

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Häufigkeit von Krebserkrankungen

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes starben im Jahr 2000 in Deutschland insgesamt über 800 000 Personen, davon erlagen mehr als 200 000 einem Krebsleiden (Tab. 1-1). Damit ist Krebs nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache. Die Zahl der an Krebs erkrankten Personen in Deutschland wird auf 4–5 Millionen geschätzt, pro Jahr gibt es circa 350 000 Neuerkrankungen.

**Tab. 1-1:** Todesursachen in Deutschland.<sup>a)</sup>

Todesursache	Sterbefälle	Anteil (%)
Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems	394 900	47.1
Krebs	211 000	25.2
Herzinfarkt	73 300	8.7
Krankheiten des Verdauungssystems	35 000	4.2
Krankheiten der Atmungsorgane	30 900	3.7
andere	93 696	11.1
insgesamt	838 796	100.0

<sup>a)</sup>nach vorläufigen Angaben des Statistischen Bundesamtes für das Jahr 2000

Im medizinischen Sprachgebrauch wird unter dem Krankheitsbild Krebs eine bösartige Geschwulst verstanden. Allgemeiner ist der Begriff Tumor, der – als Folge eines verschiedenartig bedingten Überschuwachstums von körpereigenen Zellen – für eine örtlich abgegrenzte Zunahme von Gewebevolumen steht. Die Einteilung von Tumoren erfolgt auf der Basis histologischer Befunde und ihres biologischen Verhaltens. Man unterscheidet gutartige oder benigne Tumoren, welche sich klar vom Nachbargewebe abgrenzen, oft verkapselt vorliegen und nur langsam wachsen, von bösartigen oder malignen Tumoren. Diese sind durch ein schnelles Zellwachstum, eine unscharfe Abgrenzung gegenüber ihrem Nachbargewebe, hohe Invasivität sowie Metastasenbildung gekennzeichnet.<sup>4</sup>

## 1.2 Therapie von Tumorerkrankungen

Die frühe Diagnose eines Tumors ist in vielen Fällen das entscheidende Kriterium für den Erfolg einer Krebstherapie. Für die Behandlung von malignen Tumoren stehen operative und nichtoperative Verfahren zur Verfügung. Verfolgt man das Ziel einer vollständigen Heilung, so spricht man von kurativer Therapie. Verfahren, die zusätzlich zu anderen therapeutischen Maßnahmen angewendet werden, um die Chancen einer vollständigen und anhaltenden Heilung zu erhöhen, bezeichnet man als adjuvante Therapie, sofern sie nach der Operation zur Behandlung von Tumorresten und Mikrometastasen eingesetzt wird, oder als neoadjuvante, sofern sie vor einer Operation zur Tumorverkleinerung Verwendung findet. Unter dem Begriff palliative Therapie versteht man therapeutische Verfahren, die nicht eine Heilung zum Ziel haben, sondern einer Verminderung der Beschwerden, einer Erhöhung der Lebensqualität oder einer Verlängerung der Überlebenszeit des Patienten dienen.

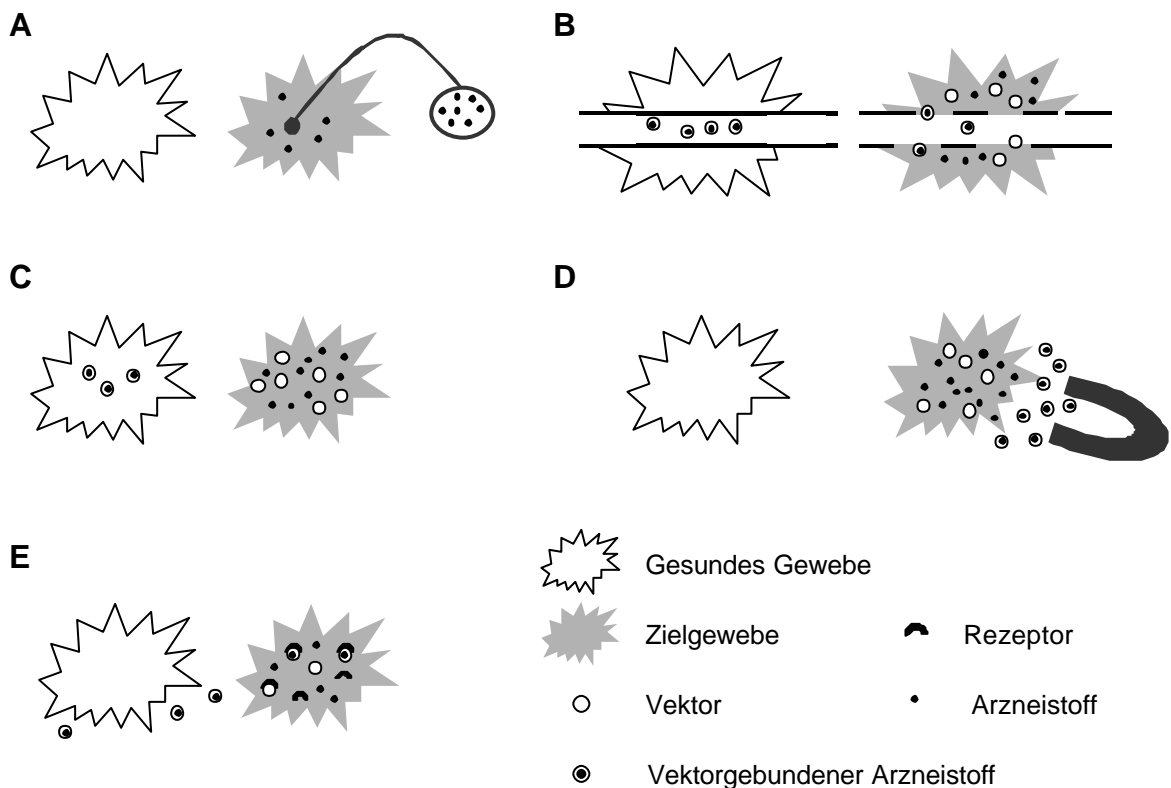
Bei soliden Tumoren haben operative Verfahren als kurative Therapie eine sehr große Bedeutung. Auch in weiter fortgeschrittenen Stadien versucht man in vielen Fällen den Tumorherd zu entfernen, denn es gibt nur wenige Krebsarten, bei denen nichtoperative Verfahren eine vollständige Heilung ermöglichen. Dieser Tatbestand spiegelt sich in den verschiedenen Abstufungen des Therapieerfolgs wider, der an der Remission (Reduktion des Tumors) und an deren Dauer gemessen wird. So versteht man unter einer kompletten Remission, daß alle Tumorbefunde (nur) für mindestens vier Wochen verschwinden. Um ein erneutes Tumorwachstum (Rezidiv) hinauszuzögern, sind für sehr viele Tumorpatienten auch die nichtoperativen Verfahren wie Strahlen-, Chemo- oder Immuntherapie – im Rahmen einer adjuvanten oder palliativen Therapie – von immenser Bedeutung.

Bei den nichtoperativen Verfahren liegt das Hauptaugenmerk auf der Chemotherapie. Chemotherapeutika, im Rahmen einer Tumorthherapie auch Zytostatika genannt, sind Zellgifte, die ihre Wirkung über eine Hemmung der Zellvermehrung entfalten. Von einer solchen Wirkung sind in erster Linie Gewebe mit hoher Zellteilungsrate betroffen, wie z. B. Tumorzellen. Allerdings werden neben diesen auch Zellen von gesunden, stark proliferierenden Geweben geschädigt (Magen-Darm-Epithel, Schleimhäute, Haarfollikel, Knochenmark, Leber). Daraus resultieren die allen Zytostatika gemeinsamen, schweren Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden mit Appetitlosigkeit, Durchfall und Erbrechen, Haarausfall, Hemmung der Hämatopoese sowie eine Immunsuppression und zusätzlich Leberschädigungen. Da sich gesundes Gewebe in der Regel schneller von den Wirkungen erholt als Tumorgewebe, wird oft eine intermittierende Stoßtherapie durchgeführt. Allerdings kommt es trotz einer Zytostatikabehandlung relativ häufig zu einem erneuten Tumorwachstum. Begründet wird dies mit einer Resistenzentwicklung von Tumoren gegenüber den verwendeten Zytostatika. Man unterscheidet hierbei verschiedene Mechanismen der Resistenzentwicklung, beispielsweise kann der Tumor durch spontane Mutationen bereits vor der Behandlung resistente Klone enthalten, deren Anteil unter Elimination der empfindlichen Klone so stark ansteigt, daß Resistenzen auftreten. Andere Tumoren sind – bedingt durch ihre anatomische Lage – für die Zytostatika nur schwer zugänglich und *per se* resistent.

## 1.3 Neue Ansätze in der Tumorthherapie

Aufgrund vielversprechender Fortschritte auf den Gebieten der operativen Verfahren, der Chemo- und Strahlentherapie lassen sich einige Tumorarten inzwischen weitaus besser behandeln als noch vor wenigen Jahren. Trotzdem konnte in den letzten Jahren die Krebsmortalität insgesamt kaum gesenkt werden. Limitierende Faktoren der nichtoperativen Verfahren sind immer noch die unzureichende Selektivität für das Tumorgewebe und die dadurch bedingten, häufig schwerwiegenden Nebenwirkungen. Deshalb versucht man inzwischen vermehrt, Zytostatika so zu verändern oder zu applizieren, daß sie selektiv nur im Tumorgewebe zur Wirkung kommen.

Allgemein bezeichnet man die gezielte Konzentrierung eines Arzneistoffes am Wirkort, wobei andere Organe weitgehend unbeschadet bleiben, als *Drug-Targeting*. Zur Reduktion von Nebenwirkungen ist dieses Prinzip für die Tumorthherapie geradezu ideal, doch auch bei anderen Therapien profitiert man von einer hohen lokalen Wirkstoffkonzentration (z. B. Thrombolyse). Prinzipiell verfolgt man im *Drug-Targeting* verschiedene Strategien (Abb. 1-1), die zum Teil auch kombiniert eingesetzt werden, um selektiv möglichst hohe Arzneistoffkonzentration zu erreichen:<sup>5</sup>



**Abb. 1-1:** Unterschiedliche Konzepte zum *Drug-Targeting* – Schematisch dargestellt sind verschiedene Methoden der selektiven Arzneistoffanreicherung im Zielgewebe: **A** Katheter, **B** EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention), **C** wirkortspezifische Aktivierung, **D** gerichtetes Magnetfeld und **E** rezeptorspezifische Vektormoleküle.

