

Cysteinselektive Reaktionen zur Konjugation von Antikörpern**

Pedro M. S. D. Cal, Gonçalo J. L. Bernardes* und Pedro M. P. Gois*

Antikörper · Bioorganische Chemie · Konjugation · Maleimide · Wirkstofftransport

Im Gedenken an Carlos Barbas III

Die einzigartigen Erkennungsmerkmale von Antikörpern haben ein großes Interesse an der Anbindung von cytotoxischen Wirkstoffen an diese Biomoleküle hervorgerufen, um Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs, antibody–drug conjugates) zu erzeugen, die gesundes Gewebe aussparen können und ihre Fracht erst nach spezifischer Erkennung von Krebszellantigenen freisetzen.^[1] Trotz ihrer konzeptionellen Einfachheit müssen die einzelnen Komponenten von ADCs spezifische/zielgerichtete Eigenschaften aufweisen, um einen therapeutischen Nutzen zu bewirken. Der Antikörper sollte eine hohe Affinität zu spezifischen in Tumoren reichlich vorhandenen Antigenen besitzen, und seine pharmakokinetischen Eigenschaften sollten nach Konjugation mit dem Wirkstoff nicht beeinträchtigt sein. Das cytotoxische Molekül sollte hochwirksam sein, sodass möglichst wenig „Ladung“ konjugiert werden muss. Schließlich muss das Konjugationsverfahren die chemische Anlagerung des Wirkstoffs an den Antikörper an vorgegebenen Stellen ermöglichen, und die Stabilität des Konjugats während der Zirkulation im Organismus muss gewährleistet sein. Zwei ADCs wurden kürzlich als Arzneimittel zugelassen: Adcetris (Brentuximab-Vedotin) zur Behandlung von refraktärem Hodgkin-Lymphom und anaplastischem großzelligem Lymphom und Kadcyla (Trastuzumab-Emtansin) zur Behandlung von metastatischem HER2-positivem Brustkrebs.^[2]

Ein Schlüsselfaktor bei der Entwicklung therapeutisch nützlicher ADCs ist die Fähigkeit, chemisch definierte, stabile Protein-Wirkstoff-Konjugate zu erzeugen. Anfängliche Versuche zur Konjugation von Antikörpern und cytotoxischen Molekülen beruhten auf der Reaktivität von lösungsmittelzugänglichen Lysinresten und Cysteinresten, die schnell mit *N*-Hydroxysuccinimidestern (z.B. Brentuximab-Vedotin) bzw. Maleimid-Reagentien (z.B. Trastuzumab-Emtansin) reagieren. Derartige Modifizierungen führen jedoch häufig zu Gemischen mit uneinheitlichem Wirkstoff/Antikörper-Verhältnis mit möglicherweise unterschiedlichen pharmakokinetischen und therapeutischen Eigenschaften.^[3] Diese Probleme führten zu einer verstärkten Suche nach robusten regioselektiven Modifizierungsmethoden zur Herstellung homogener Konjugate mit verbesserten Eigenschaften. So zeigte ein chemisch definiertes ADC, das durch Oximbindung zwischen Ketonen in der Seitenkette einer nichtnatürlichen Aminosäure und einem Hydroxylamin-funktionalisierten Wirkstoff mit einem nicht-absplaltbaren Linker hergestellt wurde, eine erhöhte pharmakokinetische Stabilität und verbesserte In-vitro- und In-vivo-Wirksamkeiten im Vergleich zu einem herkömmlich synthetisierten ADC mit absplaltbarem Linker.^[4] In diesem Highlight werden neue Verfahren zur regioselektiven Biokonjugation an nativen oder künstlich eingeführten Cysteinen vorgestellt. Das Gebiet der ADCs wurde vor kurzem in einem hervorragenden Übersichtsartikel ausführlich beschrieben.^[1]

