

3. Einleitung

Aufgrund der Inzidenz und Mortalität maligner Erkrankungen sollte deren Prävention, Diagnose und Therapie ein hoher Stellenwert zukommen. Im Jahr 2002 starben in Deutschland 215 441 Menschen an Krebs (www.destatis.de). Damit entfielen 25,6 % aller Todesfälle auf maligne Erkrankungen. Innerhalb der multimodalen Therapieprotokolle repräsentiert der Einsatz von Chemotherapeutika einen unverzichtbaren Bestandteil der Behandlung maligner Erkrankungen und ist die effektivste Therapieoption für bereits metastasierte Tumore [1]. Zytostatika hemmen über unterschiedliche Mechanismen das Zellwachstum. Relative Selektivität auf das Tumorgewebe wird erst durch die hohe Teilungsrate der Tumorzellen erreicht. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen kann man zwischen Zytostatika unterscheiden, die nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus wirken (phasenspezifisch) und solchen, die unabhängig vom Zellzyklus sind (phasenunspezifisch).

Etoposid (VP-16), ein halbsynthetisches Derivat des Podophyllotoxins aus *Podophyllum peltatum* (Maiapfel), gehört zu der Gruppe der phasenspezifischen Zytostatika. Es wirkt über eine Interaktion mit der Topoisomerase II vor allem in der späten S- und der frühen G2-Phase des Zellzyklus [2]. Nach seiner präklinischen Entwicklung seit 1966 wurde ab 1971 seine klinische Wirksamkeit getestet. Hier konnte eine antineoplastische Wirksamkeit bei AML, Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphom, groß- und kleinzelligem Bronchialkarzinom, Magenkarzinom, Mamma- und Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. 1983 erfolgte die offizielle Zulassung der neuen Substanz für die klinische Anwendung [3]. Angriffsort des Etoposids ist die Topoisomerase II. Topoisomerase I und II sind Enzyme, welche die Topologie der DNA verändern. Sie beeinflussen den Superspiralisierungsgrad der DNA und nehmen dabei eine entscheidende Rolle bei der Replikation und Transkription ein [4]. Während die Topoisomerase I Einzelstrangbrüche verursacht, katalysieren Topoisomerase II α und β ATP- und Mg (II)-abhängig transiente DNA-Doppelstrangbrüche. Durch diese transienten Strangbrüche können sich andere DNA-Doppelhelices winden, bevor es zu einer Religation der Stränge kommt [5,6,7,8]. Topoisomerase II-Inhibitoren binden an den binären DNA-Enzymkomplex und bilden so einen sogenannten stabilen ternären, kovalent verbundenen DNA-, Enzym- und Etoposid-Komplex [9]. Es kommt zu einer vermehrten Bildung von Strangbrüchen und folglich auch zu einer Blockierung DNA-bindender Enzyme wie RNA- und DNA-Polymerasen [10]. Dies führt über noch nicht

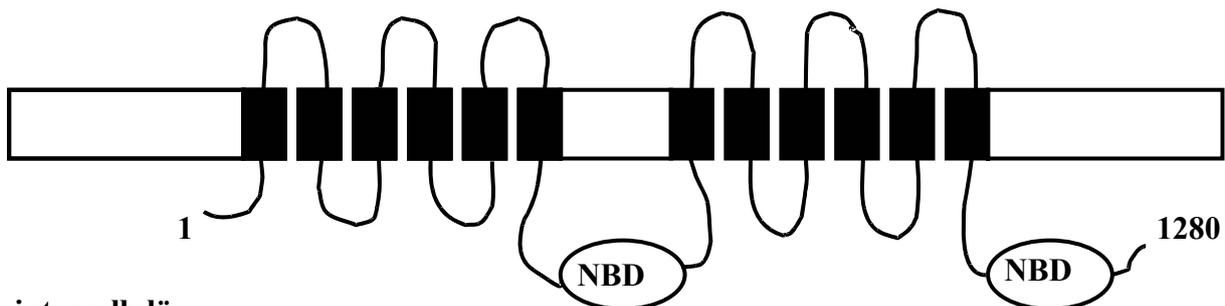
vollständig aufgedeckte Signaltransduktionswege zur Einleitung von Apoptose. Die Tumorselektivität von Etoposid erklärt sich durch den relativen Mangel von Topoisomerase II in proliferierenden Zellen im Gegensatz zu normalem Gewebe [11,12,13]. Dies schließt jedoch nicht aus, daß Normalgewebe mit einem hohen Zellumsatz, sogenanntes Wechselgewebe, ebenfalls geschädigt wird. Neben den allgemein für Zytostatika typischen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Durchfall, Fieber oder Alopezie ist vor allem die auftretende Knochenmarkdepression ein dosislimitierender Faktor. Zudem steigt das Risiko für eine sekundär induzierte myeloische Leukämie [14,15].

