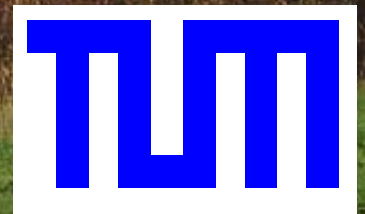


Wie ein Krebsmedikament entsteht

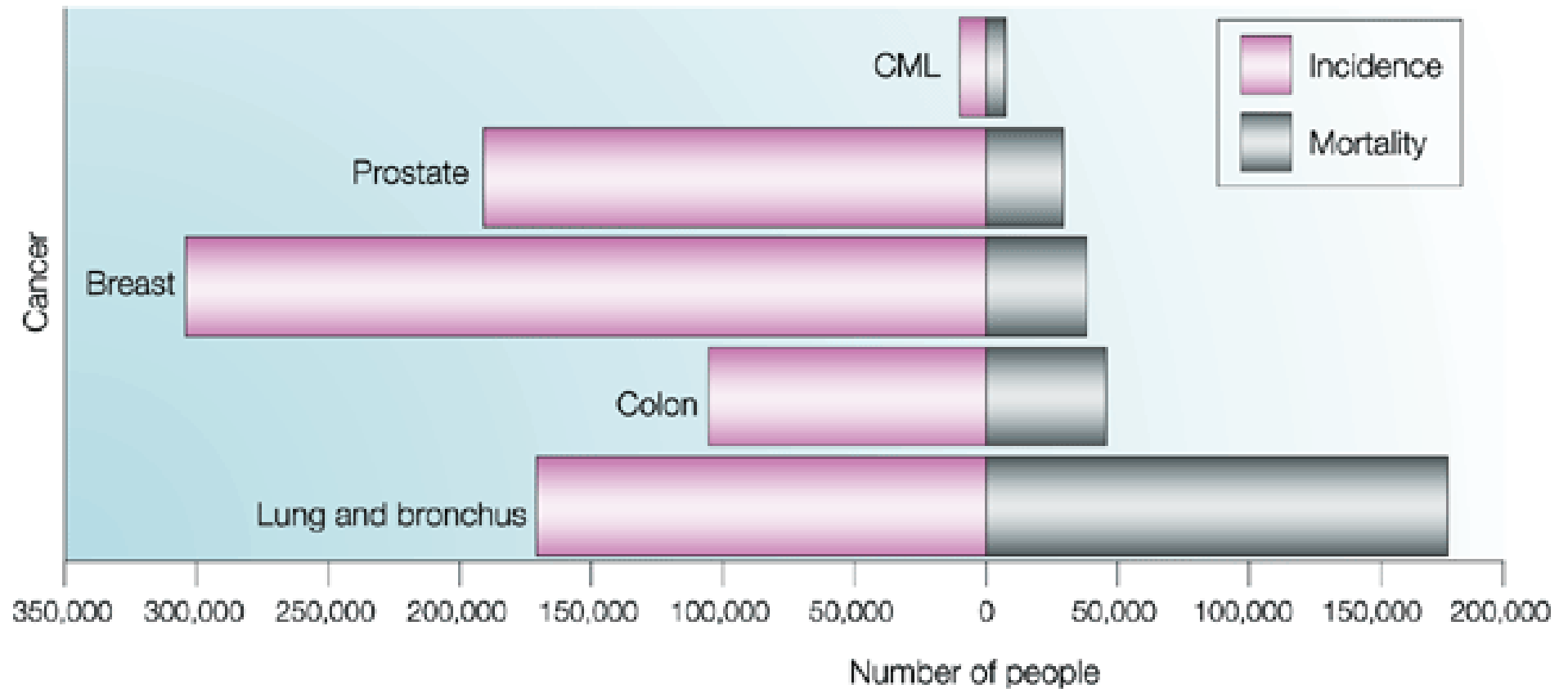
15. Juni 2010



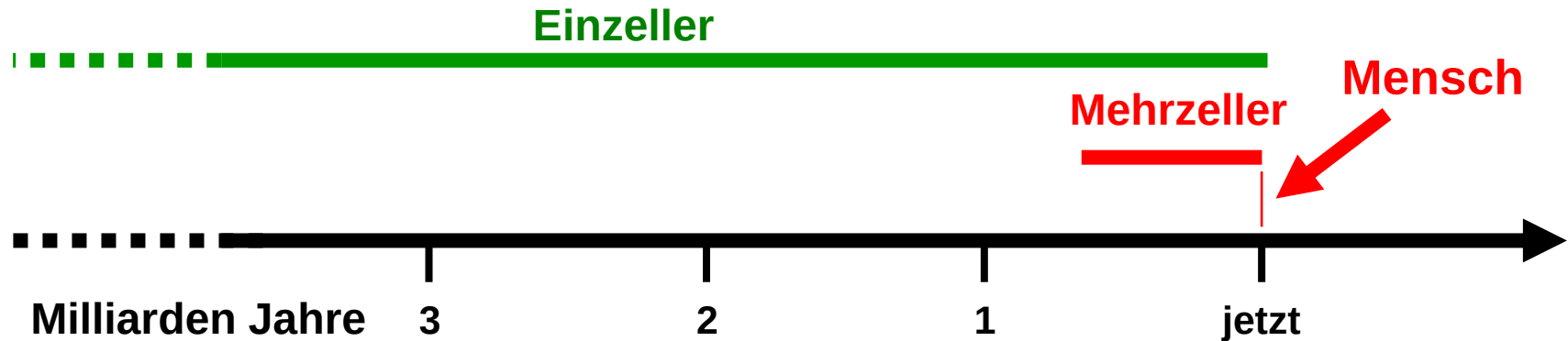
Horst Kessler



Krebs (Häufigkeit und Mortalität)



Evolution des Lebens auf der Erde



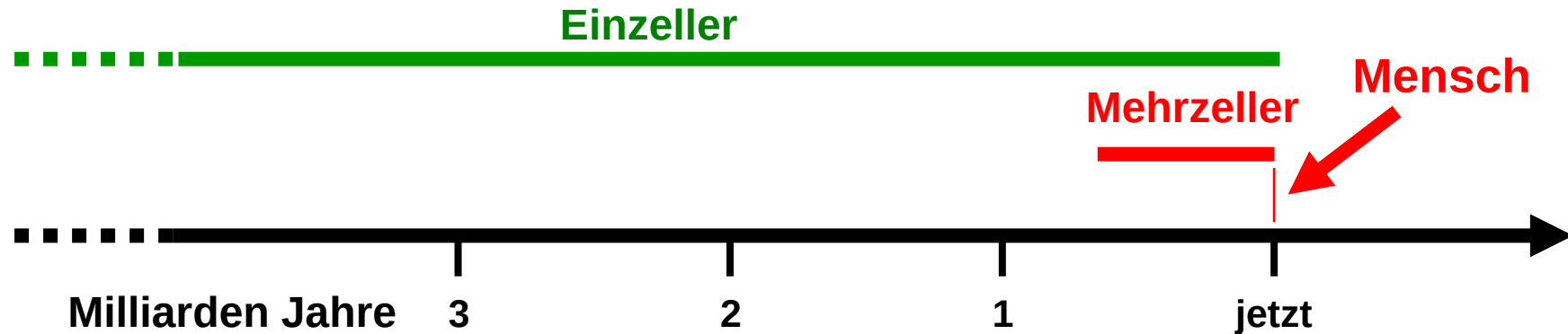
Menschen gibt es erst seit ca. 400 000 Jahren.

Das entspricht etwa 10 Sekunden, wenn die Entwicklung des Lebens auf einen Tag gerechnet wird.

Die Venus von Willendorf, eine der ältesten Skulpturen der Menschheit (ca. 25 000 Jahre alt) entstand weniger als eine Sekunde vor der Gegenwart!



Evolution des Lebens auf der Erde



Höhere Organismen
brauchen:

Zellsignale

Signalweiterleitung

Apoptose (gezielter Zelltod)



Erkennung und
Regulation der
Anheftung von
Zellen
(Nachbarschaft)

Krebs gibt es nur bei höheren Organismen!

Die Evolution des Lebens begann vor ca. 4 Milliarden Jahren. Erst vor weniger als einer Milliarde Jahren traten erstmals Mehrzeller (höhere Lebewesen) auf.

Warum ist das so?

Es mussten erst viele neue „Entdeckungen“ gemacht werden:

Das Wachstum der Zellen muss durch die Umgebung kontrolliert werden.

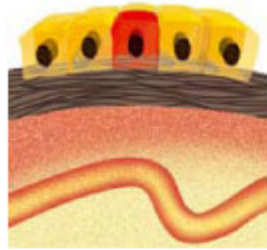
Zelltod (gezieltes Absterben; Apoptose)

Die Zellen müssen miteinander kommunizieren können.

