

Die extrazelluläre Inhibition des VEGF-Rezeptors-2 durch Antikörper-ähnliche Peptidmoleküle: Implikationen für die Tumortherapie

Caroline AC Hyde, Kurt Ballmer-Hofer

Paul Scherrer Institut

Hintergrund

Seit geraumer Zeit verspricht sich die experimentelle Krebsforschung erfolgreiche Therapieansätze auf dem Gebiet der Anti-Angiogenese, das heisst der Inhibition der Blutgefässneubildung im Tumorgewebe. Dieses Bestreben ist zurückzuführen auf ein wissenschaftliches Konzept des amerikanischen Forschers Judah Folkman, der aufzeigte, dass Tumore, die eine Grösse von 1 mm³ überschreiten, nicht mehr mit genügend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Folglich bemühen sich Krebswucherungen stets, umgehend Anschluss an neue Blutgefässe zu finden. Aus dieser Erkenntnis heraus liess sich rückschliessen, dass das «Aushungern» von Tumoren durch die Inhibition der Neo-Angiogenese ein möglicher Therapieansatz darstellt. Die Unterbindung solcher Gefässanschlüsse versprach sämtliche Tumore, die für ihr Bestehen von einer Blutversorgung abhängig sind, in ihrem Wachstum zu stoppen.

Der physiologische Prozess der Angiogenese ist hauptsächlich gesteuert von extrazellulären Signalmolekülen, die zwischen Tumor- und Endothelzellen (parakrine Sekretion) in Form von Peptidmolekülen ausgetauscht werden. Im Falle der Blutgefässneubildung sind dies grösstenteils Wachstumsfaktoren, insbesondere das Protein Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), welches an den zellmembrangebundenen VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) bindet. Die Interaktion des VEGF mit seinen Rezeptoren führt zur intrazellulären Aktivierung von Signalwegen, die letztlich zur Teilung, Migration und somit der Vermehrung der umliegenden Endothelzellen und der Bildung neuer Mikrogefässstrukturen führt. Die neue Gefässanbindung gestattet dem Tumor, sich mit den nötigen Stoffen zu versorgen und den Wachstumsprozess zu beschleunigen. Folglich kann das Tumorgewebe in benachbarte, gesunde Gewebestrukturen einwachsen (Invasion) oder sich über die Blutgefässe im restlichen Organismus verbreiten und Metastasen bilden. Des Weiteren kann der Tumor über die Gefässe Botenstoffe entsenden, die zusätzliche Stroma- und Immunzellen in und ums Tumorgewebe herum heranlocken und eine dem Tumorstadium förderliche Tumorumgebung schaffen.

Leider hat der antiangiogene Behandlungsansatz bis heute nur beschränkt klinische Erfolge erzielt [1]. Hierbei sind vor allem die zwei Ansätze der anti-VEGF-Antikörper (Bsp. Avastin®, Roche) und der anti-VEGFR-2-Tyrosinkinaseinhibitoren (Bsp. Nexavar®, Bayer; Votrient®, GlaxoSmithKline) aufzuführen. Beide Ansätze bringen eine Problematik des unspezifischen «Targetings» mit sich. Die Inhibition des VEGF verhindert dessen Interaktion mit sämtlichen Rezeptoren, nicht nur mit VEGFR-2,

und löst dadurch auch die Nebenwirkungen der Behandlung aus. Des Weiteren befindet sich der VEGF-Antikörper konstant im Wettbewerb mit körpereigenen, induzierbaren und regulierbaren Mengen an angiogenem Protein. Die Inhibition des VEGFR-2 mit niedermolekularen Molekülen hat sich hauptsächlich auf die Blockierung der intrazellulären Tyrosinkinase fokussiert. Somit wird eine Rezeptorstruktur angepeilt, die weitgehend identische Sequenzen mit verwandten Rezeptoren (VEGF-Rezeptor-1 und -3 sowie Platelet-derived-Growth-Factor-[PDGF]-Rezeptor) aufweist. Dies führt zur unspezifischen Inhibition verschiedener Signalpfade mit entsprechenden Nebenwirkungen.

