

Anti-EGFR-Immunoliposomen – Liposomen der nächsten Generation

Christoph Mamot

Einleitung

Auch nach Jahrzehnten intensiver Forschung und zweifellos bedeutenden Teilerfolgen in der Krebsbehandlung sind die therapeutischen Möglichkeiten bei einer Vielzahl von Patienten im Verlaufe dieser Krankheit trotz des Einsatzes neu entwickelter Wirkstoffe weiterhin begrenzt. Eine Lösung oder zumindest Verbesserung dieses unbefriedigenden Zustandes könnte die Entwicklung von Transportsystemen sein, mit deren Hilfe Chemotherapeutika spezifisch und in hoher Konzentration zu Tumorgewebe gebracht werden können. Insbesondere Liposomen, zumeist bestehend aus einer einzigen Bilayer-Schicht aus einem Gemisch von Cholesterin und Phospholipiden, sind in der Lage, Wirkstoffe in ihrem Innern effizient aufzunehmen und aufgrund ihrer besonderen pharmakokinetischen Eigenschaften, eine höhere Wirkstoffkonzentration im Tumorgewebe zu erreichen [1, 2]. Es konnte demonstriert werden, dass der Einsatz von Liposomen zu einer wirksamen Tumortherapie bei gleichzeitig verminderten systemischen Nebenwirkungen führen kann [3].

Dadurch, dass Wirkstoffe in Liposomen verpackt werden, steigt deren Halbwertszeit in der Blutzirkulation von zumeist wenigen Minuten auf ein Vielfaches (oft >48 Stunden). Diese veränderte Pharmakokinetik in Verbindung mit der Fähigkeit, bevorzugt in Tumoren und nicht in normalem Gewebe zu akkumulieren, ist entscheidend für deren Wirksamkeit. Letztere Eigenschaft wird in der Literatur als «enhanced retention and permeability effect» («EPR effect») beschrieben [4] und basiert darauf, dass durch ein schnelles und unkontrolliertes Wachstum von Tumoren deren Mikrovaskula-

tur unvollständig, d.h. «löchrig», und das lymphatische System (wichtig für den Abtransport von Partikeln wie z.B. Liposomen) nur sehr bedingt angelegt sind [5]. Liposomen können somit die Blutzirkulation bevorzugt in Tumorebenen durch Endothellücken verlassen und in deren Interstitium akkumulieren. Dort angelangt entweichen mit der Zeit Wirkstoffmoleküle aus den Liposomen oder können in Form intakter Liposomen in die Tumorzelle gelangen, um wirksam zu werden; der genaue Mechanismus ist weiterhin unklar.

Ein entscheidender Fortschritt konnte durch die Kopplung von receptorspezifischen Antikörpern oder deren Fragmenten an der Oberfläche von Liposomen erreicht werden [6]. Im Vergleich zu konventionellen Liposomen erkennen diese so genannten Immunoliposomen (ILs) (Abb. 1) spezifische Antigene an der Tumorzelloberfläche und werden nach Bindung durch aktive Endozytose von den Tumorzellen aufgenommen. In der Form von ILs verabreichte Chemotherapeutika werden so direkt und im Idealfall ausschliesslich in Tumorzellen transportiert. Hierdurch wird einerseits die therapeutische Wirksamkeit optimiert, andererseits die systemische Toxizität infolge unspezifischer Aufnahme in andere Gewebe weiter vermindert. Dieser Schritt ist entscheidend nicht nur für ILs, sondern auch für Immuntoxine, Antikörper-Wirkstoff-Konjugate und Antikörper-basierender Gentherapie.

Immunoliposomen

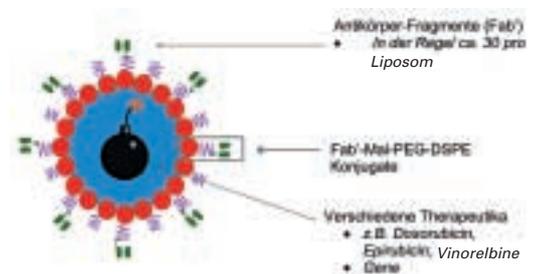
In den letzten Jahren wurden eine Reihe von gegen verschiedene Oberflächenmerkmale gerichtete ILs entwickelt. Hierbei wurde offen-

Korrespondenz:
Dr. med. Christoph Mamot
Abteilung Onkologie
Departement Innere Medizin
Kantonsspital
Petersgraben 4
CH-4031 Basel

christoph@mamot.net

Abbildung 1.