Die Zellen müssen gewebespezifisch sein (Reifung)

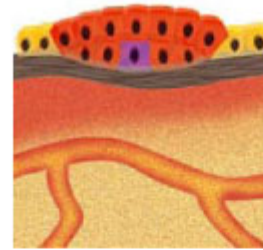
Schrittweise Entwicklung eines bösartigen Tumors

1



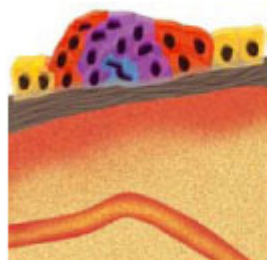
Zelle mit Neigung zur Vermehrung

2



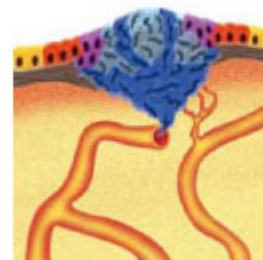
unkontrolliertes Wachstum (Geschwulst)

3



einige Zellen wandern aus, bilden (Metastasen)

4



Krebs durchdringt Gewebebarrieren

Charakteristika von Krebs

Wachstum

Apoptose =
natürlicher
Zelltod

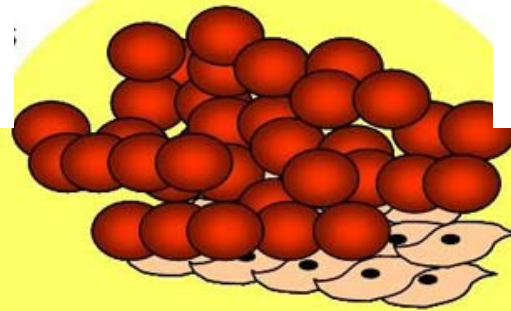
+

der Apoptose
entkommen

eigenes Wachstum

Ⓜ

keine Verhinderung
des Wachstum



Krebszellen

Angiogenese

∞

grenzenlose
Vermehrung

Angiogenese
= Bildung
neuer
Blutgefäße

Eindringen in
fremdes Gewebe

genetische
Instabilität

Zellwachstum

Da sich alle Zellen aus einer einzigen Stammzelle entwickeln, müssen sie „reifen“ und sich durch Differenzierung in die einzelnen Gewebezellen entwickeln

Die Teilungsfähigkeit reifer Zellen ist begrenzt (maximal ca. 60 mal teilungsfähig) **Nobelpreis Medizin 2009**

Unbegrenztes Zellwachstum, wie es auftritt, ist eine Entartung. ☹️



Entartungen können immer auftreten
gibt es jeden Tag in jeder Körperzelle ca. eine Millionen
DNA Strangbrüche



Es gibt zum Glück ein Protein (**p53**), das diese Strangbrüche erkennt und die weitere Vermehrung der Zellen anhält, bis alles repariert ist oder die Zelle in den Tod (Apoptose) schickt.

DNA Langzeitspeicher



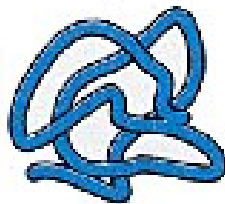
**Vermehrung
(Proliferation)**

Transkription

RNA



Translation

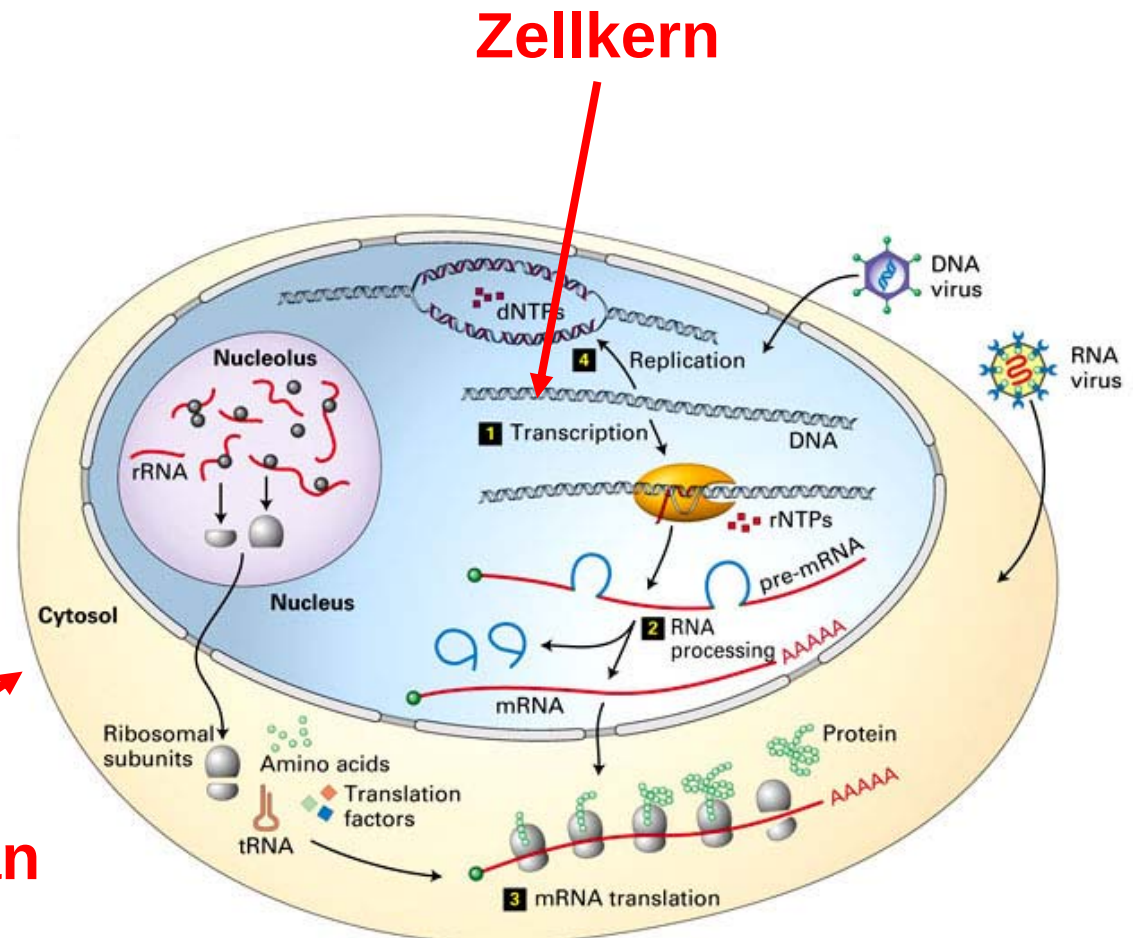


Protein

**Funktion
"Arbeitspferd"**

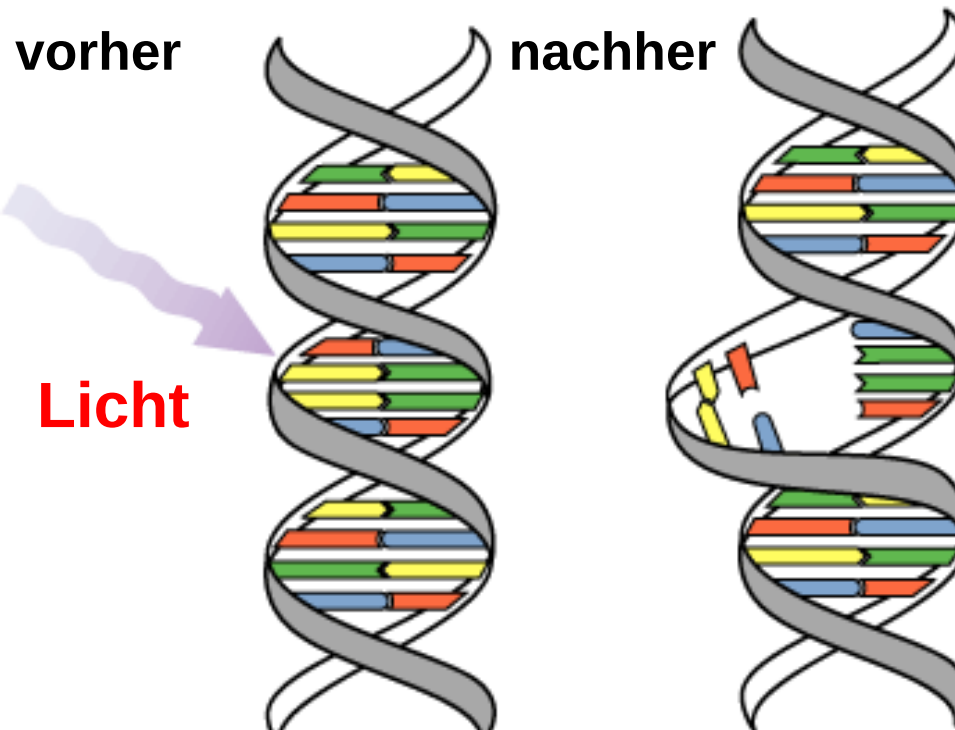
Zellmembran

etwas Biologie



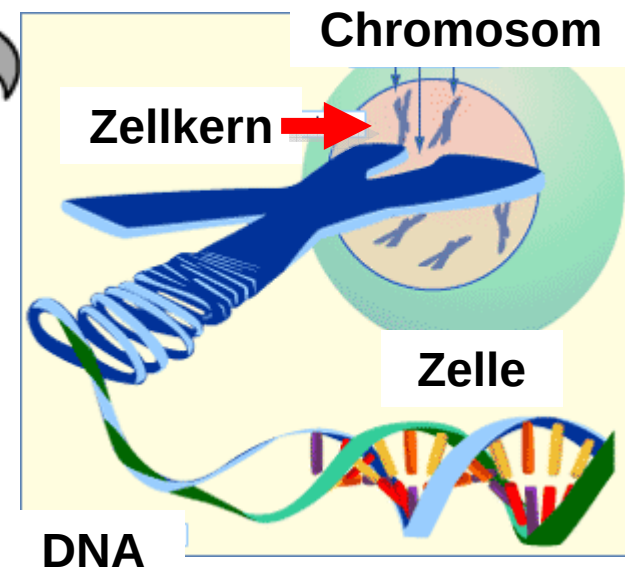
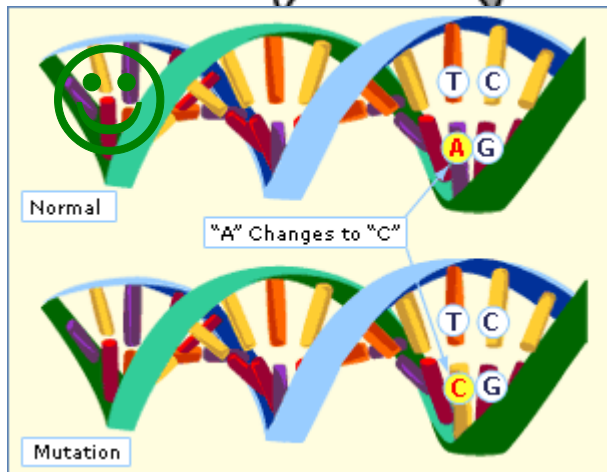
im Mensch: 3×10^9 Basen (je 1 cm dann reicht es ein mal um die Erde)

