

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein neues Prodrug von Etoposid, ProVP-16 I, beschrieben und charakterisiert. Getestet wurde die Hypothese, ob chemische Veränderungen am Chemotherapeutikum selbst zu einer Überwindung der durch Überexpression von MDR-1- ausgelösten Chemotherapie-Resistenz führen.

Hierzu wurde die Hydroxylgruppe an der C4'-Position des Benzolringes von Etoposid mit einer Propylcarbonoxy-Seitengruppe verestert. Diese Hydroxylgruppe stellt das biologisch aktive Zentrum des Etoposids dar. Neben der Bindung und Stabilisierung des TopoII-DNA-Komplexes ist diese auch für die Metabolisierung des Etoposids von großer Bedeutung [37, 38, 39]. Gleiches konnte mit einem ähnlichen Prodrug von Etoposid nachgewiesen werden, welches mittels einer retro-aldol-retro-Michael Reaktion, katalysiert durch den Antikörper 38C2, aktiviert wird. Erst nach enzymatischer Abspaltung dieser Carbamat-Verknüpfung von der C4'-Hydroxylgruppe entfaltet das Prodrug seine volle Zytotoxizität [40].

Erster Schritt nach der Synthese war die Charakterisierung des Prodrugs als solches. Die Aktivierung über einen sogenannten *slow-release*-Mechanismus vor Entfaltung der zytotoxischen Wirkung als zentrale Prodrug-Eigenschaft konnte für ProVP-16 I bestätigt werden. *In vitro* zeigte sich für ProVP-16 I ein erst nach 48-72 Stunden vollständig ausgebildeter zytotoxischer Effekt. Die Wirkung von VP-16 ist hingegen nach 24 Stunden abgeschlossen. Diese langsame Freisetzung der Effektorsubstanz erklärt auch die Verminderung der Toxizität des Prodrugs *in vivo* um den Faktor 3 im Vergleich zu Etoposid. Diese Beobachtungen stehen im Kontext mit Ergebnissen, die für ein hydrolytisch aktivierbares Prodrug von Paclitaxel beschrieben sind. In diesen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Vermeidung von toxischen Plasmaspitzen des Effektormoleküls durch die langsame Aktivierung des Prodrugs mit einer Reduktion der Toxizität des Prodrugs einherging. Dies ermöglichte den Einsatz höher Dosen sowohl in Mäusen [41] als auch am Patienten [42], mit dem Resultat, daß in Heilversuchen bei ausbehandelten Patienten überraschende Ansprechraten beobachtet wurden. Die Untersuchung des Aktivierungsmechanismus für ProVP-16 I erbrachte zunächst eine Stabilität des Prodrugs in PBS-Puffer über einen weiten pH-Bereich von 5 bis 10. Erst oberhalb eines pH-Bereiches von 10.5 konnte eine Konversion des Prodrugs zu VP-16 beobachtet werden. Aufgrund des eher sauren Tumormilieus [43], kann man bei diesem Prodrug nicht von einem pH-abhängigen Mechanismus, sondern von einer enzymatischen Aktivierung ausgehen. Untersuchungen von nach Molekulargewicht getrennten Serumfraktionen ergaben die stärkste Aktivierung in der

Fraktion von 40-80 KD, was auf eine Umsetzung durch Carboxylesterasen hindeutet [30]. Dies konnte für ProVP-16 I bestätigt werden, indem die Umsetzung von ProVP-16 I zu VP-16 auch von gereinigter Carboxylesterase vermittelt wurde. Carboxylesterasen katalysieren neben der Konversion von Carbonsäureestern auch die Hydrolyse von Amiden, Thioestern, Phosphorsäureestern und sauren Anhydriden [44]. Aufgrund der weiten Verbreitung der Carboxylesterasen in Leber-, Nieren-, Hoden- und Lungengewebe als auch im Plasma kommen diese Enzyme nicht für eine spezifische Aktivierung von Prodrugs im Tumormilieu in Frage. Aber ein durch Carboxylesterasen aktivierbares Prodrug wurde bereits zur klinischen Reife entwickelt, mit dem Ziel einer Verbesserung der Bioverfügbarkeit und der Reduktion der Toxizität: CPT-11/Irinotecan. Weitere Beispiele befinden sich derzeit in präklinischer Entwicklung, wie: Paclitaxel-2-ethylcarbonate, Capecitabine und mehrere Amidomethyl-Ester Prodrugs [44].

Nach der Charakterisierung des Prodrugs als solches und seiner gesicherten enzymatischen Aktivierung, folgte die Testung hinsichtlich der Umgehung von Zytostatika-Mehrfach-Resistenz.

