen wurden 5 Tage lang 1 nM Konjugat ausgesetzt. Ag (-) = antigen-negativ; Ag (+) = antigen-positiv.

Hinderung auf der Maytansinoid-Seite der Disulfidbindung töteten mehr Bystander-Zellen ab. Die AMCs **8h** und **8d** mit einer sterischen Hinderung auf der Maytansinoid-Seite der Disulfidbindung zeigten ein vergleichbares Maß an Abtötung der Bystander-Zellen. AMC **8i** mit dem nicht-spaltbaren Thioether-Linker jedoch tötete keine unbeteiligten Zellen ab, auch nicht in Gegenwart einer großen Zahl antigen-positiver Zellen.^[57]

Während bei huC242-AMCs die Art des Linkers die In-vitro-Wirksamkeit gegen antigen-positive Zellen nicht beeinflusste, war dies bei AMCs gegen andere Antigene oft nicht der Fall. Die In-vitro-Wirksamkeit von AMCs aus einem Antikörper gegen den Folatrezeptor α (anti-FOLR1) verdeutlicht diesen Befund (Abbildung 11).^[58] Die anti-FOLR1-Konjugate mit den Thioether- oder Disulfid-Linkern hatten vergleichbare In-vitro-Wirksamkeit auf antigen-positive KB-Zellen, die mindestens 2×10^6 Rezeptoren pro Zelle exprimieren. Konjugate mit Disulfid-Linkern waren aller-

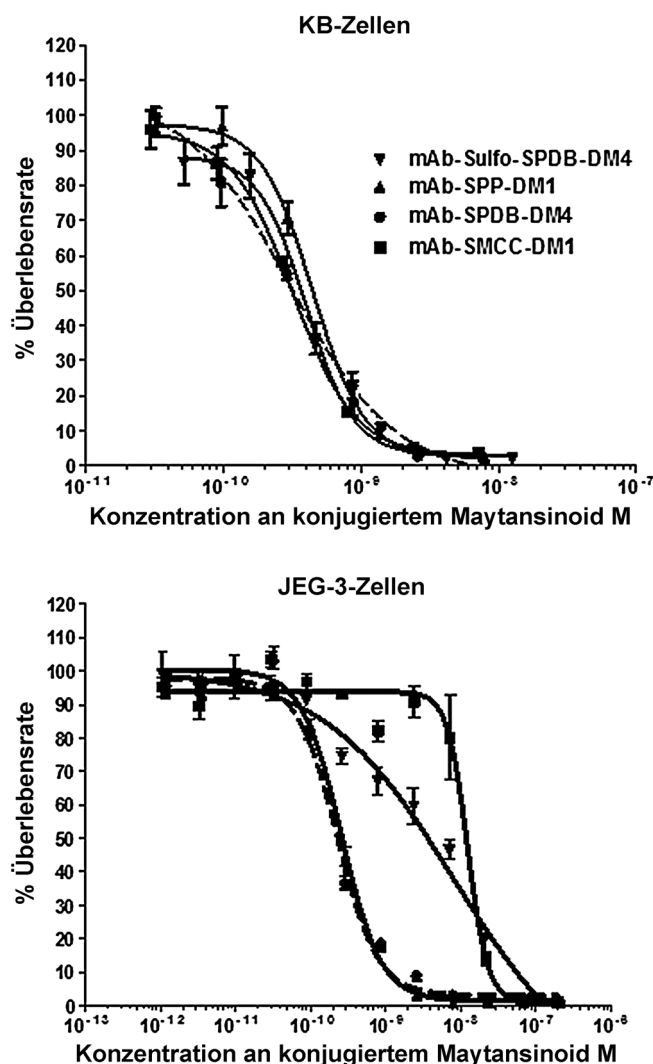


Abbildung 11. Die relative Wirkung von anti-FOLR1-AMCs in vitro ist zelllinienabhängig.

dings wirksamer als AMCs mit Thioether-Linkern gegenüber JEG-3-Zellen, die das Zielantigen nur etwa 4×10^4 -mal pro Zelle exprimieren.^[58] Der Wirksamkeitsunterschied von Disulfid- im Vergleich zu Thioether-verbrückten anti-FOLR1-AMCs scheint also von der Zelllinie oder der Expressionshöhe des Antigens abzuhängen. EGFR-AMCs mit einem Disulfid- und einem Thioether-Linker waren vergleichbar wirksam gegenüber MDA-MB-468-Zellen, während die disulfidverbrückte Verbindung gegenüber A-431-Zellen mehr als 20-mal wirksamer war, obwohl in diesem Fall die Höhe der Antigenexpression vergleichbar war.^[59]

5.1.5. Zellulärer Katabolismus von AMCs

Um die Cytotoxizität und die Abtötung der Bystander-Zellen zu verstehen und um die Linker-Systeme für die AMCs zu verbessern, wurde versucht, die Mechanismen der AMC-Prozessierung in antigen-positiven Zellen aufzuklären.^[60] Antigen-positive COLO205-Zellen wurden in vitro mit huC242- 3 H]Maytansinoid-Konjugaten, die mit verschiede-

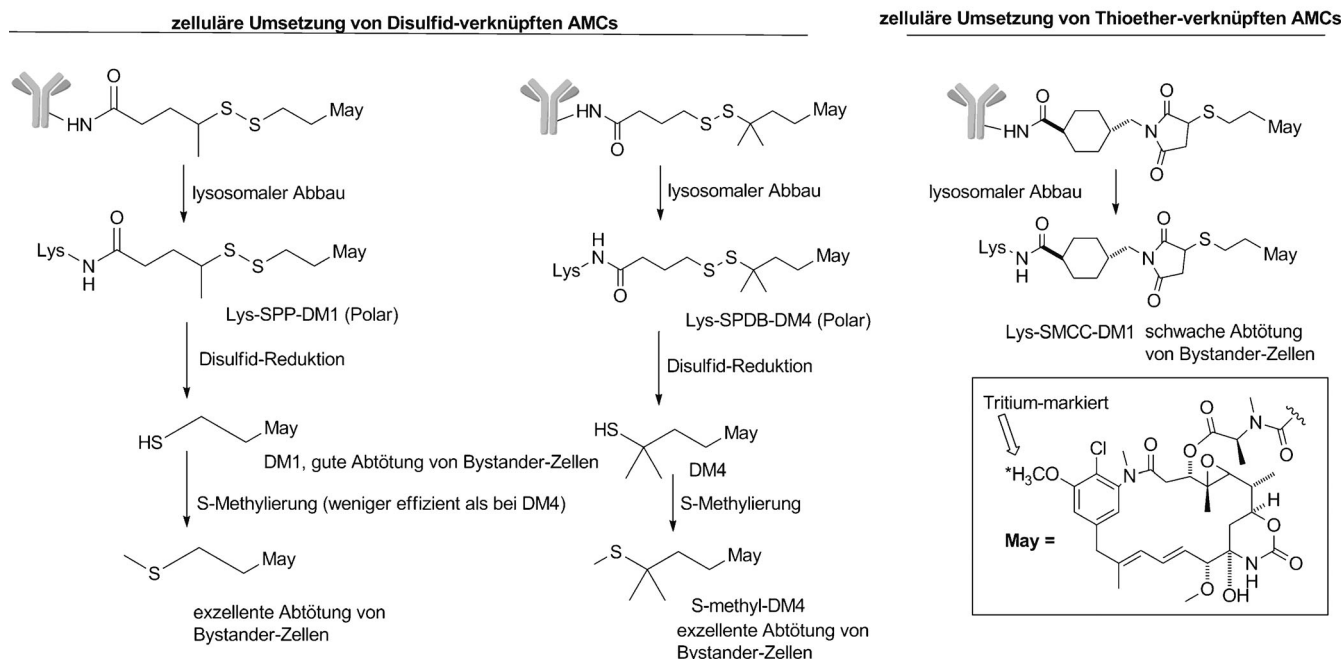


Abbildung 12. Prozessierung der AMCs in der Zelle.

denen Linkern hergestellt worden waren, behandelt (Disulfid-Linker: SPP, SPDB; Thioether-Linker: SMCC) (Abbildung 12). Aus allen Konjugaten wurden lysinhaltige Katabolite abgespalten, die eine unversehrte Bindung zu den unveränderten Maytansinoiden hatten. Die lysinhaltigen Katabolite fanden sich überwiegend in den Zelllysaten und in kleineren Mengen in den Überständen ($\approx 10\%$ oder weniger von dem in den Lysaten befindlichen Mengen); vermutlich wurde der Antikörper vollständig bis auf den Lysinrest abgebaut, und die Kataboliten konnten durch aktiven oder passiven Transport zu einem gewissen Anteil die Zellmembran passieren. Das Konjugat mit dem nicht-spaltbaren Thioether-Linker lieferte Lysin-Linker-Maytansinoid als einzigen Kataboliten, während aus den Konjugaten mit Disulfid-Linkern noch weitere Verbindungen entstanden. Aus den disulfidverbrückten DM1-Konjugaten entstanden DM1 und kleinere Mengen an S-Methyl-DM1, das vermutlich aus DM1 entsteht. DM1 und S-Methyl-DM1 wurden im Zellkulturmedium und im Zelllysat nachgewiesen. Analog dazu entstanden aus dem disulfidverbrückten DM4-Konjugat DM4 und S-Methyl-DM4 (letzteres war die Hauptkomponente), die ebenfalls im Kulturmedium und im Zelllysat nachweisbar waren. In keinem der Katabolite wurde eine Veränderung des Makrocyclus gefunden, ein Hinweis

darauf, dass die Maytansinoide trotz ihrer Epoxid-, Ester- und cyclischen Carbamatreste in Lysosomen stabil sind.

Die vorgeschlagenen Mechanismen für die Verstoffwechselung der Konjugate sind in Abbildung 13 zusammengefasst. Nach Bindung an die Oberfläche der Tumorzellen und Internalisierung wird der Antikörperanteil der AMC im Lysosom proteolytisch bis auf den letzten verbleibenden Lysinrest abgebaut. Der Rest der Verbindung wird dann passiv oder aktiv aus dem Lysosom ins Cytoplasma transportiert. Im

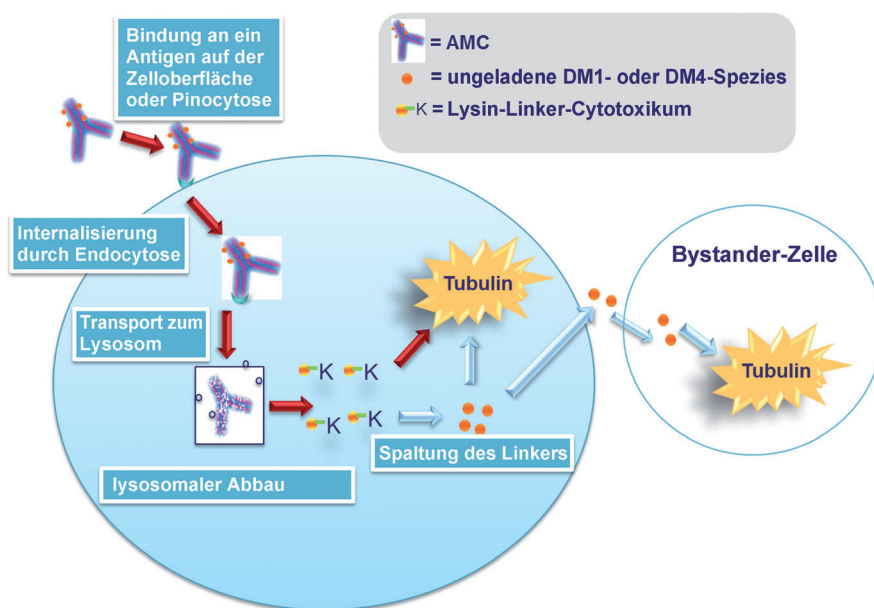


Abbildung 13. Vorgeschlagener Mechanismus für den AMC-Abbau und die potentielle Abtötung von Bystander-Zellen.

Fall der AMC's mit nicht-spaltbarem Linker kann das Lysin-Linker-Maytansinoid-Bruchstück im Cytoplasma an Tubulin binden, den Umbau der Mikrotubuli blockieren und damit den Zelltod induzieren, oder es kann aus der Zelle hinaus-transportiert werden. Weil die lysintragenden Kataboliten geladen sind, sollten sie nicht in die benachbarten Bystander-Zellen diffundieren und dort die Zellen in der G2/M-Phase arretieren und den Zelltod induzieren. Bei AMC's mit Disulfid-Linkern werden einige oder alle lysinhaltigen Katabolite zunächst durch Reduktion im Cytoplasma gespalten. Dabei entstehen die thiolhaltigen Maytansinoide DM1 oder DM4, die dann durch ein endogenes S-Methyltransferase-Enzym am Thiol methyliert werden können. Diese Metabolite sind ungeladen und können daher aus der Zelle ausfließen und in die Bystander-Zellen eindiffundieren und sie abtöten. Die Abtötung der Bystander-Zellen kann in manchen Situationen vorteilhaft sein. Man vermutet, dass ADCs nur schlecht in Tumoren eindringen, sodass Tumorzellen umso weniger Konjugat aufnehmen, je weiter weg sie von den Blutgefäßen liegen.^[61] Ungeladene niedermolekulare Metaboliten sollten allerdings tiefer in den Tumor eindringen und auch solche Zellen abtöten, die für das Konjugat schlechter zugänglich sind. Die Abtötung von Bystander-Zellen kann auch unverzichtbar sein, um Zellen eines heterogenen Tumors abzutöten, in dem das Zielantigen nur von einem Teil der Zellen hoch exprimiert wird.

5.1.6. Cytotoxizität von AMC's gegen MDR-1⁺-Zellen

Es gibt verschiedene Mechanismen, durch die Tumorzellen gegen eine Behandlung resistent werden können. So können MDR-Proteine (multi-drug resistance) das Chemotherapeutikum aus der Zelle heraustransportieren. Eine der häufig vorkommenden MDR-Pumpen ist MDR-1. AMC's wurden gegen Zellen getestet, die das MDR-1-Protein (auch P-Glycoprotein oder Pgp genannt) exprimieren.^[62] AMC's mit ungeladenen oder unpolaren Linkern waren in vitro weniger wirksam gegen MDR-1⁺-Zellen als gegen MDR-1⁻-Zellen. Im Allgemeinen transportiert MDR-1 hydrophobe Verbindungen effizienter als hydrophile. Folgerichtig wurden geladene oder hydrophile Linker entwickelt. Die damit hergestellten AMC's wurden zu hoch geladenen oder polaren Metaboliten abgebaut, die eine verbesserte Wirkung gegen MDR-1⁺-Zellen aufwiesen. Beispiele für solche polaren Linker sind Sulfo-SPDB und Mal-PEG4-NHS (Abbildung 14).^[62,63]

5.1.7. Präklinische Pharmakokinetik, Verträglichkeit und Wirksamkeit von AMC's

Die AMC's mit spaltbaren Disulfid-Linkern und nicht-spaltbaren Thioether-Linkern wurden in vivo auf ihre pharmakokineti-

schen Parameter (PK) getestet.^[56] Die Serumhalbwertszeit von AMC's mit Disulfid-Linkern hing vom Ausmaß der sterischen Hinderung der Disulfidbrücke ab; mit steigender Hinderung nahm die Eliminationsgeschwindigkeit stetig ab (Tabelle 1). So hat das sterisch sehr anspruchsvolle AMC **8f** eine Halbwertszeit von etwa 218 h, die mit der des nicht-spaltbaren AMC **8i** und mit der von unmodifiziertem humanem IgG₁ in Mäusen vergleichbar ist. Die Halbwertszeit von **8f** in vivo war 14.5-mal länger als die des sterisch nicht gehinderten AMC **8a**. Die Verträglichkeit von AMC's mit Disulfid-Linkern wurde in Mäusen von den sterischen Eigenschaften der Disulfidbrücke offenbar kaum beeinflusst, denn die verschiedenen disulfidverbrückten AMC's hatten ähnliche MTDs von etwa 50 mg kg⁻¹ (Antikörperdosis bei einer typischen Maytansinoid-Beladung von 3.5 bis 4 je Antikörper).^[56] AMC's mit nicht-spaltbaren Linkern wurden von Mäusen besser vertragen, die MTDs lagen etwa 2- bis 3-mal so hoch wie die der disulfidverbrückten AMC's.^[62]

Allerdings korrelierte bei In-vivo-Versuchen mit AMC's mit Thioether- oder Disulfidbrücken die Wirksamkeit oft nicht mit der In-vivo-Stabilität. Die Antitumorstärke von huC242-Maytansinoid-Konjugaten mit unterschiedlicher sterischer Hinderung in der Disulfidbrücke (**8b**, **8e**, **8f**) wurde in Mäusen mit COLO205-Xenografts verglichen (Abbildung 15). In diesem Modell war AMC **8b** am wirksamsten. Bei der getesteten Dosis zeigten AMC's mit weniger leicht spaltbaren Linkern wenig oder keinen Wirkungsvorsprung gegenüber Kontrollmäusen, die phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) erhalten hatten. In einem zweiten Experiment wurden Mäuse mit einem COLO203-Xenograft mit anderen AMC's behandelt (Abbildung 16). Das AMC **8d** erwies sich als wirksamstes, gefolgt von **8h**; AMC's **8b** und **8c** waren am wenigsten wirksam. Diese beiden Versuchsreihen demonstrieren, dass eine starke sterische Hinderung der Disulfidbrücke sich nachteilig auf die Wirksamkeit der AMC's auswirken kann; auch die Lage der blockierenden Gruppen hat dabei einen Einfluss. Besonders eine sterische Hinderung auf der Maytansinoid-Seite der Disulfidbrücke führte zu besserer Wirkung im Vergleich zu einer Hinderung auf der Antikörper-Seite. Diese verbesserte Aktivität kann auf die Bildung

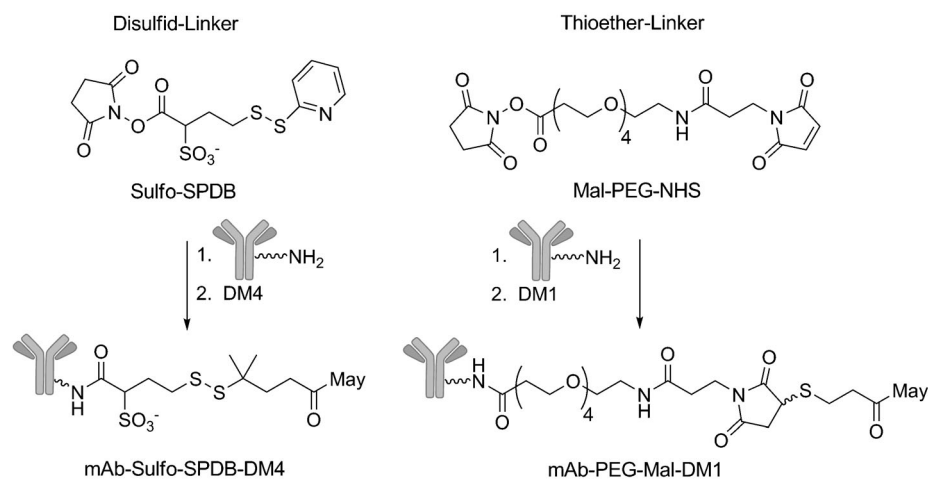


Abbildung 14. Polare Sulfo-SPDB- und Mal-PEG4-OSu-Linker und die damit hergestellten AMC's.