Schematische Darstellung von Immunoliposomen. Eine Vielzahl von diagnostischen oder therapeutischen Substanzen kann in das Innere von Liposomen passiv und zum Teil auch aktiv geladen werden. Durch die Kopplung von Antikörper-Fragmenten (Fab') an der Oberfläche von Liposomen werden diese zu Immunoliposomen konvertiert, z.B. zu anti-EGFR-Immunoliposomen. Dabei erlauben Antikörper-Fragment-Konjugate – Fab'-Mal-PEG-DSPE; entstanden durch eine kovalente Bindung des Antikörper-Fragments (Fab') an eine Maleimide-(Mal)-Gruppe verbunden mit einem Lipid (PEG-DSPE) – ein einfaches modulartiges Einfügen von Antikörper-Fragmenten in die verschiedensten vorgefertigten Liposomen.



sichtlich, dass nur solche ILs erfolgsversprechend sind, die nach Interaktion mit dem entsprechenden Tumorantigen, eine Internalisierung des gesamten Antikörper-Antigen-Komplexes auslösen. Besonders viel versprechend wurden ILs gegen den Folat- [7] und Transferrin-Rezeptor [8] sowie gegen HER2 [9], welches häufig in Brustkrebszellen exprimiert wird, getestet. Die Entwicklung von anti-HER2-Immunoliposomen ist aktuell am weitesten fortgeschritten. Dabei konnte gezeigt werden, dass diese ILs verschiedene Chemotherapeutika, wie z.B. Anthrazykline (Doxorubicin, Epirubicin) effektiv und spezifisch zu Tumorzellen transportieren können. In verschiedenen Tiermodellen mit HER2-überexprimierenden Brustkrebszellen demonstrierten mit Doxorubicin beladene anti-HER2-ILs eindrucksvoll ihre Überlegenheit mit Heilungsraten von über 50%, während konventionelles liposomales Doxorubicin (Doxil®/Cealyx®) und auch nicht-liposomales (freies) Doxorubicin keine einzige komplette Remission erzielen [10]. Gleichzeitig stieg die maximale tolerierte Dosis (MTD) von Doxorubicin im Mausmodell von 7,5 mg/kg für das (freie) Doxorubicin auf 22,5 mg/kg für das liposomale bzw. immunoliposomale

Doxorubicin. Aktuell wird eine klinische Phase-I-Studie mit Doxorubicin beladenen Anti-HER2-ILs vorbereitet; dies ist der erste klinische Einsatz von Immunoliposomen überhaupt.

EGFR – ein ideales Antigen?

Zelloberflächenrezeptoren mit Tyrosin-Kinase-Aktivität, welche nach Binding eines Liganden den gesamten Komplex, bestehend aus Rezeptor und ILs, internalisieren, stellen besonders erfolgsversprechende Antigene für die Entwicklung von Immunoliposomen dar. Der EGF-Rezeptor (EGFR, HER1) ist der Prototyp der Klasse-I-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), zu denen auch HER2, HER3 und HER4 gehören. Dabei ist der EGF-Rezeptor ein einfach erreichbares Oberflächenantigen, welches oft mit einer schlechten Prognose assoziiert [11] und im Gegensatz zu HER2 in einer Reihe verschiedenster Tumoren zu einem hohen Anteil überexprimiert wird [12].