Um das Homogenitätsproblem bei Proteinkonjugaten anzugehen, wurden Ansätze entwickelt, um die Reaktivität von nativen oder künstlich eingeführten Cysteinen zu nutzen. Cysteinreste bieten den strategischen Vorteil einer geringen Häufigkeit sowie einer hohen Nukleophilie der Thiol-Seitenkette. Verschiedene Reaktionen zur Modifizierung von Cysteinresten wurden entwickelt,^[5] zum Beispiel: 1) Reaktion der Sulfhydryl-Seitenkette von Cystein mit α -Halogen-carbonylverbindungen, perfluoraromatischen Verbindungen (A; Abbildung 1)^[6] und Monobrommaleimiden (B);^[7] 2) Reaktion mit 2-Cyanobenzothiazol und Reagentien der Julia-Kociński-Olefinierung, z.B. ein Phenylloxadiazolsulfon-Derivat (C);^[8] 3) Umwandlung zu Dehydroalanin und anschließende Reaktion unter Bildung von Thioladdukten der Michael-Addition (D)^[9] oder Kupplungsprodukten der Thiol-En-Radikalreaktion (E);^[10] 4) Reaktion mit bekannten Michael-Akzeptoren wie Vinylsulfonen oder Maleimiden (F)^[5b] bzw. Allenamiden (G).^[11] Von diesen Beispielen wur-

[*] P. M. S. D. Cal, Dr. P. M. P. Gois
Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa)
Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa
Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa (Portugal)
E-Mail: pedrogois@ff.ul.pt
Homepage: <http://www.ff.ul.pt/~pedrogois/index.html>
Dr. G. J. L. Bernardes
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)
E-Mail: gb453@cam.ac.uk
gbernardes@fm.ul.pt
Homepage: <http://gbernardes-lab.com>

[**] P.M.S.D.C. und P.M.P.G. danken dem FCT (PTDC/QUI-QUI/118315/2010, Pest-OE/SAU/UI4013/2011, SFRH/BD/72376/2010) für die finanzielle Unterstützung. G.J.L.B. ist Royal Society University Research Fellow und FCT Investigator.

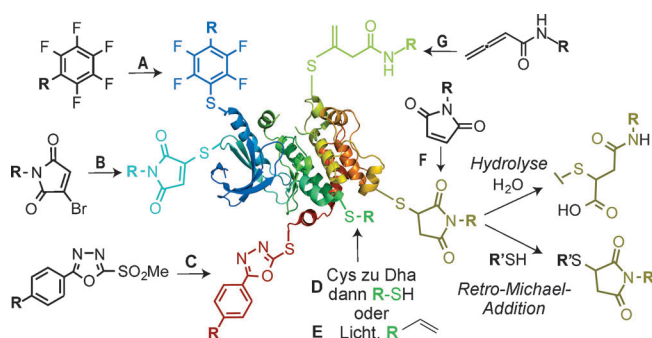


Abbildung 1. Neue cysteinelektive Biokonjugationsreaktionen und Abbauewege von Maleimid.

den Maleimide am häufigsten als Grundgerüst zur Anbindung von Molekülfrachten an Antikörper verwendet.^[12] Die Strategie wurde genutzt, um Brentuximab-Vedotin herzustellen und verschiedene Moleküle (z. B. Proteine, radiomarkierte Chelatoren, Fluoreszenzmarker) an Antikörper zu konjugieren. Auch gemischte Disulfide wurden zur Bildung von ADCs untersucht. So modifizierten Neri und Mitarbeiter Antikörperfragmente direkt am Cystein mit thiolhaltigen Wirkstoffen, um spurlose, chemisch definierte, Disulfid-verknüpfte Konjugate zu erzeugen.^[13]