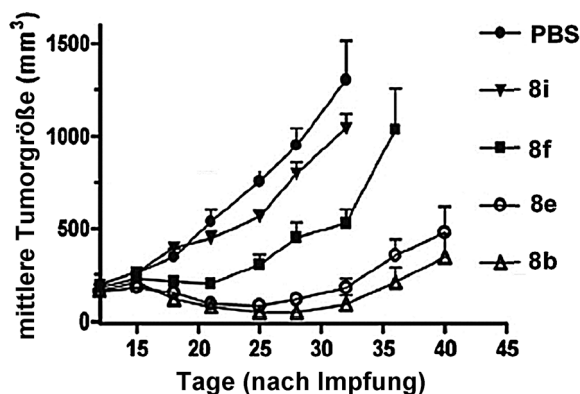


Abbildung 15. Einfluss der sterischen Hinderung der Disulfidgruppe auf die In-vivo-Wirksamkeit von huC242-Konjugaten auf COLO205-Xenografts.

eines aktiveren Maytansinoid-Metaboliten zurückgeführt werden; aber auch Unterschiede beim Abbau der AMC's und der Pharmakokinetik können eine Rolle spielen.

Auch wenn in der Mehrzahl der Fälle ein AMC mit optimalem Disulfid-Linker in vivo aktiver ist als das entsprechende Konjugat mit einem nicht-spaltbaren Linker,^[56,64] kann es eine gewisse Abhängigkeit von der Zielstruktur geben. So sind Konjugate des anti-HER2-Antikörpers Trastuzumab mit dem Maytansinoid DM1 mit Disulfid-Linker oder Thioether-Linker in vivo ähnlich aktiv.^[65]

5.1.8. Untersuchungen des In-vivo-Stoffwechsels von AMC's und der Cytotoxizität der Kataboliten

Für In-vivo-Untersuchungen wurden tumortragende Mäuse separat mit huC242-[³H]Maytansinoid-Konjugaten mit verschiedenen Linkern behandelt (Disulfid-Linker: SPP, SPDB; Thioether-Linker: SMCC).^[66] In Abständen zwischen 2 h und 7 Tagen nach der Injektion wurden die Mäuse getötet. Tumor und Leber wurden entnommen und homogenisiert, und die radioaktiv markierten Verbindungen mittels HPLC wurden analysiert. Ähnlich wie bei den In-vitro-Versuchen war das Lysin-Linker-Maytansinoid-Bruchstück (Lys-SMCC-DM1) der einzige Katabolit, der von dem Konjugat mit dem nicht-spaltbaren Linker (mAb-SMCC-DM1) zu irgendeinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte. Das Fehlen neuer Kataboliten in Leber oder Galle wies darauf hin, dass Phase-I- und Phase-II-Reaktionen des Lebermetabolismus nicht in nennenswertem Umfang stattfinden. Bei Mäusen, die mit disulfidverbrückten AMC's behandelt worden waren, war das Katabolitenprofil der Tumoren passend zu dem aus den In-vitro-Versuchen. In der Leber wurden als zusätzliche Abbauprodukte S-Methyl-DM1-sulfoxid und S-Methyl-DM1-sulfon durch Oxidation des disulfidverbrückten DM1-AMC's gebildet, während aus dem entsprechenden DM4-Konjugat S-Methyl-DM4-Sulfon gebildet wurde (Abbildung 17).^[66] Auch hier wurden keine Phase-II-Metabolite in den Leberhomogenaten gefunden.

Die Katabolite und die durch Oxidation in der Leber entstandenen Metabolite der AMC's können in vivo vielleicht zu der systemischen Toxizität beitragen. Es ist daher wün-

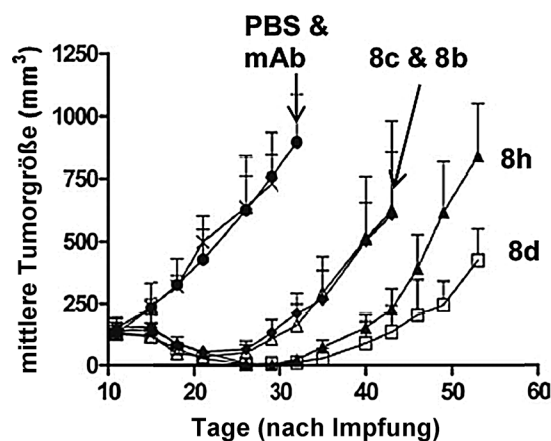


Abbildung 16. Effekt der sterischen Hinderung an verschiedenen Positionen der AMC-Disulfidbrücke auf die In-vivo-Wirksamkeit.

schenswert, die Cytotoxizität jeder Einzelverbindung zu kennen und zu bestimmen, ob der Lebermetabolismus diese Kataboliten effizient entgiftet. Alle lysinhaltigen Katabolite hatten in vitro eine vergleichsweise schlechte cytotoxische Wirkung (Tabelle 2). Allerdings scheinen diese Katabolite sehr potent zu sein, wenn sie über den AMC-Abbau in einer Zelle freigesetzt werden. Die ungeladenen Katabolite DM1 (7d), S-Methyl-DM1, DM4 (7g) und S-Methyl-DM4 waren stark cytotoxisch, während die Sulfoxide und Sulfone von S-Methyl-DM1 und S-Methyl-DM4 nur schwach cytotoxisch waren; wahrscheinlich entgiftet die Mausleber diese Kataboliten effizient durch Oxidation. Auch die lysinhaltigen Kataboliten aus AMC's mit nicht-spaltbaren Linkern werden in der Leber nicht verändert, sodass ihre relativ schwache Cytotoxizität unverändert blieb.

5.2. Auristatin-Analoga als ADC-Beladung

Das kleine lineare Peptid Dolastatin 10 (2a) (Abbildung 2) ist ein hochwirksames antimitotisches Agens, das aus der marinen schalenlosen Molluske *Dolabella auricularia* aus dem Indischen Ozean und den Küstengewässern um Japan gewonnen wurde.^[67] Dolastatin 10 und seine Derivate hemmen die tubulinabhängige GTP-Bindung, hemmen nicht-kompetitiv die Bindung von Vincristin an Tubulin und hemmen die Mikrotubuli-Dynamik. Einige Dolastatine wie Dolastatin 15 (2b) und das synthetische Analogon Cemadotin (2c) sind Protease- und Esterase-sensitiv (Abbildung 18). Solche labilen Dolastatine sind als Nutzlast für ADC's kaum geeignet, weil sie in den Lysosomen der Zielzellen ganz oder teilweise inaktiviert werden können.

5.2.1 Die Entwicklung konjugierbarer Auristatine

Die antimitotisch wirkende Auristatinfamilie besteht aus vollsynthetischen Verbindungen, die anhand von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen auf der Basis von Dolastatin 10 entwickelt wurden.^[68] Der Dolapheninrest in 2a konnte ohne Wirkungsverlust durch Phenethylamin oder substituierte

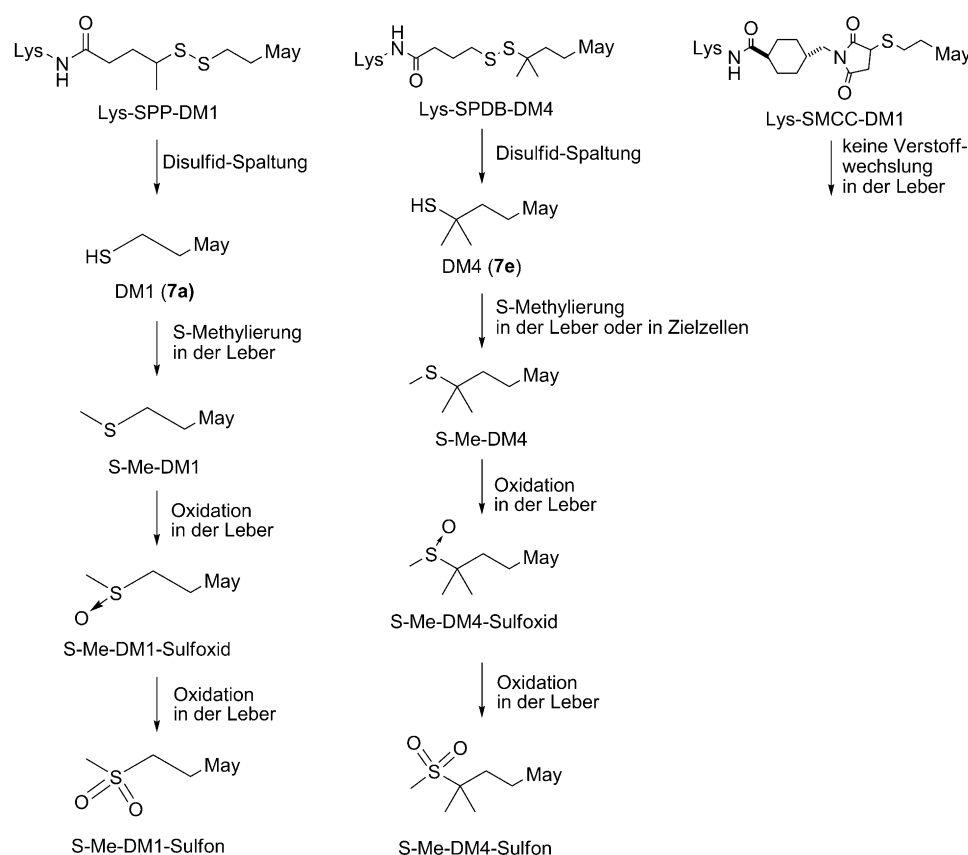


Abbildung 17. Verstoffwechselung der lysosomalen und S-methylierten Katabolite von AMCs in der Leber.

Phenethylaminreste ersetzt werden. Die Wirkung blieb auch erhalten, wenn der terminale tertiäre Aminrest von Dolastatin durch ein primäres oder sekundäres Amin ersetzt wurde. Insbesondere Monomethyl-Auristatin E (MMAE, **9a**) und Monomethyl-Auristatin F (MMAF, **9b**) wurden auf Basis solcher Struktur-Wirkungs-Beziehungen hergestellt und dann derivatisiert, um sie als Nutzlast für ADC zu verwenden (Abbildung 19).

Über den Maleimidrest des Derivats kann die Verbindung an eine Thiolgruppe der Zielverbindung gekoppelt werden. Valin-Citrullin-PAB-Konstrukte werden von Cathepsin B gespalten, und so sind in allen klinischen Studien Auristatin E-ADCs mit dem Valin-Citrullin-Dipeptid als Linker eingesetzt worden. Analoga von Auristatin E ohne einen Peptid-Linker sind zwar bekannt, doch sind solche ADCs bislang noch nicht bis zur klinischen Prüfung gelangt. MMAF

MMAF ist in vitro etwa 100-mal weniger cytotoxisch als MMAE.^[69] Dennoch ist das Methylesterderivat von MMAF (MMAF-OMe) eine der cytotoxischsten der bekannten Auristatin-Verbindungen und ist für die meisten getesteten Zelllinien etwa 100-mal cytotoxischer als MMAE. Man vermutet, dass MMAF-OMe in die Zellen diffundieren kann, wo die Esterasen im Cytoplasma es in MMAF umwandeln. MMAF ist wahrscheinlich so wenig cytotoxisch, weil die geladene Carboxylgruppe die Diffusion in die Zelle verhindert. Einmal in der Zelle ist es allerdings sehr wirksam. MMAE und MMAF wurden ausgewählt und für die Bindung an Antikörper modifiziert.

MMAE wird meistens am terminalen Amin modifiziert, sodass es an einen Antikörper über ein Dipeptid gekoppelt werden kann, das an einem *para*-Aminobenzyl(PAB)-Rest hängt (Abbildung 20).

Tabelle 2: In-vitro-Cytotoxizität von AMC-Kataboliten und die Oxidationsprodukte des Leberstoffwechsels.^[a]

ADC-Katabolit	IC ₅₀ [M] (KB)	Lebermetaboliten aus AMC-Kataboliten	IC ₅₀ [M] (KB)	Faktor des Aktivitätsrückgangs ^[c]
S-Me-DM1	6.6 × 10 ⁻¹¹	S-Me-DM1-Sulfoxid	1.3 × 10 ⁻⁸	196
		S-Me-DM1-Sulfon	3.5 × 10 ⁻⁹	53
S-Me-DM4	2.6 × 10 ⁻¹¹	S-Me-DM4-Sulfoxid	1.9 × 10 ⁻⁹	73
		S-Me-DM4-Sulfon	8.0 × 10 ⁻¹⁰	31
DM1	1.0 × 10 ⁻⁹ ^[b]	DM1-Sulfonsäure	n.b.	n.b.
		DM1-Sulfonsäure	4.0 × 10 ⁻⁸	40
DM4	3.0 × 10 ⁻¹⁰ ^[b]	DM4-Sulfonsäure	n.b.	n.b.
		DM4-Sulfonsäure	2.7 × 10 ⁻⁸	90
Lys-SPP-DM1	2.9 × 10 ⁻⁸	keine	–	–
Lys-SPDB-DM4	3.3 × 10 ⁻⁸	keine	–	–
Lys-SMCC-DM1	6.2 × 10 ⁻⁸	keine	–	–

[a] n.b.: Nicht bestimmt; die Verbindung wurde nicht synthetisiert. –: keine Werte, weil die Ausgangsverbindungen nicht metabolisiert wurden. (KB) bedeutet, dass die Cytotoxizität der verschiedenen Maytansinoide gegenüber der KB-Zelllinie bestimmt wurde. [b] Die In-vitro-Cytotoxizität schwankt aufgrund der Thiolreaktivität mit Cystein und anderen disulfidhaltigen Bestandteilen des Zellmediums. [c] Faktor des Aktivitätsrückgangs = (IC₅₀ des Lebermetaboliten)/(IC₅₀ des Primärmetaboliten).

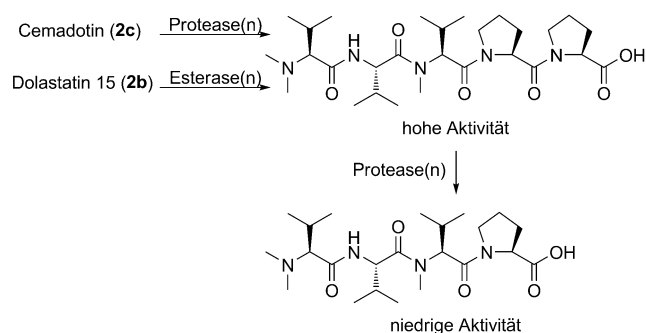


Abbildung 18. Proteolytische Inaktivierung des aktiven Restes aus Cemadotin (2c) und Dolastatin 15 (2b).

wurde am terminalen sekundären Amin mit dem selben Mal-Caproyl-Val-Cit-Linkersystem derivatisiert, und außerdem auch mit einem nicht-spaltbaren Maleimid-Caproyl-Linker. Analoga von Auristatin F mit einem terminalen Dimethylaminrest sind auch am Carboxyterminus für die Verknüpfung mit Antikörpern modifiziert worden. Diese Verbindungen werden hier allerdings nicht weiter behandelt.^[70]

5.2.2. Herstellung von Auristatin-ADCs

Für eine Konjugation mit maleimidtragenden Auristatin-Derivaten werden am Antikörper freie Thiolgruppen benötigt. Antikörper haben im Allgemeinen allerdings keine freien Thiole; sie enthalten nur endogene Cysteine, die als Disulfidpaare mit anderen Cysteinen 4 Brücken zwischen und 12 Brücken innerhalb der Ketten bilden (bei humanen IgG₁-Antikörpern). Die Disulfide zwischen den Ketten können leichter reduziert und in einem reduzierten Zustand erhalten werden als die Disulfide innerhalb der Ketten.^[71] Für die vollständige oder teilweise Reduktion dieser Brücken genügen milde Reduktionsmittel wie DTT; dabei entstehen verschiedene Antikörperderivate mit 2 bis 8 freien Thiolresten. Die Antikörper können dann vom Reduktionsmittel abgetrennt und mit einem maleimidhaltigen Auristatin-Derivat umgesetzt werden. Man erhält Antikörper, die mit einer unterschiedlichen Zahl von Auristatinmolekülen beladen sind, wobei der Durchschnitt bei 4 Auristatinen je Antikörper liegt.^[72] Konjugate von MMAE mit dem Val-Cit-Linker wurden

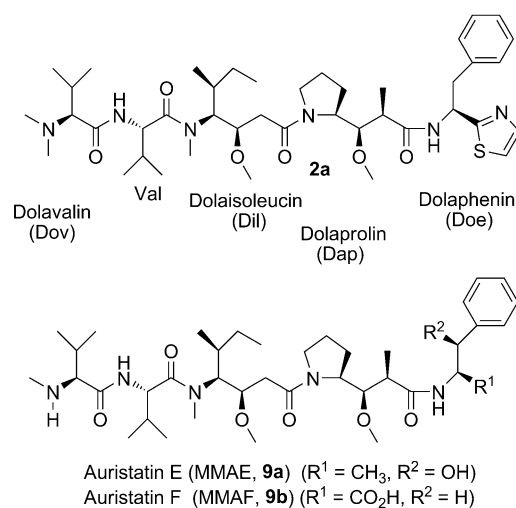


Abbildung 19. Bezeichnung der Reste für SAR-Studien an Dolastatin 10 (2a) und die Strukturen von MMAE und MMAF.

auch durch hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) gereinigt, um die einzelnen Verbindungen mit 2, 4 oder 8 MMAE pro Antikörper voneinander zu trennen.^[73] Die einzelnen Fraktionen wurden in der Forschung verwendet, wurden aber noch nicht klinisch getestet.

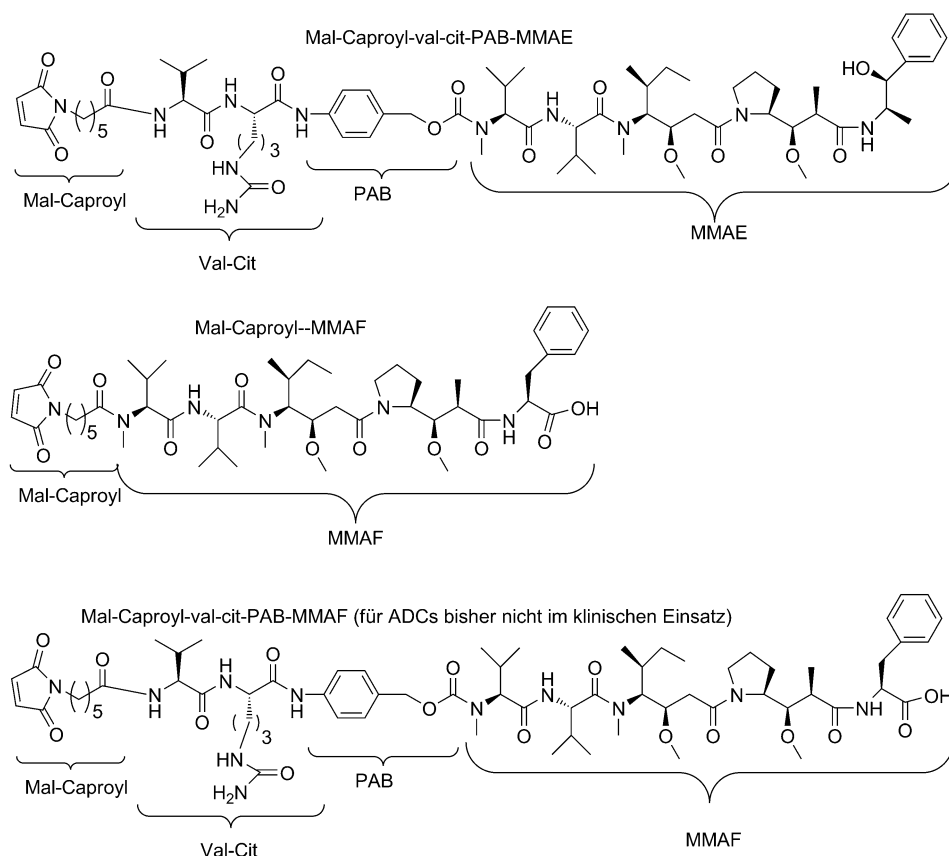


Abbildung 20. Ausgewählte konjugierbare Derivate von MMAE und MMAF.

