

# Ein niedermolekulares Ligand-Wirkstoff-Konjugat zur Behandlung von Carboanhydrase IX exprimierenden Tumoren\*\*

Nikolaus Krall, Francesca Pretto, Willy Decurtins, Gonçalo J. L. Bernardes, Claudiu T. Supuran und Dario Neri\*

**Abstract:** Antikörper-Wirkstoff-Konjugate sind eine vielversprechende Klasse neuer Krebsmedikamente. Die Verwendung niedermolekularer Liganden für den zielgerichteten Transport zytotoxischer Substanzen in solide Tumoren ist dagegen weniger gut entwickelt. Hier beschreiben wir zum ersten Mal kleine Ligand-Wirkstoff-Konjugate zur Behandlung von Carboanhydrase IX exprimierenden Tumoren. Mit Ligand-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugaten zeigen wir, dass solche Moleküle sich bevorzugt in Antigen exprimierenden Läsionen anreichern, schnell ihr Ziel erreichen und tief in den Tumor eindringen können. Ferner sind derartige Konstrukte durch Totalsynthese herstellbar. Ein über eine Disulfidbrücke verbundenes Wirkstoff-Konjugat bestehend aus dem Maytansinoid DM1 als zytotoxischer Nutzlast und einem Derivat von Acetazolamid als Transportligand zeigte eine hohe Wirksamkeit gegen SKRC52-Nierenkleinzellkarzinom *in vivo*. Die klinisch eingesetzten Standardtherapien Sunitinib und Sorafenib hatten dagegen keine Aktivität.

Der Transport hoch potenter Zytostatika direkt in erkrankte Gewebe ist eine vielversprechende Strategie zur Behandlung von Krebs und anderen schweren Erkrankungen. Die therapeutische Nutzlast wird dabei über einen Linker mit einem Liganden für ein Markerprotein, meist einen Tu-

mormarker, verbunden. Der Ligand stellt sicher, dass sich das Konstrukt nur im Zielgewebe, nicht aber in gesunden Organen anreichert. Dort wird der Linker anschließend geschnitten und die Nutzlast selektiv freigesetzt. Die effektiv angewandte Dosis kann so gesteigert und Nebenwirkungen können verringert werden. Bis jetzt wurden meist monoklonale Antikörper als Transportliganden eingesetzt.<sup>[1,2]</sup> Zwei derartige Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, Brentuximab Vedotin und Trastuzumab Emtansin, wurden mittlerweile für therapeutische Anwendungen in der Onkologie zugelassen.<sup>[3]</sup>

Man beginnt allerdings immer mehr, außer den Vorteilen auch die Einschränkungen von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten zu erkennen.<sup>[4]</sup> Antikörper sind große Makromoleküle und können deshalb oft nicht tief in solide Tumoren eindringen.<sup>[5]</sup> Zusätzlich können sie Abwehrreaktionen des Immunsystems hervorrufen,<sup>[6]</sup> und lange Zirkulationszeiten im Blutstrom<sup>[7]</sup> können zu frühzeitiger Freisetzung des Wirkstoffs und so zu Nebenwirkungen führen. Des Weiteren ist die Herstellung derartiger Konjugate sehr aufwendig und teuer.<sup>[4]</sup>

Durch die Verwendung von kleineren Liganden als Transportvehikel, z.B. Peptiden oder kleinen, medikamentähnlichen Molekülen, könnten sich manche dieser Limitationen umgehen lassen. Die geringere Größe dieser Substanzen könnte dabei helfen, tiefer in Tumoren einzudringen. Die Möglichkeit, die Liganden durch Totalsynthese herzustellen, könnte die Produktionskosten verringern.<sup>[4,8]</sup> Tatsächlich wurden schon mehrere kleine Ligand-Wirkstoff-Konjugate mit Erfolg getestet. Besonders zu erwähnen sind hier Folsäure-Wirkstoff-Konjugate<sup>[9]</sup> und Moleküle, die gegen Prostata-spezifisches Membranantigen (PSMA)<sup>[10]</sup> gerichtet sind. Ein Folsäure-Wirkstoff-Konjugat hat mittlerweile die Phase III der klinischen Studien erreicht.<sup>[11]</sup> Trotz steigenden Interesses vonseiten akademischer und industrieller Forschung steht das Gebiet noch am Anfang seiner Entwicklung, und nur wenige Liganden und Rezeptoren wurden bis jetzt mit Erfolg getestet.

Hier beschreiben wir die Entwicklung und Charakterisierung einer Familie neuartiger niedermolekularer Ligand-Wirkstoff-Konjugate für die Therapie von Carboanhydrase IX (CAIX) exprimierenden Tumoren. CAIX ist ein Membranprotein mit extrazellulärem aktivem Zentrum und kommt in verschiedensten Krebsformen, darunter Glioblastom,<sup>[12]</sup> Kolorektal-<sup>[13]</sup> und Mammakarzinom<sup>[14]</sup> in hypoxischen Tumorregionen vor.<sup>[15]</sup> Wegen seiner weiten Verbreitung wird es als sehr interessantes Target angesehen. Im Nierenkleinzellkarzinom wird das Protein oft konstitutiv überexprimiert und ist einer der besten Zelloberflächenmarker dieser Krankheit.<sup>[16]</sup> Andere Isoformen der Carboanhydrase erfüllen diverse physiologische Funktionen. Wäh-