Nebst der Signifikanz in der Angiogenese gibt es (zumindest in gewissen Tumoren) Hinweise dafür, dass die Signaltransduktion mittels VEGF über VEGFR-2 auch direkte Konsequenzen auf das Wachstum der Tumorepithelzellen hat (autokrine Sekretion) [2]. Dies betrifft vor allem einige gynäkologische Tumoren, insbesondere das Ovarialkarzinom, wo ein erhöhter VEGF-Spiegel eine grundsätzlich schlechte Prognose darstellt und vermehrt mit der Bildung von malignem Aszites einhergeht [3]. In der Folge gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass Erfolgsresultate der antiangiogenen Behandlung zum Teil nicht auf der Inhibition der umliegenden Blutgefässe, sondern auf dem direkten Effekt auf das Tumorstadium beruhen [2].

Zielsetzung und Hypothese

Wenn man die bisher ernüchternden Therapieerfolge der antiangiogenen Behandlungsansätze betrachtet, drängen sich zwei Fragen auf. Erstens, würde eine spezifischere Ansteuerung des VEGFR-2 bessere Therapieergebnisse erzielen? Und zweitens, was hat die autokrine Sekretion von VEGF in Tumorzellen für die antiangiogene Behandlung zu bedeuten, und ist der Erfolg der Behandlung abhängig vom Tumortyp?

Wir nehmen an, dass eine spezifischere Inhibition von VEGFR-2, die nicht die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne anpeilt oder mit dem körpereigenen VEGF im Wettbewerb steht, eine systemische antiangiogene Therapie mit weniger Nebenwirkungen und grösserer Wirksamkeit ermöglichen würde. Zusätzlich möchten wir mit Hilfe dieser neuen Inhibitoren die Bedeutung der parakrinen versus autokrinen Signalwirkung von VEGF in Tumorzellen gezielter untersuchen. Ein besseres Verständnis der direkten Konsequenzen der Signaltransduktion mittels VEGF über VEGFR-2 auf Tumorstadium und -progression bietet zusätzliche Möglichkeiten für zukünftige Therapieansätze.

Die Autoren erklären, dass sie keine Interessenkonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag haben.

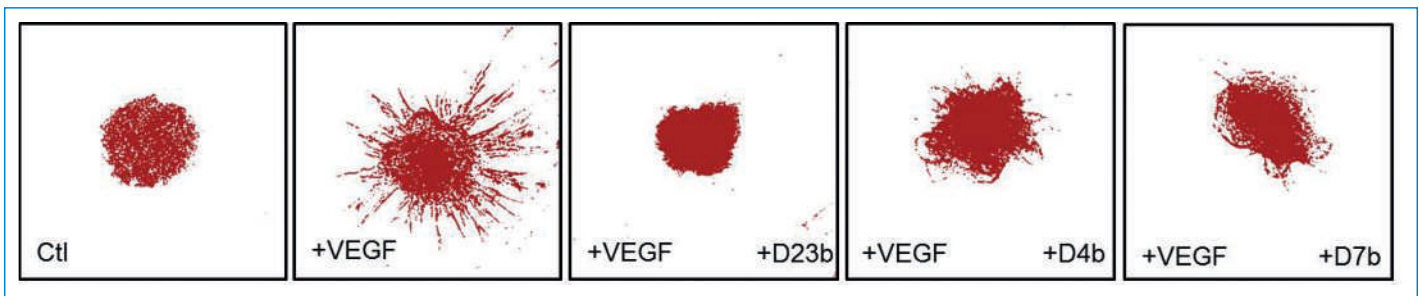


Abbildung 1

Inhibierende Effekte der anti-VEGFR-2-DARPin im Modell der dreidimensionalen mikrovaskulären Angiogenese. Der typisch strahlenförmige Auswuchs von Endothelzellen unter Einfluss von VEGF wird innert 24 Stunden mit der Beigabe von anti-VEGFR-2-Domäne-23-bindenden (D23b), -Domäne-4-bindenden (D4b) und -Domäne-7-bindenden (D7b) Peptidmolekülen markant unterbunden.