Mutation



Es gibt jeden Tag in jeder Körperzelle ca. eine Millionen DNA Strangbrüche ☹️

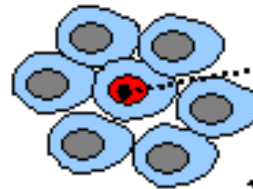
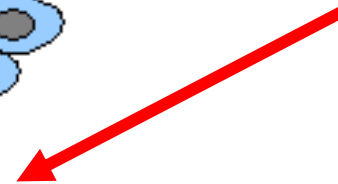
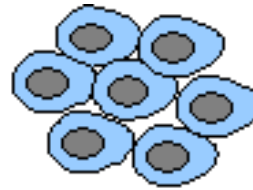
Also: es muss ständig repariert werden, sonst wären wir alle tot. 😊



Entstehung von Krebs



Schädigung durch Strahlen
oder Chemikalien (auch
„natürliche“ Stoffe)

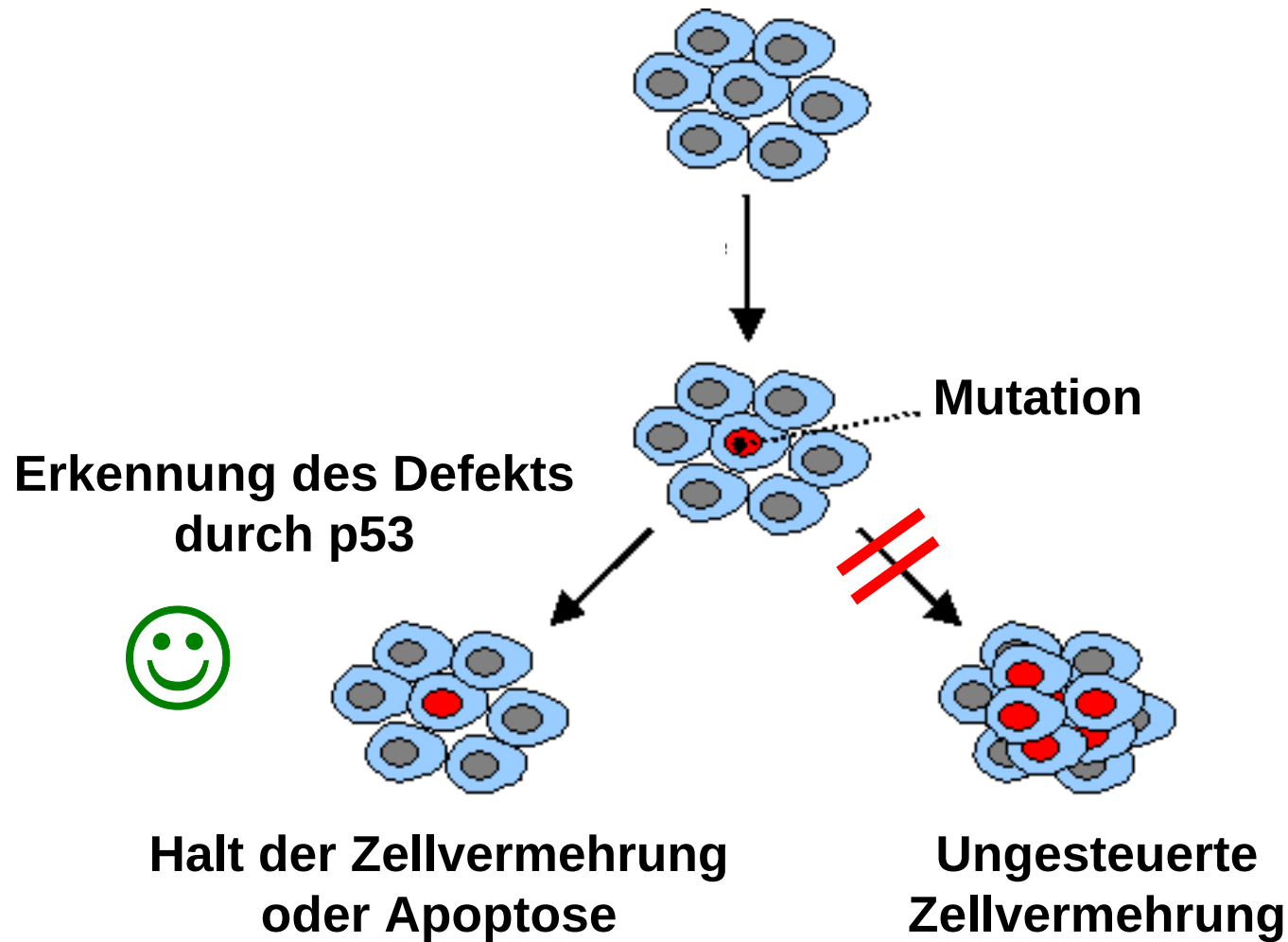


Mutation

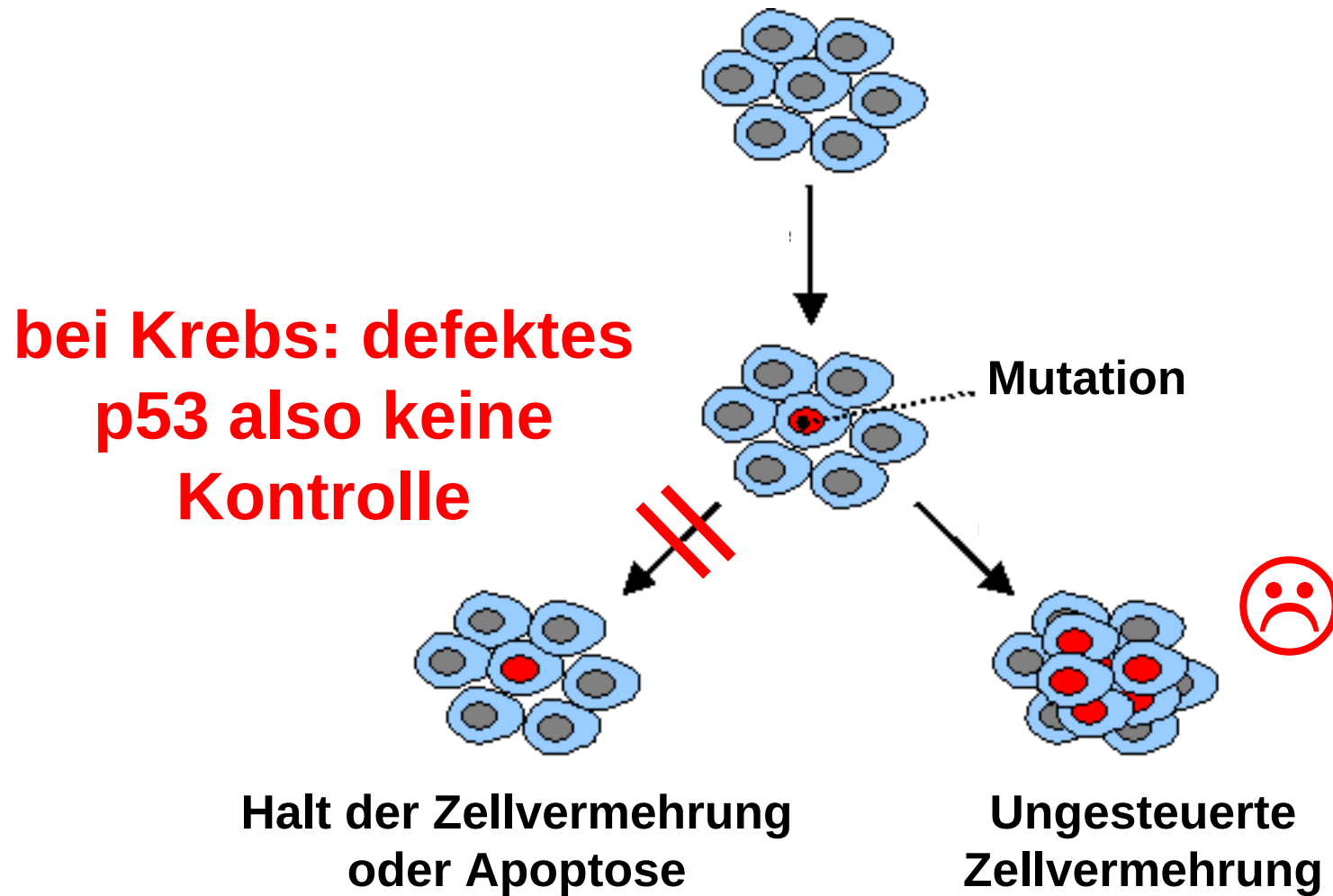


Ungesteuerte
Zellvermehrung

p53 der „Wächter des Genoms“



p53 der „Wächter des Genoms“



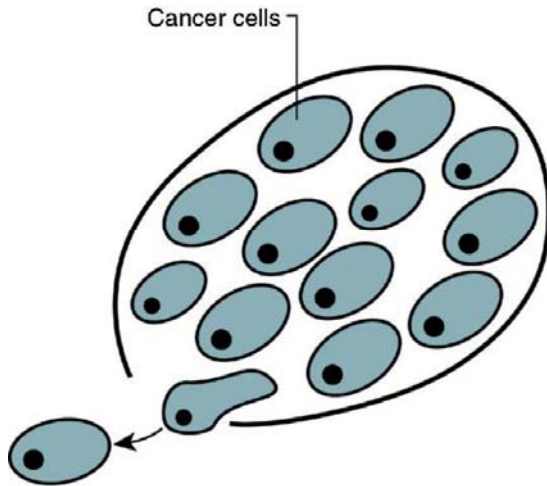
Probleme in der Krebstherapie

Es gibt sehr viele **verschiedene Krebsarten** (je nach Klassifizierung über 100)