[\*] N. Krall, F. Pretto, W. Decurtins, Dr. G. J. L. Bernardes, Prof. D. Neri  
Institute of Pharmaceutical Sciences, ETH Zürich  
HCI, G391.4, Vladimir-Prelog-Weg 1-5/10, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: dario.neri@pharma.ethz.ch

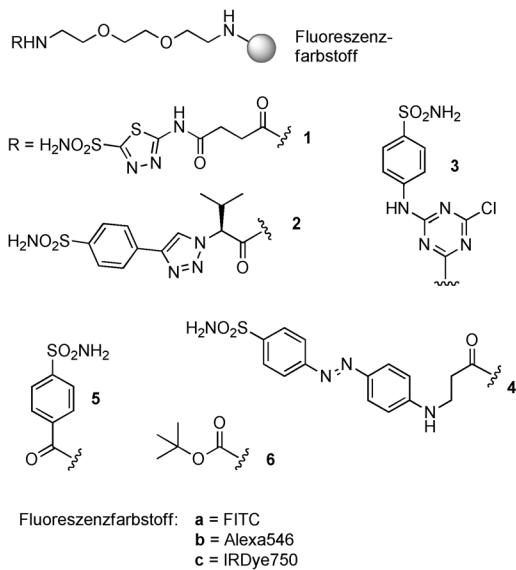
Dr. G. J. L. Bernardes  
Aktuelle Adresse: Department of Chemistry  
University of Cambridge  
Lensfield Road, CB2 1EW, Cambridge (Großbritannien)  
und

Instituto de Medicina Molecular  
Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa  
Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisboa (Portugal)

Prof. C. T. Supuran  
University of Florence, Neurofarba Department  
Via Ugo Schiff 6, Polo Scientifico, 50019 – Sesto Fiorentino (Firenze)  
(Italien)

[\*\*] Die Arbeit über kleine Wirkstoff-Konjugate für die Tumortherapie in der Gruppe Neri wird von der ETH Zürich, dem Schweizerischen Nationalfonds und Oncosuisse finanziert. Prof. Dario Neri ist Aktionär der Philochem AG, die Technologien auf dem Gebiet niedermolekularer Ligand-Wirkstoff-Konjugate von der ETH Zürich lizenziert hat. Wir danken EMBO für ein Long-Term Fellowship für G.J.L.B. sowie Dr. Raphael Franzini, Dr. Giulio Casi und Moreno Wichert für das kritische Lesen und Korrigieren der Manuskripte.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201310709> zu finden.

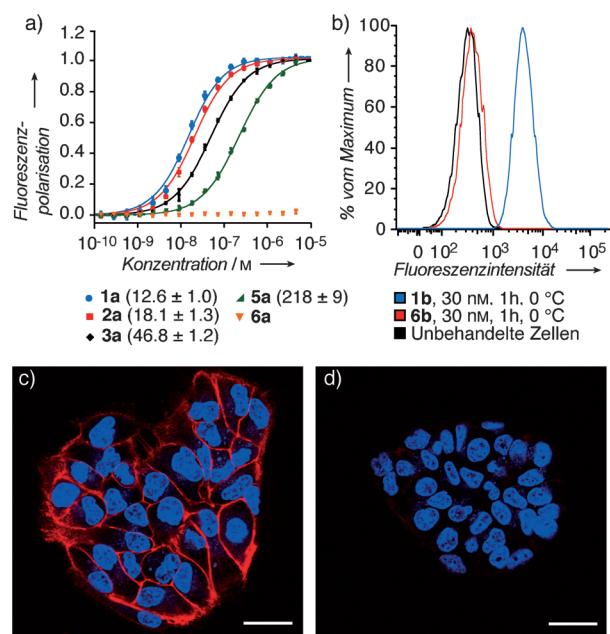


**Schema 1.** Chemische Strukturen von Ligand-Linker-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugaten, die für die Untersuchung der Bindung verschiedener Liganden *in vitro* und ihrer Tumorkumulation *in vivo* hergestellt wurden. FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

rend viele intrazellulär lokalisiert sind (z.B. die weit verbreitete CAII), sind andere membrangebunden (z.B. CAXII).<sup>[17,18]</sup>

Basierend auf bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen<sup>[19–21]</sup> wurde eine Reihe hochaffiner, gegen CAIX gerichteter Liganden-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate **1a–3a** hergestellt (Schema 1). Die Dissoziationskonstanten von **1a–3a** und **5a** gegen rekombinante extrazelluläre Domäne von CAIX wurden mithilfe von Fluoreszenzpolarisation (FP) bestimmt (Abbildung 1a). Zelldurchflusszytometrie zeigte eine ligandabhängige Bindung von Alexa546- und IRDye750-Konjugaten **1b** und **1c–5c** an CAIX-positive Zellen (Abbildung 1b; Zusatzabbildung 1 der Hintergrundinformationen), aber nicht an CAIX-negative Kontrollzellen (Zusatzabbildungen 2 und 3 der Hintergrundinformationen). Kontroll-Konjugate **6b** und **6c**, denen der Ligand fehlt, zeigten keine Bindung an Zellen (Abbildung 1b, Zusatzabbildung 1 der Hintergrundinformationen). Im Unterschied zu früheren Berichten über rezeptorabhängige Internalisierung von CAIX-Liganden<sup>[22–25]</sup> fanden wir ein auf Acetazolamid (AAZ) basierendes Konjugat mit einem Fluoreszenzfarbstoff **1b** bevorzugt auf der Oberfläche von CAIX-positiven Zellen (Abbildung 1c). In einem Kontrollexperiment konnten dieselben Zellen nicht von einem Konjugat ohne entsprechenden Liganden **6b** angefärbt werden (Abbildung 1d). Weitere durchflusszytometrische Experimente legen eine geringfügige und sehr ineffiziente Internalisierung nahe (Zusatzabbildung 5 der Hintergrundinformationen). Unsere Resultate zeigen, dass Konjugate **1a–c** basierend auf dem für die Therapie des Glaukoms verwendeten Medikament AAZ hoch affine CAIX-Binder sind ( $K_D = 12.6 \text{ nm}$  für **1a**) und AAZ deshalb möglicherweise als Ligand für den zielgerichteten Wirkstoff-Transport geeignet ist.