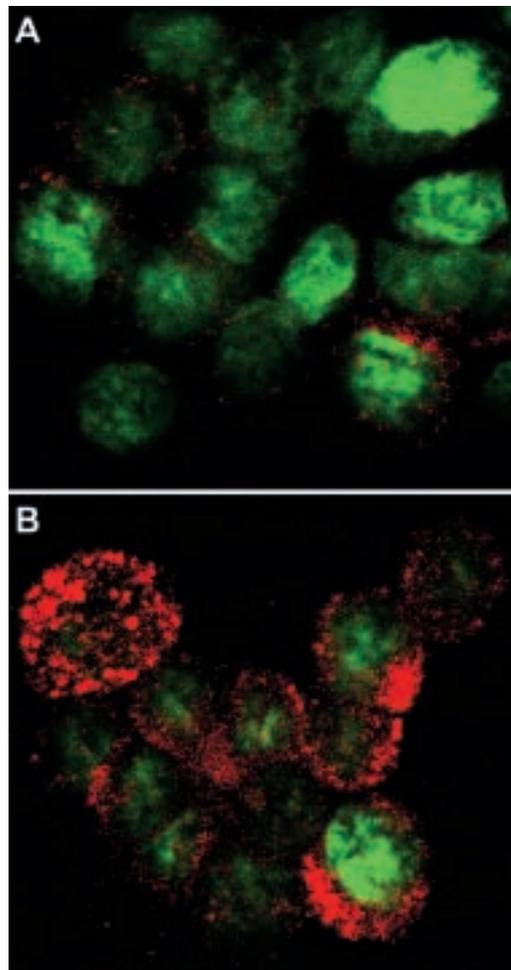
Zusätzlich zu dem «normalen» auf Tumorzellen überexprimierten EGF-Rezeptor wurden bisher noch mindestens sieben verschiedene Mutationsvarianten gefunden. Dabei scheint die Variante III (EGFRvIII), hervorgerufen durch eine Deletion der Exons 2-7, auch klinische Bedeutsamkeit zu besitzen. Diese mutierte Form des EGF-Rezeptors wurde bisher auf Tumorzellen des Mammakarzinoms, nicht-kleinzelligen Bronchuskarzinoms und Glioblastoms nachgewiesen [13]. Erwähnenswert ist, dass diese Rezeptorvariante im Gegensatz zum auch in normalen Geweben nachweisbaren Wildtyp bisher nur auf Tumorzellen gefunden werden konnte und damit eine nahezu ideale Zielstruktur für Immunotherapien darstellt.

Anti-EGFR-Immunoliposomen

Zuletzt gelang die Entwicklung von Immunoliposomen, welche gegen den EGF- und auch EGFvIII-Rezeptor gerichtet sind [14]. Hierzu wurden in unserem Labor Antikörper-Fragmente (Fab') des monoklonalen Antikörpers C225 (Cetuximab, Erbitux™) bzw. so genannte «single chain»-Antikörper aus einer Antikörper-Bibliothek in Zusammenarbeit mit der «University of California at San Francisco (UCSF)» benutzt. Die Antikörper-Fragmente, welche sowohl den EGF- als auch den EGFvIII-Rezeptor erkennen bzw. eine Internalisierung auslösen, werden kovalent an die Liposomen gebunden (20–30 pro Liposom). Dabei konnte gezeigt werden, dass anti-EGFR-ILs einen spezifischen Transport verschiedenster Diagnostika und Therapeutika zu EGFR-überexprimierenden Zellen ermöglichen. Quantifizierungsversuche in vitro haben ergeben,

Abbildung 2.

Gesteigerte Aufnahme von Anti-EGFR-Immunoliposomen im Vergleich zu konventionellen Liposomen. Im Tumor-Maus-Modell werden mit einem roten Farbstoff markierte konventionelle Liposomen bzw. gegen den EGF-Rezeptor gerichtete ILs intravenös injiziert. Nach 24 h werden die EGFR-überexprimierenden Tumoren entnommen, die einzelnen Zellen voneinander getrennt und wiederholt gewaschen. Dabei konnte demonstriert werden, dass unspezifische konventionelle Liposomen nur spärlich von den Tumorzellen aufgenommen werden (A), während anti-EGFR-ILs (B) sich verstärkt nach Aufnahme im Zytoplasma um den Zellkern herum (grün) anreichern.