A. Direkte Applikation des Wirkstoffes, z. B. mittels eines Katheters (lokoregionale Applikation): Die lokoregionale Applikation konventioneller Zytostatika ist heute unter Berücksichtigung der allgemeinen Kriterien eines Patienten (Lage des Tumors, Häufigkeit der Applikation, Belastbarkeit seiner Venen) immer dann angezeigt, wenn mit ihr – im Gegensatz zur systemischen Applikation – im Tumorgewebe eine höhere Wirkstoffkonzentration erzielt werden kann und die systemische Toxizität geringer ist. Man verwendet in der Regel Katheter oder Ports, durch die der Tumor – entweder über das ihn versorgende Blutgefäß oder durch Applikation in die Körperhöhle, in der er sich befindet – mit hohen Konzentrationen des Arzneistoffes versorgt wird.<sup>6</sup>

B. Passive Akkumulation des Wirkstoffes im Zielgewebe durch den EPR-Effekt: Im Tumorgewebe kommt es unter bestimmten äußeren Umständen zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität. Daher können größere Partikel als sonst üblich passiv im Interstitialraum akkumulieren (z. B. Liposomen oder Proteine, Partikelgröße von circa 10–500 nm). Belädt man nun Partikel geeigneter Größe mit Arzneistoffen, so akkumuliert das Konstrukt durch den EPR-Effekt (erhöhte Permeabilität und Retention) im Tumorgewebe, wo der Arzneistoff lokal begrenzt freigesetzt wird.<sup>7,8</sup>

C. Akkumulation aufgrund einer wirkortspezifischen Aktivierung: Die physiologischen Gegebenheiten in pathologisch veränderten Geweben sind häufig anders als in gesunden. So gibt es z. B. Unterschiede in der Temperatur, im pH-Wert und in der Enzymausstattung. Diese Eigenschaften macht man sich zunutze, indem man solche Trägersysteme oder *Prodrugs* entwickelt, die den Arzneistoff möglichst ausschließlich unter den im Tumor vorliegenden, veränderten Bedingungen freisetzen (z. B. hitzelabile Liposomen).<sup>9,10</sup>

D. Akkumulation durch externe Einflußfaktoren: Hier sind vor allem solche Transportsysteme zu nennen, bei denen man das Trägersystem mit ferromagnetischen Teilchen versetzt. Nach Applikation kommt es durch Anlegen eines externen, gerichteten Magnetfeldes – abhängig von Feldstärke und Blutfluß – zu einer Arzneistoffanreicherung im Zielorgan.<sup>11</sup>

E. Akkumulation aufgrund von Vektormolekülen: Vektormoleküle zeichnen sich durch eine spezifische Affinität zu bestimmten Geweben aus. Verbindet man solche Moleküle mit einem Arzneistoff, so kommt es zu einem spezifischen Transport des Konjugates zum Zielorgan und somit zu einer Anreicherung des Arzneistoffes. Als Vektormoleküle eignen sich vor allem Antikörper und deren Fragmente, Cytokine, Hormone, Lektine und unterschiedliche Zuckerstrukturen.

## 1.4 Immunologische Therapiekonzepte

Das Prinzip einer immunologischen Therapie von Tumoren ist bereits sehr alt. Schon Paul Ehrlich machte um 1900 Vorschläge bezüglich einer spezifischen Therapie von malignen Tumoren mit Hilfe des Immunsystems.<sup>12</sup> Aber erst mit der molekularen Charakterisierung von Immunglobulinen<sup>13,14</sup> und mit der Entdeckung der Hybridomatechnik zur Herstellung monoklonaler Antikörper im Jahre 1975<sup>15</sup> nahm das Konzept konkrete Formen an. Die Charakterisierung von zahlreichen Zelloberflächenantigenen führte zu weiteren Fortschritten bei der Entwicklung zelltypspezifischer Antikörper.

Außer in der Tumorthherapie spielen monoklonale Antikörper eine wichtige Rolle in der Diagnostik und Behandlung zahlreicher anderer Krankheiten, die mit konventionellen Methoden nur schwer zugänglich sind. Auf der Basis von Antigen-Antikörper-Reaktionen können z. B. durch Strukturmodifikationen Effekte deutlich unterschiedlicher Art induziert und therapeutisch genutzt werden:<sup>16</sup>

1. Durch verschiedene Effekte läßt sich bereits mit vollständigen, unveränderten Antikörpern eine therapeutische Wirkung erzielen. a) Das Zielantigen wird durch den eingesetzten Antikörper abgefangen (z. B. Infliximab, Remicade<sup>®</sup>, blockiert bei Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis den vermehrt gebildeten Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und verhindert damit die Infiltration inflammatorischer Zellen in die entzündeten Bereiche). b) Das Zielantigen wird opsoniert und durch den F<sub>c</sub>-Teil des Antikörpers werden weitere Immunreaktionen vermittelt (z. B. Pavilizumab, Synagis<sup>®</sup>, gerichtet gegen ein Epitop auf der Oberfläche vom *Respiratory-Syncytial-Virus*, prophylaktisch eingesetzt bei besonders gefährdeten Kindern). c) Nach Erkennung des Zielantigens kommt es durch Signaltransduktion zu einer direkten Beeinflussung der Zelle (z. B. Rituximab, Mabthera<sup>®</sup>, die Antikörperbindung an das CD 20-Antigen führt durch Veränderungen in der Zellregulation schließlich zur Apoptose, Anwendung bei therapierefraktären follikulären Lymphomen der Stadien III–IV).

2. Cytotoxische Agenzien können nach Konjugation mit Antikörpern oder Antikörperfragmenten sehr selektiv an entsprechende Zielzellen geleitet werden und einen therapeutischen Effekt hervorrufen, da die Antikörper sich als Vektormoleküle eignen. Abhängig vom cytotoxischen Agens unterscheidet man verschiedene Immunokonjugate, die vor allem in der Tumorthherapie Verwendung finden: a) Radioimmunokonjugate, bei denen der Antikörper in der Regel mit <sup>131</sup>Jod oder <sup>90</sup>Yttrium gekoppelt wird (Tositumomab / <sup>131</sup>Jod-Tositumomab, Bexxar<sup>®</sup>, gerichtet gegen das CD 20-Antigen, Einsatz bei Non-Hodgkin-Lymphomen), b) Zytostatikaimmunokonjugate (siehe Abschnitt 1.5) und c) Immunotoxine (siehe Abschnitt 1.6).

3. Bispezifische Antikörper sollen durch die gleichzeitige Bindung einer Zielzelle und einer immunologischen Effektorzelle die Cytotoxizität vermitteln. Die Herstellung solcher Moleküle mit zwei verschiedenen Antigenbindungsstellen war – vor dem Aufkommen rekombinanter Techniken – extrem aufwendig, was ihre Weiterentwicklung zunächst stark

einschränkte. Inzwischen gibt es einige vielversprechende klinische Studien der Phase I und II zu diesem Konzept. Dabei wurden initial vor allem T-Zellen und Natürliche Killerzellen als Effektorzellen anvisiert. In neueren Studien zielt man auch auf Makrophagen und antigenpräsentierende Zellen ab, wodurch die Tumorantigene theoretisch anderen immunkompetenten Zellen präsentiert werden und eine komplexe Immunreaktion auslösen können.<sup>17</sup>

## 1.5 Zytostatikaimmunokonjugate

Bei dieser Substanzklasse handelt es sich um Immunokonjugate, bei denen niedermolekulare, cytotoxische Wirkstoffe an zelltypspezifische Antikörper oder andere Polymere gekoppelt werden. Im Gegensatz zu Immunotoxinen sind diese Konstrukte meist weniger immunogen, allerdings ist das cytotoxische Potential der verwendeten Arzneistoffe in der Regel auch geringer. In den meisten Untersuchungen finden insbesondere Anthracycline wie beispielsweise Doxorubicin, sowie Chlorambucil und Fluorouracil Verwendung.<sup>18-21</sup>

Vektor- und Arzneistoffmolekül werden in diesen Konjugaten über Verbindungsglieder (im folgenden als Crosslinker oder Linker bezeichnet) in Form von ganz unterschiedlichen funktionellen Gruppen aneinander gekoppelt. Häufig versucht man, durch die Einführung labiler Linker eine besonders hohe Freisetzung des Arzneistoffes an der Zielzelle zu erreichen. Dabei geht man von folgendem Wirkungsmechanismus aus: Nach Antigenbindung und anschließender Internalisierung des Konjugates wird das Zytostatikum vom Vektormolekül abgespalten und kann dann – im Gegensatz zu entsprechenden Toxindomänen – frei ins Zellinnere diffundieren. Als Linkergruppen eignen sich somit entweder säurelabile oder enzymatisch spaltbare Bindungen, die beide zu einer Freisetzung des Arzneistoffes im endosomalen oder lysosomalen Kompartiment führen. Allerdings ist der pH-Wert im Tumorgewebe gegenüber normalen Geweben geringfügig erniedrigt (0.5–1 Einheit), was bei der Verwendung säurelabiler Linker (wie z. B. einem Acylhydrazon) zu beachten ist.<sup>22</sup>

In den USA ist mit Gemtuzumab-Ozogamicin (Mylotarg<sup>®</sup>) bereits ein Wirkstoff dieser Substanzklasse zugelassen. Gemtuzumab ist ein humanisierter Antikörper, der gegen das bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie vermehrt exprimierte CD 33-Antigen gerichtet ist. Bei Ozogamicin handelt es sich um ein antitumoral wirksames Antibiotikum, das bei der Suche nach DNA-schädigenden Substanzen in *Micromonospora echinospora* gefunden wurde. Das Bindungsverhältnis Antikörper zu Arzneistoff beträgt circa 1:2–3, wobei die Bindung über einen Linker erfolgt, der an einem Ende eine durch zwei Methylgruppen sterisch geschützte Disulfid- und am anderen eine Acylhydrazongruppe enthält.<sup>23</sup>

Neben tumorspezifischen Antikörpern und Liganden findet Albumin als Vektormolekül im Rahmen dieses Konzeptes Verwendung. Für die Anreicherung eines solchen Konstruktes werden die gesteigerte metabolische Aktivität, die fehlende Lymphdrainage und der EPR-Effekt im Tumorgewebe verantwortlich gemacht.<sup>24</sup> Ebenso gibt es Ansätze, in solche Konstrukte Proteaseschnittstellen für beispielsweise MMP 2 und 9 (Gelatinase A und B)

einzufragen, durch deren Spaltung eine Arzneistoffakkumulation im Tumor resultiert.<sup>25</sup> Damit wird deutlich, daß die in Abschnitt 1.3, Seite 3 beschriebenen Möglichkeiten des *Drug-Targeting* nie völlig getrennt voneinander betrachtet werden können und daß die in einem Zellverband vorherrschenden Bedingungen vielfach sehr komplex sind, so daß selektive Effekte nur kaum zu erzielen sind. Vielmehr ist die Kombination mehrerer Prinzipien eine Chance für ein noch besseres *Targeting*.