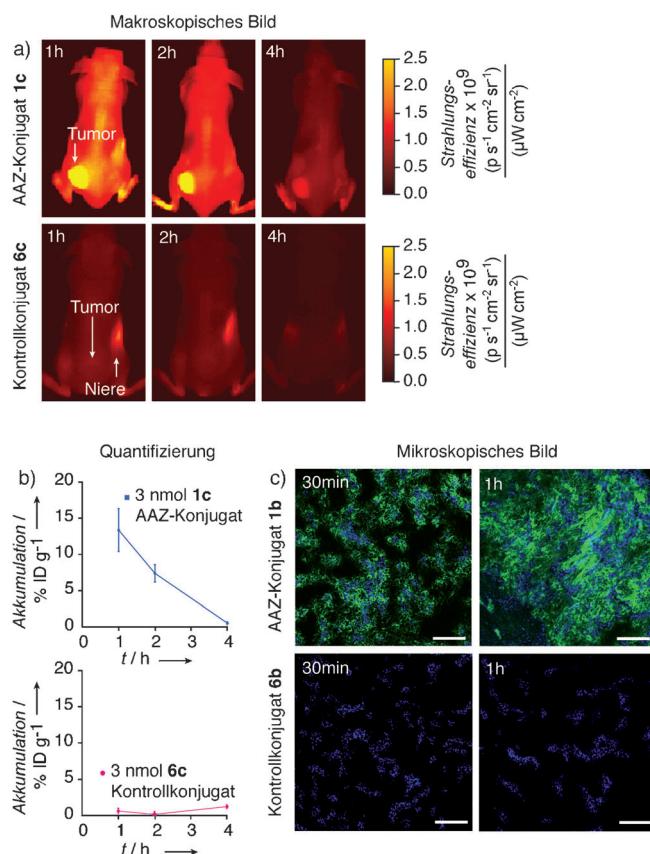
Wir untersuchten deshalb das Potenzial von **1b** und **1c**, Tumoren *in vivo* zu erreichen (Abbildung 2). Eine intrave-



**Abbildung 1.** In-vitro-Charakterisierung von Ligand-Linker-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugaten. a) Bestimmung des  $K_D$ -Werts von **1a–3a**, **5a** und **6a** gegen die rekombinante extrazelluläre Domäne von CAIX mithilfe von Fluoreszenzpolarisation. Der  $K_D$ -Wert des Diazoliganden **4a** konnte wegen seiner Absorptionsmerkmale bei 495 nm nicht bestimmt werden. Datenpunkte geben den Mittelwert von drei Experimenten. Fehlerbalken geben die Standardabweichung.  $K_D$ -Werte sind in Klammern in nm ± Standardfehler der nichtlinearen Regression gegeben. b) Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von Alexa546-Konjugaten **1b** und **6b** an CAIX exprimierende SKRC52-Zellen. Nur Konjugat **1b** mit gekuppeltem CAIX-Liganden bindet die Zellen, während das Konstrukt **6b** ohne Ligand ein Histogramm ergibt, das mit dem unbehandelter Zellen deckungsgleich ist. c) Konfokalmikroskopische Bilder von CAIX exprimierenden SKRC52-Zellen, nachdem sie 1 h mit Konjugat **1b** (30 nm) behandelt wurden. Das Konjugat scheint mehrheitlich an die Zelloberfläche gebunden zu sein. d) Konfokalmikroskopische Bilder von CAIX exprimierenden SKRC52-Zellen, nachdem sie 1 h mit Kontrollsubstanz **6b** (30 nm) behandelt wurden. Ohne Ligand kann keine Bindung auf der Zelloberfläche festgestellt werden. Der Balken zeigt eine Länge von 35 µm an.

nöse Dosis von 3 nmol AAZ-basiertem Konjugat **1c** reichte sich bevorzugt in subkutanen CAIX exprimierenden SKRC52-Tumoren<sup>[26]</sup> in athymischen Mäusen an (Abbildung 2a; Zusatzabbildung 7 der Hintergrundinformationen). Intravenöse Gabe von 3 nmol **2c** führte nach 1 h zu einer moderaten Akkumulation im Tumorgewebe (Zusatzabbildung 8 der Hintergrundinformationen). Das Signalverhältnis von Tumor zu Hintergrund war jedoch schlecht. Konjugate **3c–5c** und Kontrollsubstanz **6c** erreichten den Tumor nicht in messbaren Mengen (Abbildung 2a; Zusatzabbildung 8 der Hintergrundinformationen). Da **1a** den geringsten  $K_D$ -Wert, gefolgt von **2a**, aufweist, lassen diese Resultate darauf schließen, dass die Bindungsaffinität zur Tumorkumulation beiträgt.