5.2.3. Cytotoxizität von Auristatin-ADCs

In Studien wurde bestimmt, wie die Beladung eines Antikörpers mit MMAE die In-vitro- und In-vivo-Aktivität des entstehenden Konjugats und die pharmakokinetischen Parameter beeinflusst.^[73] (Anti-CD30-Antikörper)-MMAE-Konjugate in den getrennten Chargen mit 2, 4 oder 8 MMAE-Molekülen pro Antikörper behielten die volle Affinität zum Antigen. Cytotoxizitätstests ergaben einen leichten Anstieg der In-vitro-Aktivität mit steigender MMAE-Beladung.

ADCs von MMAF haben sich ebenfalls antigen-positiven Zellen gegenüber als hoch cytotoxisch erwiesen. Der anti-CD30-Antikörper cAC10 wurde getrennt mit Mal-Caproyl-vc-PAB-MMAF und Mal-Caproyl-MMAF zu einem Protease-spaltbaren und einem nicht-spaltbaren ADC konjugiert. Die beiden ADCs hatten vergleichbare Aktivität gegen eine Testbatterie CD30-positiver Zelllinien. Gegenüber einigen Zellarten war das Val-Cit-gekuppelte ADC jedoch bis zu 10-mal wirksamer. Daher wurde vermutet, dass MMAF-ADCs mit der Val-Cit-Brücke in einigen Fällen effizientere Kataboliten freisetzen als MMAF-ADCs mit nicht-spaltbarem Linker.^[69]

5.2.4. Zellulärer Stoffwechsel von Auristatin-ADCs

Wie AMCAs werden auch Auristatin-ADCs durch die Zielzellen abgebaut. Ein Vorschlag für den katabolischen Mechanismus von MMAE-ADCs ist in Abbildung 21 dargestellt. Der Antikörper-Anteil eines Auristatin-ADC bindet an das Zielantigen auf der Zelloberfläche. Anschließend wird das Konjugat internalisiert und in ein proteolytisches Kompartiment überführt. Nach der Spaltung der Amidbindung zwischen dem Peptid und

dem aromatischen Amin kommt es unter Decarboxylierung zur spontanen Abspaltung des PAB-Restes; MMAE bleibt zurück. MMAF ist meist über einen nicht-spaltbaren Linker an den Antikörper gebunden. Dieser wird in den katabolischen Vesikeln der Zellen nicht gespalten (Abbildung 22). Stattdessen wird der Antikörperteil des ADC abgebaut und setzt einen Kataboliten frei, der Cystein-gebundenes MMAF enthält (Cys-Mal-Caproyl-MMAF).

Proteaselabile, spontan zerfallende Konjugate von MMAE-ADCs können das Abtöten von Bystander-Zellen induzieren, vermutlich, indem sie das membrangängige MMAE freisetzen, das in die benachbarten Zellen diffundieren und sie abtöten kann.^[74] MMAF-Konjugate, die über einen nicht-spaltbaren Linker gekuppelt sind, induzieren dagegen kein Abtöten von Bystander-Zellen, vermutlich, weil

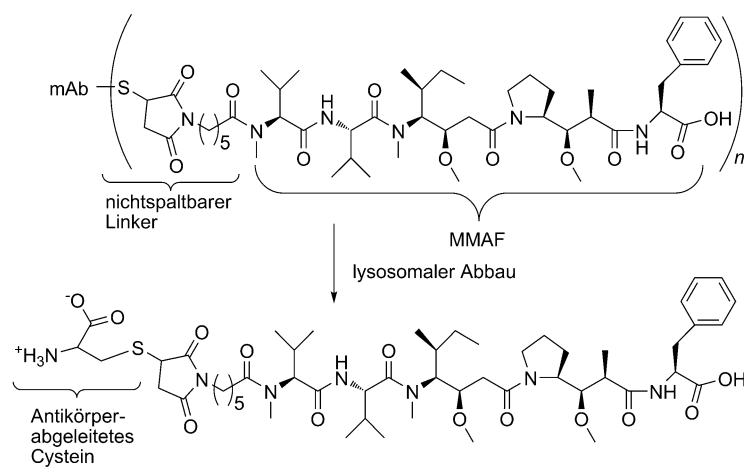


Abbildung 22. Zellulärer Metabolismus von ADCs mit dem über einen nicht-spaltbaren Linker angekuppelten Auristatin F.

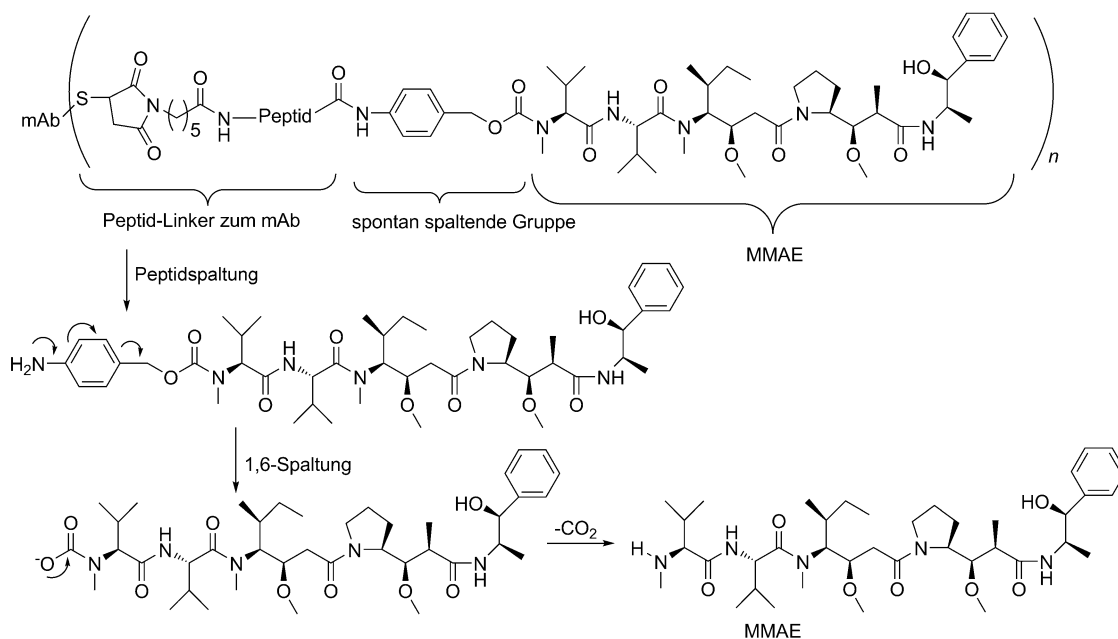


Abbildung 21. Zellulärer Metabolismus spontan zerfallender ADCs mit Auristatin E.

sie den geladenen Cys-Caproyl-MMAF-Kataboliten freisetzen, der nur schlecht membranpermeabel ist.

Die Effizienz der ADC-Internalisierung sollte die Aktivität beeinflussen, doch zeigt sich auch, dass der Weg, über den ADCs internalisiert werden, auch bestimmt, ob aktive Katabolite freigesetzt werden. Smith et al. führten eine Untersuchung mit dem ADC L49-MMAF durch, in welchem der monoklonale anti-Melanotransferrin-Antikörper (L49) über einen nicht-spaltbaren Linker mit MMAF verbunden war.^[75] Die ADCs wurden bereitwillig von verschiedenen antigenpositiven Zelllinien internalisiert, die eine hohe Expression des Zielantigens aufweisen. Die Zelllinien waren auch sensitiv gegenüber den membranpermeablen Auristatinen, sodass erwartet werden konnte, dass die L49-ADCs gegenüber allen Zielzellen hoch cytotoxisch sind. Einige Zelllinien waren gegen L49-MMAF allerdings resistent. Später stellte sich heraus, dass insensitive Zellen L49 in Caveolae genannte Vesikel internalisieren und die ADCs offenbar nie in katabolische Vesikel gelenkt wurden. Ohne Spaltung der ADCs werden die cytotoxischen Katabolite, die die Zellen abtöten, jedoch nicht freigesetzt.

5.2.5. Präklinische Pharmakokinetik, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Auristatin-ADCs

Da das cAC10-Konjugat mit 8 MMAE-Einheiten in vitro aktiver ist als Konjugate mit geringerer MMAE-Beladung, wurde eine Überprüfung in vivo vorgenommen. Hier allerdings verschwand das ADC mit 8 MMAE je Antikörper deutlich schneller aus dem Serum als Konjugate mit 4 oder weniger MMAE pro Antikörper.^[73] Dies wird oft als Beweis gesehen, dass hoch beladene ADCs schneller eliminiert werden. Allerdings halten die Disulfidbrücken zwischen den Ketten die schweren und leichten Antikörperketten zusammen und tragen so zur Stabilität des Antikörpers bei; die Spaltung aller dieser Disulfidbrücken, um damit Anknüpfungspunkte für eine höhere Beladung mit MMAE zu schaffen, hat das Potenzial, die Stabilität der Konjugate und die Eliminierungsgeschwindigkeit in vivo zu verändern. Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Linkersystemen oder cytotoxischen Molekülen sind wahrscheinlich notwendig, um herauszufinden, ob hoch beladene ADCs ohne Beeinträchtigung der Eliminierungsgeschwindigkeit hergestellt werden können. Die cAC10-ADCs mit 4 MMAE-Molekülen pro Antikörper haben eine MTD von 30–40 mg kg⁻¹ (Antikörperprotein-Dosis) in SCID-Mäusen.^[71]

Konjugate von cAC10 mit Val-Cit-verbrückten MMAF oder Mal-Caproyl-MMAF haben ähnliche In-vivo-Wirksamkeit gegen Karpas-299-Xenografts in Nacktmäusen. Allerdings hatte das ADC mit dem nicht-spaltbaren Mal-Caproyl-Linker in Mäusen eine MTD von > 150 mg kg⁻¹, während das ADC mit dem spaltbaren Val-Cit-Linker mit einer MTD von 50 mg kg⁻¹ dreimal so toxisch war. Die Konjugate waren mit 4 MMAE je Antikörper beladen. SGN-75 ist ein anti-CD70-Antikörper, der über einen nicht-spaltbaren Linker mit MMAF gekuppelt ist. Für In-vivo-Untersuchungen wurde eine doppelt radioaktiv markierte Variante von SGN-75 hergestellt ([¹⁴C]-MMAF und [³H]-anti-CD70-Antikörper).^[76] Bei Verteilungsstudien mit diesem Konjugat in tu-

mortragenden Mäusen wurden die Akkumulation von ¹⁴C aus MMAF und ³H aus dem Antikörper im Tumor und in verschiedenen normalen Geweben bestimmt. Die Radioaktivität aus MMAF befand sich hauptsächlich im Tumor (82 % der injizierten Dosis/g nach 2 Tagen). Ähnlich wie bei Maytansinoid-Konjugaten wurden die ADCs stark in solchen Geweben angereichert, die die Antikörper abbauen.

6. DNA-wirksame Substanzen als ADC-Beladung

6.1. Calicheamicine

Die Calicheamicine sind eine Klasse Endiin-haltiger Antitumor-Antibiotika, die zu den wirksamsten Tumortheraeutika gehören, die je entdeckt wurden. Sie wurden erstmals 1986 als Fermentationsprodukt des Bakteriums *Micromonospora echinospora* ssp. *calichensis* bei einer Suchkampagne nach neuen DNA-schädigenden Substanzen gefunden.^[77,78] Calicheamicin β_1^{Br} (**10a**) und γ_1^{Br} (**10b**) waren die zuerst isolierten Vertreter dieser Klasse, gefolgt von Calicheamicin γ_1^{I} (**10c**) (Abbildung 23) und anderen Calicheamicinen.^[79]

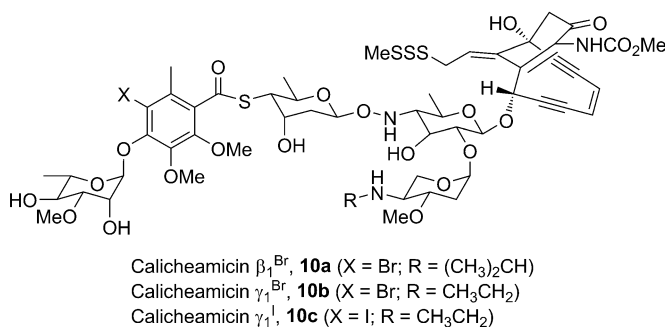


Abbildung 23. Strukturen von Calicheamicinen.

Calicheamicin γ_1^{I} , der bekannteste Vertreter der Gruppe, hat eine komplexe Struktur mit einer hochfunktionalisierten bicyclischen Endiin-Einheit, die einen Methyltrisulfidrest trägt und über eine Reihe ungewöhnlicher Bindungen an einen ausgedehnten Zuckerrest gekuppelt ist, der einen vollständig substituierten Benzolring trägt. In vivo weist die Substanz bei sehr niedrigen Dosen (0.15 $\mu\text{g kg}^{-1}$) eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegen eine Reihe von Tumoren auf.^[80] Trotz der molekularen Komplexität wirken alle Komponenten der Calicheamicine in einem faszinierenden Wirkmechanismus zusammen (Abbildung 24).^[81,82] Das Aryltetrasaccharid von **10c** bindet fest und relativ sequenzspezifisch an die kleine Furche der DNA und positioniert so den Endiin-„Gefechtskopf“ innerhalb der DNA-Doppelhelix. Dort kann aus dem Methyltrisulfid durch einen nucleophilen Angriff (z. B. durch Glutathion) letztlich ein freies Thiol gebildet werden, das spontan mit dem α,β -ungesättigten Keton am Ende des Endiins cyclisiert. Die Ringspannung, die durch diese Addition auf das Endiin ausgeübt wird, wird durch eine Cycloaromatisierung vom Bergman-Typ^[83] aufgelöst, wobei ein 1,4-Benzol-Diradikal entsteht. Dieses spaltet Wasser-

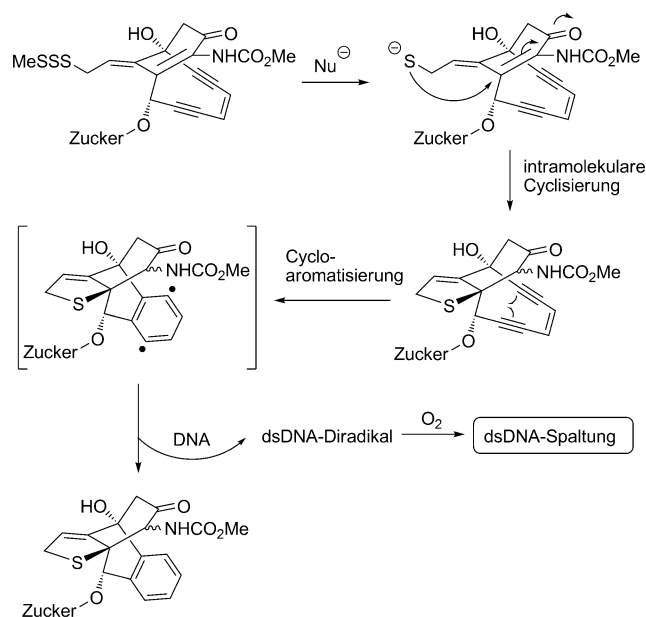


Abbildung 24. Mechanismus der DNA-Spaltung durch Calicheamicin.

stoffatome von beiden Strängen der DNA-Doppelstrangs ab und erzeugt so ein doppelsträngiges DNA-Diradikal. In Gegenwart von Sauerstoff wird der DNA-Doppelstrang gespalten und der Zelltod ausgelöst.

Wegen dieses einmaligen Wirkmechanismus und der hohen Aktivität wurden viele Analoga der Calicheamicine als mögliche Chemotherapeutika in präklinischen Modellen untersucht. Aufgrund der bei der Behandlung mit diesen Verbindungen auftretenden toxischen Nebenwirkungen wurden allerdings keine Therapien mit Calicheamicinen als reinen Wirkstoffen entwickelt. Stattdessen sind sie aufgrund ihrer Wirksamkeit ideale Kandidaten für ADCs, vor allem, wenn die Antigenexpression gering ist.

6.1.1. Calicheamicine als ADC-Beladung

Calicheamicin γ_1^I wurde wegen seiner extremen Wirksamkeit und Toxizität als zu toxisch für ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat eingeschätzt. Daher wurde *N*-Acetyl- γ -Calicheamicin, ein 20fach weniger aktives Analogon, als Träger des Calicheamicin-Zentrums entwickelt.^[84] Außerdem wurde das natürliche Trisulfid der Ausgangsstruktur in ein Disulfid umgewandelt, das sich damit für die Konjugation an einen Antikörper eignete. Die Versuche, Calicheamicin-Antikörper-Konjugate herzustellen, konzentrierten sich hauptsächlich auf die Hydrazon- oder Amidverknüpfung.^[85]

Konjugate mit kuppelbaren Derivaten von Calicheamicin (Abbildung 25) wurden mit anti-MUC1- und anti-CD33-Antikörpern hergestellt; die Ergebnisse waren höchst unterschiedlich.^[85–88] Bei einer Konjugation wurde NAc- γ -Calicheamicin-DMH (**10d**) über eine säurelabile Hydrazonbindung mit dem Antikörper verknüpft. Die Hydrazonbindung wurde gebildet, indem Kohlenhydratreste des Antikörpers mit Periodat unter Entstehung von Aldehydgruppen oxidiert

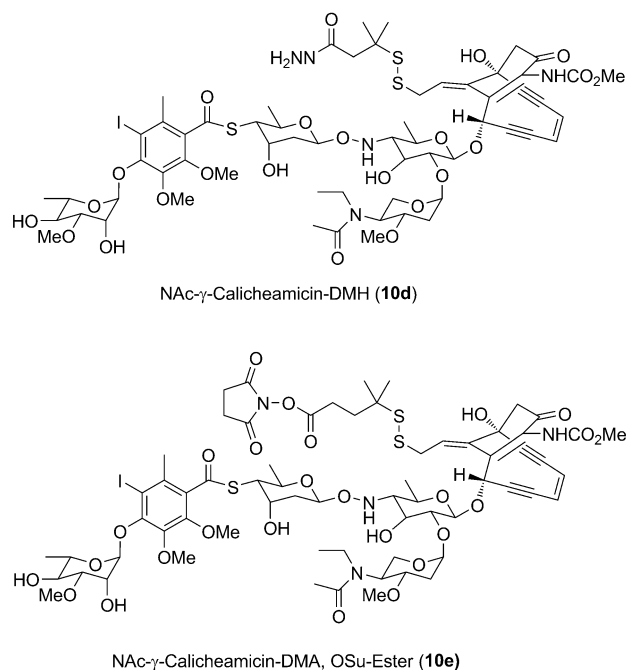


Abbildung 25. Strukturen von konjugierbaren NAc- γ -Calicheamicin-DMH (**10d**) und -DMA, OSu-Ester (**10e**).

wurden. In der anschließenden Reaktion mit **10d** entstand ein „Kohlenhydratkongjugat“. Alternativ wurde ein „Amidkongjugat“ hergestellt, indem man das NAc- γ -Calicheamicin-DMA (**10e**) über eine Lysingruppe des Antikörpers mit einer stabileren Bindung verknüpfte. Auch wenn diese beiden Verbindungen unterschiedlich sind, behalten beide Formen das sterisch gehinderte Disulfid, das geminale Dimethylsubstituenten trägt; dies ermöglicht einen weiteren Weg der Wirkstofffreisetzung durch Disulfidspaltung. Im Allgemeinen entstanden mit diesen Konjugationsverfahren Konjugate mit durchschnittlich 2 bis 3 Molekülen Calicheamicin pro Antikörper.