Die Reaktion zwischen der Sulfhydryl-Seitenkette von Cystein und Maleimid-Derivaten läuft in wässrigem Medium schnell und mit hohen Selektivitäten ab. Die gebildeten Succinimidthioether können allerdings Hydrolyse oder einen Austausch mit anderen Thiolen eingehen (über eine Retro-Michael-Reaktion), wodurch in vivo heterogene Konjugatgemische resultieren, die die therapeutische Wirksamkeit verändern, zu systemischer Freisetzung und potenzieller Toxizität führen.^[14] Infolgedessen wurde nach Verfahren für die schnelle und effiziente Bildung von Thioethern an Cysteinreste und für die Bildung von plasmastabilen Produkten gesucht. Beispielsweise wurde ein Bis(sulfon)-Reagens beschrieben, das selektiv zwei freie, von einem nativen Disulfid abgeleitete Cysteine alkyliert. Dies ermöglicht die kovalente Neubildung der Disulfidbrücken, und die Struktur des Antikörpers bleibt unversehrt. Konjugate, die mit dem Bis(sulfon)-Reagens hergestellt wurden, blieben nach 96 h Inkubation in Rattenserum und humanem Serum weitgehend stabil.^[15]

Ein Beispiel einer Cystein-Biokonjugation, die zu einem stabilen Thioetherkonjugat führt, wurde kürzlich von Barbas und Mitarbeitern veröffentlicht.^[8] Aufbauend darauf, dass Methylsulfonylbenzothiazol als selektives Thiolblockierungsreagens fungiert,^[16] wurden mehrere Methylsulfon-Derivate synthetisiert und auf ihre Reaktivität gegenüber einer Cystein-geschützten Aminosäure untersucht. Es wurde gefunden, dass von diesen das Phenylloxadiazolsulfon **1** (Abbildung 2) sehr schnell (< 5 min) in quantitativer Ausbeute zum gewünschten Thioetherkonjugat reagiert.^[8] Wichtig ist, dass **1** nicht mit anderen in Proteinen vorhandenen Nukleophilen reagierte und sich das gebildete Thioetherkonjugat als äußerst stabil unter sauren und basischen Bedingungen sowie in Gegenwart von Glutathion erwies. Es wurde auch gezeigt, dass das Sulfon **1** leicht modifiziert werden kann. Das so erhaltene Sulfon **2** ermöglichte die regioselektive Konjugation von Fluorophoren und Polyethylenglycol(PEG)-Ketten an Cystein-markierten Proteine wie rekombinantem humanem Serumalbumin und dem Maltose-bindenden Protein MBP-C-HA, das einen Cysteinrest aufweist, der MBP mit einem Influenza-Hämagglutinin(HA)-Peptidtag verknüpft (Abbildung 2). Die Konjugation lief bei Raumtemperatur unter wässrigen Bedingungen mit nur 10 Äquivalenten des Sulfon-Reagens mit vollständigem Umsatz ab. In humanem Plasma zeigte das über den Thioether verknüpfte MBP-C-HA-Konjugat **4** eine höhere Stabilität ($t_{1/2} = 117$ h) als ein über Maleimid-Chemie hergestelltes Konjugat ($t_{1/2} = 59,9$ h). Tatsächlich – und im Gegensatz zum Maleimid-Konjugat – wurde bei **4** kein Fluoreszenzaustausch mit Plasmaproteinen beobachtet. Obwohl diese neue Klasse von Sulfonen und auch eine Reihe von kürzlich beschriebenen chemoselektiven Cystein-Biokonjugationen (Abbildung 1) nicht bei Antikörpern angewendet wurden, sind sie vielversprechend als Alternative zur derzeitigen Technologie auf Maleimidbasis zum Aufbau stabilerer, homogener und therapeutisch nützlicher Konjugate.

Seit der Entdeckung von Maleimid, Iodacetamid und auf Michael-Akzeptoren basierenden Reagentien wurden etliche neue Reaktionen zur selektiven Modifizierung von Proteinen an nativen oder künstlich eingeführten Cysteinen entwickelt. Zusammen mit Fortschritten bei der Bestimmung der Wirkstoffverteilung in vivo^[17] und der Untersuchung der Konformation und Dynamik von Konjugaten in Lösung^[18] haben diese neuen Reaktionen und Verfahren das Potenzial, die