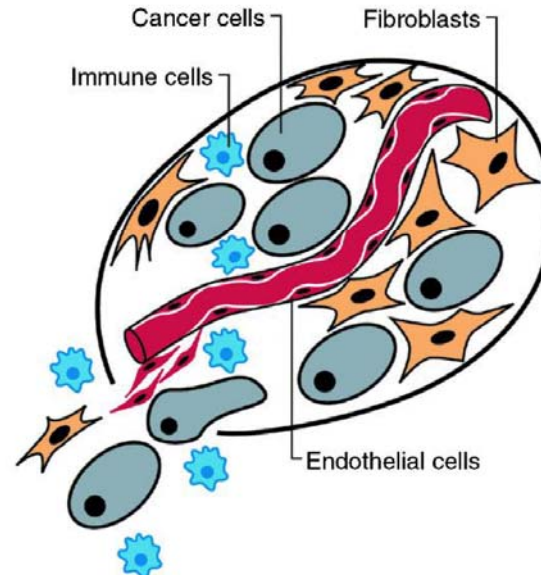
Krebszellen durchziehen das natürliche Gewebe

Innerhalb eines Krebses gibt es verschiedene Zelltypen (Heterogenität)

The Reductionist View



A Heterotypic Cell Biology



Probleme in der Krebstherapie

Es gibt sehr viele **verschiedene Krebsarten** (je nach Klassifizierung über 100)

Krebszellen durchziehen das natürliche Gewebe

Innerhalb eines Krebses gibt es verschiedene Zelltypen (Heterogenität)

Krebszellen mutieren sehr schnell und entkommen damit meist der Chemotherapie

Wegen der hohen Mutationsraten können sich Transportsysteme entwickeln, die die toxischen Krebsmedikamente aus dem Krebs herausschleusen (Resistenz)

Probleme in der Krebstherapie

Es gibt sehr viele **verschiedene Krebsarten** (je nach Klassifizierung über 100)

Krebszellen durchziehen das natürliche Gewebe

Innerhalb eines Krebses gibt es verschiedene Zelltypen (Heterogenität)

Krebszellen mutieren sehr schnell und entkommen damit meist der Chemotherapie (p53 ist kaputt!) 

Wegen der hohen Mutationsraten können sich Transportsysteme entwickeln, die die toxischen Krebsmedikamente aus dem Krebs herausschleusen (Resistenz) **(vergleichbar der Resistenz von Bakterien gegen Antibiotika)**



Charakteristika von Krebs

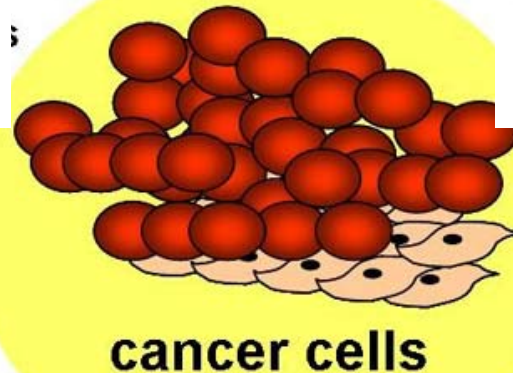
Apoptose =
natürlicher
Zelltod

+
der Apoptose
entkommen


Angiogenese

Angiogenese
= Bildung
neuer
Blutgefäße


eigenes Wachstum




Eindringen in
fremdes Gewebe


genetische
Instabilität


keine Verhinderung
des Wachstum


grenzenlose
Vermehrung

**klassische
Chemotherapie:**
alle wachsenden
Zellen werden
getötet

**Haarausfall
Darmprobleme
Geschlechtszellen**

Wie tötet man Krebszellen ohne gesunde Zellen zu treffen?

1. Selektive Toxizität

Arzneimittel, die auf Tumorzellen einen stärker wachstumshemmenden Einfluss haben als auf normale Zellen

Imatinib (Gleevec®)

2. Gezielter Transport zur Krebszelle

Stoffe, die spezifisch mit Molekülen reagieren, die beim Krebs verstärkt vorhanden sind

*Antikörper,
peptidische Hormone
Integrin-Liganden*

3. Angiogenese (Bildung neuer Blutgefäße)

Nutzt die abnormale Gefäßstruktur der Tumoren

*Bevacizumab (Avastin®),
RGD Peptide
In Liposomen verkapselte
Arzneimittel*

Eine Naturstoff ist noch lange kein Arzneimittel



Natur

Multidimensionale
Optimierung

Mehrere (verschiedene)
Rezeptoren

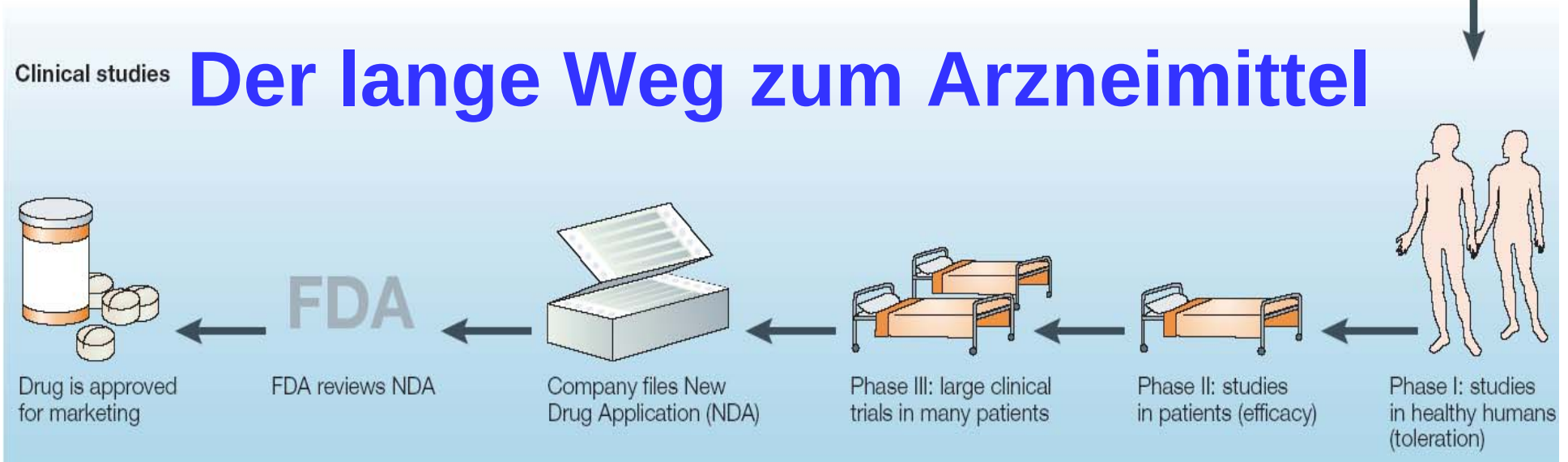
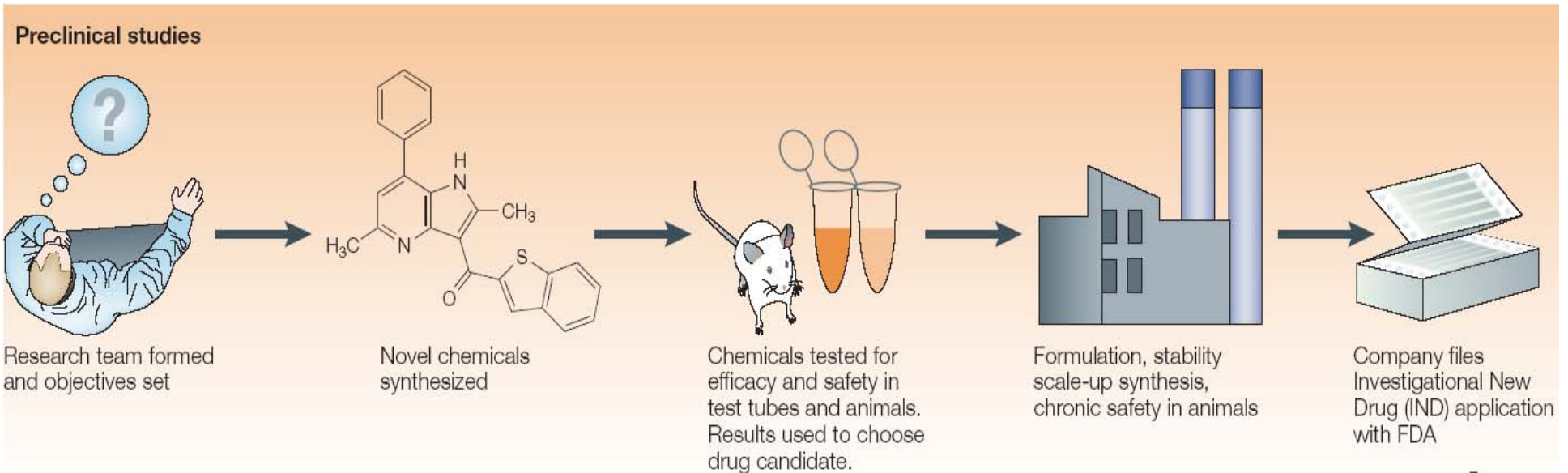
Lokale und zeitliche
Verteilung