Anti-MUC1-Konjugate^[86,87] mit dem IgG1-Antikörper CTM01, gekuppelt mit Calicheamicin mit den beiden unterschiedlichen Linker-Arten, wurden in vitro getestet; beide Konjugate waren in einem 1h-Expositionstest wirksam und spezifisch. Das Kohlenhydratkongjugat verlor aber offenbar völlig seine Spezifität in einem Dauerexpositionstest über 4 Tage, vermutlich aufgrund einer extrazellulären hydrolytischen Spaltung der weniger stabilen Hydrazonbindung unter Freisetzung von Calicheamicin. Dieser Mangel an Spezifität stimmt mit der leicht höheren Toxizität des hydrazonverknüpften Kongjugats gegenüber dem amidverknüpften Kongjugat überein. In vivo war das Amidkongjugat gegen eine Anzahl verschiedener Tumormodelle mindestens so aktiv wie das Hydrazonkongjugat, zeigte aber eine bessere Aktivität gegenüber Tumoren, die das PgP-Multiresistenzprotein überexprimieren. Aus diesen Daten kann man wahrscheinlich folgern, dass zumindest bei diesem anti-MUC1-Kongjugat das gehinderte Disulfid des Amidkongjugats eine ausreichende Freisetzung von intrazellulärem Calicheamicin durch Glutathionreduktion ermöglicht. Daher wurde das anti-MUC1-

Calicheamicin-Amidkonjugat CMB-401 in klinischen Studien gegen Ovarial- und Lungentumoren getestet, doch wurden nur wenige Hinweise auf Wirksamkeit beobachtet.^[87]

Calicheamicin wurde auch durch eine Kohlenhydrat- oder eine Amidbindung wie oben beschrieben an den Mausantikörper P67.6 als anti-CD33-Konjugat gekuppelt.^[85,88] Anders als bei den anti-MUC1-Konjugaten gab es hier in vitro eine klare Präferenz für das säurelabile Konjugat, denn dieses war gegenüber antigen-positiven HL-60-Zellen fast 7000-mal so wirksam wie das entsprechende Amidkonjugat. Wahrscheinlich liegt dem ein anderer Mechanismus der zellulären Spaltung zugrunde. Die P67.6-Amidkonjugate waren zwar aktiv, erzeugten jedoch keine langdauernden Antworten bei einer In-vivo-Evaluierung in Xenograft-Modellen, während das Kohlenhydratkonjugat die meisten Tumoren (9 von 10) bei Dosen von 150 und 300 $\mu\text{g kg}^{-1} \times 3$ abtötete. Diese widersprüchlichen Resultate zwischen Antikörper (anti-MUC1 verglichen mit anti-CD33) und Verbindungstyp machen klar, dass ein einziger Kupplungstyp für Konjugate nicht notwendigerweise für alle Antikörperkonjugate optimal ist.

Während sich die murine Form des P67.6-Antikörpers erfolgreich mit Natriumperiodat oxidieren ließ, um die hydrazonverknüpften Calicheamicin-Konjugate zu bilden, schlug bei ähnlichen Versuchen mit dem entsprechenden humanisierten Antikörper die Beladung fehl, und die Bindungsaffinität ging verloren.^[88] Das Konjugat wurde daher so überarbeitet, dass die Hydrazonbindung erhalten blieb, die Konjugation aber über ein Lysin des Antikörpers verlief und die Oxidation des Antikörpers vermieden wurde. Von 36 verschiedenen hybriden Linkern, die getestet wurden (eine repräsentative Auswahl ist in Abbildung 26 dargestellt),^[88] wurde der AcBut-Linker ausgewählt, denn er war über 24 h bei 37 °C und pH 7.4 hinreichend stabil (94 %) und wurde bei pH 4.5 fast vollständig hydrolysiert (97 %). Der Linker sollte also im Kreislauf im Blutplasma stabil sein, in den sauren Lysosomen aber leicht gespalten werden können. Das hP67.6-NAC- γ -Calicheamicin-DMH-AcBut-Konjugat (**10f**) erwies sich als sehr wirksam gegenüber antigen-positiven HL-60-Zellen und war über 100 000-mal wirksamer als das nicht zielgerichtete MOPC-21-Konjugat, was die hohe Konjugatselektivität unterstreicht. In vivo induzierte das Konjugat in HL-60-Tumoren Xenografts vollständige Tumoregression. Außerdem zeigte sich in Ex-vivo-Versuchen eine moderate Hemmung der Koloniebildung bei einer Reihe leukämischer Knochenmarksproben von AML-Patienten (akute myeloische Leukämie). Auf der Basis dieser Daten wurde **10f** (CMA-676, Gemtuzumab Ozogamicin) in die klinische Prüfung am Menschen übernommen.^[88]

CMC-544 (**10g**) ist ein zweites NAC- γ -Calicheamicin-DMH-Konjugat, das auf ähnliche Weise unter Verwendung des AcBut-Hydrazon-Linkers hergestellt wurde.^[89] CMC-544 ist ein humanisiertes IgG4-Antikörper-Calicheamicin-Konjugat, das CD22 erkennt, welches auf der Mehrzahl maligner B-Zellen exprimiert wird. CMC-544 war stabil, sehr wirksam, in vitro spezifisch und erreichte in vivo eine vollständige Tumoregression bei Mäusen, die humane Lymphoma-Xenografts trugen; manche Tiere waren für mehr als 100 Tage tumorfrei.^[90] Gegenwärtig wird **10g** (Inotuzumab Ozogamicin) in zahlreichen klinischen Studien getestet, darunter in einer

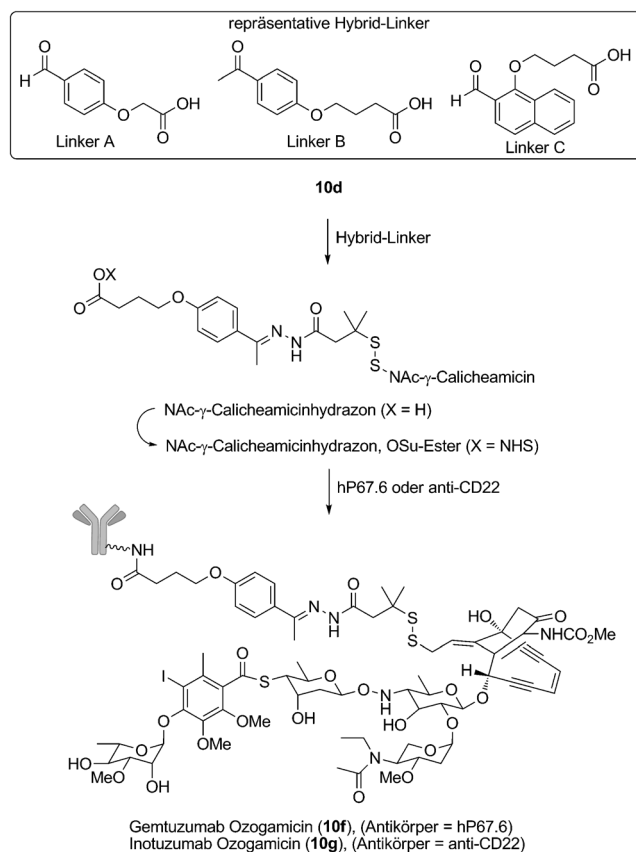


Abbildung 26. Synthese von ADCs mit Calicheamicin.

Phase-III-Studie gegen akute lymphoblastische Leukämie (ALL).^[91]

6.2. (+)-CC-1065 und die Duocarmycine als ADC-Beladung

Die Duocarmycine wie Duocarmycin A (**11a**) und SA (**11b**) (Abbildung 27) sind eine Familie natürlich vorkommender antibakterieller Substanzen, die zuerst in den späten 1970er Jahren aus Bakterienkulturen von *Streptomyces zeilensis* isoliert wurden.^[92] Die chemische Struktur von (+)-CC-1065 (**4a**), das ebenfalls zur Duocarmycin-Familie gehört, wurde 1980 bestätigt; die Verbindung besteht aus drei verbundenen Pyrroloindol-Untereinheiten, von denen eine einen sonst noch nie gefundenen spirocyclischen Cyclopropylpyrroloindolrest (CPI) enthält.^[93] Zur Zeit der Entdeckung gehörte **4a** zu den wirksamsten bekannten Antitumor-Antibiotika.^[94] Die Duocarmycine, insbesondere **4a**, erreichen ihre hohe Wirksamkeit durch eine sequenzspezifische Alkylierung der DNA, in der eine 5 Basenpaare lange, AT-reiche Sequenz bevorzugt wird, da diese die zentrale Pyrroloindol-Untereinheit besonders gut einbaut. So in der kleinen Furche der DNA eingelagert, greift das N3 des Adenin den Cyclopropanrest am am wenigsten substituierten Kohlenstoff von **4a** an (Abbildung 28) und bildet ein DNA-Addukt. Die DNA-Alkylierung verursacht letztlich den Zelltod.^[95]

Eine klinische Entwicklung von **4a** wurde nicht verfolgt, denn die Substanz wies eine verzögerte Toxizität in Mäusen

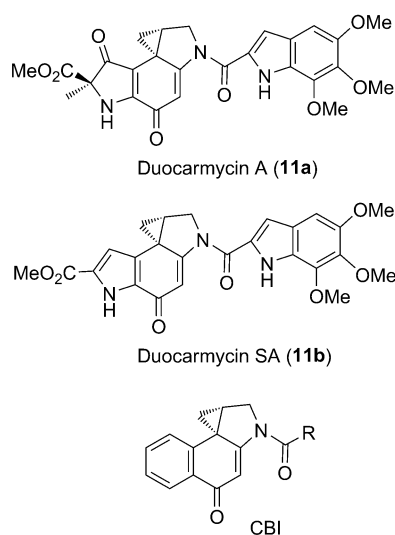


Abbildung 27. Strukturen der Duocarmycine A und SA und des Cyclopropabenzindolrestes (CBI).

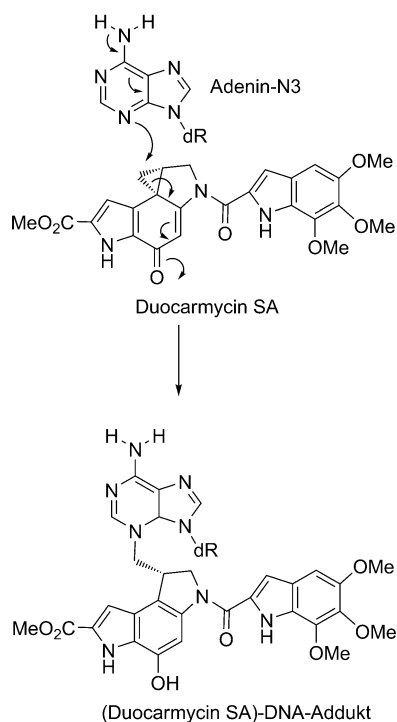


Abbildung 28. Mechanismus der DNA-Alkylierung durch Duocarmycin SA.

auf. Bei den Bemühungen, dieses Problem zu überwinden, wurden Moleküle wie Adozelesin (**4b**), Carzelesin (**4c**) und Bizelesin (**4d**) synthetisiert (Abbildung 3). Mit diesen Molekülen gelang es zwar, das Problem der verzögerten Toxizität zu umgehen, doch hatten sie nur eine begrenzte therapeutische Aktivität bei der klinischen Erprobung.^[96,97] Dennoch konnte bei den Arbeiten viel Erfahrung und ein besseres Verständnis der Duocarmycinstruktur gewonnen werden. Die Einsichten waren hilfreich bei der Entwicklung der Duo-

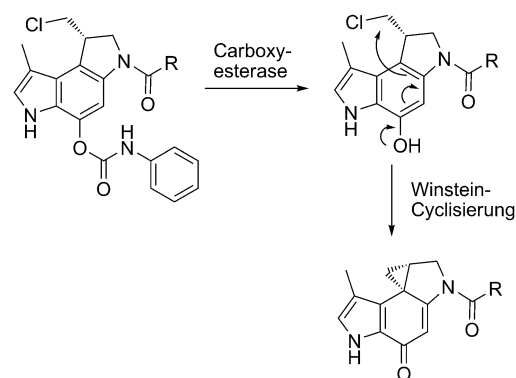


Abbildung 29. Mechanismus der Aktivierung von Carzelesin durch Winstein-Cyclisierung.

carmycine als ADC-Nutzlast. Zum Beispiel wirkte sich die Verwendung eines Chlormethylsubstituenten als Vorläufer der reaktiven Cyclopropylgruppe in vitro und in vivo nur wenig aktivitätsmindernd aus, was darauf hindeutet, dass der Ringschluss, gleich ob chemisch oder enzymatisch, schnell abläuft (Abbildung 29).^[96,98] Als Konsequenz konnte der CPI-Rest in der ringoffenen Chlormethylform im phenolischen Zustand derivatisiert werden, wodurch verschiedene Arten von Wirkstoffvorstufen wie Carbamoyl-, Glycosyl-, Peptidyl- und Carbonatderivate zugänglich wurden. Der Einbau einer solchen Vorstufe einer funktionellen Gruppe kann dabei helfen, die Bildungsgeschwindigkeit der DNA-reaktiven Cyclopropylgruppe zu kontrollieren, die chemische Gesamtstabilität zu verbessern und die Wasserlöslichkeit zu erhöhen. Schließlich beschrieben Boger und Mitarbeiter die Synthese eines synthetisch besser zugänglichen Cyclopropabenzindols (CBI, Abbildung 27) als Möglichkeit, um die alkylierende CPI-Untereinheit zu ersetzen und dabei zu Verbindungen zu gelangen, die noch immer aktiv waren, aber etwa 4-mal so stabil.^[99–101]

Versuche, diese neuen Gruppen einzubauen, wurden zunächst mit der Synthese des Analogons DC1 umgesetzt, das das stabilere Chlormethyl-Surrogat, CBI als alkylierende Untereinheit und einen Linker mit einem Thiol an der terminalen Pyrroloindol-Einheit für die Konjugation mit einem Antikörper enthält (Abbildung 30).^[102] Antikörper-DC1-Konjugate mit 3 bis 4 DC1-Molekülen pro Antikörper und Disulfidbrücken erwiesen sich als extrem cytotoxisch mit IC₅₀-Werten im niedrigen pikomolaren Bereich und mit einer > 1000fachen Selektivität für antigen-positive Zellen. Das Ausgangskonjugat, anti-B4-DC1, war zwar in humanen Tumorenograft-Modellen aktiv, doch seine schlechte Löslichkeit und Instabilität in wässriger gepufferter Lösung schloss eine weitere Entwicklung aus.

Um diese Nachteile zu umgehen, wurden Analoga von DC1 synthetisiert, in die eine Phosphatgruppe als Vorstufe an der Phenolgruppe der CBI-Untereinheit eingebaut wurde. So entstanden die Verbindungen DC4 und DC44 (Abbildung 30) mit deutlich besserer Löslichkeit (3000-mal besser als DC1) und stark erhöhter Stabilität unter den herrschenden wässrigen Konjugationsbedingungen.^[103] Der Einbau der Phosphat-Vorstufe änderte weder die Aktivität noch die Spezifität der

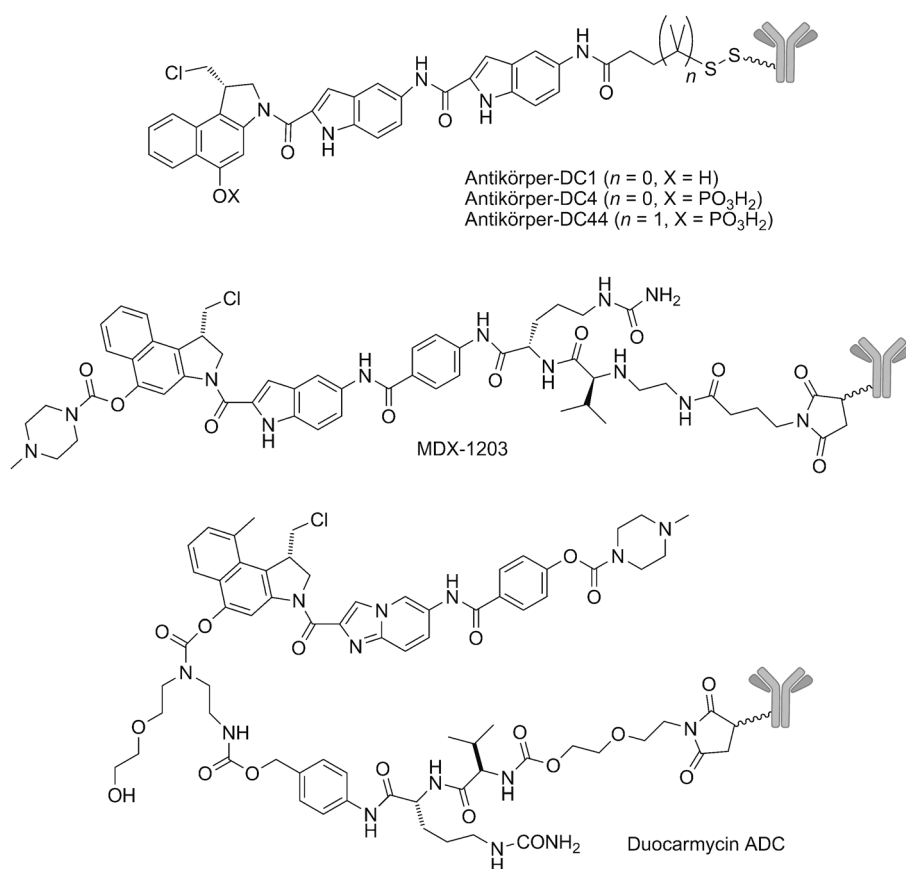


Abbildung 30. Strukturen von Duocarmycin-ADCs der zweiten Generation.

huB4-DC-Konjugate; die Krebszellen besitzen also die notwendigen Phosphatasen, um die Vorstufe intrazellulär zu aktivieren.^[103]

Weitere Syntheseveruche unter Nutzung der Strukturinformationen aus der Duocarmycinforschung mündeten in das ADC MDX-1203. Dieses Konjugat enthält ein synthetisches Duocarmycin-Derivat, verknüpft mit einem humanen anti-CD70-Antikörper (Abbildung 30). Das Duocarmycin-Analogon enthält das Chlormethyl-Surrogat, eine Piperazincarbamat-Vorstufe an der Phenolgruppe der CBI-Einheit und eine modifizierte terminale Pyrroloindol-Untereinheit mit einem substituierten Anilin. Über diese Gruppe erfolgt die Bindung an den Antikörper über einen Val-Cit-Dipeptid-Linker. Ist das Konjugat internalisiert, wird das Dipeptid gespalten und das anilinhaltige Duocarmycin freigesetzt. Dieses wird dann durch Carbamatspaltung aktiviert, vermutlich durch eine Carboxyesterase. MDX-1203 besitzt in vitro und in vivo eine starke antigenspezifische Aktivität und wird daher klinisch gegen Nierenzellkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom getestet.