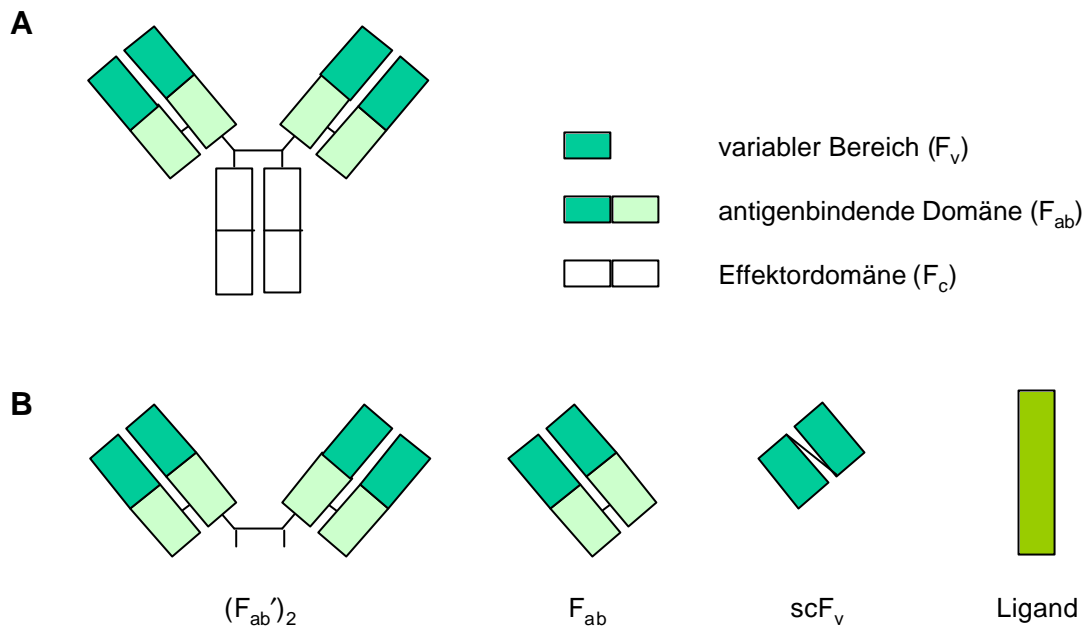
## 1.6 Immunotoxine

Mit Immunotoxinen macht man sich gezielt das hohe cytotoxische Potential von natürlichen Toxinen zunutze. Den Wirkungsmechanismus stellt man sich dabei so vor, daß das Konstrukt nach Antigenbindung zunächst über endocytotische Prozesse internalisiert wird. Aus den Endosomen gelangt nur der Toxinanteil ins Zellinnere und vermittelt die Cytotoxizität. Die Zellbindung, die eine wesentliche Voraussetzung für die Toxinaufnahme darstellt, bleibt bei normal differenzierten Zellen aufgrund der Seltenheit des Antigens weitestgehend aus. Somit kommt es zu einer deutlichen Reduktion der unerwünschten Effekte. Zu den potentiellen Anwendungsgebieten solcher Konstrukte zählen nicht nur die Tumorthherapie – wobei dieser sicherlich die größte Bedeutung zukommt – sondern auch die Behandlung von Infektionen mit dem *Human-Immunodeficiency-Virus* (HI-Virus) und Autoimmunerkrankungen wie z. B. rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus Typ I und Psoriasis.<sup>26,27</sup>

Aufgrund der vielfältigen Entwicklungen in diesem Bereich wurde die Definition für „Immunotoxine“ fortlaufend erweitert. Im klassischen Sinne wurden nur solche Konstrukte als Immunotoxine bezeichnet, die Toxine gekoppelt an zielzellspezifische Antikörper oder entsprechende Antikörperfragmente enthielten.<sup>28</sup> Neben Antikörpern wurden aber zunehmend auch spezifische Wachstumsfaktoren oder Rezeptorliganden als Vektormoleküle eingesetzt, es entstanden chimäre Toxine. Mit der Klonierung von Toxinen und Antikörperfragmenten bzw. Liganden und der Möglichkeit einer rekombinanten Produktion entstand der Begriff Fusionstoxine. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und um die verschiedenen Konstrukte unter einem Begriff zusammenfassen zu können, geht man inzwischen dazu über, alle Toxin-Ligand-Konstrukte – unabhängig von der Art des Vektormoleküls (Abb. 1-2) – als „Immunotoxine“ zu bezeichnen.<sup>29</sup>

### 1.6.1 Ligandenauswahl und Zielzellerkennung

Initial wurden Immunotoxine aus vollständigen, monoklonalen Antikörpern und Pflanzen- oder Bakterientoxinen über chemische Konjugation hergestellt. Solche Konstrukte zeigten zwar *in vitro* ein deutlich höheres cytotoxisches Potential als andere, bekannte Zytostatika, jedoch waren die Ergebnisse der ersten klinischen Studien nicht sehr vielversprechend.<sup>30</sup> Aufgrund ihrer Größe waren die Immunotoxine oftmals nicht in der Lage, tief genug ins Tumorgewebe einzudringen, der chemische Linker war häufig sehr instabil und außerdem wurden starke systemische, zum Teil therapielimitierende Nebenwirkungen beobachtet.<sup>28</sup>



**Abb. 1-2:** Mögliche Vektormoleküle für Immunotoxine – **A** Struktureller Aufbau eines Antikörpers. Für Immunotoxine eignen sich vor allem monoklonale IgG-Antikörper, die chemisch entweder über Disulfid- oder stabilere Thioethergruppen an das Toxin gekoppelt werden. Sie bestehen aus zwei leichten und aus zwei schweren Ketten, die über mehrere Disulfidgruppen zusammengehalten werden. **B** Durch Abspaltung der Effektor-domäne mit der Protease Pepsin erhält man die beiden  $F_{ab}'$ -Fragmente  $(F_{ab}')_2$ . Mit Papain können die  $F_{ab}$ -Fragmente isoliert werden, während die  $F_c$ -Teile als homogene Masse auskristallisieren.  $F_{ab}$ -Fragmente können ebenfalls rekombinant hergestellt werden. Die kleinsten Fragmente erhält man, wenn man mittels DNA-Technologie nur die variablen Bereiche der  $F_{ab}$ -Fragmente darstellt, die sogenannten  $F_v$ -Teile. Diese können entweder über Disulfidgruppen miteinander verbunden werden ( $dsF_v$ , nicht dargestellt) oder rekombinant als ein Molekül ( $scF_v$ ,  $sc = Single Chain$ ) hergestellt werden. Weiterhin eignen sich verschiedene Liganden oder Wachstumsfaktoren als Vektormoleküle, wie z. B. Interleukin 2 (IL 2), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) oder Transferrin (Tf).

Zu den systemischen Begleiterscheinungen der Immunotoxine zählten vor allem solche, die durch die hohe Antigenität der einzelnen Komponenten hervorgerufen wurden. Auch wenn die größere Bedeutung dabei den verwendeten Toxinen zukommt, so haben auch monoklonale, murine Antikörper ein beachtliches immunogenes Potential. Ein alternatives Konzept für die Entwicklung von Immunotoxinen stellte deshalb die Verwendung von humanen, tumorspezifischen Liganden dar. Mit entsprechenden chimären Toxinen war es je nach Ligand ebenfalls möglich, die Molekülgröße zugunsten einer verbesserten Tumorpenetration zu verringern. So sind Transferrin (Tf, 80 kDa), Interleukin 2 (IL 2, 15 kDa) und der epidermale Wachstumsfaktor (EGF, 6 kDa), die häufig als tumorspezifische Liganden verwendet werden, wesentlich kleiner als ein Antikörper mit circa 150 kDa.

Die aufwendige Produktion der anfänglich verwendeten Konstrukte (chemische Kopplung von Toxin und Antikörper bzw. Ligand) wurde durch die Entwicklung neuer, vor allem molekularbiologischer Methoden wesentlich vereinfacht. So gewannen rekombinante Fusionsproteine zunehmend an Bedeutung. Mit der Weiterentwicklung der DNA-Technologie war es ebenfalls möglich, kleinere Antikörperfragmente zu generieren, die zur Zielzell-



erkennung in Immunotoxinen geeignet waren ( $F_{ab}$ - oder  $F_v$ -Fragment). Außerdem wurde – auch im Hinblick auf die anderen Anwendungsmöglichkeiten von Antikörpern (siehe Abschnitt 1.4, Seite 5) – daran gearbeitet, ihre Immunogenität zu senken. Dieses Ziel konnte erreicht werden, indem die konservierten Bereiche des Antikörpers durch humane Strukturen ersetzt wurden. Je nach Ausmaß der Veränderungen bezeichnet man solche Antikörper als chimär oder als humanisiert, wenn weniger als 10 % murine Sequenzen enthalten sind.<sup>16,31</sup>

Für einen erfolgversprechenden Einsatz von Immunotoxinen in der Tumorthherapie ist die Spezifität der zielzellerkennenden Antikörper, Antikörperfragmente oder Liganden für die betreffenden Zellen das entscheidende Kriterium für das Ausmaß der Schädigung von Nicht-tumorzellen. Weitere Anforderungen werden an die zellulären Zielstrukturen gestellt, an die die Vektormoleküle binden. Für ein effektives *Targeting* muß das Antigen in ausreichender Dichte (möglichst) ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert werden und es sollte nicht oder nur in geringem Maße von der Zelloberfläche abgegeben werden (*Shedding*), da sonst lösliche Tumorantigene das Immunotoxin abfangen können, bevor es an die Zelle binden kann. Eine weitere, wichtige Voraussetzung für das Antigen ist die Fähigkeit der Tumorzelle zur Internalisierung des Antigen-Immunotoxin-Komplexes.<sup>32</sup>

Durch intensive Forschungsarbeit auf dem Gebiet zelltypspezifischer Oberflächenstrukturen sind inzwischen circa 400 Tumorantigene bekannt.<sup>16</sup> Auch wenn von diesen nur die wenigsten allen Kriterien entsprechen, so gab es doch mit einigen von ihnen beachtliche Erfolge. In neueren Studien finden insbesondere solche Immunotoxine Verwendung, die gegen den IL 2- oder den EGF-Rezeptor gerichtet sind, außerdem werden die Antigene CD 5, 7, 19, 22 und 25 aufgrund ihrer tumorspezifischen Verteilung häufig zum *Targeting* genutzt.<sup>30,33</sup>

Ein weiteres Antigen, das vielfach zum *Targeting* von Immunotoxinen genutzt wird, ist der Transferrinrezeptor. Aufgrund ihrer hohen metabolischen Aktivität haben Tumorzellen einen vermehrten Bedarf an Eisenionen, den sie über eine verstärkte Expression von Transferrinrezeptoren kompensieren.<sup>34</sup> Zur zellulären Eisenaufnahme bindet eisenbeladenes Transferrin an seinen Rezeptor, wird mit diesem zusammen internalisiert und setzt in den Endosomen Eisenionen frei, welche anschließend ins Cytosol gelangen. Die zellulären Transportprozesse vom Transferrinrezeptor sind bereits sehr genau charakterisiert,<sup>35</sup> was seine Anwendung als Modellantigen zur Entwicklung von Immunotoxinen besonders attraktiv macht.

## 1.6.2 Proteintoxine und ihre Wirkungsmechanismen

Die aktive Komponente in Immunotoxinen läßt sich eindeutig von der in Zytostatikaimmunkonjugaten differenzieren. Während letztere niedermolekulare, cytotoxisch aktive Agenzien (z. B. Doxorubicin) enthalten, die durch passive Diffusion in die Zielzelle gelangen, so sind bei Immunotoxinen Substanzen mit peptidischem Ursprung gemeint. Diese bieten – je nach Wirkungsmechanismus und Größe – den Vorteil, nur über gerichtete Transportprozesse in die Zielzelle aufgenommen zu werden.