In vitro konnte eine bis zu dreifach gesteigerte zytotoxische Aktivität vor allem in MDR-1-exprimierenden Zellen (VCR100, SW480, HT-29, Kelly, SK-N-SH) nachgewiesen werden. Diese höhere Effektivität konnte ebenso in der von uns generierten MDR-1-exprimierenden Zelllinie MOVP-3 bestätigt werden.

Bei dem über Carboxylesterasen aktivierbaren Prodrug Irinotecan (CPT-11) konnten ähnliche Befunde erhoben werden. Neben verbesserter pharmakokinetischer Eigenschaften wurde für CPT-11 auch eine höhere Effektivität in der Vincristin (VCR)- und Adriamycin (ADR)-resistenten Leukämiezelllinie P388 und eine verbesserte Wirksamkeit in der Behandlung resistenter Kolonkarzinome nachgewiesen [45]. Aufgründessen wurde es als Alternative für die Therapie MDR-1-überexprimierender Tumoren vorgeschlagen [46]. Ob CPT-11 oder sein aktiver Metabolit SN-38 jedoch wirklich in der Lage sind, MDR-1-Resistenz zu überwinden, wird kontrovers diskutiert und der endgültige Beweis steht noch aus [47].

Entscheidend jedoch ist, daß ProVP-16 I eine Hemmung der MDR-1-Pumpfunktion mit den Prodrugeigenschaften eines Zytostatikums in einem Molekül vereinigt. Bislang wurde die Therapie von MDR-1-vermittelter Zytostatikaresistenz durch eine kombinierte Gabe von Zytostatikum und einem MDR-1-Inhibitor optimiert.

In den bisherigen Studien mit MDR-1-Modulatoren vor allem der 1. (z.B. Cyclosporin und Verapamil) und 2. Generation (z.B. Valspodar) traten allerdings unerwartete Probleme auf:

1. Geringe Affinität und Spezifität für P-gp, so daß für die klinische Anwendung Konzentrationen zur Erzielung eines Effektes eingesetzt werden müssten, die mit inakzeptablen toxischen Nebenwirkungen verbunden wären. Zusätzlich werden durch die geringe Spezifität auch andere ABC-Transporter blockiert, so daß normale Zellen und Gewebe wie z.B. das ZNS oder die Gonaden vermehrt durch die Zytostatika geschädigt werden [48].
2. Pharmakokinetische Interaktionen mit den Chemotherapeutika z.B. durch kompetitive Hemmung des Abbaus über Cytochrom P450 3A4 erfordern eine Dosisreduktion des Chemotherapeutikums [48].

Zwar konnten mit Modulatoren der 3. Generation wie Tariquidar erfreulichere Ergebnisse hinsichtlich der Umgehung der MDR-1-Resistenz vor allem durch Steigerung der Spezifität für P-gp erzielt werden, doch auch diese weisen pharmakokinetische Interaktionen mit den Chemotherapeutika auf [48]. Aufgrund dieser pharmakokinetischen Beeinflussung des Zytostatikums durch den MDR-1-Modulator sind neue Dosisfindungs- und Toxizitätsstudien am Patienten der Kombination erforderlich, so daß sich das Konzept der Verwendung eines Zytostatikums im etablierten Dosisbereich mit einem neuen MDR-1-hemmenden Medikament so nicht realisieren ließ.

Die verbesserte zytotoxische Wirksamkeit von ProVP-16 I bei MDR-1-vermittelter Zytostatikaresistenz ist durch die Hemmung der Pumpfunktion von MDR-1 hinreichend erklärt. Inwiefern noch andere Mechanismen zu einer verbesserten Wirksamkeit auch bei nicht-resistenten Tumoren beitragen, ist für das ProVP-16 I bislang noch nicht geklärt. Grund für eine verbesserte Wirkung des Prodrugs könnte möglicherweise auch eine Steigerung der Lipophilität der Substanz sein, wie bei Aligiannis *et al.* postuliert [49]. Hier wurde allerdings Daunomycin als Ausgangssubstanz verwendet und Veränderungen am Zuckerrest vorgenommen. Veränderungen am Zuckerrest des Etoposids konnten ebenso eine Steigerung der Effektivität in MDR-1-exprimierenden Zellen hervorrufen [29]. Zhang *et al.* erklären dies mit einer Stabilisierung des DNA-TopoII-Komplexes. Die Theorie ist eine Einlagerung des planaren ABCD-Ringsystem des Etoposids zwischen die Basenpaare der DNA, während der Zuckerrest und der gegenüberliegende Benzolring sich entlang der kleinen Furchen der DNA ausstrecken können, um so DNA oder z.B. die Topoisomerase II zu binden. Substitutionen an C4 könnten dabei zu einer Stabilisierung des DNA-Komplexes beitragen. Theoretisch könnte