Eine weitere Möglichkeit zur Kupplung von Duocarmycinen ist ebenfalls in Abbildung 30 dargestellt. In diesem Fall wurde ein Methylpiperazincarbamat am terminalen Pyrroloindol eingebaut und ein Peptid-Linker über den Phenolrest der CBI-Einheit verknüpft.^[104] Der Linker trägt ein spaltbares Peptid, das eine *p*-Aminobenzylgruppe freisetzt. Diese durchläuft eine Reihe spontaner Zerfallsreak-

tionen, in deren Verlauf das aktive Duocarmycin entsteht. Solche Konjugate wurden über Thiole mit Trastuzumab verbunden; die Thiolgruppen wurden durch Reduktion der zwischen den Antikörperketten vorliegenden Cystine freigelegt. Die Konjugate waren mit durchschnittlich 2 Duocarmycin-Molekülen pro Antikörper beladen. Die Variation der Linkerlänge beeinflusst die Stabilität des Konjugats im humanen Blutplasma, die Konjugate selbst sind in vitro aktiv. Die In-vivo-Aktivität gegen Tumore hängt von der Länge des Linkers und der Art des Wirkstoffs ab.

6.3. SN-38 und die Camptothecine

Camptothecin (CPT, **12a**), ein pentacyclisches pflanzliches Chinolon-Alkaloid, wurde erstmals 1966 von Wani und Wall aus dem asiatischen Laubbaum *Camptotheca acuminata* isoliert (Abbildung 31).^[105] CPT ist stark antitumorwirksam, indem es selektiv die DNA-Topoisomerase I hemmt, die DNA-Replikation damit in der S-

Phase blockiert und die Apoptose der Tumorzelle induziert.^[106] Wie die Duocarmycine hat auch **12a** einige Nach-

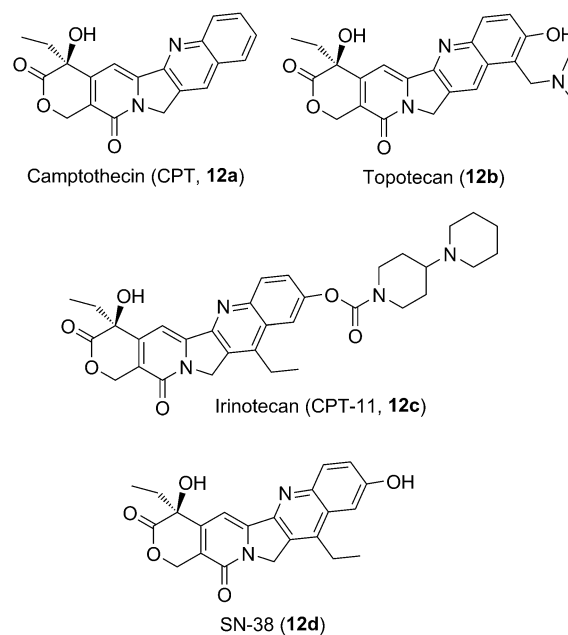


Abbildung 31. Chemische Strukturen von Camptothecin (CPT) und klinisch bedeutsamen Analoga.

teile, die seine klinische Entwicklung verhinderten, so die schlechte Wasserlöslichkeit und die leichte physiologische Umwandlung des Lactons in die inaktive ringoffene Carboxylatform. Bei Versuchen, diese Eigenschaften zu verbessern, gelangte man zu den Verbindungen Topotecan (**12b**) und Irinotecan (**12c**), die von der FDA als Chemotherapeutika zugelassen wurden.^[107,108] Die Überführung in eine wasserlösliche Piperazin-Vorform (**12c**) war zwar für eine klinisch effektive Verbindung ausreichend, doch nahm die Wirksamkeit wegen der ineffizienten Carboxylesterase-katalysierten Hydrolyse dieser Vorform im Patienten zum aktiven Metaboliten SN-38 (**12d**) ab.

Für die Kupplung von **12d** an einen Antikörper wurde die C20-Hydroxygruppe getestet.^[109–114] Dies verfolgte einen doppelten Zweck: a) erhält man einen Angriffspunkt für den Einbau eines Linkers und b) unterstützt dies die Minimierung der Lactonring-Öffnung unter physiologischen Bedingungen. Die aktuellen Ansätze konzentrierten sich entweder auf den CL2-Linker, der einen lösungsvermittelnden Abstandhalter, ein pH-sensitives *p*-Aminobenzylcarbonat und eine Lysin-Phenylalanin-Dipeptidbrücke enthält,^[109] oder den CL2A-Linker mit einem einzelnen Lysinrest.^[110,111] Mit diesen Linkern wurde **12d** an Cysteinreste gekuppelt, die durch Reduktion des Antikörpers freigelegt wurden. Es entstehen Konjugate, bei denen durchschnittlich sechs SN-38-Moleküle pro Antikörper über Thioetherbindungen angekuppelt sind. Diese Konjugate sind im Humanserum nicht sehr stabil, sondern setzen etwa 50 % des aktiven Metaboliten **12a** pro Tag frei.^[112] Weil der Antikörper jedoch zielgerichtet ist, wird der überwiegende Teil des Metaboliten lokal im Tumor freigesetzt, und man vermutete, dass für die Aktivität keine Internalisierung notwendig sei.^[110]

Das klinisch am weitesten fortgeschrittene SN-38-Konjugat ist Labetuzumab SN-38 (Abbildung 32), in dem der humanisierte Antikörper hMN-14 gegen das karzinoembryo-

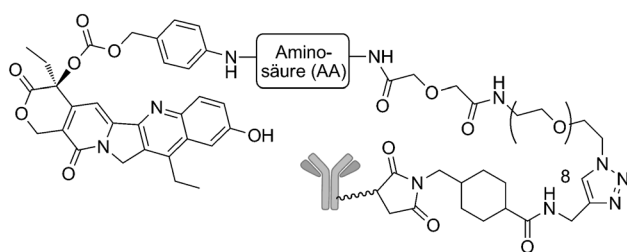
den oder behandlungsresistenten Kolorektaltumoren getestet. hRS7-SN-38 (IMMU-132) ist ein Konjugat von **12a** mit dem humanisierten Trop-2-Antikörper, gekuppelt über den CL2A-Linker. Der Antikörper ist gegen das humane Trophoblasten-Zelloberflächenantigen gerichtet, das auf vielen humanen Tumoren exprimiert wird, darunter auf vielen epithelialen Karzinomen. Präklinische Studien mit IMMU-132 erbrachten Antitumorwirkungen, die denen von nicht-zielgerichteten Kontrollen bei nicht-toxischen Dosen in Mäusen mit verschiedenen Tumortypen überlegen waren.^[114] IMMU-132 wird in einer klinischen Phase-I-Studie an Patienten mit fortgeschrittenen Epithelkarzinomen getestet. Präklinische Untersuchungen von SN-38-Konjugaten gegen zwei andere Zielantigene, Milatuzumab SN-38^[112] und Epratuzumab SN-38^[110] wurden ebenfalls schon beschrieben.

7. Klinische Ergebnisse

Das erste ADC, das von der FDA zugelassen wurde, war Gemtuzumab Ozogamicin (**10f**, Abbildung 26), das aus einer stark cytotoxischen, DNA-Strangbrüche verursachenden Calicheamicin-Verbindung, die über einen Hydrazon-Linker mit einem CD33-Antikörper gekuppelt ist, besteht. Die beschleunigte Zulassung im Jahr 2000 beruhte auf einer einarmigen klinischen Phase-II-Studie und betraf die Behandlung von über 60 Jahre alten Patienten mit einem ersten Rückfall bei CD33⁺-AML, die nicht für eine Chemotherapie infrage kommen.^[115] Später, im Jahr 2010, wurde Gemtuzumab Ozogamicin vom Markt genommen, als eine bestätigende klinische Studie in Kombination mit Chemotherapie Befürchtungen bezüglich der Toxizität aufwarf und kein ausreichender klinischer Nutzen (Verlängerung der Überlebenszeit) nachgewiesen werden konnte.^[116,117] Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass dieses ADC mit einem anderen Dosierungsschema durchaus therapeutisch von Nutzen sein kann.^[117]

Aktuell sind zwei ADCs zur Krebstherapie zugelassen: das auf CD30 zielende Brentuximab Vedotin gegen Hodgkin-Lymphom und anaplastisch-großzelliges Lymphom (ALCL) und das auf HER2 zielende Ado-Trastuzumab Emtansin (T-DM1) gegen metastasierenden Brustkrebs (Abbildung 33). Die beiden ADCs tragen verschiedene gegen Mikrotubuli aktive Wirkstoffe als Nutzlast.

Brentuximab Vedotin besteht aus Monomethylauristatin E (MMAE), einem synthetischen Analogon von Dolastatin 10, gekuppelt mit dem chimären CD30-Antikörper cAC10 an Cysteinreste über einen Valin-Citrullin-Dipeptidlinker mit einem spontan zerfallenden *p*-Aminobenzylcarbonat (PABC) als Abstandhalter. Das Val-Cit-Dipeptid soll in den Lysosomen (von Cathepsin B) gespalten werden, was dann zum Zerfall des PABC-Restes und der Freisetzung von MMAE führt.^[74,118] Der unkonjugierte anti-CD30-Antikörper cAC10 war zuvor klinisch getestet worden, zeigte aber als Monotherapie keine ausreichende Aktivität, um über die Phase-I- und Phase-II-Studien hinauszukommen (8 % Ansprechrate insgesamt).^[119] Demgegenüber führte die überzeugende klinische Aktivität seines MMAE-Konjugats, Brentuximab Vedotin, zur beschleunigten Zulassung durch



Labetuzumab-SN-38 (Antikörper = huMN-14, AA = Lys-Phe (CL2))
hRS7-SN-38 (Antikörper = huRS7, AA = Lys (CL2A))

Abbildung 32. Strukturen von Labetuzumab SN-38 und hRS7-SN-38-ADCs.

nale Antigen (CEA bzw. CD66e) über einen CL2-Linker mit **12d** gekuppelt ist. In präklinischen Untersuchungen verlängerte Labetuzumab SN-38 (IMMU-130) signifikant die mediane Überlebenszeit von Nacktmäusen mit einer Reihe verschiedener humaner Kolorektal- und Pankreaskarzinome im Vergleich zu nicht-zielgerichteten Kontrollen und CPT-11.^[113] IMMU-130 wird gegenwärtig in zwei verschiedenen klinischen Phase-I-Studien an Patienten mit wiederkehren-

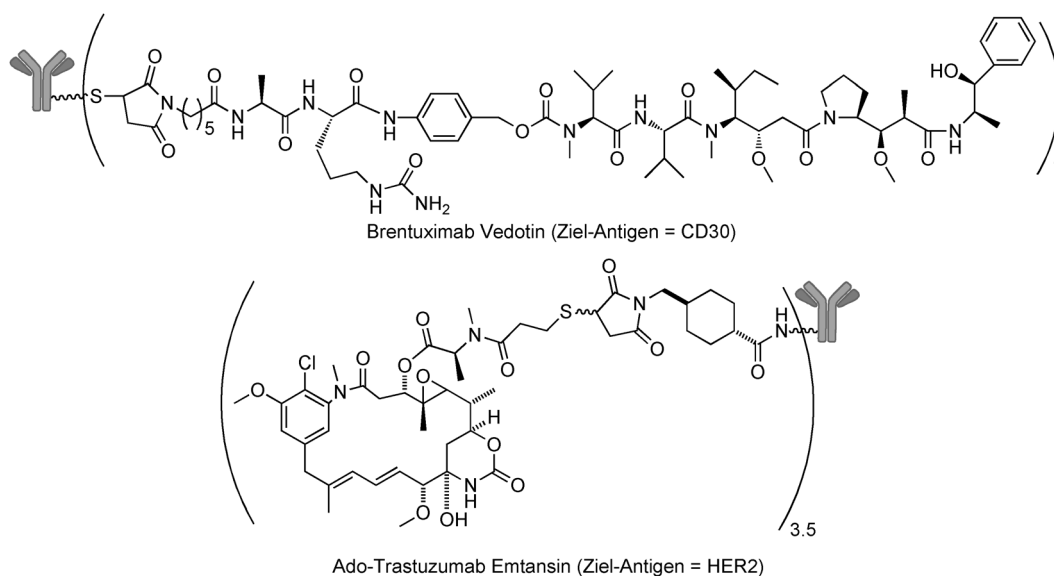


Abbildung 33. Strukturen von Brentuximab Vedotin und Ado-Trastuzumab Emtansin.

die FDA im Jahr 2011.^[120,121] In einer entscheidenden Phase-II-Studie gegen wiederkehrendes oder resistentes Hodgkin-Lymphom zeigte Brentuximab Vedotin in einer Dosis von 1.8 mg kg^{-1} alle drei Wochen eine Gesamtansprechrate von 75 %, wobei 34 % der Patienten eine vollständige und 40 % eine partielle Remission zeigten. Bei wiederkehrender oder resistenter systemischer ALCL war die Ansprechrate 86 % mit Totalremission bei 53 % der Patienten.^[120,122]

Das erste zugelassene ADC zur Behandlung solider Tumore, Ado-Trastuzumab Emtansin, ist ein Konjugat des anti-HER2-Antikörpers Trastuzumab, gekuppelt über Lysinreste mit dem Maytansinoid DM1 über den nicht-spaltbaren SMCC-Thioether-Linker. Die aktive Verbindung, das lysingebundene Maytansinoid, erscheint, wenn das ADC internalisiert und in die Lysosomen transportiert ist, wo der Antikörperrest vollständig zu den Aminosäuren abgebaut wird. Die intrazelluläre Freisetzung des lysingebundenen Maytansinoids führt zum Einfrieren des Zellzyklus und letztlich zum Absterben der Zielzelle.^[65] Sicherheit und Wirksamkeit von Ado-Trastuzumab Emtansin wurden in einer klinischen Phase-III-Studie an 991 Patienten getestet, die zufällig ausgewählt entweder Ado-Trastuzumab Emtansin (3.6 mg kg^{-1} alle drei Wochen) oder Lapatinib plus Capecitabin nach einem etablierten Behandlungsschema erhielten. Bei diesen HER2⁺-Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs, die vorher mit Trastuzumab in Kombination mit einem Taxan behandelt worden waren, bewirkte Ado-Trastuzumab Emtansin im Median ein progressionsfreies Überleben (PFS; progression-free survival) von 9.6 Monaten und eine Gesamtüberlebenszeit im Median von 30.9 Monaten, verglichen mit einem progressionsfreien Überleben von 6.4 Monaten und einer Gesamtüberlebenszeit von 25.1 Monaten bei Behandlung mit Lapatinib plus Capecitabin. Ado-Trastuzumab hatte auch ein günstigeres Sicherheitsprofil im Vergleich zu der chemotherapeutischen Kombination aus Lapatinib und Capecitabin.^[123] Auf dieser Basis erhielt Ado-Trastuzumab Emtansin von der FDA im Jahr 2013 die volle

Marktzulassung^[123,124] zur Behandlung HER2-positiver metastatischer Brustkrebspatientinnen, die vorher Trastuzumab und ein Taxan erhalten hatten. Es war damit das erste ADC, das eine solche vollständige Zulassung erhalten hat.

Mehrere ADCs befinden sich in unterschiedlichen Stadien der klinischen Testung (Tabelle 3). Die meisten enthalten Mikrotubuli-hemmende Verbindungen (Maytansinoide oder Auristatine) als Nutzlast. Die beiden zugelassenen ADCs Ado-Trastuzumab Emtansin und Brentuximab-Vedotin werden auf eine Ausweitung der Indikationen getestet. So wurden in einer Phase-II-Studie 137 Patientinnen mit HER2-positivem metastasierendem Brustkrebs oder wiederkehrendem lokalem fortgeschrittenem Brustkrebs randomisiert mit Trastuzumab plus Docetaxel ($n = 70$) oder T-DM1 ($n = 67$) als erster Therapieoption behandelt. Im T-DM1-Arm ergab sich eine Gesamtansprechrate von 69.2 % gegenüber 58.0 % im Vergleichsarm. T-DM1 wies auch eine signifikant bessere PFS gegenüber Trastuzumab plus Docetaxel auf (14.2 Monate Überlebenszeit gegenüber 9.2 Monaten). Außerdem hatte T-DM1 ein besseres therapeutisches Fenster als eine Standard-Erstbehandlung mit weniger Nebenwirkungen vom Grad ≥ 3 (46.4 % gegenüber 90.9 %).^[125] Auf Basis dieser vielversprechenden Ergebnisse wird aktuell eine randomisierte klinische Phase-III-Studie durchgeführt.

Brentuximab Vedotin wird gerade in drei verschiedenen Phase-III-Studien getestet, darunter eine Erstbehandlung in Kombination mit Chemotherapie gegen Hodgkin-Lymphom und Lymphom CD30-positiver T-Zellen. Das ADC Inotuzumab Ozogamicin (**10g**, Abbildung 26) besteht aus einem anti-CD22-Antikörper, der über eine Hydrazonbrücke an NAc- γ -Calicheamicin gekuppelt ist, und wird gegenwärtig in einer Phase-III-Studie gegen CD22-positive adulte ALL getestet.^[126] Aus einer Phase-III-Studie gegen CD22-positives Non-Hodgkin-Lymphom wurde das ADC vor kurzem zurückgezogen, weil sich keine Verbesserung in der Gesamtüberlebenszeit ergab.

Tabelle 3: Liste von ADCs, die gegenwärtig klinisch getestet werden.