Medizinischer Chemiker

- Optimierung für ein
ausgesuchtes Zielmolekül
- Spezifität
- Stabilität
- Super-Aktivität

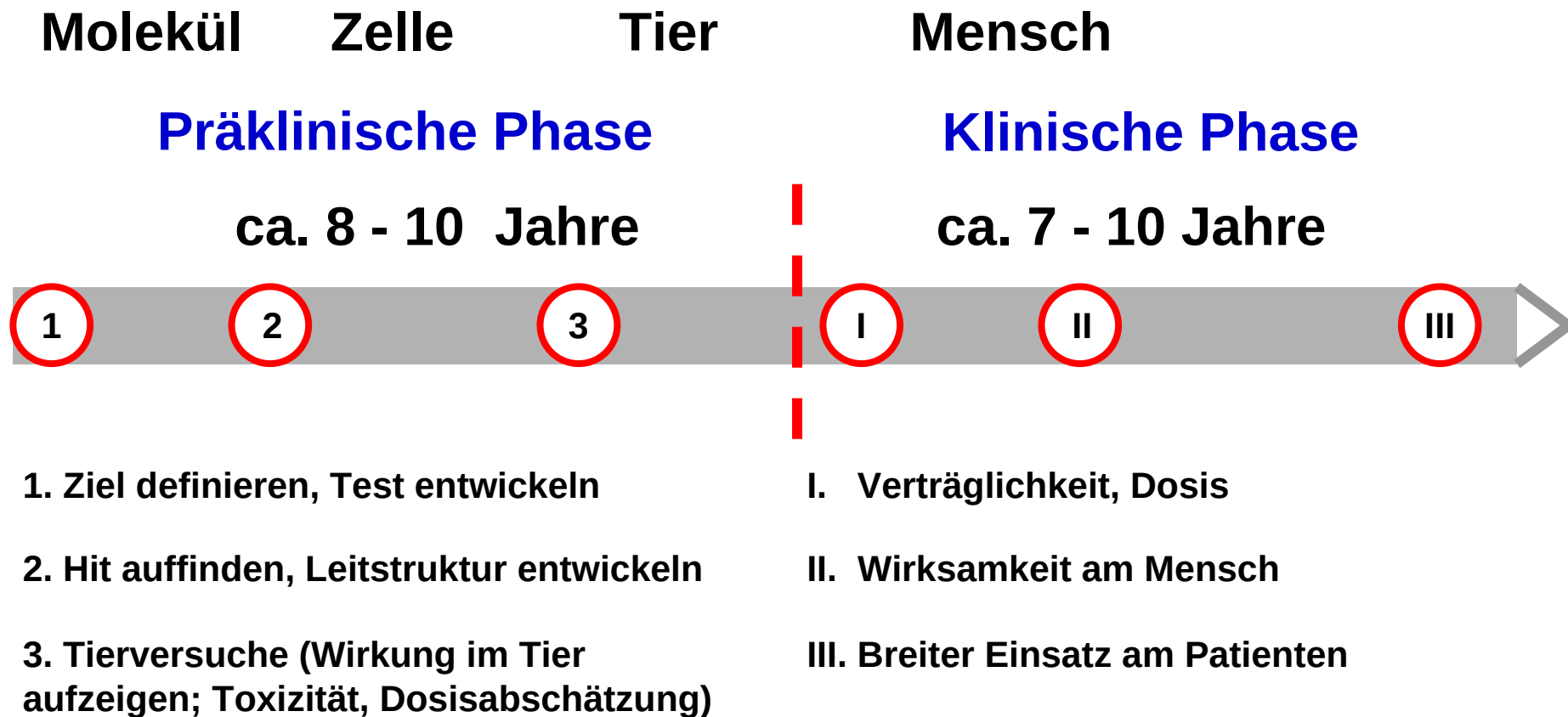
Präklinik



Zulassung

Klinik

Der Weg von der Theorie zum Arzneimittel



Im Durchschnitt arbeiten Forscher 10-15 Jahre an der Entwicklung eines neuen Wirkstoffes, der einmal ein Arzneimittel werden könnte – aber noch nicht ist

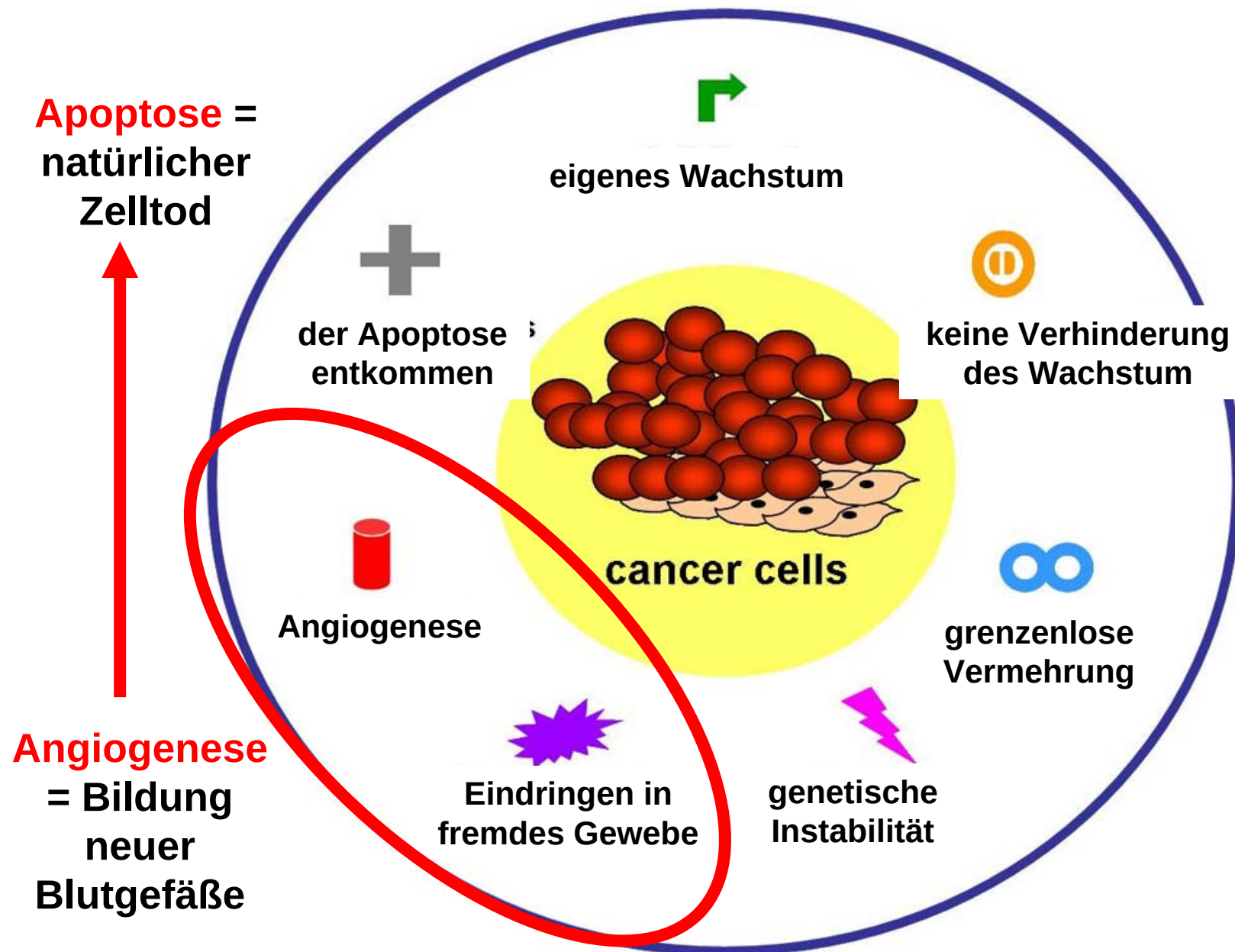
Die Forschungs- und Entwicklungskosten betragen derzeit etwa 1 Milliarde € pro Medikament

Nur zwei von 10 vermarkteten Arzneimitteln bringen die Kosten wieder ein, bzw. bringen mehr Verdienst als Forschungs- und Entwicklungskosten.