auch eine Substitution am Benzolring, wie beim ProVP-16 I, diese Wirkung verstärken. In weiterführenden Untersuchungen wurde die Frage untersucht, ob die MDR-1-inhibitorische Wirkung alleine in der Linkerstruktur begründet liegt. Zu diesem Zweck wurde ein Prodrug von Taxol verwendet, das mit exakt demselben Linker synthetisiert wurde [41]. Interessanterweise war das Taxol-Prodrug nicht in der Lage, den MDR-1-vermittelten Substratefflux zu inhibieren. Wahrscheinlich ist eine durch die Substitution an der Hydroxylgruppe des Benzolringes hervorgerufene spezifische sterische Umwandlung des gesamten VP-16 Moleküls für die Blockierung der P-gp-Pumpe verantwortlich.

Ein weiterer Aspekt der chemischen Modifikationen der Ausgangssubstanz ist eine mögliche, zusätzliche Aktivierung eines unbekanntes Targets, welches bei der Induktion von Apoptose eine Rolle spielt.

Voruntersuchungen ergaben zwar, daß ProVP-16 I gleichermaßen nach seiner Konversion die Aktivität der Topoisomerase II inhibiert wie VP-16. ProVP-16 I induziert allerdings einen für VP-16 bisher nicht beschriebenen G2/M-Arrest. Dies gibt Grund zur Annahme, daß ProVP-16 I neben der Topoisomerase II-Inhibition noch mindestens über ein weiteres intrazelluläres Angriffsziel Apoptose induzieren kann. Beobachteter G2/M-Arrest ist typisch für Spindelgifte wie Taxol [50]. Deshalb wurde die Frage untersucht, ob ProVP-16 I auch als Spindelgift wirkt. Diese Vermutung konnte allerdings experimentell nicht bestätigt werden. Während Taxol als Spindelgift die Tubulin-Depolymerisation inhibiert, zeigt ProVP-16 I keinen Effekt.

Abschließend zu diesen *in vitro*-Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, ob ProVP-16 in einem resistenten und nicht-resistenten *in vivo*-Modell wirksam ist.

Aufgrund identischer Ergebnisse für beide Prodrugs *in vitro*, wurde aufgrund höher Wasserlöslichkeit ProVP-16 II für weiterführende Experimente ausgewählt.

ProVP-16 II führte zu einer vollständigen Regression bereits etablierter Tumoren in einem resistenten T-Zell-Leukämie Xenograft-Modell von MOVP-3. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu mit VP-16 behandelten Tieren, bei denen kein Einfluss auf das Tumorstadium gezeigt werden konnte [A]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Untersuchung der Wirksamkeit von ProVP-16 II auf ein nicht-resistentes Tumormodell ausgedehnt. Zudem sollte die Wirksamkeit beim Neuroblastom untersucht werden. In Hierbei ergab sich, was den Metastasierungsgrad der Leber angeht, kein Unterschied zwischen der mit VP-16 und der mit

ProVP-16 II behandelten Gruppe. Allerdings wurde nur ein Drittel der für ProVP-16 II zuvor analysierten MTD eingesetzt.

Hier ist vor allem darauf hinzuweisen, daß ProVP-16 II, obgleich nur ein Drittel seiner MTD eingesetzt wurde, gleiche Effekte erzielte wie VP-16 bei MTD einhergehend mit verminderten toxischen Nebenwirkungen für ProVP-16 II. Aufgrund der identischen *in vitro*-Daten für beide Prodrugs ist von einem ähnlichen Effekt für ProVP-16 I auszugehen. *In vivo*-Ergebnisse hierzu stehen allerdings noch aus.

Zusammenfassend wurden hydrolytisch aktivierbare Prodrugs von Etoposid generiert und charakterisiert. Es konnte eine gesteigerte Effektivität gegenüber einer Zahl von MDR-1-positiven Zellen nachgewiesen werden. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus ergab eine Inhibition des MDR-1-vermittelten Stofftransportes und kann so die Wirkungssteigerung von ProVP-16 I in resistenten Zellen erklären. Für ein ähnliches Prodrug von Etoposid, dem ProVP-16 II, konnte der beobachtete *in vitro*-Effekt *in vivo* bestätigt werden. Ebenso zeigt dieses Prodrug eine gute Wirksamkeit in nicht-resistenten Zellen und einem nicht-resistenten Tiermodell.

Damit stellen diese hydrolytisch aktivierbaren Prodrugs von Etoposid eine interessante Alternative zur Behandlung MDR-1-exprimierender Tumore dar.