Kandidat	Wirkstoff	Antigen	Leitindikation ^[a]	Entwickler/Partner
von der FDA zugelassen				
Ado-Trastuzumab Emtansin (Kadcyla)	DM1	HER2	Brustkrebs	Roche/Genentech/ImmunoGen
Brentuximab Vedotin (Adcetris)	MMAE	CD30	HL/ALCL	Seattle Genetics
Phase III				
Inotuzumab Ozogamicin (CMC-544)	Calicheamicin	CD22	ALL	Pfizer
Gemtuzumab Ozogamicin (CMA-676)	Calicheamicin	CD33	AML	Pfizer
Phase II				
SAR3419	DM4	CD19	B-Zell-Entartungen	Sanofi/ImmunoGen
RG7593	MMAE	CD22	B-Zell-Entartungen	Roche/Genentech/Seattle Genetics
RG7596	MMAE	CD79b	B-Zell-Entartungen	Roche/Genentech/Seattle Genetics
Glembatumumab Vedotin (CDX-011)	MMAE	GPNCMB	Brustkrebs, Melanom	Celldex Therapeutics/Seattle Genetics
PSMA-ADC	MMAE	PSMA	Prostatakrebs	Progenics Pharma/Seattle Genetics
Phase I				
Lorvotuzumab Mertanisin	DM1	CD56	SCLC	ImmunoGen
IMGN529	DM1	CD37	B-Zell-Entartungen	ImmunoGen
IMGN853	DM4	FR α	Solide Tumore	ImmunoGen
IMGN289	DM1	EGFR	Solide Tumore	ImmunoGen
SAR566658	DM4	CA6	Solide Tumore	Sanofi/ImmunoGen
BT-062	DM4	CD138	Multiples Myelom	Biotest/ImmunoGen
BAY 94-9343	DM4	Mesothelin	Solide Tumore	Bayer/ImmunoGen
AMG 595	DM1	EGFRvIII	Glioma	Amgen/ImmunoGen
AMG 172	DM1	CD27L	ccRCC	Amgen/ImmunoGen
SGN-CD19A	MMAF	CD19	NHL/ALL	Seattle Genetics
AGS-22ME	MMAE	Nectin 4	Solide Tumore	Astellas Pharma/Seattle Genetics
RG7450	MMAE	STEAP1	Prostatakrebs	Roche/Genentech/Seattle Genetics
RG7458	MMAE	MUC16	Ovarialcarcinom	Roche/Genentech/Seattle Genetics
RG7599	MMAE	NaPi2b	NSCLC, Ovarialcarcinom	Roche/Genentech/Seattle Genetics
MLN0264	MMAE	GCC	GI-Entartungen	Takeda/Seattle Genetics
SGN-CD33A	PBD	CD33	AML	Seattle Genetics
MDX-1203	Duocarmycin	CD70	NHL, RCC	Bristol-Myers Squibb
Labetuzumab SN-38	SN-38	CD66e	CRC	Immunomedics
IMMU-132	SN-38	Trop-2	Epitheltumore	Immunomedics
Milatuzumab Doxorubicin	Doxorubicin	CD74	Multiples Myelom	Immunomedics
RG7598, RG7600, RG7636	ungenannt	ungenannt	verschiedene	Roche/Genentech/Seattle Genetics

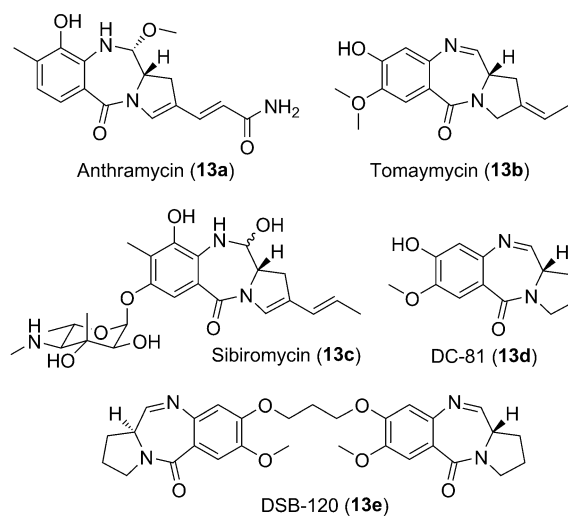
[a] HL: Hodgkin-Lymphom; ALCL: anaplastisches großzelliges Lymphom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; AML: akute myeloische Leukämie; SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom; ccRCC: Klarzellkarzinom; RCC: Nierenzellkarzinom; ALL: akute lymphoblastische Leukämie; NSCLC: nichtkleinzelliges Lungenkarzinom; GI: gastrointestinal; CRC: Kolorektalkarzinom.

8. Neu aufkommende Technologien

8.1. Neue Effektor-Moleküle

8.1.1. Benzodiazepin-Dimere

Die Molekülklasse der Pyrrolobenzodiazepine (PBD) wurde zuerst in den 1960er Jahren entdeckt, als Anthramycin (**13a**) als aktiver Bestandteil aus der Fermentationsbrühe von *Streptomyces refuineus* var. *thermotolerans* isoliert wurde.^[127,128] Wegen seiner vielversprechenden antibiotischen und Antitumoraktivität wurde nach weiteren PBDs gesucht. Dabei wurden 13 verschiedene natürliche PBD-Monomerarten gefunden und außerdem eine diverse Auswahl synthetischer Analoga hergestellt (Abbildung 34).^[129] Diese PBD-Monomere unterscheiden sich im Substitutionsmuster ihrer A- und C-Ringe und in der Sättigung des C-Rings, wobei die stärker ungesättigten PBD-Monomere meistens biologisch


Abbildung 34. Pyrrolobenzodiazepin(PBD)-Monomere und DSB-120.

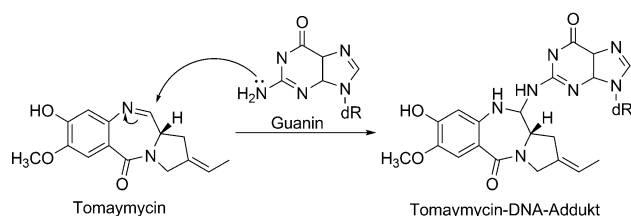


Abbildung 35. Wirkmechanismus der Pyrrolbenzodiazepine (PBD).

aktiver sind. Mechanistisch gesehen wirken die PBDs über ihre Fähigkeit, über die N10-C11-Imin/Carbinolamin-Funktionalität mit der C2-Aminogruppe eines Guaninrestes in der kleinen Furche der DNA zu reagieren (Abbildung 35).

PBD-Monomere bevorzugen bei ihrer Reaktion eine Sequenz aus drei Basen, in der der Guaninrest auf beiden Seiten von Purinen flankiert wird. In der Folge versuchten Thurston und Mitarbeiter, diese Sequenzselektivität mithilfe von PBD-Dimeren weiter zu verfolgen, die irreparable DNA-Vernetzungen ausbilden könnten.^[130] Das PBD-Dimer DSB-120 (**13e**) wurde hergestellt, indem zwei Moleküle des Naturstoffs DC-81 (**13d**) über eine Propyldioxyetherbrücke verknüpft wurden. Durch die Dimerbildung nahm die Aktivität stark zu: **13e** ist in vitro 600-mal cytotoxischer als **13d**. DSB-120 bildet DNA-Querverbindungen über sechs Basenpaare, bevorzugt mit einer zentralen GATC-Sequenz. Zur Zeit ihrer Entdeckung gehörte die Verbindung zu den effizientesten bekannten DNA-vernetzenden Verbindungen. Die weitere Bearbeitung der PBD-Dimere ergab dann die Synthese von SJG-136 (**4f**, Abbildung 3), in das eine zusätzliche ungesättigte Gruppierung in den C-Ringen von **13e** eingeführt wurde.^[131,132] Daraufhin nahmen die DNA-vernetzende Aktivität, die In-vitro-Wirksamkeit und die In-vivo-Antitumoraktivität von **4f** deutlich zu.^[133] Gegenwärtig wird SJG-136 in klinischen Phase-II-Studien gegen solide Tumoren und hämatologische Entartungen getestet.^[134]

Wegen ihrer großen Aktivität und ihres Wirkmechanismus gegenüber der DNA sind PBD-Dimere attraktive Effek-tormoleküle für ADCs. Im Jahr 2009 wurde eine neue Klasse von Wirkstoffen (IGNs) aus zwei Indolinbenzodiazepin-Monomeren, die über eine Anilinbenzyldioxybrücke verknüpft sind, beschrieben (Abbildung 36).^[135] Die Aus-

gangsverbindung dieser Klasse bildet sequenzspezifisch sehr aktiv DNA-Addukte in doppelsträngiger DNA aus und war extrem wirksam (1–10 μM) gegen eine Reihe von Krebszellarten. Der Einbau der Anilingruppe in den Abstandhalter bietet eine geeignete Stelle für die Anknüpfung eines Linkers für die Konjugation an einen Antikörper. Der Einbau einer kurzen PEG-Kette sorgt für die nötige Wasserlöslichkeit bei der Konjugation in wässrigem Medium. Mit diesen IGNs wurden ADCs mit durchschnittlich etwa drei Wirkstoffmolekülen pro Antikörper synthetisiert, die sich in vitro als hochwirksam gegen normale und mehrfachresistente Tumorzelllinien zeigten ($\text{IC}_{50} = 5\text{--}20\text{ }\mu\text{M}$). Sogar Zelllinien, die das Antigen nur wenig exprimieren (≈ 7000 Moleküle pro Zelle), wurden durch das Konjugat effizient abgetötet (IC_{50} -Wert 4 μM). Außerdem war der cytotoxische Effekt des Konjugats antigenspezifisch, denn das Konjugat war erheblich weniger cytotoxisch gegenüber einer antigen-negativen Zelllinie ($\text{IC}_{50} > 1\text{ }\mu\text{M}$). Auch von einer dosisabhängigen antigen-spezifischen Antitumoraktivität in vivo wurde berichtet.

Kürzlich wurden zwei ADCs mit dem PBD-Dimer SG2202,^[134] das einen exocyclischen Phenylsubstituenten am C-Ring besitzt, beschrieben (Abbildung 36).^[136,137] Der Einbau von Styrylgruppen steigerte die In-vitro-Aktivität des PBD-Dimers weiter und bot eine Position an, um Substituenten einzuführen, über die das PBD-Dimer an einen Antikörper gebunden werden kann. Zur Erzeugung des ADC wurde eine der Monomereinheiten mit einem Anilin-Substituenten modifiziert, sodass ein unsymmetrisches PBD-Dimer entsteht, das dann mit einem Valin-Alanin-Dipeptid an ein Maleimid gebunden wird. Es wurden Konjugate mit 1.9 PBD-Molekülen pro Antikörper hergestellt, wobei als Kupp-

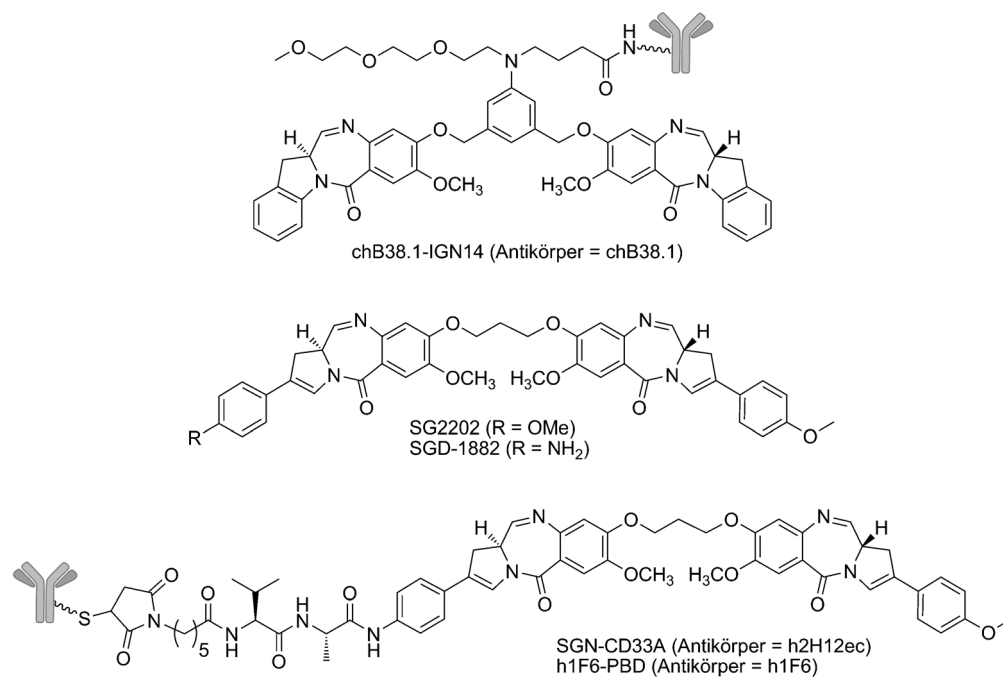


Abbildung 36. Konjugate von Indolinbenzodiazepin(IGN)- und Pyrrolbenzodiazepin(PBD)-Dimeren.

lungsstelle künstlich eingeführte Cysteinreste im Antikörper dienten.^[136,137] ADCs gegen das CD70-Antigen, das auf Nierenzellkarzinomen (RCC; renal cell carcinoma) und Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) exprimiert wird, und gegen das CD33-Antigen, das bei akuter myeloischer Leukämie (AML) exprimiert wird, waren in vitro wirksam und spezifisch gegen eine Reihe antigenexprimierender Zelllinien. In vivo zeigten beide ADCs eine dosisabhängige Antitumoraktivität in Xenograftmodellen in Mäusen. Für ein anti-CD33-PBD-Konjugat wird die Entwicklung nun mit der klinischen Testung gegen AML fortgesetzt.^[137]

8.1.2. Amanitin

Amanitine sind Pilzgifte aus der Gattung *Amanita*. Die Hauptverbindung α -Amanitin ist ein bicyclisches Octapeptid, das ein sehr aktiver Hemmer der RNA-Polymerase II ist. α -Amanitin kann nicht therapeutisch eingesetzt werden, denn es wird in vivo effizient in die reifen Hepatocyten transportiert, wo es stark hepatotoxisch wirkt. α -Amanitin wurde an Trastuzumab konjugiert; in dieser Kombination zeigt sich eine antigenspezifische Wirksamkeit gegen HER2-positive Zelllinien (IC_{50} : 8–180 pM).^[138] In vivo wurde mit niedrigen Dosen (0.05 mg kg^{-1} gekuppeltes Amanitin) eine vollständige Tumorregression erzielt. Bei den getesteten Dosen wurde keine Lebertoxizität beobachtet. Informationen über die MTD und das therapeutische Fenster des Konjugats wurden nicht mitgeteilt.

8.2. Verfahren zur ortsspezifischen Konjugation

Die ADCs, die sich gegenwärtig in der klinischen Prüfung befinden, nutzen die funktionellen Gruppen in den Antikörpern (primäre Aminogruppen von Lysinen, Thiole aus der Reduktion von Cystinen), die einer Chemie in wässriger Lösung zugänglich sind. Ein humanisierter Antikörper enthält eine große Zahl von Lysingruppen (80–90), von denen einige wenige modifiziert werden können, ohne die nativen Disulfidbrücken anzutasten und ohne nennenswerte Veränderungen der Stabilität, der biophysikalischen oder der Bindungseigenschaften des Antikörpers zu verursachen. Eine massenspektrometrische Analyse eines Maytansinoid-ADCs mit einer durchschnittlichen Beladung von 3.5–4 Molekülen je Antikörper zeigt eine annähernd binomische Peakverteilung von 0–7 Maytansinoid-Molekülen je Antikörper.^[139] Die Anhaftungsstellen der Maytansinoide an den Lysinresten sind unter kontrollierten Konjugationsbedingungen von Charge zu Charge konsistent. Die Antikörpermodifikation an Lysinresten wird für Ado-Trastuzumab Emtansin und alle anderen Maytansinoid-Konjugate, die gerade in klinischer Prüfung sind, benutzt. Außerdem wird diese Art der Kuppelung bei den Calicheaminkonjugaten eingesetzt.

Die Cystein-Konjugationsstelle in ADCs wird durch die Reduktion nativer Cystin-Disulfidbrücken zwischen den Ketten erzeugt, und die Wirkstoffbeladung wird durch den Grad der Reduktion bestimmt. Typischerweise hat ein vollständig reduzierter IgG₁-Antikörper etwa 8 Cysteine. Eine Teilreduktion der Disulfide und Beladung der Antikörper mit

etwa 4 Molekülen eines cytotoxischen Reagens an den Cysteinpositionen ergibt auch eine Verteilung mit 0, 2, 4, 6 und 8 Molekülen der angehängten cytotoxischen Verbindung mit einer vorherrschenden Beladung von 4 und 2 Molekülen.^[140,141] Brentuximab Vedotin und andere ADCs mit Auristatinen sind über Cysteine konjugiert, die über eine solche partielle Reduktion nativer Cystinbrücken zwischen den Antikörperketten freigelegt wurden. Ein Vorteil der Kuppelung der cytotoxischen Komponenten über Lysin oder reduzierte Cysteine ist, dass die Reaktion ohne molekularbiologische Anpassung der Antikörper zur Einführung spezifischer Kupplungsstellen erfolgen kann.

Um die Wirkstoffbeladung der ADCs zu erhöhen, wurde vorgeschlagen, einen Dendrimerträger zu verwenden. Die Methode beruht auf einem hydrophilen, vollständig abbaubaren Polyacetalträger mit zwei orthogonalen Linkern. Über einen davon wird der Träger über einen Cysteinrest (freigelegt durch die Reduktion einer nativen Disulfidbrücke in der Gelenkregion des Antikörpers) an den Antikörper gebunden. Der zweite Linker wird zur Anbindung eines Dolastatin-Analogons verwendet. Ein Konjugat von Trastuzumab mit 3–4 Polyacetalträgern mit insgesamt 20 Dolastatinmolekülen zeigt in vitro eine gute antigenspezifische Wirkung und in vivo signifikante Antitumoraktivität.^[142]

Verschiedene Ansätze werden gerade getestet, bei denen die Konjugation ortsspezifisch erfolgt, wo also die cytotoxische Verbindung an definierten Stellen des Antikörpers angekuppelt wird. Von dieser Methode erwartet man eine einzige ADC-Struktur statt einer Verteilung. Bei dem ersten beschriebenen Verfahren wurden Cysteinreste molekularbiologisch in die Antikörper eingefügt, z. B., indem man das Serin 442 in der c_{H3} -Domäne der schweren Kette durch ein Cystein ersetzte. So wurden zwei Thiolgruppen pro Antikörper erzeugt.^[143] Antikörper mit molekularbiologisch erzeugten Cysteinen an verschiedenen Positionen, die die Antigenbindung nicht beeinträchtigen („Thiomabs“), wurden mit Maleimido-MMAE konjugiert. Es entstanden homogene ADCs mit 2 MMAE pro Antikörper. Die Position der eingefügten Cysteinreste war von Bedeutung, weil an einigen Positionen Thiol-Maleimid-Bindungen gebildet wurden, die im Plasma instabil waren.^[139,144] Ein homogen konjugiertes anti-MUC16-Konjugat mit 2 MMAE pro Antikörper (eines pro schwerer Kette), gebunden an ein künstlich eingefügtes Cystein, zeigte eine ähnliche Wirksamkeit in Xenograftmodellen und eine verbesserte Verträglichkeit in präklinischen Ratten- und Affenmodellen, verglichen mit einem Konjugat mit durchschnittlich 3.1 Molekülen MMAE pro Antikörper, das mit reduzierten kettenverbindenden Disulfidbrücken hergestellt wurde.^[141] Antikörper mit eingefügten Cysteinen erfordern zusätzliche Herstellungsschritte verglichen mit herkömmlichen Antikörpern, weil sie zunächst in Zellkulturen als gemischte Disulfide gebildet werden, die dann partiell reduziert und reoxidiert werden müssen.^[141] Ein solches ADC mit einem molekularbiologisch eingefügten Cystein im Antikörper wurde vor kurzem in die klinische Erprobung übernommen.^[137]

Vier andere Ansätze zur Erzeugung ortsspezifisch konjugierter ADCs durch molekularbiologische Antikörperanpassung und andere Methoden sind in Entwicklung. Dazu

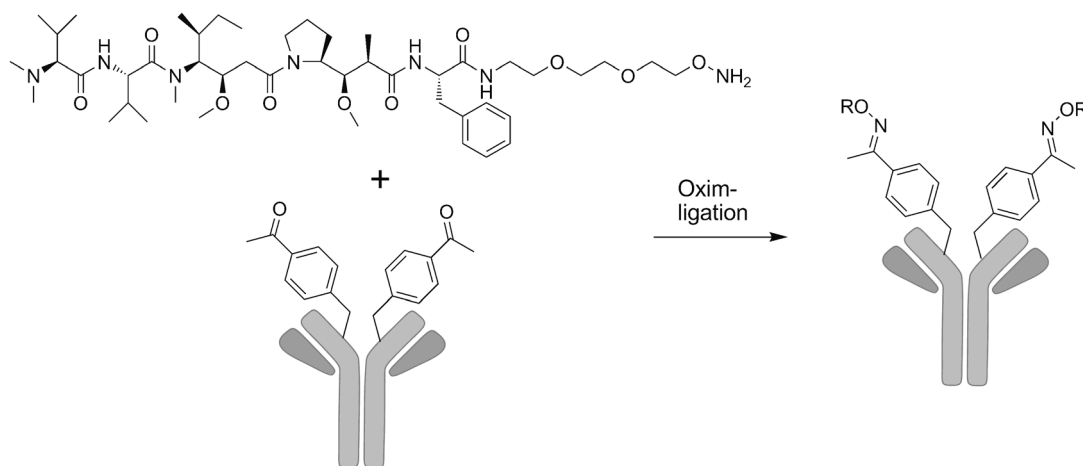


Abbildung 37. Ortsspezifische Konjugation von Alkoxyamin-derivatisiertem Auristatin.