Man unterscheidet zwischen Peptid- und Proteintoxinen. Für eine Anwendung in Immuntoxinen sind erstere nur selten geeignet, da sie häufig sehr klein sind. Nach ihrer Freisetzung vom Trägermolekül diffundieren sie zwar passiv ins Cytosol der Tumorzelle aber auch ins umliegende Gewebe, was zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann. Ferner enthalten sie oftmals seltene Aminosäuren und sind zum Teil cyclisiert, was eine rekombinante Expression und eine Kopplung an das Vektormolekül erschwert. Als Beispiel sind cyclische Octapeptide, die Amatoxine, aus dem Knollenblätterpilz zu nennen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Amanitin aus *Amanita phalloides*), deren Wirkungsmechanismus auf einer Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase und damit der Nukleinsäuresynthese beruht. Außer pflanzlichen Peptidtoxinen existieren weitere tierischen Ursprungs, z. B. bei Schlangen und Spinnen. Allerdings sind auch diese für eine Anwendung in Immuntoxinen ungeeignet, da ihre Wirkungsmechanismen – z. B. eine Interaktion mit nikotinergen Acetylcholinrezeptoren an der motorischen Endplatte – so sehr zelltypspezifisch sind (Neurotoxizität), daß nur ein kleines Spektrum an Tumorzellen erfaßt werden könnte. Wichtiger ist jedoch, daß ein solcher Wirkungsmechanismus nicht zum Zelltod führt.

Auch unter den Proteintoxinen sind nicht alle für eine Anwendung in Immuntoxinen geeignet. Anhand unterschiedlicher zellulärer Angriffspunkte kann man die Proteintoxine in verschiedene Gruppen einteilen, von denen insbesondere solche unvorteilhaft sind, deren Wirkungsmechanismus zu zelltypspezifisch ist (siehe oben) oder keine ausschließliche Aufnahme in die Zielzelle beinhaltet (unerwünschte Effekte auf benachbarte Gewebe). Letzteres ist beispielsweise bei Proteintoxinen mit folgenden Wirkungsmechanismen der Fall: a) Einfluß auf Membranen und Membrantransportvorgänge (Membranpermeabilisierung durch Streptolysin aus *Streptococcus pyogenes* oder Blockade von Exocytosevorgängen in Neuronen durch Tetanustoxin aus *Clostridium tetani*),<sup>36,37</sup> b) Wirkung auf unterschiedliche Ionenkanäle (Kaliumkanalblockade in Neuronen durch Dendrotoxin aus *Dendroaspis species*),<sup>38</sup> c) Eingriff in Signaltransduktionsvorgänge (Störung der durch G-Proteine vermittelten Signaltransduktion durch Cholera toxin aus *Vibrio cholerae* oder Pertussistoxin aus *Bordetella pertussis*)<sup>39,40</sup> und d) Einfluß auf die Immunantwort (Überexpression von proinflammatorischen Cytokinen in Makrophagen mit schockartigen Symptomen bei Anthrax toxin aus *Bacillus anthracis*).<sup>41</sup>

Für Immuntoxine besser geeignet sind dagegen die Proteintoxine, die intrazellulär und unabhängig vom Zelltyp wirken. Diese Anforderungen werden bei einer Interaktion mit dem Cytoskelett und / oder Inhibition der Proteinbiosynthese erfüllt. Das cytotoxische Potential von Vertretern dieser beiden Toxintypen läßt sich häufig anhand ihres strukturellen Aufbaus abschätzen.

1. A-B-Struktur, das heißt das Toxin verfügt über eine enzymatisch aktive Domäne (A für aktiv) und über eine Zellbindungsdomäne (B für bindend). Da diese Toxine in der Regel über einen zellulären Aufnahmemechanismus verfügen,<sup>42</sup> sind sie sowohl in zellfreien Aktivitätsassays als auch gegenüber Zellen sehr potent.

2. *Single-chain*-Struktur, das heißt dem Toxin fehlt die Zellbindungsdomäne, was sich – bei uneingeschränkter Enzymaktivität in zellfreien Assays – in einer geringeren Cytotoxizität zeigt. Diesen Toxinen wird eine antivirale Wirkung im Herkunftsorganismus zugeschrieben.<sup>43</sup>

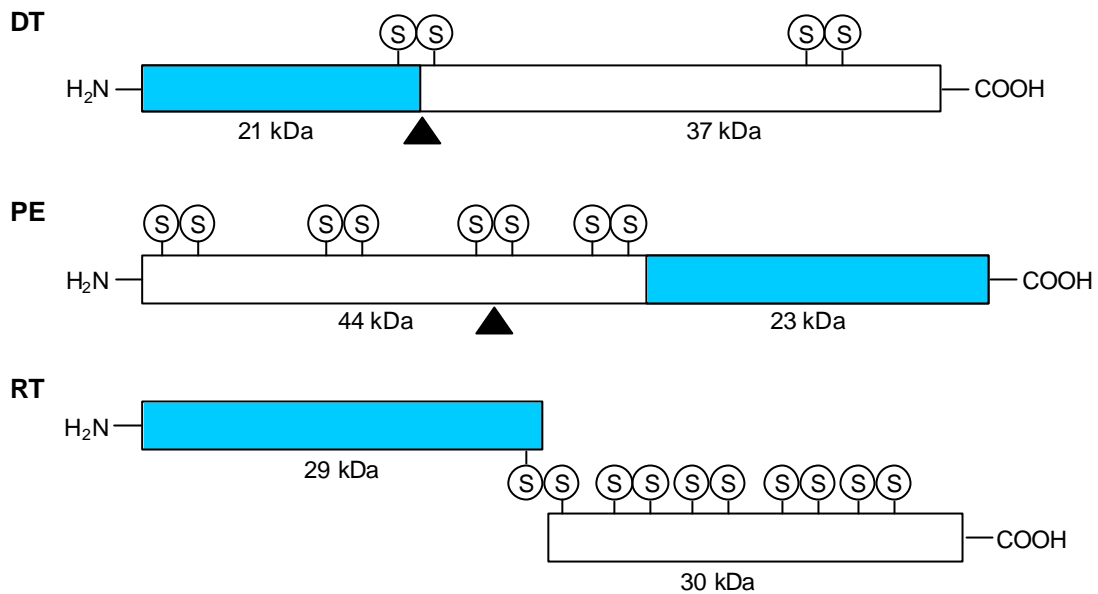
Die meisten Proteintoxine mit Einfluß auf das Cytoskelett stammen aus *Clostridium*-Arten. Entweder direkt durch Glykosylierung oder ADP-Ribosylierung (C2-Toxin aus *C. botulinum*) oder indirekt über eine Inaktivierung von GTP-Bindungsproteinen, wie z. B. Rho oder Ras (C3-Toxin aus *C. botulinum* oder CNF 1 und 2 aus *Escherichia coli*) kommt es zu einer Interaktion mit den Aktinfilamenten (Veränderungen im Polymerisationsverhalten).<sup>44</sup> Trotz ihrer prinzipiellen Eignung für Immunotoxine finden sie für diese Anwendung kaum Verwendung.

Wesentlich häufiger werden dagegen Toxine mit Einfluß auf die Proteinbiosynthese verwendet. Sie wirken unabhängig vom Zelltyp und sind durch ihren enzymatischen Wirkungsmechanismus häufig so potent, daß wenige Moleküle ausreichen, um eine Zelle abzutöten.<sup>45,46</sup> Außerdem sind ihre katalytisch aktiven Domänen sehr robust gegenüber proteolytischer Degradation.<sup>47</sup> Je nach Wirkungsmechanismus unterscheidet man drei Gruppen:

1. Endonukleasen, die die Phosphodiesterbindung 3'-seitig von Guanosin-4325 der eukaryontischen 28S-rRNA schneiden, z. B.  $\alpha$ -Sarcin aus *Aspergillus giganteus*.<sup>48</sup>
2. ADP-ribosylierende Enzyme, die den eukaryontischen Elongationsfaktor EF II am Diphthamid-715 (modifiziertes Histidin)<sup>49,50</sup> verändern, z. B. Diphtheriatoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* oder *Pseudomonas* Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>51,52</sup>
3. N-Glykosidasen, die das Adenin-4324 der 28S-rRNA abspalten (ribosomeninaktivierende Proteine, RIPs), z. B. Ricin aus *Ricinus communis* oder Saporin aus *Saponaria officinalis*.<sup>48</sup>

Die Toxine der Gruppe 1 stammen dabei in der Regel aus Pilzen, die der Gruppe 2 aus Bakterien und bei den RIPs (Gruppe 3) handelt es sich meist um Toxine mit pflanzlichem Ursprung.

Die extrem hohe Cytotoxizität von Ricin, Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin (Abb. 1-3) ist schon sehr lange bekannt.<sup>53,54</sup> Allerdings wirken die Toxine aufgrund ihrer Zellerkennungsdomänen, die in der Regel gegen hoch konservierte Oberflächenstrukturen gerichtet sind, sehr unspezifisch (z. B. bei DT: Komplex aus CD9 und dem Vorläufer eines Wachstumsfaktors ähnlich dem heparinbindenden EGF).<sup>55</sup> Somit waren sie zunächst nur bedingt therapeutisch einsetzbar.<sup>56,57</sup> Erst mit der Charakterisierung zelltypspezifischer Antigene wurde es möglich, ihr Potential unter Austausch der Zellbindungsdomänen gezielt zu nutzen. Unter diesem Gesichtspunkt ist es nicht sehr verwunderlich, daß der strukturelle Aufbau von Immunotoxinen allgemein dem der natürlichen Vorbilder – Proteintoxine mit A-B-Struktur – entspricht.



**Abb. 1-3:** Schematische Darstellung der Proteintoxine Diphtheriatoxin (DT), *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und Ricin (RT) – Alle drei Toxine sind durch eine A-B-Struktur gekennzeichnet, wobei die grauen Abschnitte die katalytisch aktiven Domänen zeigen (A-Kette). Die restlichen Abschnitte vermitteln die Zielzellerkennung und Rezeptorbindung. Die Toxine sind in der Weise dargestellt, wie sie aus ihren Herkunftsorganismen isoliert werden können. RT liegt bereits getrennt in A- und B-Kette vor, bei DT und PE zeigt das Dreieck die Position der physiologischen Spaltstelle (siehe auch Abb. 1-6, Seite 18). Nach der Spaltung werden die beiden Polypeptidketten jeweils über die der Spaltstelle benachbarte Disulfidbrücke zusammengehalten (ebenfalls dargestellt sind weitere in den Molekülen vorhandene Disulfidbrücken).