Die Akkumulation von **1c** im Tumor war schnell und mit  $(13.4 \pm 3.0) \% \text{ ID g}^{-1}$  nach nur 1 h gut (Abbildung 2b; Zusatzabbildungen 10 und 11 der Hintergrundinformationen). Dies ist höher als die Werte, die in einer früheren Studie mit Antikörpern als Transportliganden für CAIX in verschiede-



**Abbildung 2.** Evaluation der Tumorakkumulation von AAZ-Konjugaten **1b** und **1c** im Vergleich mit jener der Kontrollsubstanz **6b** und **6c**. a) Bilder im Nahinfrarotbereich einer repräsentativen Maus 1, 2 und 4 h nach intravenöser Gabe von 3 nmol Ligand-IRDye750-Konjugat **1c** oder **6c**. Eine bevorzugte Akkumulation von **1c** im Tumor ist zu sehen. Ohne Ligand kann die Kontrollsubstanz **6c** nur in den Nieren als wichtigster Exkretionsroute beobachtet werden. b) Quantifizierung von Ligand-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat **1c** und Kontrollsubstanz **6c** in homogenisierten Tumoren, entnommen 1, 2 oder 4 h nach intravenöser Gabe von 3 nmol Konjugat. Fehlerbalken geben Standardabweichungen an. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von drei Experimenten. c) 10-µm-Schnitte von Tumoren 30 min und 1 h nach intravenöser Gabe von 50 nmol Ligand-Alexa546-Konjugat **1b** und Kontrollkonjugat **6b**. Die Penetration des Tumors durch Konjugat **1b** (grün) nimmt mit der Zeit zu. Gebiete in der nahen Umgebung von Blutgefäßen wurden durch Perfusion des Tieres mit Hoechst33342 (blau) 5 min vor Tumorextraktion gefärbt. Der Balken gibt eine Länge von 200 µm an. Das Konjugat ohne Ligand erreicht den Tumor nicht in messbaren Mengen.

nen Heterotransplantatmodellen gemessen wurden (ein Maximum von  $(2.4 \pm 0.2) \% \text{ ID g}^{-1}$  wurde hier erreicht).<sup>[27]</sup> In unserem Fall dagegen dissozierte das Ligand-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugat zunehmend vom Tumor (Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des Aufenthalts ca. 1 h). Dies lässt darauf schließen, dass eine weitere Verbesserung der Bindungsaffinität des Transportliganden für CAIX eine höhere und länger anhaltende Akkumulation bewirken könnte.

Nur 1 h nach intravenöser Gabe von **1c** wurde ein Signalverhältnis von Tumor zu Blut von 13.8:1 gemessen (Zusatztabelle 2 der Hintergrundinformationen). Dieser Wert verbesserte sich auf 79.2:1 nach 4 h. Die Signalverhältnisse zwischen Tumor und Exkretionsorganen lagen zwischen 0.2:1

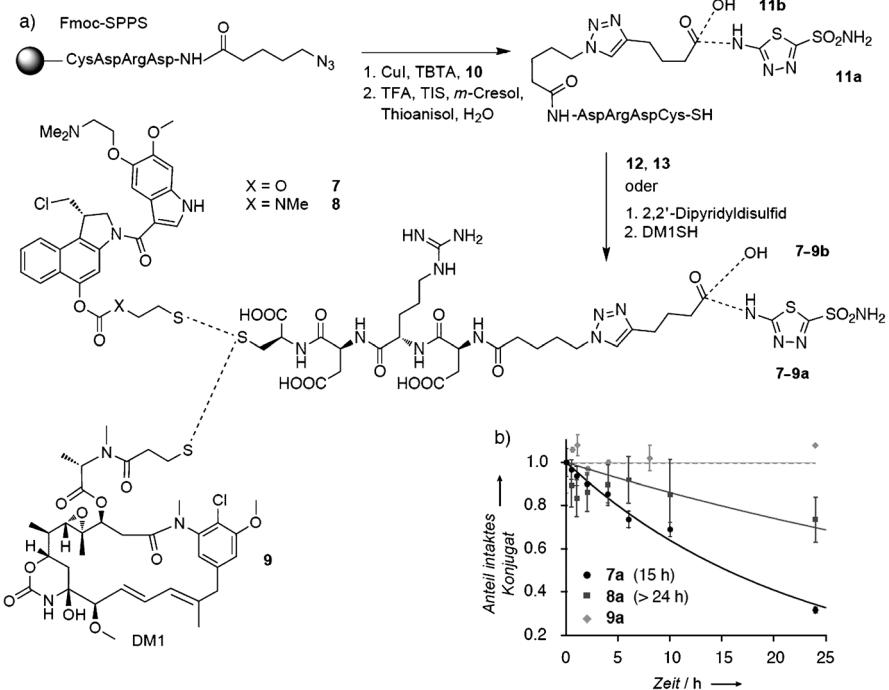
für Leber und 1.4:1 für Nieren nach 1 h (Zusatztabellen 1 und 2 der Hintergrundinformationen). Eine hohe Selektivität konnte dagegen für andere Organe (z.B. 27.6:1 für Tumor zu Herz nach 1 h; Zusatztabelle 2 der Hintergrundinformationen) beobachtet werden. AAZ ist ein CA-Ligand mit breiter Isoformselektivität.<sup>[19]</sup> Die Verwendung von geladenen Konjugaten kann jedoch eine bevorzugte extrazelluläre Lokalisation des Moleküls bewirken, sodass viele weit verbreitete CA-Isoformen wie die intrazelluläre CAII nicht zugänglich sind.<sup>[18]</sup>

Die Akkumulation im Tumor erfolgte klar in Abhängigkeit vom Liganden, wie die unterschiedlichen Flächen unter den Kurven von Tumorakkumulation gegen Zeit (Abbildung 2b) und die 22-mal höhere Akkumulation nach 1 h (Zusatztabelle 1 der Hintergrundinformationen) von zielgerichtetem Konjugat **1c** gegenüber Kontrollsubstanz **6c** belegen. Unter der Annahme, dass **6c** ein gutes Modell für die Gewebeverteilung von unkonjugierten Krebsmedikamenten ist, zeigen diese Resultate eindeutig, wie wichtig es ist, Medikamente aktiv in Tumoren zu transportieren, um dort therapeutisch relevante Dosen zu erreichen.