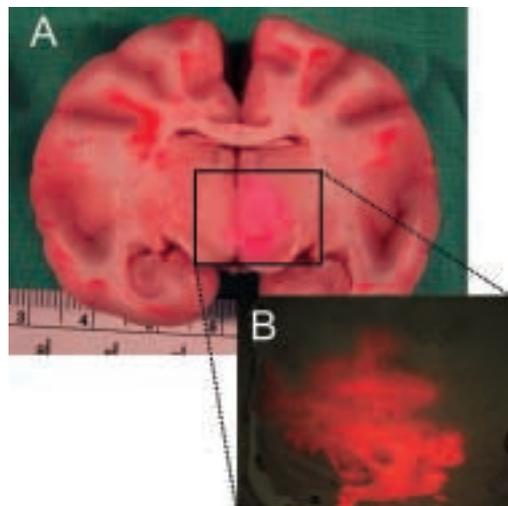


dass bis zu 31 500 ILs je EGFR-überexprimierender Tumorzelle internalisiert werden, während in nicht EGFR-überexprimierenden Tumorzellen weniger als 1000 ILs pro Zelle unspezifisch aufgenommen werden (Abb. 2). Da in jedem einzigen Liposom häufig >10 000 Wirkstoffmoleküle transportiert werden können, ist es nicht verwunderlich, dass anti-EGFR ILs, beladen mit verschiedenen Wirkstoffen wie Doxorubicin, Vinorelbine oder Methetrexat, eine verbesserte Wirksamkeit in EGFR-exprimierenden Tumorzellen zeigten. Die IC_{50} (Konzentration eines Wirkstoffes, bei der die Hälfte der Zellen stirbt) konnte im Vergleich zu konventionellen Liposomen um den Faktor 20–40 reduziert, d.h. verbessert werden. Hingegen zeigten Anti-EGFR-ILs die gleiche limitierte Wirksamkeit wie unspezifische konventionelle Liposomen in EGF-Rezeptor-negativen Tumorzellen.

Diese Daten konnten in Tiermodellen in einer Reihe von EGFR-exprimierenden Tumoren, z.B. MDA-MB-468 (EGFR+++; Mammakarzinom) oder U-87 (EGFR+++; Glioblastoma) bestätigt werden. Dabei sind Anti-EGFR-ILs, beladen mit den Anthrazyklinen Doxorubicin oder Epirubicin, sämtlichen alternativen Therapien (Kontroll-Gruppe, freier Wirkstoff, konventioneller liposomaler Wirkstoff, Ko-Applikation von konventionellem liposomalen Wirkstoff und freiem anti-EGFR Antikörper C225) überlegen. Zusätzlich gelang es in unserem Labor, Substanzen aus zum Teil anderen Wirkstoffklassen wie Vinorelbine, Vincristine oder Irinotecan effizient und stabil in Liposomen zu laden und ebenfalls mittels immunoliposomalen Transportes deren therapeutischen Index (Wirksamkeit) deutlich zu steigern.

Abbildung 3.

Effektiver intrakranieller Transport und extensive Verteilung von Liposomen durch «convection enhanced delivery (CED)». Mit einem roten Farbstoff markierte Liposomen wurden mittels CED direkt in den Hirnstamm von Primaten injiziert. Dabei konnte demonstriert werden, dass bereits kleine Volumina von Liposomen in hoher Konzentration über grosse Areale intrakraniell verteilt werden können. (A) makroskopische Ansicht 30 Minuten nach Injektion der Liposomen; (B) markierter Ausschnitt im Fluoreszenzmikroskop.



Ausblick

Immunoliposomen sind Liposomen der nächsten Generation, welche die positiven Eigenschaften von stabilen und lange in der Blutzirkulation verbleibenden Transportvehikeln auf der einen und den spezifischen Bindungseigenschaften von monoklonalen Antikörpern auf der anderen Seite miteinander verbinden. Ziel der aktuellen Forschung in unserem Labor ist es, Anti-EGFR-ILs soweit zu optimieren, dass Sie klinisch einsetzbar werden; aufgrund der häufigen Überexprimierung dieses Rezeptors auf Tumorzellen wäre diese Strategie bei einer Vielzahl von malignen Tumoren anwendbar.