Außer Proteintoxinen sind als cytotoxische Komponente in Immunotoxinen auch andere Proteine geeignet, die mit ihrer enzymatischen Aktivität Einfluß auf essentielle Zellfunktionen nehmen. So sind in den vergangenen Jahren – vor allem wegen der hohen Antigenität der verwendeten pflanzlichen oder bakteriellen Toxine – vermehrt Konzepte entwickelt worden, die sich das cytotoxische Potential von eukaryonten Ribonukleasen zunutze machen.<sup>58,59</sup>

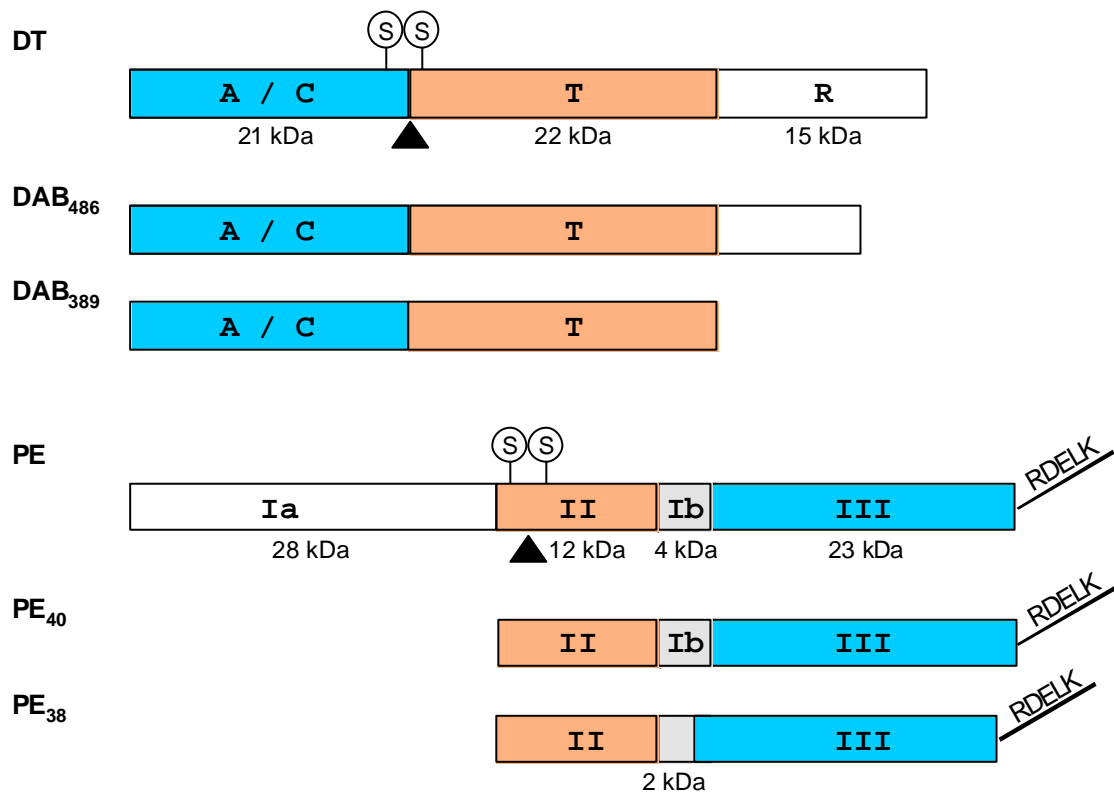
### 1.6.3 Zelluläre Aufnahmemechanismen von Proteintoxinen

Zur Auslösung eines cytotoxischen Effektes werden bei Mechanismen, die über zell-spezifische Oberflächenrezeptoren vermittelt werden, wesentlich potentere Agenzien als in der konventionellen Chemotherapie benötigt. Mit dem Antimetaboliten 5-Fluorouracil erreicht man beispielsweise eine maximale Plasmakonzentration von circa 500  $\mu\text{M}$  (bei schneller intravenöser Applikation), so daß eine Tumorzelle mit einem Volumen von  $5 \times 10^{-10}$  ml circa  $10^8$  Arzneistoffmolekülen ausgesetzt wird. Da bei Immunotoxinen das toxische Agens nicht passiv in die Zelle diffundieren kann, ist die extrazelluläre Konzentration des Wirkstoffes nicht entscheidend für die Wirkung. Vielmehr werden die Anzahl der an der Oberfläche vorhandenen, internalisierungsfähigen Zielrezeptoren (die sehr unterschiedlich sein kann, circa  $10^2$ – $10^8$ ), die cytotoxische Aktivität und die Effektivität der zellulären Aufnahme zu ausschlaggebenden Faktoren.<sup>29</sup> Schon sehr lange wird deshalb vor allem

für die Proteintoxine Ricin (RT), Diphtheriatoxin (DT) und *Pseudomonas* Exotoxin (PE) über deren Translokationsmechanismen diskutiert.<sup>42</sup>

Anfänglich wurde für Immunotoxine überwiegend die katalytische Domäne von Ricin verwendet (Ricin A, RTA),<sup>28</sup> die bereits während der Biosynthese von der B-Kette abgespalten wird.<sup>60</sup> Denn nach Isolierung aus *Ricinus*-Samen konnte RTA relativ einfach über den freien Cysteinrest an die entsprechenden Antikörper gekoppelt werden. DT und PE werden dagegen erst im Laufe des Intoxikationsprozesses gespalten.<sup>61</sup> Bei DT kann man zwar *in vitro* durch Trypsinverdau auch sehr exakt die aktive Domäne (A-Kette, DTA) unter Erhalt eines freien Cysteinrestes von der B-Kette trennen,<sup>62,63</sup> bei PE jedoch ist eine exakte Abtrennung der enzymatisch aktiven Domäne durch proteinchemische Methoden nicht möglich.

Erst nach erfolgreicher Klonierung konnten auch andere Teilstücke insbesondere von den Toxinen DT und PE hergestellt und untersucht werden (Abb. 1-4).<sup>64-66</sup> Somit konnte gezeigt werden, daß die Toxine neben den bereits bekannten Domänen noch über mindestens eine



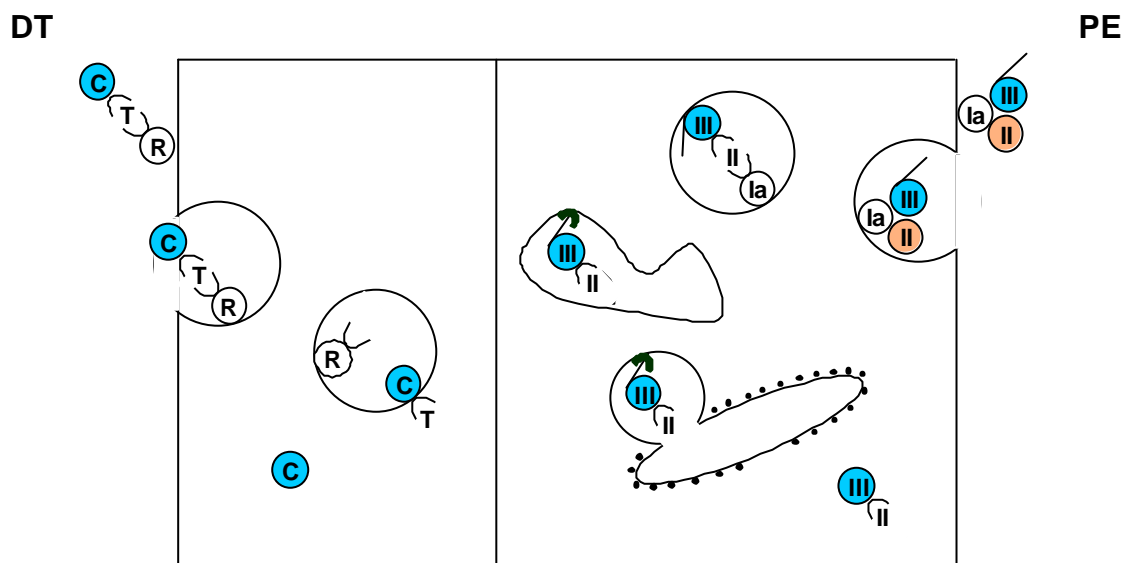
**Abb. 1-4:** Schematische Darstellung von Diphtheriatoxin (DT) und *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und ihrer in Immunotoxinen häufig verwendeten Teilfragmente – Neben der katalytisch aktiven A-Kette (in neuerer Literatur auch als C-Domäne bezeichnet)<sup>67</sup> enthält DT in der B-Kette sowohl die Translokationsdomäne (T-Domäne) als auch die zellbindende Domäne (R-Domäne).<sup>68,69</sup> Den DT-Fragmenten DAB<sub>486</sub> (54 kDa) und DAB<sub>389</sub> (43 kDa) fehlen jeweils unterschiedliche Anteile der rezeptorbindenden R-Domäne. PE verfügt insgesamt über vier Domänen. Domäne Ia vermittelt die Rezeptorbindung, Domäne II die Aufnahme ins Cytosol und Domäne III ist die enzymatisch aktive. Die Bedeutung von Domäne Ib ist bislang ungeklärt.<sup>70,71</sup> In PE<sub>40</sub> (39 kDa) wie auch in PE<sub>38</sub> (37 kDa) fehlt die rezeptorbindende Domäne Ia völlig. Bei PE<sub>38</sub> wurde außerdem ein Teil der Domäne Ib (AS 365–380) entfernt.

weitere verfügen, die nach Internalisierung der gebundenen Toxine entweder direkt die Translokation vermittelt oder Erkennungssequenzen für zelluläre Aufnahmemechanismen enthält.

Da diese Domänen in DT und PE sehr präzise lokalisiert werden konnten, gewannen beide Toxine für die Entwicklung von Immunotoxinen zunehmend an Bedeutung. Mit der Verwendung solcher Toxinteilstücke, die außer der katalytischen ebenfalls die Translokationsdomäne enthielten, erhoffte man sich durch Imitation der natürlichen Mechanismen Verbesserungen in Bezug auf die Effektivität der Toxinaufnahme in die Zelle (Abb. 1-4 und Abb. 1-5). Zur Verminderung einer unspezifischen Toxizität wurde die Struktur der verwendeten Toxine somit nur um die natürliche zellerkennende Domäne reduziert.

### 1.6.4 Aktuelle Entwicklungen im Bereich der Immunotoxine

Nachdem die erste Generation von Immunotoxinen noch aus vollständigen Antikörpern und Toxinen bestand, ging man bei der zweiten Generation dazu über, nur die enzymatisch aktiven Toxindomänen zu verwenden und zur Zielzellerkennung kleinere Antikörperfragmente chemisch daran zu koppeln. Die dritte Generation von Immunotoxinen profitierte



**Abb. 1-5:** Zelluläre Aufnahme der katalytischen Domänen von Diphtheriatoxin (DT) und *Pseudomonas* Exotoxin (PE), modifiziert nach Kreitman *et al.*<sup>29,33</sup> – DT bindet über die R-Domäne an seinen zellulären Rezeptor (Komplex aus CD 9 und dem Vorläufer eines Wachstumsfaktors ähnlich dem heparinbindenden EGF) und wird mit diesem internalisiert. Durch den geringeren pH-Wert im Endosom kommt es zu einer Konformationsänderung und die katalytisch aktive C-Domäne wird mit Hilfe der Translokationsdomäne (T, Bildung eines Kanals in der endosomalen Membran) ins Cytoplasma geschleust. PE bindet über die Domäne Ia zunächst an seinen zellulären Rezeptor ( $\alpha$ 2-Makroglobulinrezeptor) und das terminale Lysin-613 wird abgespalten. Nach Internalisierung vermittelt der C-Terminus von Domäne III (RDEL: Arg-Asp-Glu-Leu, dargestellt durch den Schrägstrich) den Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum (Bindung an den KDEL-Rezeptor), von wo aus die Translokation ins Cytoplasma mit Hilfe der Domäne II stattfindet. Domäne Ib wurde bei der Darstellung nicht berücksichtigt, da ihre Funktion bislang unklar ist.

maßgeblich von den Möglichkeiten, die sich durch neue DNA-Technologien eröffneten.<sup>28</sup> Nach der Klonierung der Toxine, Liganden und Antikörperfragmente werden heute die meisten Immunotoxine rekombinant hergestellt. Durch die intensive Forschung auf diesem Gebiet gibt es inzwischen eine Reihe verschiedener Substanzen, die sich in fortgeschrittenen Phasen der klinischen Testung befinden (Tab. 1-2).