Um die mikroskopische Verteilung von kleinen, zielgerichteten Konjugaten mit Fluoreszenzfarbstoffen in unterschiedlichen Organen zu untersuchen, wurden 50 nmol **1b** und **6b** Mäusen mit SKRC52-Tumoren intravenös verabreicht. Schon nach 30 min war **1b** aus der unmittelbaren Umgebung der Blutgefäße herausdiffundiert (Abbildung 2c; Zusatzabbildung 12 der Hintergrundinformationen), die zuvor durch Perfusion des Tiers mit Hoechst33342 markiert worden waren. Kontrollsubstanz **6b** erreichte den Tumor ohne den Transportliganden nicht in messbaren Mengen (Abbildung 2c); zudem war die Fluoreszenz auf CAIX-positive Gewebe sowie Exkretionsorgane beschränkt (Zusatzabbildung 13 der Hintergrundinformationen).

Motiviert durch diese Ergebnisse beschlossen wir, die therapeutische Wirksamkeit mehrerer Konjugate bestehend aus einem AAZ-Derivat als Transportligand, einem im Tumorumfeld labilen Linker und wirksamen zytotoxischen Nutzlasten zu untersuchen. Wir konzentrierten uns dafür auf Konjugate **7a,b** und **8a,b**, deren Nutzlast vom Naturstoff Duocarmycin abgeleitet war, und Konjugate **9a,b** mit dem Maytansinoid DM1. Beide Giftstoffe waren zuvor in der Entwicklung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten eingesetzt worden.<sup>[28,29]</sup> Da wir bei unseren Experimenten keine effiziente Internalisierung von CAIX beobachten konnten (Abbildung 1c), nahmen wir an, dass sich die Konjugate **7a–9a** zunächst extrazellulär im Tumor anreichern würden. Reduktionsmittel (z.B. von sterbenden Zellen freigesetztes Glutathion) könnten die Disulfidbrücke des Konjugats dort spalten und den Wirkstoff freisetzen, der anschließend in benachbarte Zellen diffundieren würde. Ein analoger Mechanismus war zuvor schon für die Aktivierung von nicht internalisierenden Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten vorgeschlagen worden.<sup>[30]</sup>

Die Synthese von Wirkstoff-Konjugaten **7–9a,b** ist in Schema 2a beschrieben. Für alle Konjugate wurde ein Derivat eines zuvor beschriebenen geladenen Peptid-Linkers als Verbindungsstück verwendet, um die Wasserlöslichkeit des Konstrukts sicherzustellen.<sup>[11]</sup> Der Transportligand wurde



**Schema 2.** Struktur, Synthese und Stabilität der Wirkstoff-Konjugate. a) Der geladene Peptid-Linker wurde mithilfe von Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasensynthese hergestellt. Transportligand **10** wurde durch eine Cu<sup>I</sup>-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition an diesen gekuppelt. Therapeutische Nutzlasten wurden über Disulfidbrückenaustausch mit dem Linker verbunden. b) Die hydrolytische Stabilität der Wirkstoff-Konjugate in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7.4 bei 37°C wurde mit Massenspektrometrie (**7a** und **8a**) sowie Flüssigchromatographie (**9a**) untersucht. Das Konjugat mit dem Carbamatderivat von Duocarmycin **8a** ( $t_{1/2} > 24$  h) war stabiler als das Carbonat **7a** ( $t_{1/2} = 15$  h). Das DM1-Konjugat **9a** war hydrolytisch stabil. SPPS = Festphasenpeptidsynthese, TBTA = Tris(benzyltriazolylmethyl)amin, TFA = Trifluoressigsäure, TIS = Triisopropylsilan.

durch Cu<sup>I</sup>-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition eingeführt, da die direkte Kupplung des AAZ-Bernsteinsäurederivats wie in **1a** durchgehend fehlgeschlug. Im Falle der Duocarmycin-Konjugate **7a,b** und **8a,b** war der Carbonat- bzw. Carbamatrest so ausgelegt, dass er spontan zerfallen und den aktiven Giftstoff freisetzen würde.<sup>[11,31,32]</sup> Den Konjugaten **7b**, **8b** und **9b** fehlte AAZ als Transportligand; sie wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