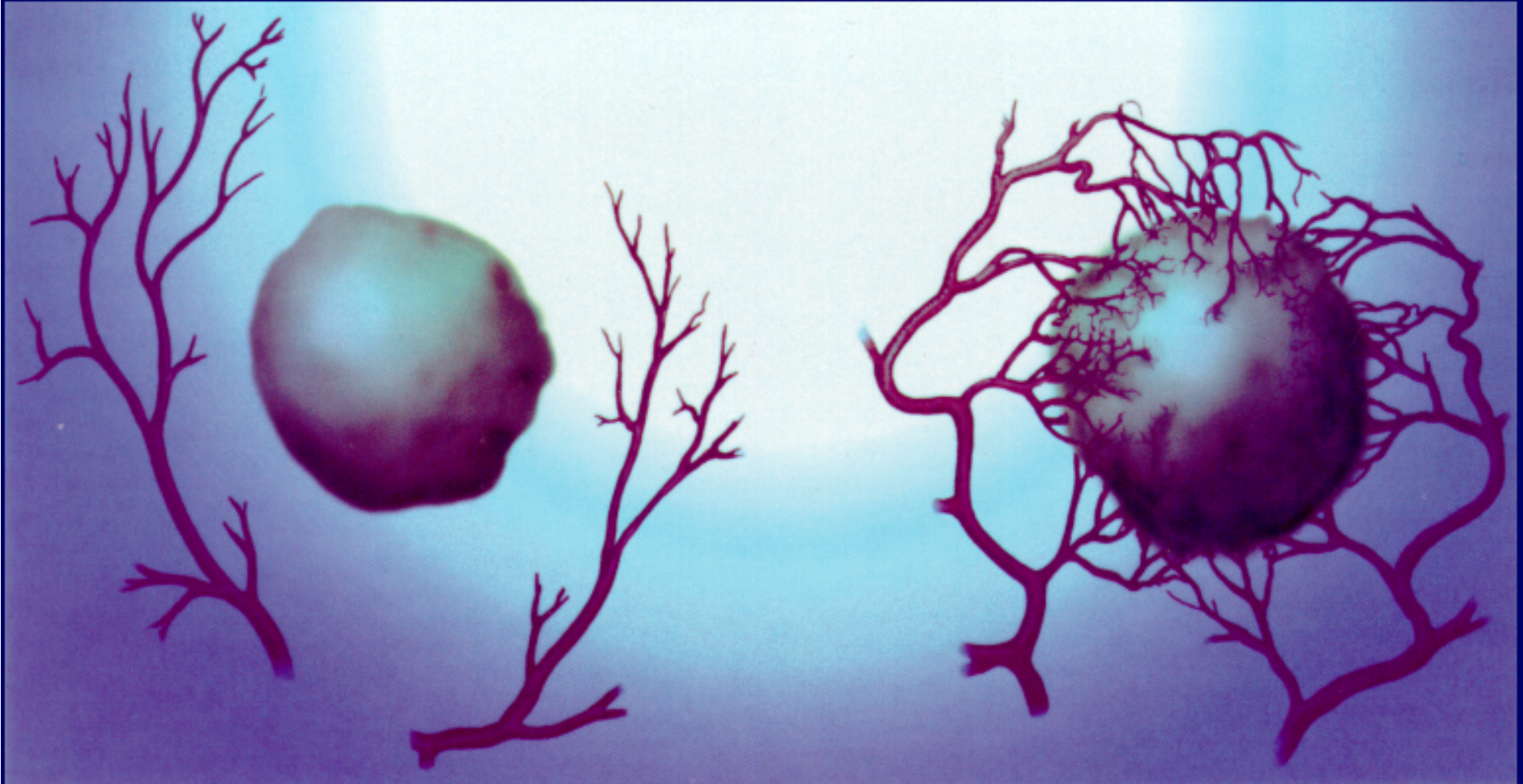
Die Pharmazeutische Industrie hat zunehmende Herausforderungen bei der Entwicklung eines neuen Medikamentes zu bewältigen.

Die Zahl neuer Medikamente pro Jahr ist dramatisch gesunken (derzeit unter 18/Jahr).

Charakteristika von Krebs



Tumor-assoziierte Angiogenese



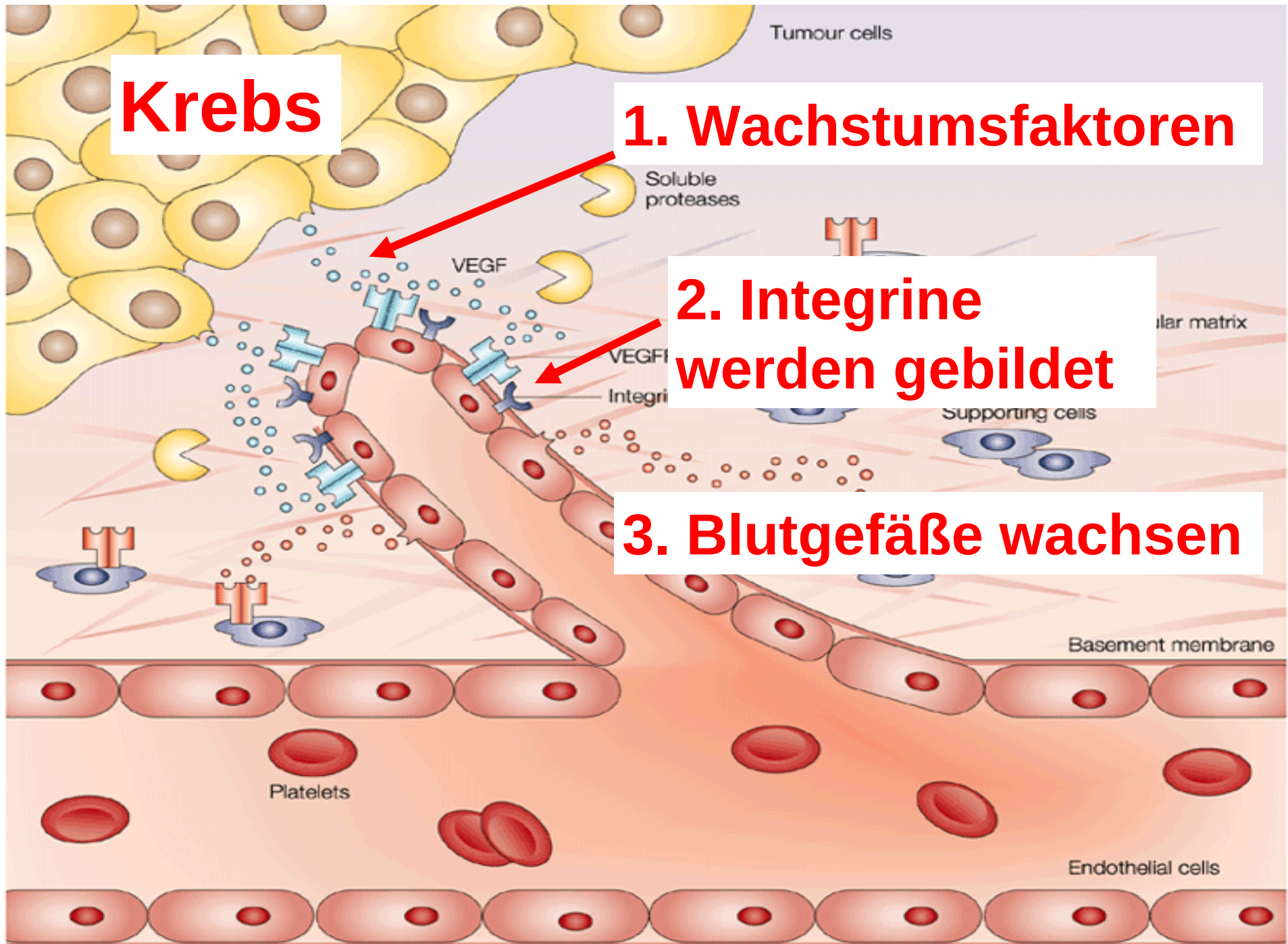
P.-A. Magnin, D. Christie, *Human Frontier* 1998, 8-10.