Der bislang größte Erfolg auf dem Gebiet der Immunotoxine konnte vor einiger Zeit mit der Substanz DAB<sub>389</sub>IL 2 verzeichnet werden. Sie bekam im Jahre 1999 – aufgrund der sehr hohen Remissionsraten beim therapierefraktären kutanen T-Zell-Lymphom in einer klinischen Studie der Phase III (Remissionen in 22 von 71 Fällen, circa 30 %)<sup>73</sup> – als erster Vertreter dieser neuen Substanzklasse die Zulassung in den USA. Damit steht DAB<sub>389</sub>IL 2 (Wirkstoffname: Denileukin Diftitox, Handelsname: Ontak<sup>®</sup>) nun offiziell als neues Therapiekonzept und erstes Immunotoxin überhaupt zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (mit mehr als 20 % CD 25-positiven Lymphocyten) zur Verfügung.

**Tab. 1-2:** Klinische Studien der Phasen I–III mit ausgewählten Immunotoxinen.<sup>a)</sup>

Bezeichnung	Toxin <sup>b)</sup>	Ligand <sup>c)</sup>	Antigen	Linker <sup>d)</sup>	Indikation
DAB <sub>389</sub> IL 2	DT	IL 2	IL 2-R	GF	kutanes T-Zell-Lymphom
HN66000	DT	Tf	TfR	CG	Gliome
LMB-2	PE	Anti-Tac scF <sub>v</sub>	CD 25	GF	Haarzelleukämie
Anti-B4–bR	RT	Anti-B4 Mab	CD 19	CG	Non-Hodgkin-Lymphome
H65-RTA	RT	H65 Mab	CD 5	CG	kutanes T-Zell-Lymphom
BL 22	PE	RFB4 dsF <sub>v</sub>	CD 22	GF	Haarzelleukämie

<sup>a)</sup> modifiziert nach Frankel *et al.*<sup>72</sup>

<sup>b)</sup> Ricin (RT), *Pseudomonas* Exotoxin (PE) und Diphtheriatoxin (DT)

<sup>c)</sup> monoklonale Antikörper (Mab), deren Fragmente (scF<sub>v</sub>, dsF<sub>v</sub>) und Liganden (IL 2, Tf)

<sup>d)</sup> genetisch fusioniert (GF) und chemisch gekoppelt (CG)

## 1.6.5 Therapielimitierende Eigenschaften von Immunotoxinen

Trotz der ersten, möglicherweise bahnbrechenden Erfolge in der Therapie mit Immunotoxinen gilt es noch immer, eine Reihe von kritischen Faktoren zu überwinden, die eine ausgedehntere Anwendung dieser Substanzen bislang einschränken:

1. Unspezifische Toxizität: Die Antigenspezifität der Antikörper oder die Tumorzellspezifität des Antigens ist nicht ausreichend genug, so daß das Immunotoxin auch an normal differenzierte Zellen bindet.
2. Systemische Effekte: Durch das immunogene Potential vor allem der Toxindomänen kommt es zu verschiedenen Reaktionen des Immunsystems, die zum Teil therapielimitierend sind.
3. Pharmakokinetische Effekte: Zum Teil haben Immunotoxine – abhängig von ihrer Zusammensetzung – so kurze Halbwertszeiten, daß ihre Plasmakonzentrationen für einen antitumoralen Effekt nicht ausreichen.

4. Tumorpenetration: Bereits bei sehr kleinen, soliden Tumoren stellt die Penetrationsfähigkeit des Immunotoxins (abhängig von der Größe) einen wichtigen Limitationsfaktor für den Therapieerfolg dar.

Durch Variation und /oder Verkleinerung sowohl der zielzellerkennenden als auch der toxischen Komponenten konnten in zahlreichen Untersuchungen bereits beachtliche Verbesserungen beobachtet werden.<sup>72,74</sup> Trotzdem stehen bisher aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit hauptsächlich hämatologische Tumoren im Mittelpunkt der Indikationsgebiete von systemisch applizierten Immunotoxinen.

Solide Tumoren, die mit circa 85 % den Hauptteil aller Krebsleiden darstellen,<sup>75</sup> weisen dagegen einige Eigenschaften auf, die die Anwendung von Immunotoxinen erheblich erschweren: aufgrund ihrer physiologischen Gegebenheiten – sie verfügen über eine heterogene Durchblutung, sehr enge Zellkontakte und einen hohen interstitiellen Druck<sup>76</sup> – sind sie insbesondere für polymere Wirkstoffmoleküle nur schwer erreichbar. Selbst nach lokoregionaler Applikation (siehe Abschnitt 1.3, Seite 3) ist die Verteilung von Arzneistoffen in solchen Geweben wenig effizient (5–10fach langsamer als bei einschichtigen Zellkulturen),<sup>77</sup> so daß bereits bei einer Tumorgöße von circa 10 mm die Penetrationsfähigkeit von Immunotoxinen zum limitierenden Faktor für die antitumorale Wirkung wird.<sup>78</sup>

Trotzdem haben Immunotoxine gerade bei soliden Tumoren ein besonders gutes therapeutisches Potential. Vor allem die bei steigender Tumormasse schlechter werdende Blutversorgung (schlechte Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr) führt dazu, daß bis zu 90 % der Zellen in die Ruhephase übergehen oder sogar absterben. Zellen in der Ruhephase sind gegenüber den meisten konventionellen Chemotherapeutika relativ unempfindlich oder sie entwickeln häufig Resistenzen. Einige Immunotoxine greifen jedoch durch Apoptoseinduktion auch Zellen in der Ruhephase an<sup>79</sup> und wirken sogar gegenüber multiresistenten Zellen cytotoxisch.<sup>80-83</sup> Diese Eigenschaften werden in klinischen Studien durch die hohen Ansprechraten bei Patienten mit therapierefraktären Tumorarten (auf die der Einsatz von Immunotoxinen zur Zeit weitestgehend beschränkt ist) eindrucksvoll bestätigt.

## 1.7 Crosslinker für Immunokonjugate

In Immunokonjugaten ist die Verbindung zwischen Vektormolekül und Arzneistoff von besonderer Bedeutung. Im Organismus muß sie einerseits über eine ausreichende Stabilität im Blutkreislauf verfügen und andererseits eine spezifische, effiziente Freisetzung des Wirkstoffes an der Zielzelle gewährleisten. Bevor Immunotoxine überwiegend rekombinant hergestellt wurden, spielten vor allem Cysteinreste für die Kopplung von Antikörpern und Toxinen eine wichtige Rolle. Auch bei Zytostatikaimmunokonjugaten sind cysteinbasierte Kopplungen bekannt, doch überwiegen inzwischen solche Verbindungen, die unter den in Endosomen und Lysosomen vorherrschenden Bedingungen gespalten werden.



### 1.7.1 Endosomal / lysosomal spaltbare Sequenzen

Bei Proteintoxinen mit A-B-Struktur wie auch bei Immunotoxinen setzt eine zelluläre Aufnahme zunächst die Internalisierung und anschließend die Aktivierung des Translokationsmechanismus voraus. Im Falle von Diphtheriatoxin und *Pseudomonas* Exotoxin (und ihren in Immunotoxinen verwendeten Fragmenten, siehe Abb. 1-4, Seite 13) werden dazu in den Endosomen die beiden Domänen voneinander getrennt. Für die Spaltung innerhalb eines proteasesensitiven Bereiches werden Furin oder furinähnliche Enzyme verantwortlich gemacht, wobei in beiden Fällen die exakte zelluläre Lokalisation der Reaktion aufgrund der geringen Expressionsraten der verantwortlichen Enzyme nur sehr schwer zu klären ist.<sup>61</sup> Bei Zytostatikaimmunokonjugaten erfolgt ebenfalls zunächst eine Internalisierung, der nach Freisetzung des Arzneistoffes dessen passive Diffusion ins Cytosol folgt. Im Gegensatz zu peptidischen Agenzien werden niedermolekulare Zytostatika jedoch typischerweise nicht in den Lysosomen abgebaut, so daß ihre Abspaltung vom Vektormolekül auch dort, also in den Lysosomen, erfolgen kann.

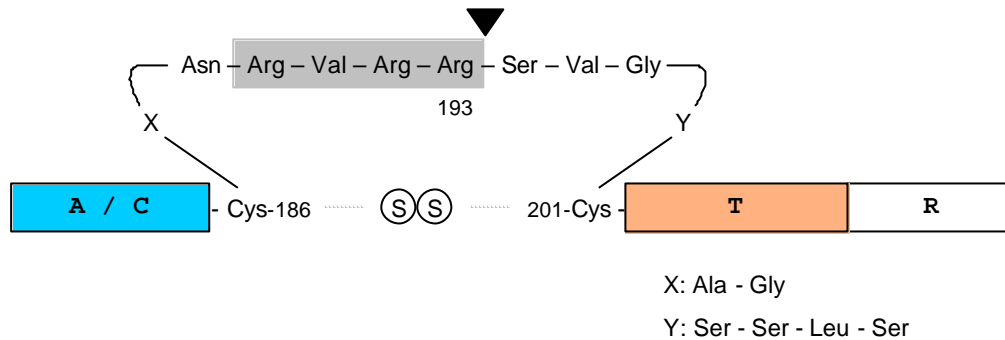
Grundsätzlich sind für die erforderlichen, spaltbaren Einheiten chemische Crosslinker oder bei einer rekombinanten Synthese selektiv spaltbare Peptide einsetzbar. Die Auswahl an chemischen Bindungen, die unter den in den Endosomen vorherrschenden Bedingungen ein geeignetes Spaltungsverhalten zeigen (geringfügig erniedrigter pH, circa 5.5–6.5), ist sehr begrenzt. In den Lysosomen, in denen der pH-Wert noch etwas niedriger ist, sind funktionelle Gruppen wie beispielsweise Acetale / Ketale und Acylhydrazone labil. Die Spaltungsneigung solcher Gruppen ist dabei in Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur und ihrer Liganden sehr verschieden.<sup>19,84,85</sup>

Für die Zusammensetzung eines endosomal spaltbaren Peptids liegt es nahe, sich der proteasespaltbaren Bereiche von PE und DT zu bedienen (Abb. 1-6). Beide Sequenzen wurden bereits unabhängig von ihren restlichen Toxinanteilen in Immunokonjugaten eingesetzt.<sup>86,87</sup> Weiterhin ist die Verwendung von Erkennungssequenzen (Konsensusmotiven) der beiden Proteasen Cathepsin H und S denkbar, deren Lokalisation in den frühen bzw. späten Endosomen beschrieben wird.<sup>88</sup> Als lysosomal spaltbares Peptid wird in verschiedenen Immunokonjugaten die Sequenz Gly-Phe-Leu-Gly angegeben, deren Spaltung möglicherweise durch Cathepsin D bedingt ist, welches zwischen zwei hydrophoben Aminosäuren schneidet.<sup>89,90</sup> Dieser Linker wurde in einem mit Doxorubicin beladenen HPMA-Polymer (*N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid) bereits im Rahmen einer klinischen Studie der Phase I evaluiert.<sup>91</sup>

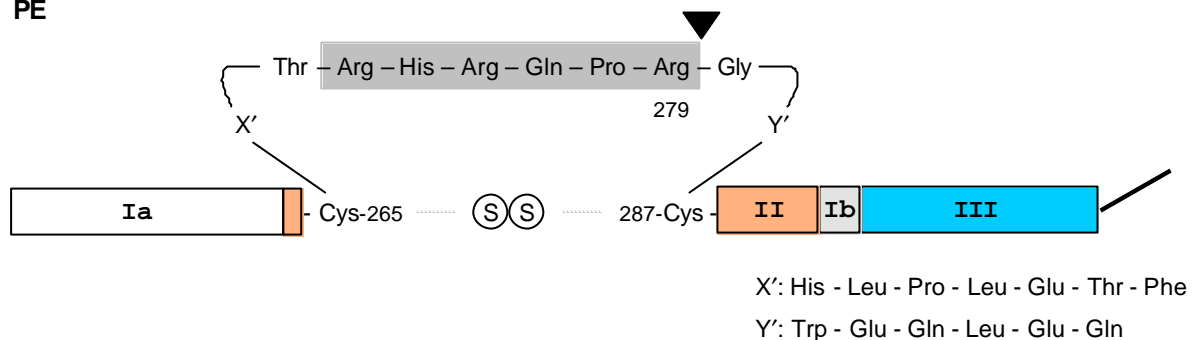
### 1.7.2 Cytosolisch spaltbare Sequenzen

Das cytosolische Kompartiment zeichnet sich vor allem durch seine reduktiven Eigenschaften aus, so daß eine Disulfidgruppe einen geeigneten chemischen Linker darstellt. Schwieriger ist es dagegen einen peptidischen Linker zu finden, denn im Ruhezustand enthält das Cytosol nur wenige, proteolytisch aktive Systeme, die intakte, nicht zur Degradation modifizierte Moleküle abbauen.