Alle zielgerichteten Wirkstoff-Konjugate **7-9a** banden in einem kompetitiven Fluoreszenzpolarisationsversuch gegen **1a** CAIX in vitro mit niedrigen nanomolaren Affinitäten, während die Kontrollsubstanzen **7-9b** nur schwach mit dem Protein interagierten ( $K_D > 1 \mu\text{M}$ ; Zusatzabbildung 14 der Hintergrundinformationen).<sup>[33]</sup> Wie erwartet, war das Carbonat **7a** ( $t_{1/2} = 15$  h) weniger stabil in PBS bei 37°C als das Carbamat **8a** ( $t_{1/2} > 24$  h). Kein Zerfall konnte für das DM1-Konjugat **9a** unter denselben Bedingungen beobachtet werden (Schema 2b). Die Stabilität von **7a** und **8a** war in Mäuseserum in vitro verringert ( $t_{1/2} = 43$  bzw. 61 min; Zusatzabbildung 15a der Hintergrundinformationen), jedoch unserer Ansicht nach hoch genug, um mit einer schnellen Akkumulation im Tumor kompatibel zu sein.<sup>[34]</sup> Das DM1-Konjugat **9a** war viel stabiler ( $t_{1/2} = 20$  h; Zusatzabbildung 15b der Hintergrundinformationen). Alle Konjugate hatten in vitro eine nachweisbare zytotoxische Wirkung

(Zusatzabbildungen 16 und 17 der Hintergrundinformationen).

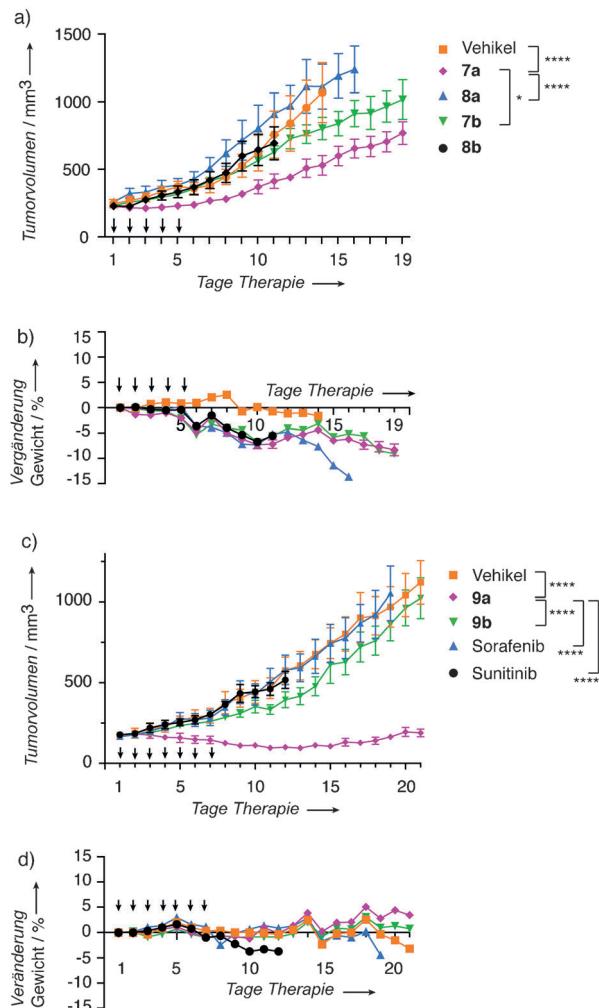
Die therapeutische Aktivität von Duocarmycin- und DM1-Konjugaten **7-9a,b** wurde in Mäusen mit subkutanen SKRC52-Tumoren getestet. Die Moleküle wurden täglich intravenös in einer empfohlenen Dosis verabreicht, die zuvor experimentell in einer Dosiseskalation bestimmt worden war (Zusatzabbildungen 18 und 19 der Hintergrundinformationen). Die Kontrollsubstanzen **7b**, **8b** und **9b** wurden zusammen mit äquimolaren Mengen von AAZ als Negativkontrollen verabreicht.

Therapieversuche mit Duocarmycin-AAZ-Konjugaten zeigten nur eine geringe Aktivität (Abbildung 3a). Trotzdem bewirkte das zielgerichtete Carbonatkonjugat **7a** eine statistisch signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums gegenüber dem bei Mäusen, die nur Vehikel erhielten ( $p < 0.0001$ ), sowie Mäusen, die Kontrollsubstanz **7b** plus äquimolare Mengen an AAZ verabreicht bekamen ( $p < 0.05$ ). Die Carbamate **8a** und **8b** bewirkten keine Verlangsamung des Tumorwachstums. Es scheint möglich, dass die geringe Affinität von **8a** gegenüber dem Antigen ( $K_D = (40.3 \pm 2.6)$  nm gegenüber  $K_D = (7.3 \pm 0.5)$  nm für **7a**) sowie ineffizi-

ente extrazelluläre Aktivierung zum mindest teilweise für diesen Effekt verantwortlich sind. Während der Behandlung verloren die Tiere weniger als 15 % Gewicht (Abbildung 3b).

Mit dem DM1-Konjugat **9a** konnte mit Dosen, die zu keinem messbaren Gewichtsverlust führten und deshalb als minimal toxisch zu betrachten sind ( $7 \times 70$  nmol **9a** an sieben aufeinander folgenden Tagen) ein starker Antitumoreffekt erzielt werden. Während der Behandlung und an sieben darauf folgenden Tagen verringerte sich das Volumen der Tumoren. Erst 20 Tage nach dem Beginn der Behandlung begannen Tumoren wieder zu wachsen, was damit zu erklären ist, dass die Tiere nach dem ersten Zyklus keine weitere Behandlung erhielten. Weder Sorafenib noch Sunitinib, die beide zur Behandlung von Nierenkrebs klinisch eingesetzt werden,<sup>[35]</sup> hatten einen messbaren Antitumoreffekt. Dies ist in Übereinstimmung mit Versuchen in anderen Nierenkrebsmodellen<sup>[36]</sup> und legt nahe, dass der zielgerichtete Transport zytotoxischer Substanzen ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung von Nierenkrebs sein könnte. DM1 könnte dabei eine besonders vorteilhafte Nutzlast für die Entwicklung von Wirkstoff-Konjugaten sein, da z.B. der Ester in dessen Struktur die Detoxifikation durch Esterasen in Exkretionsorganen ermöglichen könnte.<sup>[37,38]</sup>