Neben der Optimierung von Anti-EGFR-ILs für die systemische Therapie (i.v.) werden momentan auch Verfahren zur lokalen Applikation von Liposomen und Immunoliposomen zur Behandlung von Hirntumoren, welche häufig EGFR oder EGFRvIII überexprimieren und bei denen die Bluthirnschranke ein Hindernis sein kann, getestet. Besonders viel versprechend ist dabei eine Technik, welche in der Literatur als «convection enhanced delivery (CED)» beschrieben wird [15, 16]. Im Gegensatz zur konzentrationsabhängigen Diffusion basiert CED auf einen von einer Katheterspitze ausgehenden Druckgradienten mit dessen Hilfe Moleküle durch das Interstitium transportiert werden. Mit diesem lokalen Transportsystem gelingt es, auch Liposomen in hoher Konzentration über grosse Tumorareale zu verteilen (Mamot C, Bankiewicz K. Unpublizierte Daten). Aktuell werden Parameter in Ratten- und Primaten-Modellen mit dem Ziel eines möglichst baldigen klinischen Einsatzes optimiert.

Schliesslich bieten sich immunoliposomale Techniken an, um spezifisch und vor allem effizient therapeutische Gene in Tumorzellen zu transportieren. Dabei werden neuartige kürzlich entwickelte Nanopartikel benutzt, welche DNA in hoher Konzentration aufnehmen können und sowohl in vitro als auch in vivo stabil einsetzbar sind (Hayes M, Hong K. Unpublizierte Daten). Derartige immunoliposomale Vektoren könnten in der Lage sein, bisherige Hauptprobleme der Gentherapie wie Notwendigkeit einer lokalen Applikation wegen Instabilität in der Blutzirkulation oder Sicherheitsrisiken von viralen Vektoren zu lösen.

Danksagung

Diese Forschung wurde unterstützt durch ein Nachwuchsstipendium der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften (SAMW) bzw. des Schweizerischen Nationalfonds (SNF) und durch Förderung der Krebsliga beider Basel. Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Stefan Bilz (Yale University, New Haven, USA) für die vielen konstruktiven und hilfreichen Kommentare.

Literatur

- 1 Lasic DD, Papahadjopoulos D. Liposomes revisited. *Science* 1995;267:1275-6.
- 2 Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999;51:691-743.
- 3 Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:11460-4.
- 4 Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the anti-tumor agent smancs. *Cancer Res* 1986;46: 6387-92.
- 5 Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res* 1995;55:3752-6.
- 6 Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D, Benz CC. Immunoliposomes for cancer treatment. *Adv Pharmacol* 1997;40:399-435.
- 7 Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clin Cancer Res* 2000;6:1949-57.
- 8 Huwylar J, Cerletti A, Fricker G, Eberle AN, Drewe J. By-passing of P-glycoprotein using immunoliposomes. *J Drug Target* 2002;10: 73-9.
- 9 Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, et al. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. *Biochemistry* 1997;36:66-75.
- 10 Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, et al. Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* 2002;8:1172-81.
- 11 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and Cancer Prognosis. *Eur J Cancer* 2001;37:S9-15.
- 12 Mendelsohn J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2001;8:3-9.
- 13 Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, et al. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995;55:3140-8.
- 14 Mamot C, Drummond DC, Greiser U, Hong K, Kirpotin DB, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 2003;63:3154-61.
- 15 Cunningham J, Oiwa Y, Nagy D, Podsakoff G, Colosi P, Bankiewicz KS. Distribution of AAV-TK following intracranial convection-enhanced delivery into rats. *Cell Transplant* 2000;9:585-94.
- 16 Lonser RR, Walbridge S, Garmestani K, Butman JA, Walters HA, et al. Successful and safe perfusion of the primate brainstem: in vivo magnetic resonance imaging of macromolecular distribution during infusion. *J Neurosurg* 2002;97:905-13.