## DT



## PE



**Abb. 1-6:** Proteasesensitive Bereiche aus Diphtheriatoxin (DT) und *Pseudomonas* Exotoxin (PE) – Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen zwischen den beiden Cysteinresten, die nach Proteolyse für die Ausbildung der Disulfidbrücken zwischen A- und B-Kette verantwortlich sind. Bei DT handelt es sich um die Aminosäuren 186–201 (Spaltung nach Arg-193), bei PE sind die Aminosäuren 265–287 dargestellt (Spaltung nach Arg-279). Die Position der Spaltung wird durch das Dreieck angedeutet, Konsensusmotive für Furin und furinähnliche Enzyme, die für die Proteolyse verantwortlich gemacht werden, sind grau unterlegt.<sup>92</sup>

Erst bei der Einleitung von apoptotischen Prozessen werden eine Reihe von proteolytisch wirksamen Caspasen (Cysteinproteasen, die nach Asp schneiden) aktiviert, die in der Lage sind, Proteine an sehr spezifischen Erkennungssequenzen zu schneiden. Man unterscheidet zwei Untergruppen (Regulations- und Effektorproteasen), für die als bekannteste Stellvertreter Caspase 1 und 3 stehen. Alle Caspasen werden als inaktive Proformen exprimiert und erst nach entsprechender Induktion (rezeptorvermittelt oder streßinduziert) durch Proteolyse, Bindung von Kofaktoren oder Dissoziation von Inhibitoren aktiviert.<sup>93,94</sup> Da in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, daß Protein- und Immunotoxine neben einer Inhibition der Proteinsynthese auch eine Apoptoseinduktion vermitteln,<sup>95-98</sup> ist es möglich, für solche Immunokonjugate ein cytosolisch spaltbares Peptid zu entwerfen, das entsprechende Motive für die Caspasen 1 und 3 enthält. Obwohl Caspase 1 nicht als Effektorprotease identifiziert werden konnte, so ist ihre Beteiligung an der toxinvermittelten Apoptose nicht auszuschließen. Für Caspase 3 konnte die Beteiligung belegt werden.<sup>79,97</sup> Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Expressionsraten beider Caspasen in zahlreichen Tumoren (Pankreas-tumore, Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome etc.)<sup>99,100</sup> erhöht sind, was ihre Beteiligung an einer Apoptose – vermittelt durch verschiedene antitumorale Wirkstoffe – ebenfalls wahrscheinlich macht.

Des Weiteren ist die Verwendung des Tripeptids Arg-Gly-Pro für solche Zwecke denkbar. Für dieses Motiv konnte im Cytosol von Hefezellen indirekt eine Spaltung nachgewiesen werden. Auch wenn der Mechanismus bislang ungeklärt ist, besteht die Möglichkeit, daß das Motiv auch in humanen – ebenfalls eukaryonten – Zellen spaltbar ist.<sup>101,102</sup>

## 1.8 Toxinunabhängiger Membrantransfer

Polare Biopolymere wie Peptide, Proteine und Oligonukleotide sind als hochspezifische, intrazellulär aktive Agenzien sowohl in der Grundlagenforschung als auch für therapeutische Zwecke besonders interessant. Allerdings sind ihre Einsatzmöglichkeiten sehr limitiert, da sie ohne entsprechende Aufnahmemechanismen nicht in der Lage sind, passiv die Zellmembran zu durchqueren. Deshalb sind für Proteine zur Zeit nur solche Anwendungen denkbar, bei denen der therapeutische Effekt keine zelluläre Aufnahme voraussetzt (z. B. Insulin, Gerinnungsfaktoren, Hormone und Zytokine). Immunotoxine, bei denen eine effektive Zellaufnahme durch die enthaltenen Toxin-domänen gewährleistet wird, bilden hier eine große Ausnahme. Falls es möglich sein sollte, ihre Transferdomänen für andere Proteine oder Oligonukleotide zu nutzen, stellen sie ein vielversprechendes Applikationsprinzip im Bereich des immunologischen *Targeting* dar.

Begrenzt auf die Zellkultur ermöglichen invasive Techniken wie Elektroporation und Mikroinjektion bereits seit geraumer Zeit die intrazelluläre Untersuchung von pharmakologisch aktiven Makromolekülen, wie z. B. Proteinen oder DNA. Für *In-vivo*-Anwendungen mit dem Ziel einer Arzneistoffentwicklung sind andere, mildere Verfahren von größerer Bedeutung. Sie beruhen entweder auf reinen Endocytosemechanismen, was sie unzuverlässig und wenig effizient macht, oder sie machen sich die Transduktionsfähigkeit von Viren zunutze, bei der eine Restpathogenität nie völlig ausgeschlossen werden kann. Eine vielversprechende Alternative im Bereich der nichtinvasiven Verfahren stellen inzwischen sogenannte Trojanische Peptide dar.<sup>103,104</sup> Man versteht darunter kleine Peptide mit bis zu circa 30 Aminosäuren, die gekoppelt an Proteine oder Oligonukleotide deren zelluläre Aufnahme direkt durch die Zellmembran vermitteln (Tab. 1-3).

Zunächst wurde diese Eigenschaft bei einem Peptid entdeckt, das aus dem vom Antennapediagen codierten Transkriptionsfaktor in *Drosophila* stammt (Penetratin).<sup>2</sup> Inzwischen sind bei anderen Transkriptionsfaktoren weitere Peptide mit Transfereigenschaften identifiziert worden (Tat, VP 22).<sup>105,106</sup> Ihnen allen ist gemein, daß sie sowohl bei 4 °C als auch bei 37 °C einen Transfer vermitteln (was einen endosomalen Aufnahmemechanismus ausschließt) und daß der Transfer nicht sättigbar ist (was eine Rezeptorbeteiligung unwahrscheinlich macht). Trotz intensiver Forschungen konnten bislang jedoch weder die strukturellen Voraussetzungen noch die genauen Aufnahmemechanismen für diese Peptide geklärt werden. Man vermutet, daß basische Zentren und eine gewisse helikale Amphiphilie die Voraussetzungen für eine Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran sind, die anschließend zur Ausbildung inverser Mizellen führt (Abb. 1-7).

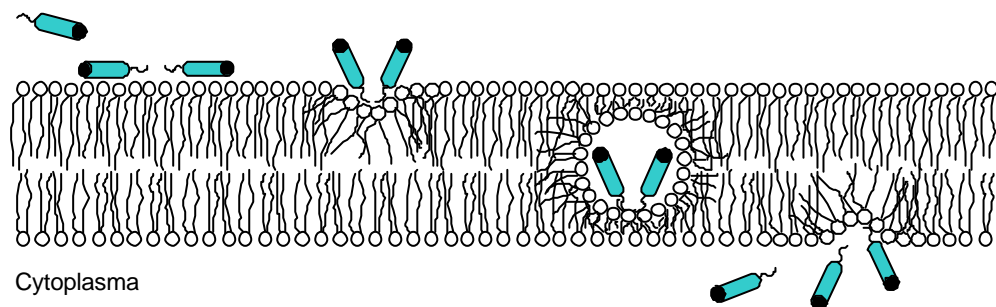
**Tab. 1-3:** Trojanische Peptide (Auswahl) – **A** Natürliche und **B** synthetische Transporter.

Bezeichnung	Ursprung	Aminosäuresequenz <sup>a)</sup>
<b>A</b> Penetratin	Antennapedia-Transkriptionsfaktor, <i>Drosophila</i>	RQIKIWFQNRRMKWKK
<b>A</b> MTS	Kaposi-Fibroblastenwachstumsfaktor, human	AAVLLPVLLAAP
<b>A</b> TLM	Oberflächenantigen, <i>Hepatitis-B-Virus</i>	PLSSIFSRIGDP
<b>A</b> Tat	Transkriptionsaktivierender Faktor, HI-Virus, Typ 1	GRKKRRQRRRPPQ
<b>A</b> VP 22	Transkriptionsfaktor, <i>Herpes-Simplex-Virus</i> , Typ 1	DAATATRGRSAASRPTEPRAPARSASRPRRPVE
<b>B</b> Transportan	aus Galanin und Mastoparan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL
<b>B</b> MP	amphiphiles Modellpeptid	KLALKLALKALKAALKLA

<sup>a</sup> 1-Buchstabencode siehe Abschnitt 7.3.2, Seite 149

Nicht zutreffen kann dieses Modell jedoch für solche Transferpeptide, die aus Signalsequenzen verschiedener Proteine aufgebaut sind. Das Peptid MTS beispielsweise ist sehr hydrophob und enthält kein basisches Zentrum, vermag aber trotzdem Proteine verschiedener Größe temperaturunabhängig (4–37 °C) durch die Membran zu transportieren.<sup>1</sup> Allerdings zeigen nicht alle signalsequenzbasierten Transferpeptide diese Eigenschaft unabhängig von der Temperatur.<sup>107</sup>

Die zweite große Gruppe stellen synthetische Transferpeptide dar. Bei Transportan handelt es sich um ein halbsynthetisches Fusionspeptid aus dem Neuropeptid Galanin und dem membraninteragierenden Wespengift Mastoparan. Es zeigt wie Penetratin energieunabhängige Transfereigenschaften, allerdings – bedingt durch seine Hydrophobie – mit einer Lokalisation überwiegend in membranären Strukturen (Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum) anstatt im Cytosol oder Zellkern.<sup>108</sup>



**Abb. 1-7:** Modell für den zellulären Aufnahmemechanismus von Penetratin nach Derossi *et al.*<sup>2</sup> – Das Transferpeptid interagiert mit negativ geladenen Phospholipiden an der extrazellulären Membran. Dadurch wird die Lipiddoppelschicht destabilisiert und es bilden sich inverse Mizellen. Diese wandern durch die Membran und vermitteln somit den Transfer des Trojanischen Peptids ins Cytoplasma (Transport in die umgekehrte Richtung ist ebenfalls denkbar). Falls dieses Modell zutrifft, bleibt das Peptid stets im wässrigen Milieu.