Nach bestem Wissen beschreiben wir hier zum ersten Mal den Einsatz eines neuartigen niedermolekularen Ligand-



**Abbildung 3.** Therapieexperimente. a) Wachstum von SKRC52-Heterotransplantattumoren in balb/c-Nacktmäusen nach Behandlung mit Duocarmycinderivat-Konjugaten **7–8a,b**. Es wurden 5-mal an fünf aufeinander folgenden Tagen (Pfeile) 4 nmol Substanz oder Vehikel (5% DMSO in PBS pH 7.4) intravenös verabreicht. Kontrollsubstanzen **7b** und **8b** ohne Transportligand wurden zusammen mit äquimolaren Mengen AAZ verabreicht. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. b) Gewichtsveränderung der Tiere, die mit Molekülen aus (a) behandelt wurden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. c) Wachstum von SKRC52-Heterotransplantattumoren in balb/c-Nacktmäusen nach Behandlung mit DM1-Konjugaten **9a,b**. Es wurden 7-mal an sieben aufeinander folgenden Tagen (Pfeile) 70 nmol Substanz oder Vehikel (5% DMSO in PBS pH 7.4) intravenös verabreicht. Kontrollsubstanz **9a** ohne Transportligand wurde zusammen mit äquimolaren Mengen AAZ verabreicht. Wirkstoff-Konjugat **9a** zeigte eine signifikant stärkere Antitumorwirkung als Kontrollsubstanz **9b** ohne Transportligand, die bis zu einer Woche nach der letzten Injektion anhielt. 20 Tage nach Beginn der Behandlung begannen die Tumoren wieder zu wachsen, da die Behandlung nach dem ersten Zyklus nicht fortgesetzt wurde. Klinisch zugelassene Kinase-Inhibitoren Sorafenib und Sunitinib wurden in einer Standarddosis von  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  verabreicht, zeigten aber keine Wirkung. Fehlerbalken geben den Standardfehler an. d) Gewichtsveränderung der Tiere, die mit Molekülen aus (c) behandelt wurden. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. \* bedeutet  $p < 0.05$ , \*\*\*\* bedeutet  $p < 0.0001$ . Gruppen wurden euthanasiert, sobald ein Tier eine Tumorvolumen von  $> 2000 \text{ mm}^3$  aufwies oder das Gewicht  $> 15\%$  abgenommen hatte. In Gruppe **9a** waren alle Tiere auch nach 40 Tagen noch am Leben. Jede Gruppe bestand aus fünf oder sechs Tieren.

Wirkstoff-Konjugats zur Behandlung von CAIX exprimierendem Nierenkleinzellkarzinom. Unsere Arbeit zeigt, dass es möglich ist, niedermolekulare Wirkstoff-Transportsysteme gegen nicht oder nur ineffizient internalisierende Antigene zu richten. Eine starke therapeutische Wirkung ist nur durch die richtige Kombination von Linker und Nutzlast möglich, wie die unterschiedlichen Resultate mit DM1 und Duocarmycinderivaten zeigen. Beide wurden schon mehrfach in der Entwicklung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten eingesetzt.<sup>[28,29]</sup>

Unsere quantitativen Biodistributionsanalysen zeigen, dass der CAIX-Ligand zur bevorzugten Akkumulation des Wirkstoffs im Tumor beiträgt. Durch weitere Verbesserung der Affinität und Isoformselektivität unserer Liganden hoffen wir, die therapeutische Wirkung und Selektivität unserer Konjugate weiter verbessern zu können. Wichtig ist dabei, solche Studien auch bei Krebspatienten unter Zuhilfenahme von nichtinvasiven bildgebenden Verfahren durchzuführen. Nur so kann der Schritt vom Mausmodell in die Klinik bewältigt werden. Wir sind davon überzeugt, dass unsere Resultate die Entwicklung von Wirkstoff-Konjugaten zur Behandlung von CAIX exprimierenden soliden Tumoren unterstützen werden. Manche der Erkenntnisse haben möglicherweise auch Relevanz für die Entwicklung von Ligand-Wirkstoff-Konjugaten, die gegen andere tumorassoziierte Antigene gerichtet sind.