Ein weiteres Problem in der Behandlung mit Etoposid ist das Auftreten von Resistenzen. Man unterscheidet intrinsische, primäre Resistenzen, die bereits *a priori* ohne vorausgegangene zytostatische Therapie bestehen, von sogenannten extrinsischen, sekundär erworbenen Resistenzen. Dabei werden initial sensitive Zellen erst während der Behandlung resistent. Ursachen für die Entstehung einer Chemoresistenz können grundsätzlich auf allen zellulären Ebenen begründet liegen. Hierzu zählen verminderte Aufnahme des Substrates in die Zelle (z.B. Herabsetzung der Methotrexataufnahme), vermehrte intrazelluläre Inaktivierung (z.B. Überexpression der Glutathion-S-Transferase und damit gesteigerte Detoxifikation von Alkylantien und Platinkomplexen) oder verminderte Aktivierung des Substrates (z.B. verminderte Aktivierung von AraC durch die Deoxycytidinkinase), verminderte Affinität des Substrates zu den intrazellulären Zielorten und gesteigerte Reparationskapazität der Zelle (z.B. gesteigerte DNA-Reparation). Diese Möglichkeiten zur Ausbildung einer Resistenz sind z.T. substratspezifisch und stehen somit nicht alle im direkten Zusammenhang mit der klinisch bedeutsamen, unspezifischen Vielfachresistenz gegenüber einem breiten Spektrum chemisch nicht verwandter Substanzen. Für diesen Fall läßt sich ein weiterer Punkt definieren, der die Wirkung energieabhängiger Transportproteine zu zellulärer Detoxifikation beschreibt. Das Auftreten einer pleiotropen Resistenz gegen eine Vielzahl strukturell bzw. funktionell unterschiedlicher Agenzien wird als *multidrug resistance* (MDR) bezeichnet. Der MDR-Phänotyp schließt eine Kreuzresistenz gegen Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin), Vinca-Alkaloide (Vinblastin, Vincristin) Taxol, Epipodophyllotoxine (Etoposid) und andere Zytostatika ein. Wegweisende Untersuchungen zur Identifizierung des MDR-Mechanismus zeigten eine verminderte Zytostatikakonzentration in MDR-positiven Tumorzellen [16]. Diskutiert wurde ein vermehrter Auswärtstransport [17] bzw. eine verminderte Zellpermeabilität [18]. Zu den bisher beschriebenen Mechanismen, die mit MDR assoziiert sind, gehört die Überexpression von P-Glykoprotein (P-gp), das *multidrug*

resistance related protein (MRP) und das *lung resistance related protein* (LRP). P-gp und MRP gehören zu der Gruppe der ABC-Transporter (ATP-binding-cassette-transporter). Diese umfasst mittlerweile mehr als 200 verschiedene Proteine in Pro- und Eukaryonten, von denen die meisten eine Transportfunktion besitzen. Die Mitglieder der ABC-Superfamilie nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP für einen meist unidirektionalen Transport verschiedenster Moleküle durch biologische Membranen [19,20,21]. LRP ist ein Vertreter der Vault-Proteine. Vaults sind die größten bekannten Ribonukleoprotein-Komplexe. Sie bestehen aus einer untranslatierten RNA und aus drei Proteinen: dem humanen *major vault protein* (MVP) sowie zwei kleinen *minor vault proteins* p193, und p240 [22,23]. Das am besten charakterisierte, mit dem Phänotyp der Multidrug-Resistenz in Zusammenhang stehende Protein ist das MDR-1-Genprodukt P-gp. Es ist ein 170 kD großes, membranständiges Transportprotein, daß zur ABC-Superfamilie gehört [21] und 1976 identifiziert und charakterisiert wurde [24]. Dabei korrelierte die Menge der Expression auf der Zelloberfläche mit dem Ausmaß der Resistenz der Zellen gegen Colchicin. Die vermutete natürliche Funktion des Proteins gilt der Detoxifikation der Zelle von potentiell toxischen Substanzen. P-gp ist das Genprodukt des MDR-1 [25,26] und schleust energieabhängig verschiedene Substanzen aus der Zelle.