Zur genaueren Charakterisierung der strukturellen Voraussetzungen für die Transfereigenschaften von Peptiden entwickelten Oehlke *et al.* vollsynthetisch ein Modellpeptid mit amphiphiler, helikaler Struktur (MP, siehe Tab. 1-3),<sup>109</sup> welches eine hohe Membranpenetration aufweist. In nachfolgenden Untersuchungen wurde die Peptidsequenz systematisch in Hinblick auf Struktur, Ladung und Größe verändert. Dabei zeigte sich zunächst, daß eine Amphiphilie über mindestens vier helikale Windungen die Voraussetzung für einen Transfer darstellt. In späteren Studien konnte jedoch auch für nichtamphiphile Peptide ein Transfer gezeigt werden, was wiederum auf einen anderen Aufnahmemechanismus als den von Penetratin schließen läßt.<sup>110,111</sup>

Außer im Aufnahmemechanismus und in der zellulären Lokalisation unterscheiden sich die einzelnen Trojanischen Peptide ebenfalls in ihrer Transporteffizienz. Je nach Peptid konnte bislang für ganz unterschiedlich große, polare Biopolymere unter Erhalt ihrer Funktionalität der Transfer in die Zelle gezeigt werden. Dabei wird die Molekülmasse als ein Maß für die potentielle Molekülgröße herangezogen. Für eine Anwendung in Immunotoxinen ist vor allem der Transport von solchen Proteinen interessant, die – wie die reinen katalytischen Domänen von Proteintoxinen – im Bereich von 20–30 kDa liegen. Für die Transferpeptide TLM, Tat und VP 22 konnte jeweils ein Transfer von GFP (27 kDa) gezeigt werden.<sup>3,106,112</sup> Mit dem Peptid MTS konnte sogar die Glutathion-S-Transferase (41 kDa) im Zellinneren nachgewiesen werden,<sup>1</sup> mit Penetratin dagegen nur kleinere Proteine mit bis zu 100 Aminosäuren.<sup>2</sup>

## 1.9 Zielsetzung für die vorliegende Arbeit

Die zahlreichen Therapieerfolge von Immunotoxinen mit ganz unterschiedlichen Vektormolekülen zeigen, daß sich insbesondere die Verwendung kleiner tumorspezifischer Liganden als vorteilhaft erweist (z. B. IL 2 mit circa 15 kDa). Im Zuge weiterer Entwicklungen konnten die verwendeten Toxinanteile ebenfalls beachtlich verkleinert werden, jedoch sind diese bedingt durch die toxineigenen Translokationsdomänen immer noch relativ groß (siehe Abb. 1-4, Seite 13), was sich nachteilig auf eine gute Tumorpenetration der Gesamtkonstrukte auswirken kann. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, möglichst kleine Immunotoxinkonstrukte zu entwickeln, um eine bessere Penetration ins Zielgewebe zu erreichen. Gleichzeitig sollte eine möglichst hohe Affinität und Selektivität des tumorspezifischen Liganden für seinen Rezeptor zu einer möglichst geringen unspezifischen Toxizität führen.

Unter Verwendung von toxinunabhängigen Membrantransfermechanismen und verschiedenen spaltbaren Sequenzen sollte ein Adaptermolekül entwickelt werden, das einen gerichteten Transport in die Zelle und zur Steigerung der Effektivität eine Akkumulation der verkleinerten toxischen Domäne in der Zielzelle vermittelt. Dazu sollten unter Verwendung Trojanischer Peptide die zellulären Aufnahmemechanismen von Proteintoxinen wie Diphtheriatoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin möglichst genau nachgeahmt werden (siehe Abb.

1-5, Seite 14), um einen ähnlich hohen oder sogar verbesserten Transfer der enzymatisch aktiven Domänen ins Zellinnere zu erzielen.

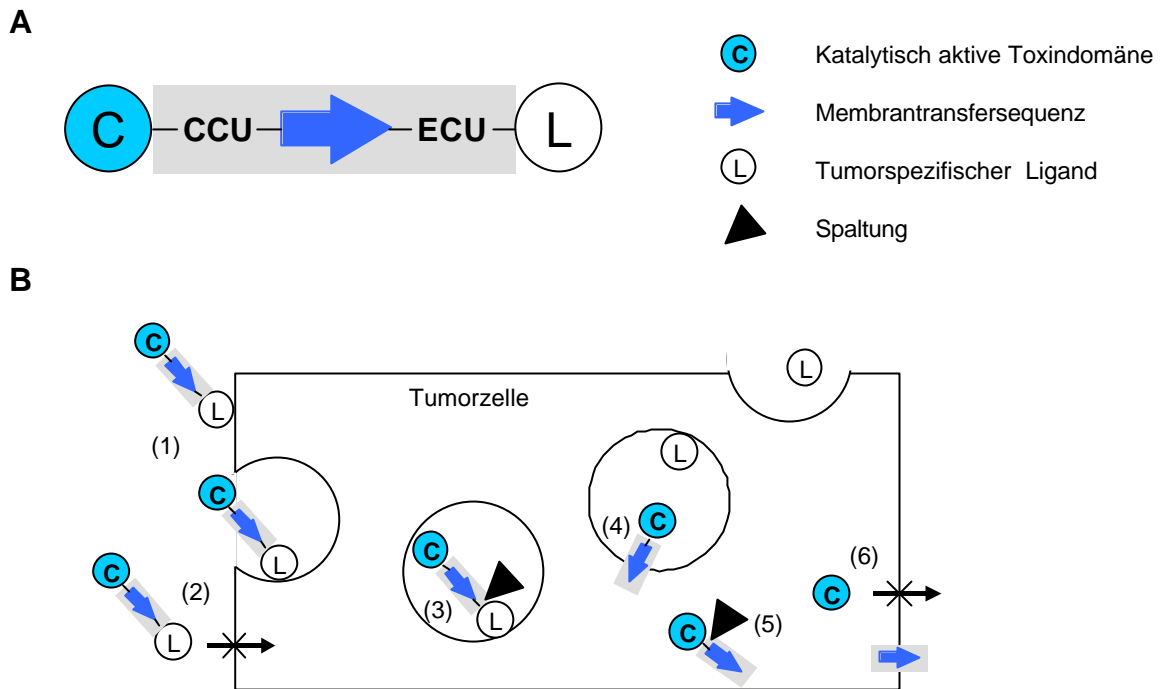
Alle bisherigen Untersuchungen über zelluläre Aufnahmemechanismen unterschiedlicher Trojanischer Peptide zeigen, daß ein Proteintransfer sowohl in die Zelle hinein als auch aus der Zelle heraus möglich ist. Deshalb kann die toxineigene Translokationssequenz (zur Reduktion der Konstruktgröße) nur dann gegen ein wesentlich kleineres Transferpeptid ausgetauscht werden, wenn sichergestellt wird, daß der Transport nur unidirektional in die Zelle hinein stattfindet. Um dies zu erreichen, sollten Toxin und Transfersequenz mittels einer cytosolisch spaltbaren Einheit (CCU oder CSP im Falle eines cytosolisch spaltbaren Peptidlinkers) verbunden werden, nach deren Spaltung ein Verbleib der katalytischen Domäne im Cytosol garantiert werden kann.

Zur Vermeidung unerwünschter Effekte auf andere Zellen war bei Substitution der toxineigenen Transferdomäne ebenfalls darauf zu achten, daß das Trojanische Peptid erst nach der zielzellspezifischen Bindung aktiviert wird. Dies sollte durch Einfügen einer endosomal spaltbaren Einheit (ECU oder ESP im Falle eines endosomal spaltbaren Peptidlinkers) zwischen Ligand und Transfersequenz gewährleistet werden. Da bislang nur für solche Konstrukte ein Transfer gezeigt werden konnte, in denen das Trojanische Peptid entweder N- oder C-terminal der zu transferierenden Sequenz angeordnet war (in manchen Fällen mit *Tag*), sollte eine direkte Translokation durch die Cytoplasmamembran durch die Bindung der Toxindomäne einerseits und der zielzellspezifischen Domäne andererseits verhindert werden. Erst mit der Spaltung der ECU in den Endosomen sollte die Transfersequenz aktiviert werden und somit eine Imitation des Aufnahmemechanismus von Proteintoxinen mit A-B-Struktur ermöglichen.

Der molekulare Aufbau der zu entwickelnden Immunoadaptortoxine und ein Modell für deren zellulären Aufnahmemechanismus sind schematisch in Abb. 1-8 dargestellt.

Als tumorspezifisches Zielsystem sollte im Rahmen dieser Arbeit der Transferrinrezeptor herangezogen werden, der als auf Tumorzellen stark exprimierter Endocytoserezeptor ein ausgezeichnetes Modellantigen darstellt.

Mit der Entwicklung eines molekularen Adapters – bestehend aus einer toxinunabhängigen Membrantransfersequenz, die von einer cytosolisch und einer endosomal spaltbaren Einheit flankiert wird – werden somit gleich mehrere Möglichkeiten zur Optimierung herkömmlicher Immunotoxine genutzt. Die Größenreduktion der Toxindomäne zusammen mit der Simulation des natürlichen Translokationsprozesses von Proteintoxinen machen eine effiziente zelluläre Aufnahme wahrscheinlich, wobei die Effektivität der Toxindomäne zusätzlich durch ihre Akkumulation im Cytosol erhöht wird. Ferner bietet ein solcher Adapter die Möglichkeit, die weiteren Bestandteile des Konstruktes, nämlich die cytotoxisch aktive Domäne und / oder den tumorspezifischen Liganden, relativ einfach auszutauschen. Dies ermöglicht seine breite Anwendung sowohl für unterschiedliche Cytotoxine und Liganden als auch im Rahmen völlig anderer *Drug-Targeting*-Konzepte, wie z. B. Enzymsubstitution oder Gentransfer.



**Abb. 1-8:** Molekularer Aufbau eines Immunoadaptortoxins und potentieller Mechanismus der zellulären Aufnahme – **A** Darstellung des Gesamtkonstruktes, bestehend aus der rein katalytisch aktiven Domäne eines Proteintoxins (welche ohne Translokationsdomäne nicht in die Zelle aufgenommen wird), dem Adapter und einem tumorspezifischen Liganden. ECU steht für endosomal spaltbare und CCU für cytosolisch spaltbare Einheit. **B** Zellulärer Aufnahmemechanismus: (1) Bedingt durch den tumorspezifischen Liganden bindet das Gesamtkonstrukt an den Rezeptor und wird mit diesem zusammen endocytotiert. (2) Ein direkter Transfer des Konstruktes durch die Cytoplasmamembran ist ohne Rezeptorbindung und Endocytose nicht möglich, da die Transfersequenz zunächst durch ihre Substituenten an beiden Seiten blockiert wird. (3) In den Endosomen kommt es durch den erniedrigten pH-Wert oder durch Proteolyse zur Abspaltung des tumorspezifischen Liganden (Spaltung der ECU) und damit zur Aktivierung der Membrantransfersequenz, die nachfolgend (4) für den Transport der katalytischen Domäne ins Cytosol verantwortlich ist. (5) Nach Abspaltung der Transfersequenz (Spaltung der CCU durch Proteolyse oder reduktiv) akkumuliert die toxische Domäne im Cytosol, da sie nicht mehr membrangängig ist (6). Angelangt an ihrem Wirkort, dem Cytosol, vermittelt die toxische Domäne eine Inhibition der Proteinbiosynthese, die schließlich zum Zelltod führt.