Eingegangen am 10. Dezember 2013  
Online veröffentlicht am 12. März 2014

**Stichwörter:** Carboanhydrase IX · Krebs · Prodrugs · Wirkstoff-Konjugate · Wirkstoff-Transport

- [1] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cerveny, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, J. A. Francisco, A. F. Wahl, D. L. Meyer, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778.
- [2] B. A. Teicher, R. V. Chari, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6389.
- [3] R. S. Zolot, S. Basu, R. P. Million, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 259.
- [4] N. Krall, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1424; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1384.
- [5] M. S. Dennis, H. K. Jin, D. Dugger, R. H. Yang, L. McFarland, A. Ogasawara, S. Williams, M. J. Cole, S. Ross, R. Schwall, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 254.
- [6] M. Carrasco-Triguero, J. H. Yi, R. Dere, Z. J. Qiu, C. Lei, Y. Li, C. Mahood, B. Wang, D. Leipold, K. A. Poon, S. Kaur, *Bioanalysis* **2013**, *5*, 1007.
- [7] L. Borsi, E. Balza, M. Bestagno, P. Castellani, B. Carnemolla, A. Biro, A. Leprini, J. Sepulveda, O. Burrone, D. Neri, L. Zardi, *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 75.
- [8] M. A. Firer, G. Gellerman, *J. Hematol. Oncol.* **2012**, *5*, 70.
- [9] J. A. Reddy, R. Dorton, E. Westrick, A. Dawson, T. Smith, L. C. Xu, M. Vetzel, P. Kleindl, I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4434.
- [10] S. A. Kularatne, K. Wang, H. K. Santhapuram, P. S. Low, *Mol. Pharmaceutics* **2009**, *6*, 780.
- [11] I. R. Vlahov, C. P. Leamon, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1357.
- [12] M. A. Proescholdt, M. J. Merrill, E. M. Stoerr, A. Lohmeier, F. Pohl, A. Brawanski, *Neurooncology* **2012**, *14*, 1357.

- [13] A. McIntyre, S. Patiar, S. Wigfield, J. L. Li, I. Ledaki, H. Turley, R. Leek, C. Snell, K. Gatter, W. S. Sly, R. D. Vaughan-Jones, P. Swietach, A. L. Harris, *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 3100.
- [14] S. A. Hussain, R. Ganesan, G. Reynolds, L. Gross, A. Stevens, J. Pastorek, P. G. Murray, B. Perunovic, M. S. Anwar, L. Billingham, N. D. James, D. Spooner, C. J. Poole, D. W. Rea, D. H. Palmer, *Br. J. Cancer* **2007**, *96*, 104.
- [15] A. Thiry, J. M. Dogne, B. Masereel, C. T. Supuran, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 566.
- [16] M. Takacova, M. Bartosova, L. Skvarkova, M. Zatovicova, I. Vidlickova, L. Csaderova, M. Barathova, J. Breza, Jr., P. Bujdak, J. Pastorek, J. Breza, Sr., S. Pastorekova, *Oncol. Lett.* **2013**, *5*, 191.
- [17] A. Kivelä, S. Parkkila, J. Saarnio, T. J. Karttunen, J. Kivelä, A. K. Parkkila, A. Waheed, W. S. Sly, J. H. Grubb, G. Shah, Ö. Tureci, H. Rajaniemi, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 577.
- [18] M. Klier, F. T. Andes, J. W. Deitmer, H. M. Becker, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 2765.
- [19] F. Carta, V. Garaj, A. Maresca, J. Wagner, B. S. Avvaru, A. H. Robbins, A. Scozzafava, R. McKenna, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3105.
- [20] A. Maresca, F. Carta, D. Vullo, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4929.
- [21] V. P. Mocharla, B. Colasson, L. V. Lee, S. Roper, K. B. Sharpless, C. H. Wong, H. C. Kolb, *Angew. Chem.* **2004**, *117*, 118; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44*, 116.
- [22] C. Xu, A. Lo, A. Yammanuru, A. S. Tallarico, K. Brady, A. Murakami, N. Barteneva, Q. Zhu, W. A. Marasco, *PloS One* **2010**, *5*, e9625.
- [23] A. Dürrbach, E. Angevin, P. Poncet, M. Rouleau, G. Chavanel, A. Chapel, D. Thierry, A. Gorter, R. Hirsch, B. Charpentier, A. Senik, F. Hirsch, *Cancer Gene Ther.* **1999**, *6*, 564.
- [24] V. Askoxylakis, R. Garcia-Boy, S. Rana, S. Kramer, U. Hebling, W. Mier, A. Altmann, A. Markert, J. Debus, U. Haberkorn, *PloS One* **2010**, *5*, e15962.
- [25] S. Rana, F. Nissen, A. Marr, A. Markert, A. Altmann, W. Mier, J. Debus, U. Haberkorn, V. Askoxylakis, *PloS One* **2012**, *7*, e38279.
- [26] F. G. van Schaijk, E. Oosterwijk, J. D. Molkenboer-Kuenen, A. C. Soede, B. J. McBride, D. M. Goldenberg, W. J. Oyen, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *J. Nucl. Med.* **2005**, *46*, 495.
- [27] J. K. Ahlskog, C. Schliemann, J. Marlind, U. Qureshi, A. Ammar, R. B. Pedley, D. Neri, *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 645.
- [28] 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, *New Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 1783.
- [29] A. Beck, J. Lambert, M. Sun, K. Lin, *mAbs* **2012**, *4*, 637.
- [30] G. J. Bernardes, G. Casi, S. Trussel, I. Hartmann, K. Schwager, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 965; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 941.
- [31] H. J. Schuster, B. Kreuer, J. M. von Hof, K. Schmuck, I. Schubert, F. Alves, L. F. Tietze, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1833.
- [32] A. El Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J. C. Florent, L. Johannes, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 6589; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6469.
- [33] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261.
- [34] 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. Ouding, M. D. Prairie, I. Gebhard, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 4904.
- [35] C. Domblides, M. Gross-Goupil, A. Quivy, A. Ravaud, *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2013**, *18*, 495.
- [36] K. Frey, C. Schliemann, K. Schwager, R. Giavazzi, M. Johannsen, D. Neri, *J. Urol.* **2010**, *184*, 2540.
- [37] X. Sun, W. Widdison, M. Mayo, S. Wilhelm, B. Leece, R. Chari, R. Singh, H. Erickson, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 728.
- [38] Z. Liu, H. G. Floss, J. M. Cassady, K. K. Chan, *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 389.