gehören a) der Einbau einer nichtnatürlichen Aminosäure durch gentechnische Verfahren.^[145] In diesem eleganten Ansatz wurde das entsprechende tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Paar genutzt, um einen Alaninrest in der schweren Kette des Trastuzumab-Antikörpers durch die nichtnatürliche Aminosäure *para*-Acetylphenylalanin zu ersetzen. Der Einbau einer Aminosäure mit einem Carbonylrest, einer funktionellen Gruppe, die in keiner der natürlichen 20 Aminosäuren vorkommt, ermöglicht orthogonale chemische Reaktionen. Die Antikörpermutanten wurden mit einem Auristatin-Derivat über eine stabile Oxim-Verbindung konjugiert. Es entstand ein homogenes ADC mit zwei Wirkstoffmolekülen in ortsspezifischer Bindung (Abbildung 37). Das Konjugat hatte gute Wirkung *in vitro* und gute *In-vivo*-Antitumoraktivität zusammen mit vorteilhafter Pharmakokinetik.

b) Gentechnischer Einbau von Glutaminen und Kupplung von Aminogruppen der cytotoxischen Verbindung über eine Amidbindung, katalysiert durch mikrobielle Transglutaminase (mTG).^[146] Dieser Ansatz nutzt aus, dass die mTG die natürlich vorkommenden Glutamine in den konstanten Regionen glycosylierter Antikörper nicht erkennt. So wurden Glutamine an ausgewählten Stellen in drei verschiedenen Antikörpern eingefügt. Eine Behandlung mit mTG in Gegenwart einer als Acylakzeptor wirkenden Nutzlast (AcLysvc-Monomethylauristatin D) erbrachte den ortsspezifischen Einbau von ungefähr 2 Wirkstoffmolekülen pro Antikörper. In einem Beispiel erwiesen sich ADCs mit 1.74 und 1.87 Wirkstoffmolekülen pro Antikörper *in vitro* als wirksam und hatten ähnliche *In-vivo*-Antitumoraktivität wie ein klassisches Konjugat mit 3.6 Auristatinmolekülen je Antikörper.

c) Ortsspezifische Modifikation der C-Termini der schweren Seitenketten durch Fusion mit Intein^[147] und d) gentechnischer Einbau von Cystein am N-Terminus und Kupplung von 1,2-Aminothiol mit einer Aldehydgruppe der cytotoxischen Substanz über eine Thiazolidin-Bindung.^[148] Bislang erreicht man mit diesen Ansätzen die Bindung von etwa zwei Molekülen eines Wirkstoffs an einen Antikörper. Es ist noch unklar, ob diese Beladung für ein effizientes Abtöten der Tumorzellen ausreicht, wenn das Antigen nur mäßig dicht vorliegt. Eine höhere Wirkstoffbeladung, ohne dabei die

biochemischen Eigenschaften der Konjugate zu verändern, konnte bis jetzt noch bei keinem der ortsspezifischen Ansätze nachgewiesen werden. Es ist noch nicht klar, ob die ortsspezifische Konjugation tatsächlich das therapeutische Fenster im Klinikeinsatz verbreitert. Auch die potentielle Immunogenität von ADCs mit Antikörpern mit nichtnatürlichen Aminosäuren lässt sich nur in humanen klinischen Studien bestimmen.

8.3. Optimierung der ADC-Aktivität

Die weitere Optimierung des ADC-Aufbaus bleibt ein aktives Forschungsfeld. Kleinere Proteingerüste oder Antikörperfragmente anstelle ganzer IgGs können aufgrund der geringeren Größe die Tumorpeneetration verbessern. In einem direkten Vergleich der Lokalisation von Antikörperfragmenten (sFv, Fab', F(ab')₂) im Tumor *in vivo* mit intaktem IgG korrelierten Geschwindigkeit und Ausmaß der Tumorpeneetration mit der Größe.^[149] Das kleinste Fragment, sFv, erreichte die maximale Tumordurchdringung nach 0.5 h, während intaktes IgG für die gleiche Durchdringung 48 bis 96 h benötigte. Außerdem war sFv gleichmäßiger über die Tumormasse verteilt als die Varianten mit höherem Molekulargewicht. Doch obwohl diese Daten schon über zwanzig Jahre vorliegen, sind Antikörperfragmente noch nicht über das präklinische Stadium hinausgekommen. Die schnellere Ausscheidung dieser Fragmente und die Neigung, sich in der Niere anzureichern, erfordern Strategien zu Verlängerung der Halbwertszeit wie die Konjugation mit Polyethylenglycolen, wodurch die Technologie komplexer wird. In einer Studie wurde ein Diabody-Auristatin-Konjugat etwa 30-mal schneller ausgeschieden als das entsprechende IgG-Konjugat, und es zeigte *in vitro* und *in vivo* nur 1/4 der Aktivität.^[150]

Andere Überlegungen für eine erfolgreiche ADC-Entwicklung richten mehr Aufmerksamkeit auf die Auswahl von Antikörpern und Linkern und eine sorgfältigere präklinische Prüfung vor dem Eintritt in klinische Phase. Es wird gemeinhin angenommen, dass Antikörper effizient internali-

siert werden müssen, um eine gute ADC-Aktivität zu erzielen. Eine aktuelle Veröffentlichung mit einem gefäßgerichteten ADC lässt vermuten, dass dies nicht immer der Fall ist.^[151] Der Linker zwischen Antikörper und Wirkstoff bestimmt die Art des Metaboliten, der in vitro und in vivo produziert wird. Aus jüngeren klinischen Daten geht hervor, dass das Toxizitätsprofil des ADC vom Linker abhängt. Änderungen der Linkerstruktur verändern das Metabolitenprofil und infolgedessen die klinische Toxizität. Präklinische Modelle für Wirksamkeitsstudien einer ADC-Therapie müssen sorgfältig so ausgewählt werden, dass die Antigenexpression des Xenograft-Modells die der Tumorzellen widerspiegelt, die klinisch behandelt werden sollen. Außerdem muss eine In-vivo-Antitumoraktivität bei Konzentrationen nachgewiesen werden, die klinisch erreichbar sind (2–7 mg kg⁻¹ für die meisten ADCs). Erhöht man so die Hürden in der präklinischen Prüfung, kann sich die Gefahr eines Scheiterns in der klinischen Prüfung verringern.

9. Zusammenfassung und Ausblick

Das Konzept des zielgerichteten Einsatzes von Tumortherapeutika basiert auf der Notwendigkeit, die Tumorselektivität der Wirkstoffe zu verbessern, um die systemische Toxizität zu verringern. Dadurch könnten die Substanzen in höherer Dosis und mit größerem therapeutischem Nutzen für die Patienten verabreicht werden. Die Tumorselektivität von Antikörpern eröffnete einen Weg zu diesem Ziel, indem sie als Transportmittel benutzt werden, um den Wirkstoff zum Tumor zu dirigieren. Dieses scheinbar einfache Konzept, als Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (ADC) bezeichnet, erregte viel Aufmerksamkeit bei Forschern an akademischen Institutionen und in der pharmazeutischen Industrie. Eine Menge Forschungs- und Entwicklungsaktivität in den 80er und frühen 90er Jahren mündete in klinische Studien mit verschiedenen ADCs. Enttäuschende klinische Ergebnisse ließen das Interesse aber wieder erlahmen.

Einige Gruppen blieben jedoch bei der Stange; sie analysierten sorgfältig die möglichen Gründe für das Scheitern. Mit den so gewonnenen Erkenntnissen wurde fast jeder Schritt der Technologie verbessert. Die gegenwärtig verwendeten ADCs nutzen humanisierte Antikörper, die daher nicht immunogen sind, und Linker, die im Kreislauf stabil sind und erst im Zellinneren gespalten werden. Medizinalchemiker können sich inzwischen die Aktivität von Substanzen zunutze machen, die einst zu giftig waren, um nützlich zu sein. Die letzten FDA-Zulassungen der beiden ADCs Brentuximab Vedotin und Ado-Trastuzumab Emtansin haben den Machbarkeitsnachweis für diesen Ansatz erbracht. Momentan befinden sich über 30 ADCs in der klinischen Erprobung, und fast jedes große pharmazeutische Unternehmen hat diese Technologie übernommen. Es gibt aktive Forschungen von Medizinalchemikern, um neue Linker zu entwickeln und neue wirksame Effektmoleküle zu entdecken, die für die Kupplung an ADCs geeignet sind. Biologen haben sich inzwischen darauf konzentriert, Zelloberflächenantigene zu identifizieren, die als Ziele für eine Antikörperentwicklung geeignet sind.

Danksagung

R.V.J.C. dankt Emil (Tom) Frei III, ehemals Chefarzt am Dana-Farber Cancer Institute, für die frühe Unterstützung seiner ADC-Arbeiten. Die Autoren danken Dr. Danies Tavares für Graphiken und Dr. John Lambert für die kritische Durchsicht des Manuskripts und wertvolle Hinweise.

Eingegangen am 29. August 2013

Online veröffentlicht am 20. Februar 2014

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] V. T. DeVita, Jr., E. Chu, *Cancer Res.* **2008**, 68, 8643–8653.
- [2] B. C. Baguley in *Anticancer Drug Development* (Hrsg.: B. C. Baguley, D. J. Kerr), Academic Press, San Diego, **2002**, S. 1–11.
- [3] E. Frei III, *Cancer Res.* **1972**, 32, 2593–2607.
- [4] S. M. Kupchan, Y. Komoda, W. A. Court, G. J. Thomas, R. M. Smith, A. Karim, C. J. Gilmore, R. C. Haltiwanger, R. F. Bryan, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1354–1356.
- [5] S. M. Kupchan, Y. Komoda, A. R. Branfman, A. T. Sneden, W. A. Court, G. J. Thomas, H. P. Hintz, R. M. Smith, A. Karim, G. A. Howie, A. K. Verma, Y. Nagao, R. G. Dailey, Jr., V. A. Zimmerly, W. C. Sumner, Jr., *J. Org. Chem.* **1977**, 42, 2349–2357.
- [6] S. Remillard, L. I. Rebhun, G. A. Howie, S. M. Kupchan, *Science* **1975**, 189, 1002–1005.
- [7] B. F. Issell, S. T. Crooke, *Cancer Treat. Rev.* **1978**, 5, 199–207.
- [8] G. R. Pettit, Y. Kamano, C. L. Herald, A. A. Tuinman, F. E. Boettner, H. Kizu, J. M. Schmidt, L. Baczynskyj, K. B. Tomer, R. J. Bontems, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6883–6885.
- [9] G. R. Pettit, Y. Kamano, C. Dufresne, R. L. Cerny, C. L. Herald, J. M. Schmidt, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 6005–6006.
- [10] H. C. Pitot, E. A. McElroy, Jr., J. M. Reid, A. J. Windebank, J. A. Sloan, C. Erlichman, P. G. Bagniewski, D. L. Walker, J. Rubin, R. M. Goldberg, A. A. Adjei, M. M. Ames, *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 525–531.
- [11] U. Vaishampayan, M. Glode, W. Du, A. Kraft, G. Hudes, J. Wright, M. Hussain, *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 4205–4208.
- [12] R. S. Al-awar, J. E. Ray, R. M. Schultz, S. L. Andis, J. H. Kennedy, R. E. Moore, J. Liang, T. Golakoti, G. V. Subbaraju, T. H. Corbett, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2985–3007.
- [13] M. J. Edelman, D. R. Gandara, P. Hausner, V. Israel, D. Thornton, J. DeSanto, L. A. Doyle, *Lung Cancer* **2003**, 39, 197–199.
- [14] S. Jain, L. T. Vahdat, *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 6615–6622.
- [15] M. A. Warpehoski, I. Gebhard, R. C. Kelly, W. C. Krueger, L. H. Li, J. P. McGovern, M. D. Prairie, N. Wicniewski, W. Wierenga, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 590–603.
- [16] M. Cristofanilli, W. J. Bryan, L. L. Miller, A. Y. Chang, W. J. Gradishar, D. W. Kufe, G. N. Hortobagyi, *Anticancer Drugs* **1998**, 9, 779–782.
- [17] N. Pavlidis, S. Aamdal, A. Awada, H. Calvert, P. Fumoleau, R. Sorio, C. Punt, J. Verweij, A. van Oosterom, R. Morant, J. Wanders, A. R. Hanauske, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2000**, 46, 167–171.
- [18] H. C. Pitot, J. M. Reid, J. A. Sloan, M. M. Ames, A. A. Adjei, J. Rubin, P. G. Bagniewski, P. Atherton, D. Rayson, R. M. Goldberg, C. Erlichman, *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 712–717.
- [19] S. N. Markovic, V. J. Suman, A. M. Vukov, T. R. Fitch, D. W. Hillman, A. A. Adjei, S. R. Alberts, J. S. Kaur, T. A. Braich, J. M. Leitch, E. T. Creagan, *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, 25, 308–312.
- [20] D. Hochhauser, T. Meyer, V. J. Spanswick, J. Wu, P. H. Clingen, P. Loadman, M. Cobb, L. Gumbrell, R. H. Begent, J. A. Hartley, D. Jodrell, *Clin. Cancer Res.* **2009**, 15, 2140–2147.

- [21] J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 28–39.
- [22] A. Arora, E. M. Scholar, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 971–979.
- [23] P. S. Low, W. A. Henne, D. D. Doorneweerd, *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 120–129.
- [24] J. A. Reddy, R. Dorton, E. Westrick, A. Dawson, T. Smith, L. C. Xu, M. Vetzal, P. Kleindl, I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, 67, 4434–4442.
- [25] I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 1357–1369.
- [26] G. Köhler, C. Milstein, *Nature* **1975**, 256, 495–497.
- [27] R. K. Oldham, R. O. Dillman, *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 1774–1777.
- [28] A. M. Scott, J. D. Wolchok, L. J. Old, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, 12, 278–287.
- [29] L. M. Nadler, P. Stashenko, R. Hardy, W. D. Kaplan, L. N. Button, D. W. Kufe, K. H. Antman, S. F. Schlossman, *Cancer Res.* **1980**, 40, 3147–3154.
- [30] J. C. Almagro, J. Fransson, *Front. Biosci.* **2008**, 13, 1619–1633.
- [31] D. G. Maloney, A. J. Grillo-Lopez, C. A. White, D. Bodkin, R. J. Schilder, J. A. Neidhart, N. Janakiraman, K. A. Foon, T. M. Liles, B. K. Dallar, K. Wey, I. Royston, T. Davis, R. Levy, *Blood* **1997**, 90, 2188–2195.
- [32] P. Uadia, A. H. Blair, T. Ghose, *Cancer Res.* **1984**, 44, 4263–4266.
- [33] B. C. Laguzza, C. L. Nichols, S. L. Briggs, G. J. Cullinan, D. A. Johnson, J. J. Starling, A. L. Baker, T. F. Bumol, J. R. F. Corvalan, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 548–555.
- [34] P. A. Trail, D. Willner, S. J. Lasch, A. J. Henderson, S. Hofstead, A. M. Casazza, R. A. Firestone, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom, *Science* **1993**, 261, 212–215.
- [35] D. J. Elias, L. E. Kline, B. A. Robbins, H. C. Johnson, Jr., K. Pekny, M. Benz, J. A. Robb, L. E. Walker, M. Kosty, R. O. Dillman, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1994**, 150, 1114–1122.
- [36] D. Schneck, F. Butler, W. Dugan, D. Littrell, B. Petersen, R. Bowsher, A. DeLong, S. Dorrbecker, *Clin. Pharmacol. Ther.* **1990**, 47, 36–41.
- [37] B. H. Petersen, S. V. DeHerd, D. W. Schneck, T. F. Bumol, *Cancer Res.* **1991**, 51, 2286–2290.
- [38] A. W. Tolcher, S. Sugarman, K. A. Gelmon, R. Cohen, M. Saleh, C. Isaacs, L. Young, D. Healey, N. Onetto, W. Slichenmyer, *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 478–484.
- [39] H. H. Sedlacek, *Antibodies as Carriers of Cytotoxicity*, Karger, Basel, **1992**.
- [40] 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.
- [41] J. D. Orth, E. W. Krueger, S. G. Weller, M. A. McNiven, *Cancer Res.* **2006**, 66, 3603–3610.
- [42] C. Dumontet, M. A. Jordan, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 790–803.
- [43] M. Abal, J. M. Andreu, I. Barasoain, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, 3, 193–203.
- [44] K. E. Gascoigne, S. S. Taylor, *J. Cell Sci.* **2009**, 122, 2579–2585.
- [45] J. A. Hadfield, S. Ducki, N. Hirst, A. T. McGown, *Prog. Cell Cycle Res.* **2003**, 5, 309–325.
- [46] W. I. Lencer, R. S. Blumberg, *Trends Cell Biol.* **2005**, 15, 5–9.
- [47] M. Lopus, E. Oroudjev, L. Wilson, S. Wilhelm, W. Widdison, R. Chari, M. A. Jordan, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, 9, 2689–2699.
- [48] R. H. Blum, T. Kahlert, *Cancer Treat. Rep.* **1978**, 62, 435–438.
- [49] G. Wu, Y. Z. Fang, S. Yang, J. R. Lupton, N. D. Turner, *J. Nutr.* **2004**, 134, 489–492.
- [50] B. J. Mills, C. A. Lang, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52, 401–406.
- [51] J. M. Cassidy, K. K. Chan, H. G. Floss, E. Leistner, *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 1–26.
- [52] C. W. Wayne, D. W. Sharon, E. C. Emily, R. W. Kathleen, A. L. Barbara, Y. Kovtun, S. G. Victor, H. Xie, M. S. Rita, J. L. Robert, R. Zhao, L. Wang, A. B. Walter, V. J. C. Ravi, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4392–4408.
- [53] M. Bénéchie, F. Khuong-Huu, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7133–7138.
- [54] A. I. Meyers, P. J. Reider, A. I. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6597–6598.
- [55] M. Kitamura, M. Isobe, Y. Ichikawa, T. Goto, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3252–3257.
- [56] B. A. Kellogg, L. Garrett, Y. Kovtun, K. C. Lai, B. Leece, M. Miller, G. Payne, R. Steeves, K. R. Whiteman, W. Widdison, H. Xie, R. Singh, R. V. Chari, J. M. Lambert, R. J. Lutz, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 717–727.
- [57] Y. V. Kovtun, C. A. Audette, Y. Ye, H. Xie, M. F. Ruberti, S. J. Phinney, B. A. Leece, T. Chittenden, W. A. Blattler, V. S. Goldmacher, *Cancer Res.* **2006**, 66, 3214–3221.
- [58] O. Ab, L. Rui, J. Coccia, H. A. Johnson, K. R. Whiteman, B. Kellogg, L. Clancy, X. Sun, V. S. Goldmacher, *American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting abstract 4576, Vol. Supplement 1*, Orlando, **2011**.
- [59] E. Maloney, N. Fishkin, R. Chari, R. Singh, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, B120.
- [60] H. K. Erickson, P. U. Park, W. C. Widdison, Y. V. Kovtun, L. M. Garrett, K. Hoffman, R. J. Lutz, V. S. Goldmacher, W. A. Blattler, *Cancer Res.* **2006**, 66, 4426–4433.
- [61] M. Heine, B. Freund, P. Nielsen, C. Jung, R. Reimer, H. Hohenberg, U. Zangemeister-Wittke, H. J. Wester, G. H. Luers, U. Schumacher, *PLoS One* **2012**, 7, e36258.
- [62] Y. V. Kovtun, C. A. Audette, M. F. Mayo, G. E. Jones, H. Doherty, E. K. Maloney, H. K. Erickson, X. Sun, S. Wilhelm, O. Ab, K. C. Lai, W. C. Widdison, B. Kellogg, H. Johnson, J. Pinkas, R. J. Lutz, R. Singh, V. S. Goldmacher, R. V. Chari, *Cancer Res.* **2010**, 70, 2528–2537.
- [63] R. Zhao, S. Wilhelm, C. Audette, G. Jones, B. Leece, A. Lazar, V. Goldmacher, R. Singh, Y. Kovtun, W. Widdison, J. Lambert, R. Chari, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3606–3623.
- [64] R. K. Kelly, D. L. Olson, Y. Sun, D. Wen, K. A. Wortham, G. Antognetti, A. E. Cheung, O. E. Orozco, L. Yang, V. Bailly, M. Sanicola, *Eur. J. Cancer* **2011**, 47, 1736–1746.
- [65] H. K. Erickson, G. D. L. Phillips, D. D. Leipold, C. A. Provenzano, E. Mai, H. A. Johnson, B. Gunter, C. A. Audette, M. Gupta, J. Pinkas, J. Tibbitts, *Mol. Cancer Ther.* **2012**, 11, 1133–1142.
- [66] X. Sun, W. Widdison, M. Mayo, S. Wilhelm, B. Leece, R. Chari, R. Singh, H. Erickson, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 728–735.
- [67] R. K. Pettit, G. R. Pettit, K. C. Hazen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 2961–2965.
- [68] G. R. Pettit, J. K. Srirangam, J. Barkoczy, M. D. Williams, M. R. Boyd, E. Hamel, R. K. Pettit, F. Hogan, R. Bai, J. C. Chapuis, S. C. McAllister, J. M. Schmidt, *Anticancer Drug Des.* **1998**, 13, 243–277.
- [69] S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee, C. G. Cervený, 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.
- [70] C. L. Law, K. A. Gordon, B. E. Toki, A. K. Yamane, M. A. Hering, C. G. Cervený, J. M. Petroziello, M. C. Ryan, L. Smith, R. Simon, G. Sauter, E. Oflazoglu, S. O. Doronina, D. L. Meyer, J. A. Francisco, P. Carter, P. D. Senter, J. A. Copland, C. G. Wood, A. F. Wahl, *Cancer Res.* **2006**, 66, 2328–2337.
- [71] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cervený, 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.
- [72] S. Kaur, K. Xu, O. M. Saad, R. C. Dere, M. Carrasco-Triguero, *Bioanalysis* **2013**, 5, 201–226.