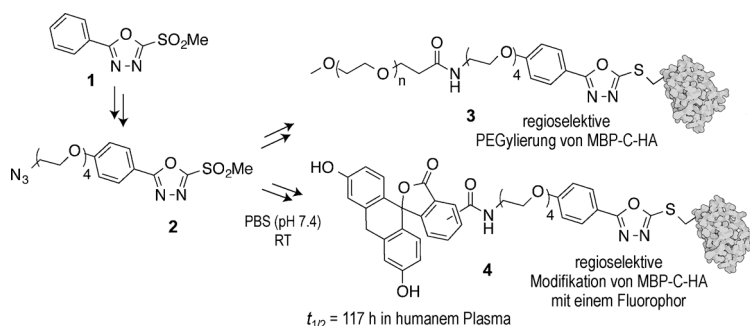


Abbildung 2. Regioselektive Modifizierung von MBP-C-HA mit Phenylloxadiazol-Derivaten, die mit PEG-Ketten und Fluorophoren ausgerüstet sind. PBS = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung.

Entwicklung von neuen chemisch definierten Proteinkonjugaten mit verbesserter Wirksamkeit und verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften voranzutreiben.

Eingegangen am 27. Mai 2014,
veränderte Fassung am 21. Juni 2014
Online veröffentlicht am 28. Juli 2014

- [1] R. V. J. Chari, M. L. Miller, W. C. Widdison, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3872–3904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3796–3827.
- [2] S. Webb, *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 191–193.
- [3] P. D. Senter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 235–244.
- [4] F. Tian, Y. Lu, A. Manibusan, A. Sellers, H. Tran, Y. Sun, T. Phuong, R. Barnett, B. Hehli, F. Song, M. J. DeGuzman, S. En-sari, J. K. Pinkstaff, L. M. Sullivan, S. L. Biroc, H. Cho, P. G. Schultz, J. DiJoseph, M. Dougher, D. Ma, R. Dushin, M. Leal, L. Tchistiakova, E. Feyfant, H.-P. Gerber, P. Sapra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1766–1771.
- [5] a) J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, B. G. Davis, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 730–741; b) J. M. Chalker, G. J. L. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630–640.
- [6] A. M. Spokoyny, Y. Zou, J. J. Ling, H. Yu, Y.-S. Lin, B. L. Pentelute, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5946–5949.
- [7] M. E. B. Smith, F. F. Schumacher, C. P. Ryan, L. M. Tedaldi, D. Papaioannou, G. Waksman, S. Caddick, J. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1960–1965.
- [8] N. Toda, S. Asano, C. F. Barbas, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12824–12828; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12592–12596.
- [9] G. J. L. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052–5053.
- [10] F. Li, A. Allahverdi, R. Yang, G. B. J. Lua, X. Zhang, Y. Cao, N. Korolev, L. Nordenskiöld, C.-F. Liu, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9785–9788; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9611–9614.
- [11] A. Abbas, B. Xing, T.-P. Loh, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7621–7624; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7491–7494.
- [12] S. Panowski, S. Bhakta, H. Raab, P. Polakis, J. R. Junutula, *mAbs* **2014**, *6*, 34–45.
- [13] a) G. J. L. Bernardes, M. Steiner, I. Hartmann, D. Neri, G. Casi, *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2079–2089; b) G. J. L. Bernardes, G. Casi, S. Trüssel, I. Hartmann, K. Schwager, J. Scheuermann, D. Neri, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 965–968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 941–944.
- [14] A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1946–1953.
- [15] G. Badescu, P. Bryant, M. Bird, K. Henseleit, J. Swierkosz, V. Parekh, R. Tommasi, E. Pawlisz, K. Jurlewicz, M. Farys, N. Camper, X. Sheng, M. Fisher, R. Grygorash, A. Kyle, A. Abhilash, M. Frigerio, J. Edwards, A. Godwin, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1124–1136.
- [16] D. Zhang, N. O. Devarie-Baez, Q. Li, J. R. Lancaster, M. Xian, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3396–3399.
- [17] S. M. Hengel, R. Sanderson, J. Valliere-Douglass, N. Nicholas, C. Leiske, S. C. Alley, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 3420–3425.
- [18] L. Y. Pan, O. Salas-Solano, J. F. Valliere-Douglass, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 2657–2664.