Krebs

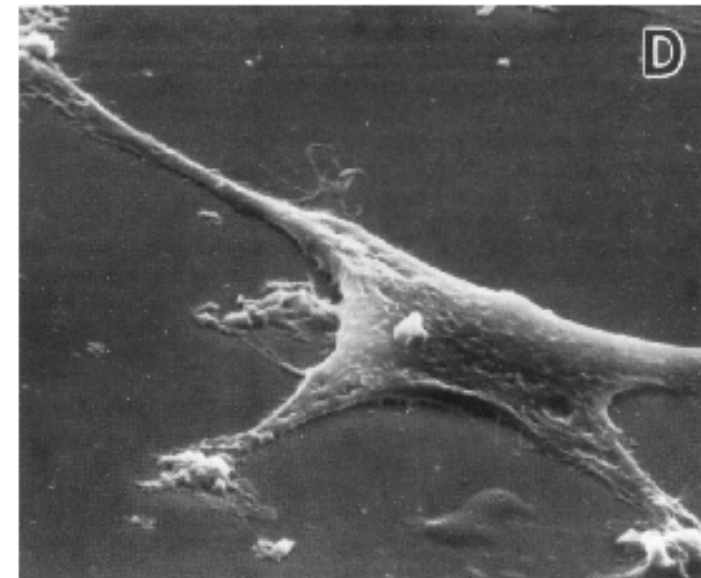
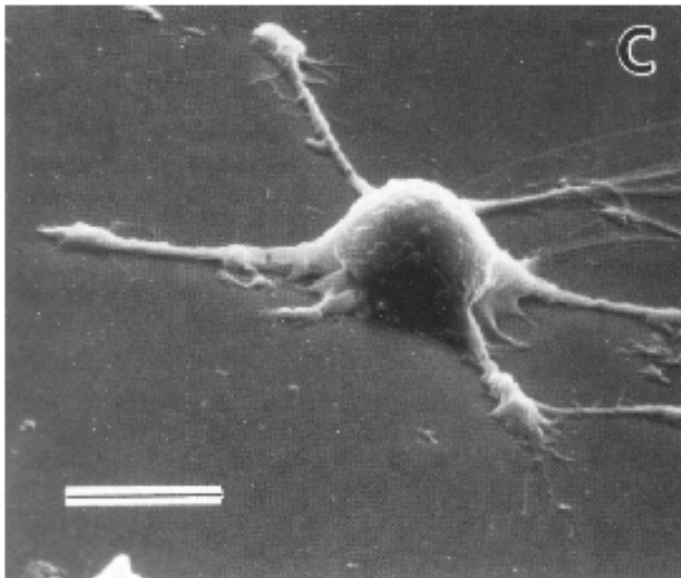
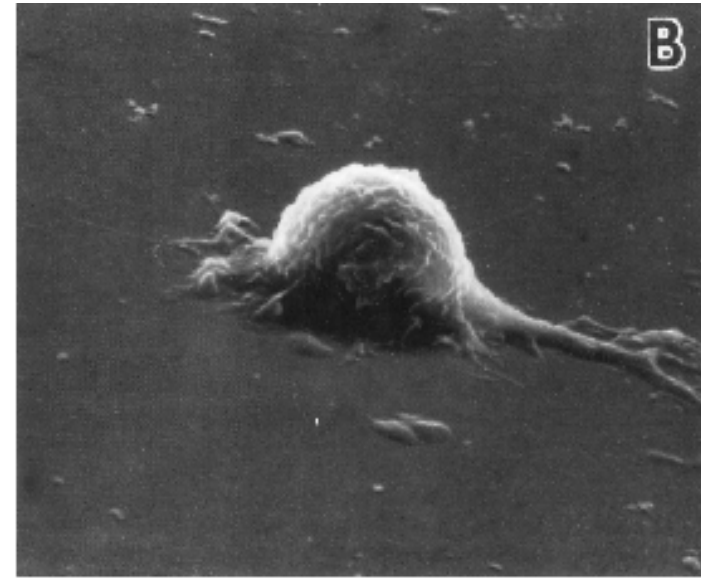
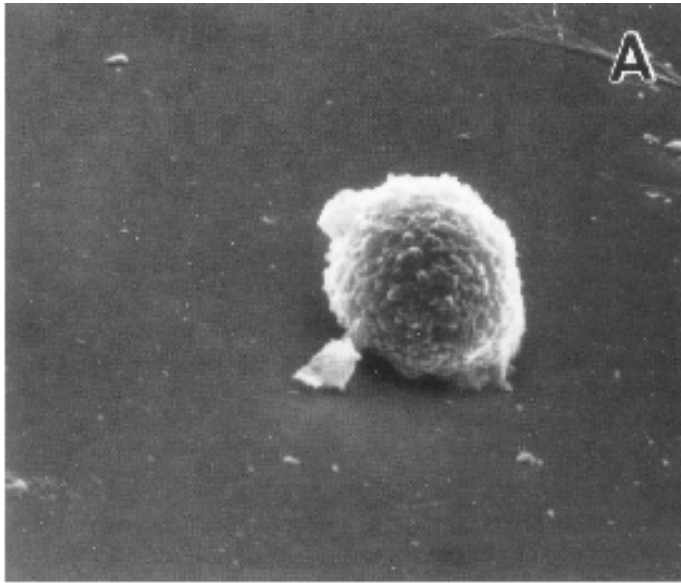
1. Wachstumsfaktoren

2. Integrine werden gebildet

3. Blutgefäße wachsen



Zelladhäsion: Keine Adhäsion → Apoptose



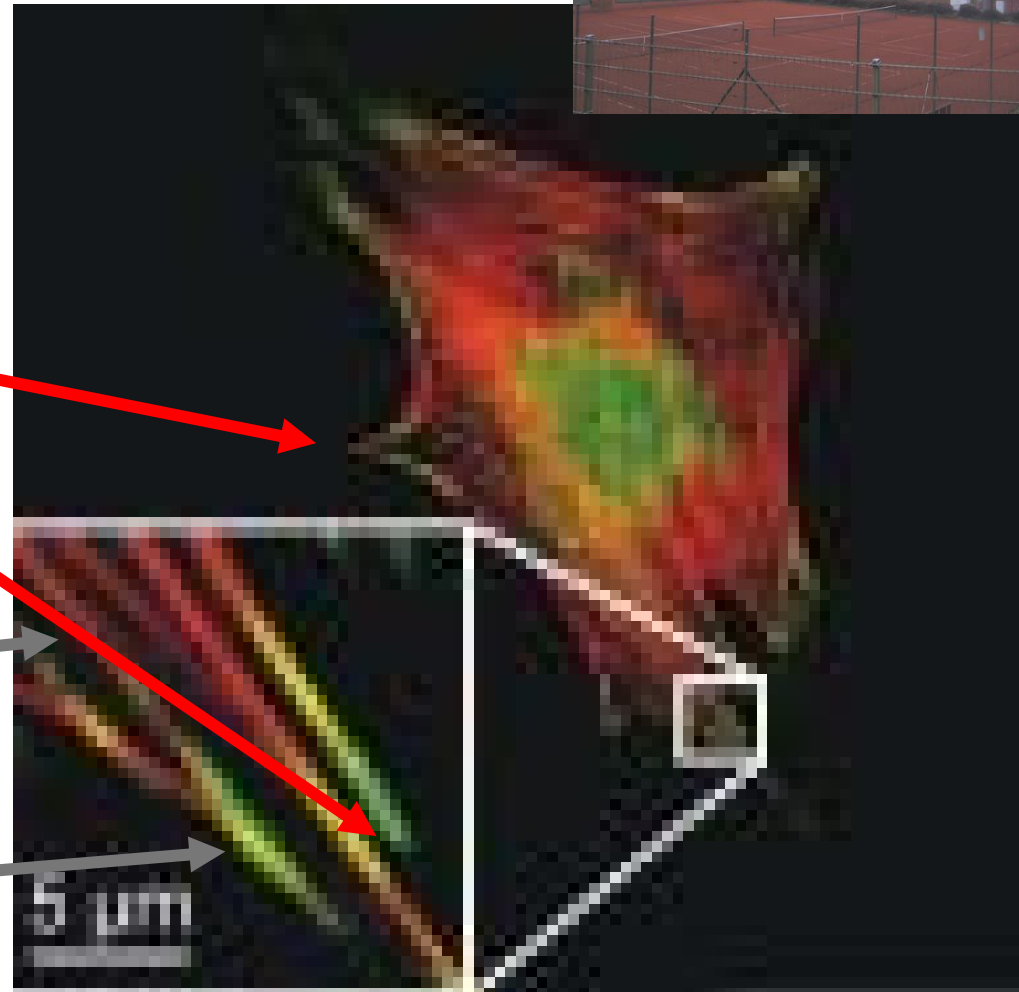
Die Zellen hängen an fokalen Adhäsionspunkten wie das Münchner Olympiastadion



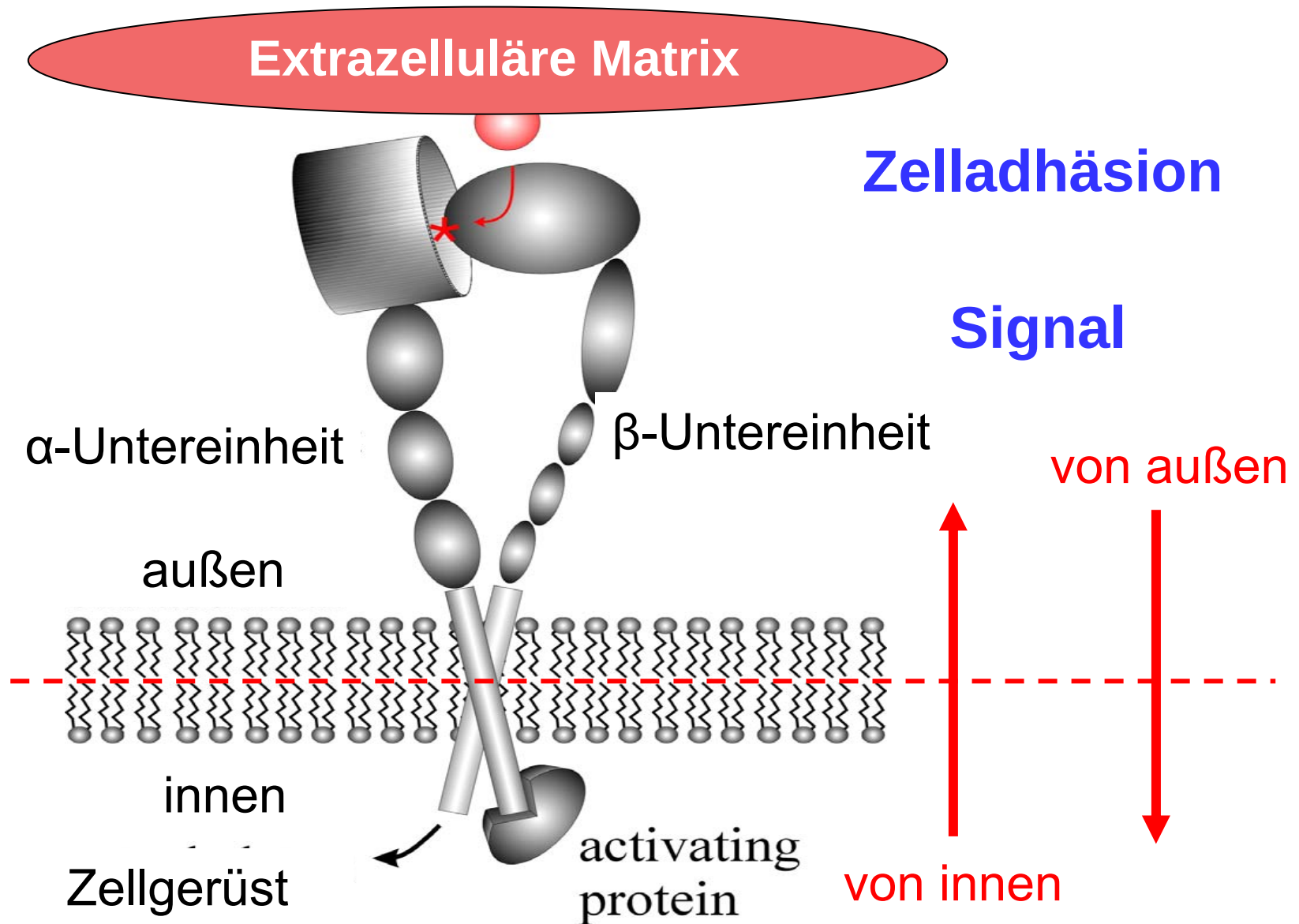
In den fokalen Adhäsionspunkten sind Integrine zu finden