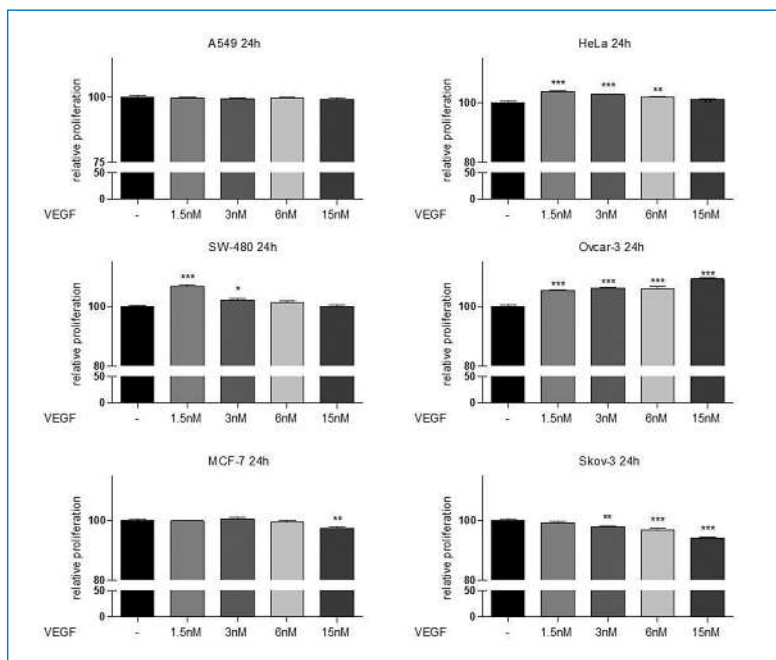


Abbildung 2


Die Rolle des VEGF/VEGF-Rezeptor-2-Signalpfads in verschiedenen Krebszelllinien. Der Einfluss von ansteigenden VEGF-Konzentrationen auf die Proliferationsrate verschiedener Krebszelllinien indiziert Möglichkeiten für die funktionelle Inhibition des Tumorwachstums mittels anti-VEGFR-2-Bindungsmolekülen.

Methodik und wichtigste Ergebnisse


Herstellung neuer Peptidmoleküle

Die extrazelluläre Domäne des VEGFR-2 besteht aus sieben Unterdomänen, D1–D7. Nachdem wir zeigen konnten, dass Mutationen im Bereich der extrazellulären Domäne D4 und D7 des VEGF-Rezeptor-2 eine signifikant reduzierte Kinaseaktivität zur Folge haben, konnten wir Peptidmoleküle herstellen, die an diese Domänen binden. Wir haben erfolgreich mehrere scFv-Fragmente (Substrukturen von Antikörpern) und auch synthetisch hergestellte «designed ankyrin repeat proteins» (DARPin) identifiziert, die den Rezeptor erkennen. Einzelne unserer scFvs wie auch der DARPin waren nachweislich spezifisch für VEGFR-2 – verglichen mit verwandten Rezeptoren – und zeigten eine ausgezeichnete Bindungsaffinität in biochemischen Untersuchungen mittels ELISA, einem antikörperbasierenden Nachweisverfahren [4].

Funktionelle Charakterisierung neuer Inhibitoren in Endothelzellen

In unterschiedlichsten Zellkulturexperimenten *in vitro* mit Endothelzellen der Schweine- und Rinderaorta konnten wir nachweisen, dass diese neuen Bindungsmoleküle eine Inhibition der VEGFR-2-Aktivität zur Folge haben. Darüber hinaus konnten wir in funktionellen Untersuchungen auch eine Inhibition der Proliferation, Migration und Invasion zeigen. Letztlich versuchten wir, die *In-vivo*-Situation der Neo-Angiogenese nachzuempfinden. Durch die Herstellung multizellulärer Sphäroide, die eingebettet in eine Matrixstruktur dreidimensionale Auswüchse bilden, konnte das Spriessen der Mikrovaskulatur modelliert werden [4]. Unter Beigabe von VEGF konnten wir ein ausgeprägtes strahlenförmiges Wachstumsschema feststellen, das unter der zusätzlichen Einwirkung der Inhibitoren stark unterbunden wurde (Abb. 1 )

Funktionelle Charakterisierung neuer Inhibitoren in Tumorzellen

Ähnlich wie bei den Zellkulturversuchen mit Blutendothelzellen wurden funktionelle Untersuchungen in verschiedensten humanen Tumorzellen durchgeführt. Hierfür wurde der Effekt von VEGF mit oder ohne Beigabe der DARPin in Zellen von Lungenkrebs (A549), Dickdarmkrebs (SW-480), Brustkrebs (MCF-7), Ovarialkarzinom (Ovar-3, Skov-3) sowie Zervixkarzinom (HeLa) analysiert (Abb. 2 )