- [73] K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace, M. M. Sun, J. Lenox, C. G. Cervený, K. M. Kissler, S. X. Bernhardt, A. K. Kopcha, R. F. Zabinski, D. L. Meyer, J. A. Francisco, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7063–7070.
- [74] 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.
- [75] L. M. Smith, A. Nesterova, S. C. Alley, M. Y. Torgov, P. J. Carter, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1474–1482.
- [76] S. C. Alley, X. Zhang, N. M. Okeley, M. Anderson, C. L. Law, P. D. Senter, D. R. Benjamin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *330*, 932–938.
- [77] M. D. Lee, T. S. Dunne, M. M. Siegel, C. C. Chang, G. O. Morton, D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3464–3466.
- [78] M. D. Lee, T. S. Dunne, C. C. Chang, G. A. Ellestad, M. M. Siegel, G. O. Morton, W. J. McGahren, D. B. Borders, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3466–3468.
- [79] M. D. Lee, G. A. Ellestad, D. B. Borders, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 235–243.
- [80] A. L. Smith, K. C. Nicolaou, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2103–2117.
- [81] K. C. Nicolaou, C. R. H. Hale, C. Nilewski, *Chem. Rec.* **2012**, *12*, 407–441.
- [82] N. Zein, A. M. Sinha, W. J. McGahren, G. A. Ellestad, *Science* **1988**, *240*, 1198–1201.
- [83] R. G. Bergman, *Acc. Chem. Res.* **1973**, *6*, 25–31.
- [84] L. M. Hinman, P. R. Hamann, R. Wallace, A. T. Menendez, F. E. Durr, J. Upešlacis, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 3336–3342.
- [85] P. R. Hamann, L. M. Hinman, C. F. Beyer, D. Lindh, J. Upešlacis, D. A. Flowers, I. Bernstein, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 40–46.
- [86] P. R. Hamann, L. M. Hinman, C. F. Beyer, L. M. Greenberger, C. Lin, D. Lindh, A. T. Menendez, R. Wallace, F. E. Durr, J. Upešlacis, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 346–353.
- [87] P. R. Hamann, L. M. Hinman, C. F. Beyer, D. Lindh, J. Upešlacis, D. Shochat, A. Mountain, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 354–360.
- [88] P. R. Hamann, L. M. Hinman, I. Hollander, C. F. Beyer, D. Lindh, R. Holcomb, W. Hallett, H. R. Tsou, J. Upešlacis, D. Shochat, A. Mountain, D. A. Flowers, I. Bernstein, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 47–58.
- [89] J. F. DiJoseph, M. M. Dougher, D. Y. Evans, B. B. Zhou, N. K. Damle, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *67*, 741–749.
- [90] F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*, Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [91] A. Advani, B. Coiffier, M. S. Czuczman, M. Dreyling, J. Foran, E. Gine, C. Gisselbrecht, N. Ketterer, S. Nasta, A. Rohatiner, I. G. Schmidt-Wolf, M. Schuler, J. Sierra, M. R. Smith, G. Verhoeft, J. N. Winter, J. Boni, E. Vandendries, M. Shapiro, L. Fayad, *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 2085–2093.
- [92] M. Ichimura, T. Ogawa, S. Katsumata, K. Takahashi, I. Takahashi, H. Nakano, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1045–1053.
- [93] L. J. Hanka, A. Dietz, S. A. Gerpheide, S. L. Kuentzel, D. G. Martin, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1211–1217.
- [94] B. K. Bhuyan, K. A. Newell, S. L. Crampton, D. D. Von Hoff, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 3532–3537.
- [95] D. L. Boger, D. S. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3642–3649.
- [96] L. H. Li, T. F. DeKoning, R. C. Kelly, W. C. Krueger, J. P. McGovern, G. E. Padbury, G. L. Petzold, T. L. Wallace, R. J. Oudring, M. D. Prairie, I. Gebhard, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4904–4913.
- [97] C. S. Lee, G. P. Pfeifer, N. W. Gibson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6024–6030.
- [98] R. Baird, S. Winstein, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 4238–4240.
- [99] D. L. Boger, C. W. Boyce, R. M. Garbaccio, J. A. Goldberg, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 787–828.
- [100] D. L. Boger, W. Yun, B. R. Teegarden, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2873–2876.
- [101] D. L. Boger, J. A. McKie, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1271–1275.
- [102] R. V. Chari, K. A. Jackel, L. A. Bourret, S. M. Derr, B. M. Tadayoni, K. M. Matlocks, S. A. Shah, C. Liu, W. A. Blattler, V. S. Goldmacher, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 4079–4084.
- [103] R. Y. Zhao, H. K. Erickson, B. A. Leece, E. E. Reid, V. S. Goldmacher, J. M. Lambert, R. V. Chari, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 766–782.
- [104] W. Dokter, P. Beusker, G. Verheijden, R. Ubink, M. v. d. Lee, D. v. d. Dobbelssteen, P. Goedings, J. Lemmens, V. d. Groot, M. Timmers, *AACR National Meeting (Washington, D. C.)* **2013**, Abstr. 4329.
- [105] M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. McPhail, G. A. Sim, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888–3890.
- [106] Y. H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L. F. Liu, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 14873–14878.
- [107] R. H. Mathijssen, R. J. van Alphen, J. Verweij, W. J. Loos, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2182–2194.
- [108] W. D. Kingsbury, J. C. Boehm, D. R. Jakas, K. G. Holden, S. M. Hecht, G. Gallagher, M. J. Caranfa, F. L. McCabe, L. F. Faucette, R. K. Johnson, R. P. Hertzberg, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 98–107.
- [109] S. J. Moon, S. V. Govindan, T. M. Cardillo, C. A. D'Souza, H. J. Hansen, D. M. Goldenberg, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6916–6926.
- [110] R. M. Sharkey, S. V. Govindan, T. M. Cardillo, D. M. Goldenberg, *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 224–234.
- [111] R. Stein, M. J. Mattes, T. M. Cardillo, H. J. Hansen, C. H. Chang, J. Burton, S. Govindan, D. M. Goldenberg, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5556s–5563s.
- [112] S. V. Govindan, T. M. Cardillo, R. M. Sharkey, F. Tat, D. V. Gold, D. M. Goldenberg, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 968–978.
- [113] S. V. Govindan, T. M. Cardillo, S. J. Moon, H. J. Hansen, D. M. Goldenberg, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 6052–6061.
- [114] T. M. Cardillo, S. V. Govindan, R. M. Sharkey, P. Trisal, D. M. Goldenberg, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 3157–3169.
- [115] P. F. Bross, J. Beitz, G. Chen, X. H. Chen, E. Duffy, L. Kieffer, S. Roy, R. Sridhara, A. Rahman, G. Williams, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 1490–1496.
- [116] S. H. Petersdorf, K. J. Kopecky, M. Slovak, C. Willman, T. Nevill, J. Brandwein, R. A. Larson, H. P. Erba, P. J. Stiff, R. K. Stuart, R. B. Walter, M. S. Tallman, L. Stenke, F. R. Appelbaum, *Blood* **2013**, *121*, 4854–4860.
- [117] J. M. Rowe, B. Lowenberg, *Blood* **2013**, *121*, 4838–4841.
- [118] M. S. Sutherland, R. J. Sanderson, K. A. Gordon, J. Andreyka, C. G. Cervený, 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.
- [119] S. M. Ansell, S. M. Horwitz, A. Engert, K. D. Khan, T. Lin, R. Strair, T. Keler, R. Graziano, D. Blanset, M. Yellin, S. Fischkoff, A. Assad, P. Borchmann, *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2764–2769.
- [120] J. Katz, J. E. Janik, A. Younes, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6428–6436.
- [121] A. Younes, A. K. Gopal, S. E. Smith, S. M. Ansell, J. D. Rosenblatt, K. J. Savage, R. Ramchandren, N. L. Bartlett, B. D. Cheson, S. de Vos, A. Forero-Torres, C. H. Moskowitz, J. M. Connors, A. Engert, E. K. Larsen, D. A. Kennedy, E. L. Sievers, R. Chen, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 2183–2189.
- [122] A. Younes, N. L. Bartlett, J. P. Leonard, D. A. Kennedy, C. M. Lynch, E. L. Sievers, A. Forero-Torres, *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 1812–1821.
- [123] S. Verma, D. Miles, L. Gianni, I. E. Krop, M. Welslau, J. Baselga, M. Pegram, D. Y. Oh, V. Dieras, E. Guardino, L. Fang,

- M. W. Lu, S. Olsen, K. Blackwell, *N. Engl. J. Med.* **2012**, 367, 1783–1791.
- [124] H. A. Burris III, H. S. Rugo, S. J. Vukelja, C. L. Vogel, R. A. Borson, S. Limentani, E. Tan-Chiu, I. E. Krop, R. A. Michaelson, S. Girish, L. Amler, M. Zheng, Y. W. Chu, B. Klencke, J. A. O'Shaughnessy, *J. Clin. Oncol.* **2011**, 29, 398–405.
- [125] S. A. Hurvitz, L. Dirix, J. Kocsis, G. V. Bianchi, J. Lu, J. Vinholes, E. Guardino, C. Song, B. Tong, V. Ng, Y. W. Chu, E. A. Perez, *J. Clin. Oncol.* **2013**, 31, 1157–1163.
- [126] H. Kantarjian, D. Thomas, J. Jorgensen, E. Jabbour, P. Kebriaei, M. Rytting, S. York, F. Ravandi, M. Kwari, S. Faderl, M. B. Rios, J. Cortes, L. Fayad, R. Tarnai, S. A. Wang, R. Champlin, A. Advani, S. O'Brien, *Lancet Oncol.* **2012**, 13, 403–411.
- [127] W. Leimgruber, A. D. Batcho, F. Schenker, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5793–5795.
- [128] W. Leimgruber, V. Stefanovic, F. Schenker, A. Karr, J. Berger, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5791–5793.
- [129] D. Antonow, D. E. Thurston, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 2815–2864.
- [130] D. S. Bose, A. S. Thompson, J. Ching, J. A. Hartley, M. D. Berardini, T. C. Jenkins, S. Neidle, L. H. Hurley, D. E. Thurston, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4939–4941.
- [131] 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.
- [132] J. A. Hartley, V. J. Spanswick, N. Brooks, P. H. Clingen, P. J. McHugh, D. Hochhauser, R. B. Pedley, L. R. Kelland, M. C. Alley, R. Schultz, M. G. Hollingshead, K. M. Schweikart, J. E. Tomaszewski, E. A. Sausville, S. J. Gregson, P. W. Howard, D. E. Thurston, *Cancer Res.* **2004**, 64, 6693–6699.
- [133] M. C. Alley, M. G. Hollingshead, C. M. Pacula-Cox, W. R. Waud, J. A. Hartley, P. W. Howard, S. J. Gregson, D. E. Thurston, E. A. Sausville, *Cancer Res.* **2004**, 64, 6700–6706.
- [134] J. A. Hartley, A. Hamaguchi, M. Coffils, C. R. Martin, M. Suggitt, Z. Chen, S. J. Gregson, L. A. Masterson, A. C. Tiberghien, J. M. Hartley, C. Pepper, T. T. Lin, C. Fegan, D. E. Thurston, P. W. Howard, *Cancer Res.* **2010**, 70, 6849–6858.
- [135] M. Miller, N. Fishkin, W. Li, B. Leece, M. Mayo, G. Jones, E. Reid, K. Archer, E. Maloney, Y. Kovtun, J. Pinkas, R. Singh, R. Chari, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, 8, B126.
- [136] S. C. Jeffrey, P. J. Burke, R. P. Lyon, D. W. Meyer, D. Sussman, M. Anderson, J. H. Hunter, C. I. Leiske, J. B. Miyamoto, N. D. Nicholas, N. M. Okeley, R. J. Sanderson, I. J. Stone, W. Zeng, S. J. Gregson, L. Masterson, A. C. Tiberghien, P. W. Howard, D. E. Thurston, C. L. Law, P. D. Senter, *Bioconjugate Chem.* **2013**, 24, 1256–1263.
- [137] M. S. Kung Sutherland, R. B. Walter, S. C. Jeffrey, P. J. Burke, C. Yu, H. Kostner, I. Stone, M. C. Ryan, D. Sussman, R. P. Lyon, W. Zeng, K. H. Harrington, K. Klussman, L. Westendorf, D. Meyer, I. D. Bernstein, P. D. Senter, D. R. Benjamin, J. G. Drachman, J. A. McEarchern, *Blood* **2013**, 122, 1455–1463.
- [138] J. Anderl, C. Muller, B. Heckl-Ostreicher, R. Wehr, *Cancer Res.* **2011**, 71, 3616.
- [139] A. C. Lazar, L. Wang, W. A. Blattler, G. Amphlett, J. M. Lambert, W. Zhang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 1806–1814.
- [140] A. Wakankar, Y. Chen, Y. Gokarn, F. S. Jacobson, *MABS* **2011**, 3, 161–172.
- [141] J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. Tsai, M. S. Dennis, Y. Lu, Y. G. Meng, C. Ng, J. Yang, C. C. Lee, E. Duenas, J. Gorrell, V. Katta, A. Kim, K. McDorman, K. Flagella, R. Venook, S. Ross, S. D. Spencer, W. L. Wong, H. B. Lowman, R. Vandlen, M. X. Sliwowski, R. H. Scheller, P. Polakis, W. Mallet, *Nat. Biotechnol.* **2008**, 26, 925–932.
- [142] A. Yurkovetskiy, N. Bodyak, M. Yin, J. Thomas, P. Conlon, C. Stevenson, A. Uttard, L. Qin, A. Campbell, D. Gumerov, E. Ter-Ovanesyan, M. DeVit, T. Lowinger, in *AACR National Meeting (Washington, D. C.)* **2013**, Abstr. 4331.
- [143] J. B. Stimmel, B. M. Merrill, L. F. Kuyper, C. P. Moxham, J. T. Hutchins, M. E. Fling, F. C. Kull, Jr., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 30445–30450.
- [144] B. Q. Shen, K. Xu, L. Liu, H. Raab, S. Bhakta, M. Kenrick, K. L. Parsons-Reponte, J. Tien, S. F. Yu, E. Mai, D. Li, J. Tibbitts, J. Baudys, O. M. Saad, S. J. Scales, P. J. McDonald, P. E. Hass, C. Eigenbrot, T. Nguyen, W. A. Solis, R. N. Fuji, K. M. Flagella, D. Patel, S. D. Spencer, L. A. Khawli, A. Ebens, W. L. Wong, R. Vandlen, S. Kaur, M. X. Sliwowski, R. H. Scheller, P. Polakis, J. R. Junutula, *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30, 184–189.
- [145] J. Y. Axup, K. M. Bajjuri, M. Ritland, B. M. Hutchins, C. H. Kim, S. A. Kazane, R. Halder, J. S. Forsyth, A. F. Santidrian, K. Stafin, Y. Lu, H. Tran, A. J. Seller, S. L. Biroc, A. Szydluk, J. K. Pinkstaff, F. Tian, S. C. Sinha, B. Felding-Habermann, V. V. Smider, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 16101–16106.
- [146] P. Strop, S. H. Liu, M. Dorywalska, K. Delaria, R. G. Dushin, T. T. Tran, W. H. Ho, S. Farias, M. G. Casas, Y. Abdiche, D. Zhou, R. Chandrasekaran, C. Samain, C. Loo, A. Rossi, M. Rickert, S. Krimm, T. Wong, S. M. Chin, J. Yu, J. Dilley, J. Chaparro-Riggers, G. F. Filzen, C. J. O'Donnell, F. Wang, J. S. Myers, J. Pons, D. L. Shelton, A. Rajpal, *Chem. Biol.* **2013**, 20, 161–167.
- [147] S. Möhlmann, P. Bringmann, S. Greven, A. Harrenga, *BMC Biotechnol.* **2011**, 11, 76.
- [148] G. Casi, N. Huguenin-Dezot, K. Zuberbühler, J. Scheuermann, D. Neri, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 5887–5892.
- [149] T. Yokota, D. E. Milenic, M. Whitlow, J. Schlom, *Cancer Res.* **1992**, 52, 3402–3408.
- [150] K. M. Kim, C. F. McDonagh, L. Westendorf, L. L. Brown, D. Sussman, T. Feist, R. Lyon, S. C. Alley, N. M. Okeley, X. Zhang, M. C. Thompson, I. Stone, H. P. Gerber, P. J. Carter, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, 7, 2486–2497.
- [151] 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.