Abbildung 1 Schematische zweidimensionale Darstellung des P-Glykoproteins

extrazellulär



intrazellulär

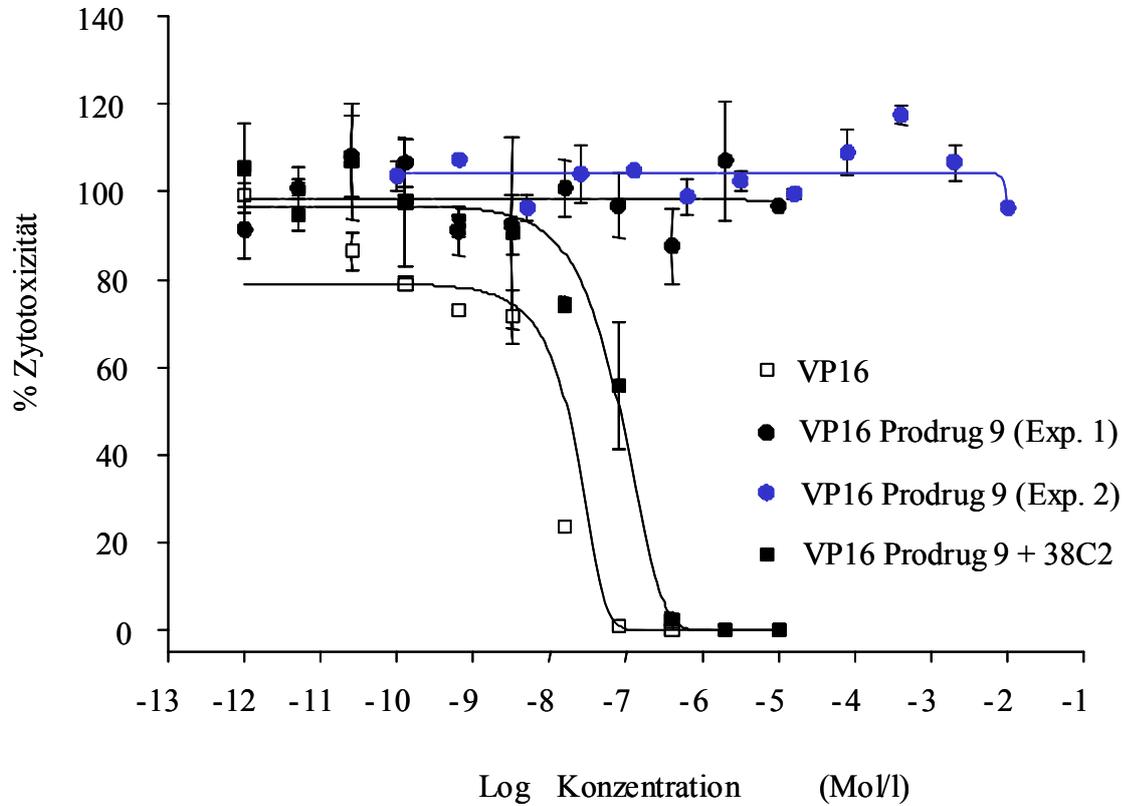
NBD-Nucleotid-Bindende-Domäne

P-gp besteht aus 1280 Aminosäuren und setzt sich aus zwei nahezu identischen Hälften zusammen. Jede besteht aus einer N-terminalen hydrophoben und einer C-terminalen hydrophilen Region. Die hydrophobe Region enthält jeweils sechs transmembranäre Segmente, während der hydrophile Teil eine Nucleotid-bindenden Domäne (NBD) für Adenosintriphosphat (ATP) aufweist, welche auf der intrazellulären Seite lokalisiert ist.

Strategien zur Lösung des Problems der Chemoresistenz fokussierten sich bisher auf Umwandlung von Therapieschemata (Kombination verschiedener Zytostatika mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen zur Verhinderung von Resistenzentstehung und Umgehung bereits entstandener Resistenzen), Entwicklung von MDR-1-Inhibitoren, sowie Kombination von Chemotherapeutika mit Bestrahlung, Hyperthermiebehandlung oder Sauerstoffüberdrucktherapie.

Unsere Strategie zur Umgehung der MDR stellt die Modifikation des Chemotherapeutikums selbst dar zur Generierung von sogenannten „Prodrugs“. Prodrugs, Vorläufersubstanzen des eigentlichen Medikaments, welche erst im Körper in die Effektorsubstanz überführt werden, stellen eine etablierte Möglichkeit dar, die Grenzen der Ausgangssubstanz zu überwinden und wurden erstmals 1958 durch Adrien Albert beschrieben und definiert [27]. Nach dieser Definition unterliegen Prodrugs zunächst einer Biotransformation, bevor sie ihre eigentliche pharmakologische Wirkung entfalten. Im Idealfall kommt es erstens zu einer Toxizitätsverringerng durch Vermeidung toxischer Plasmaspitzen mittels eines sogenannten *slow-release* Mechanismus, zweitens zu einer Freisetzung der Effektorsubstanz erst im Tumormilieu selbst, was einer Art *tumor targeting* gleich kommt und drittens zu einer Umgehung des Resistenzmechanismus, z.B. durch Vermeidung der Ausschleusung der Substanz über P-gp aus der Zelle. Prodrugs von Etoposid wurden bisher meist zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit synthetisiert z.B. in Form des Etoposidphosphats [28]. Wegweisende Untersuchungen mit einem Prodrug von Etoposid, dem ProVP-16 IX konnten die entscheidende Bedeutung der 4'-Hydroxygruppe am Benzolring für das Etoposid und dessen Wirksamkeit bestätigen. Durch Blockierung dieser Seitengruppe mit einem Linker wurde die Toxizität des Etoposids um ein Vielfaches herabgesetzt. Erst nach Abspaltung dieses Linkers durch den Antikörper 38C2 entfaltet das ProVP-16 IX seine volle Toxizität (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2 Toxizität des ProVP-16 IX vor und nach Aktivierung durch den Antikörper 38C2 im Vergleich zur Muttersubstanz VP-16



Durch Modifikation am Zuckerrest des Etoposids konnte außerdem eine verbesserte Wirkung auf P-gp exprimierenden Zellen nachgewiesen werden [29]. Möglicherweise könnten Veränderungen an der für das Etoposid für Biotransformation und Wirkung entscheidenden 4'-Hydroxygruppe des Benzolringes, auch zu einer derartigen Wirkungsoptimierung führen.