Erste Resultate zeigten eine Aktivierung von tumorwachstumsfördernden Zellsignalpfaden nach Stimulierung mit VEGF sowie einen inhibierenden Effekt der VEGFR-2-Antagonisten, vor allem beim Ovarial- und Zervixkarzinom.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die soweit erzielten Erkenntnisse aus den Zellkulturexperimenten sind verheissungsvoll und sprechen für positive Anwendungsergebnisse in vorklinischen Mausexperimenten. Durch Koppelung der Peptidmoleküle mit Radionuklidn werden wir die Anwendungsmöglichkeiten unserer neuen Moleküle in nichtinvasiven bildgebenden Verfahren testen und mittels Kleintier-Single-Photon-Emission-Computed-Tomography (SPECT) untersuchen. Hierfür wird die Pharmakokinetik des intravenös verabreichten, radionuklidhaltigen Peptids in Tumormausmodellen analysiert. Moleküle mit vorteilhafter Organverteilung und minimaler Toxizität werden anschliessend

als Tumorthapeutikum in der Maus getestet. Hierfür bietet sich zudem eine Kombinationsbehandlung mit einem Chemotherapeutikum aus der Taxan-Gruppe an (Paclitaxel), zumal der VEGF-Signalpfad an der Ausbildung der Mikrotubuli beteiligt ist, deren Abbau durch die Bindung von Paclitaxel an β -Tubulin gestört wird [5]. Abschliessend ist zu vermerken, dass wir einen neuen molekularen Wirkungsmechanismus der extrazellulären Domäne des VEGFR-2 aufdecken konnten und dass die von uns hergestellten antikörperähnlichen Peptidmoleküle Anwärter für die klinische Anwendung auf dem Gebiet der bildgebenden Diagnostik und der Tumorthherapie darstellen.

Verdankung

Wir danken unseren Kollaborationspartnern Molecular Partners AG, Schlieren, für die Gewinnung der DARPs, Prof. Dr. Dario Neri, ETH Zürich, für die Benutzung der ETH-2 Gold Library zur Herstellung der scFvs, sowie dem Center of Radiopharmaceutical Sciences (PSI/ETHZ/USZ) für die geplante Zusammenarbeit hinsichtlich der vorklinischen Studien. Ferner verweisen wir auf die finanzielle Unterstützung der folgenden Institutionen: Marie Heim-Vögtlin Beitrag des SNF (SNF PM-CDP3_134208); SNF (310031-130463); Krebsforschung Schweiz (KFS-2895-02-2012); Oncosuisse (OC2 01200-08-2007) und Novartis Stiftung für medizinisch-biologische Forschung (10C61).

Korrespondenz:

Caroline Hyde
Paul Scherrer Institut
Laboratory of Biomolecular Research
OFLG/124
CH-5232 Villigen-PSI
[caroline.hyde\[at\]psi.ch](mailto:caroline.hyde[at]psi.ch)

Literatur

- 1 Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, et al. 2009. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell*. 2009;15(3):220–31.
- 2 Kerbel R. Anti-angiogenesis in cancer; met and unmet goals – an interview with Robert Kerbel by Francesco Bertolini. *Int J Dev Biol*. 2011;55(4–5):395–8.
- 3 Färkkilä A, Anttonen MT, Pociuviene J, Leminen A, Butzow R, Heikinheimo M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 are highly expressed in ovarian granulosa cell tumors. *European Journal of Endocrinology*. 2011 164(1):115–22.
- 4 Hyde CAC, Giese A, Stüttfeld E, Abram Saliba J, Villemagne D, Schleier T, et al. Targeting extracellular domains D4 and D7 of vascular endothelial growth factor receptor 2 reveals allosteric receptor regulatory sites. *MCB*. 2012;32(19):3802–13.
- 5 Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:253–65.

Weiterführende Literatur

- Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara N. Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Research*. 1996;56(17):4032–9.
- Stüttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life*. 2009;61(9):915–22.