Actin

Vinculin

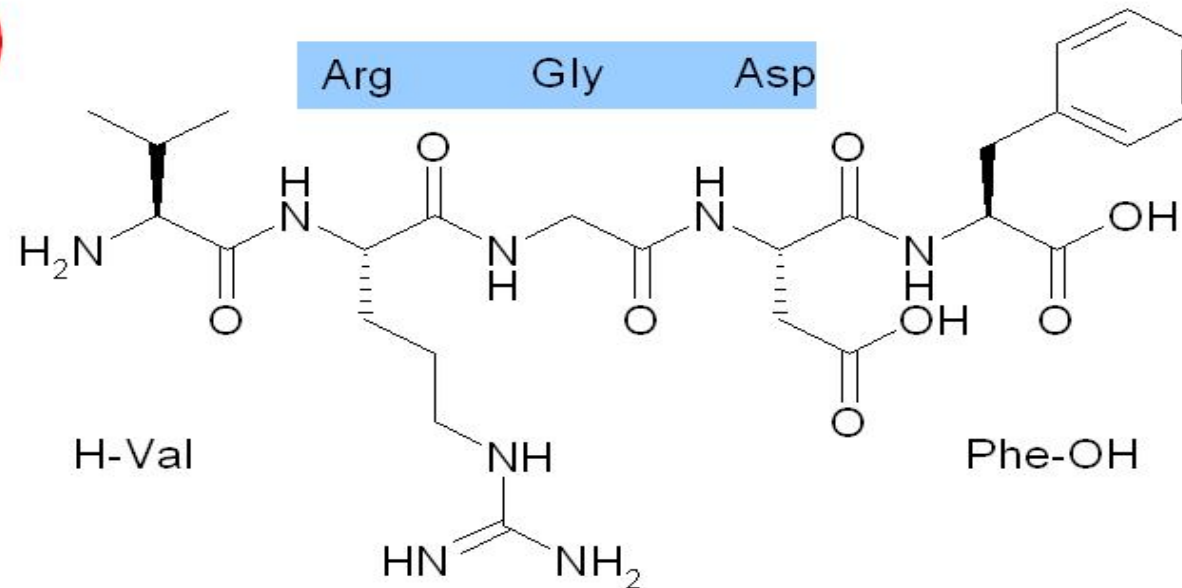


Integrine sind bidirektionale Adhäsionsrezeptoren



Das RGD-Motiv als Erkennungssequenz

RGD



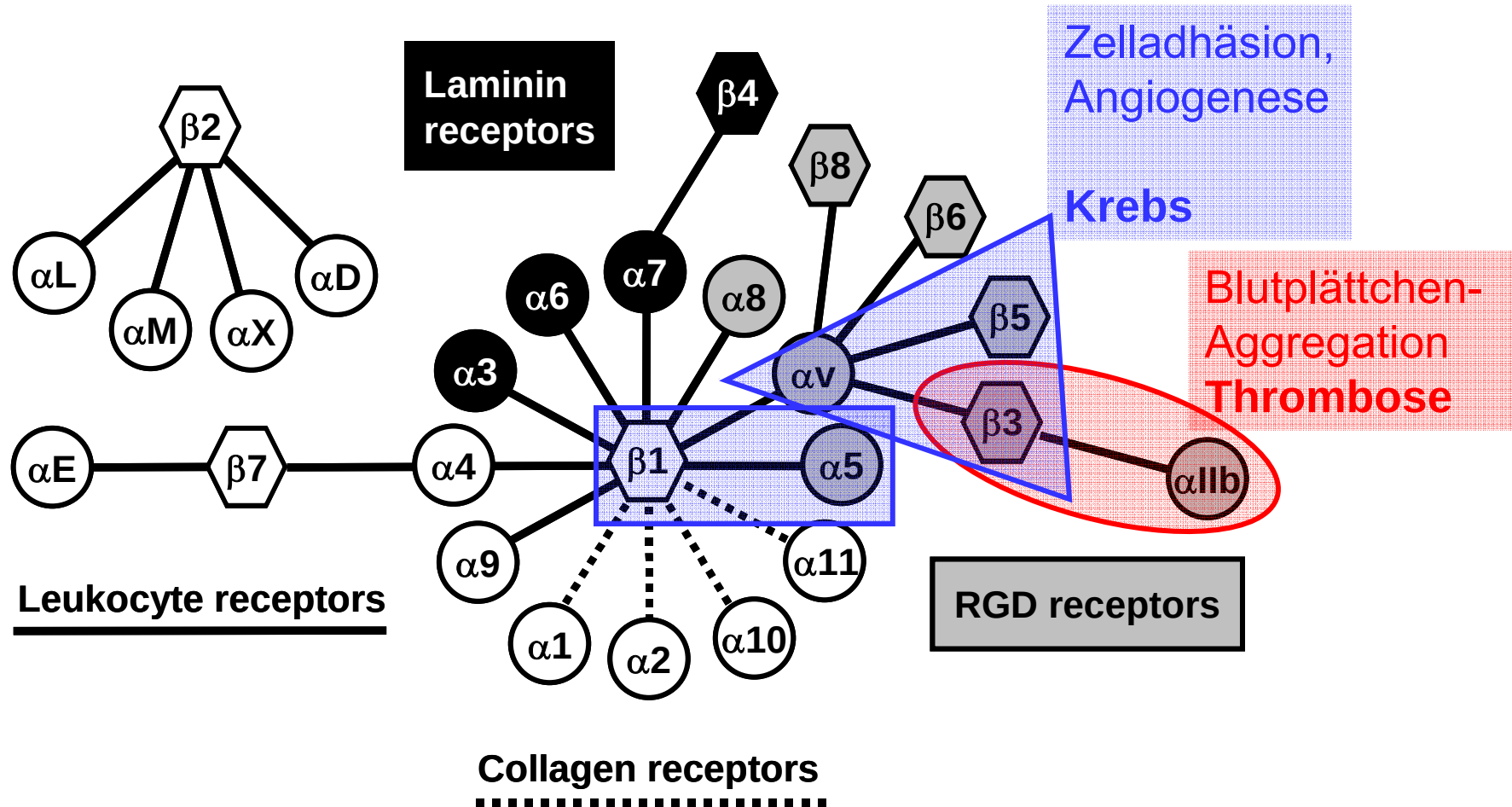
Dreibuchstaben-Code: H-Val-Arg-Gly-Asp-Phe-OH

Einbuchstaben-Code: V-R-G-D-F

Oder kurz: VRGDF

Integrin Untertypen

18 α -Untertypen und 8 β -Untertypen bilden 24 Dimere

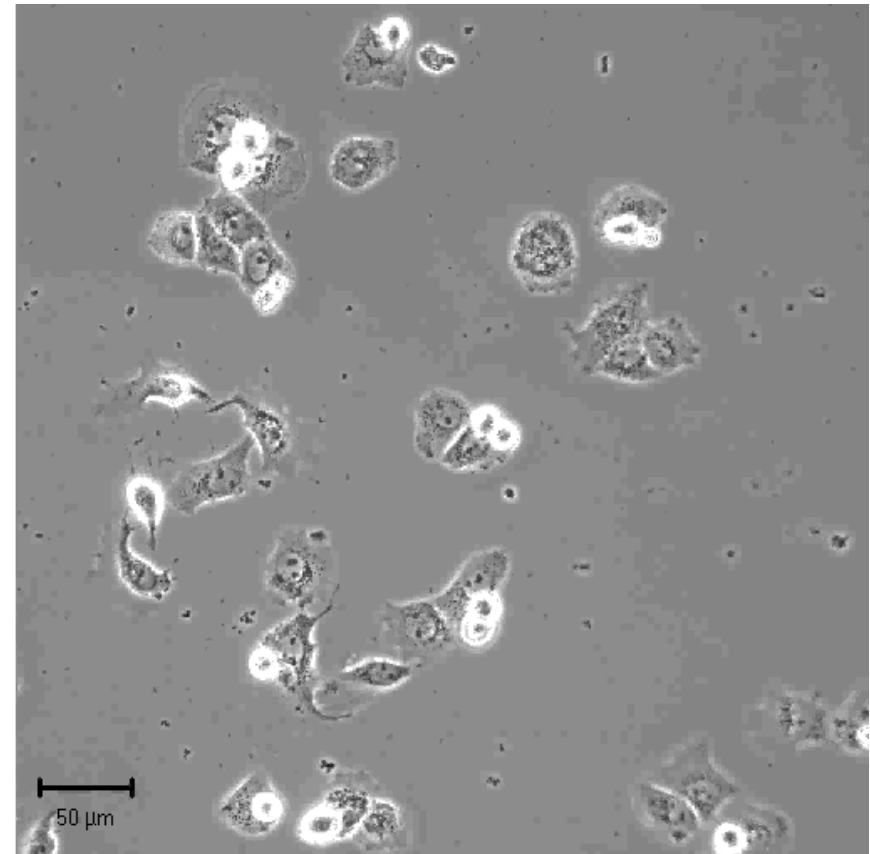
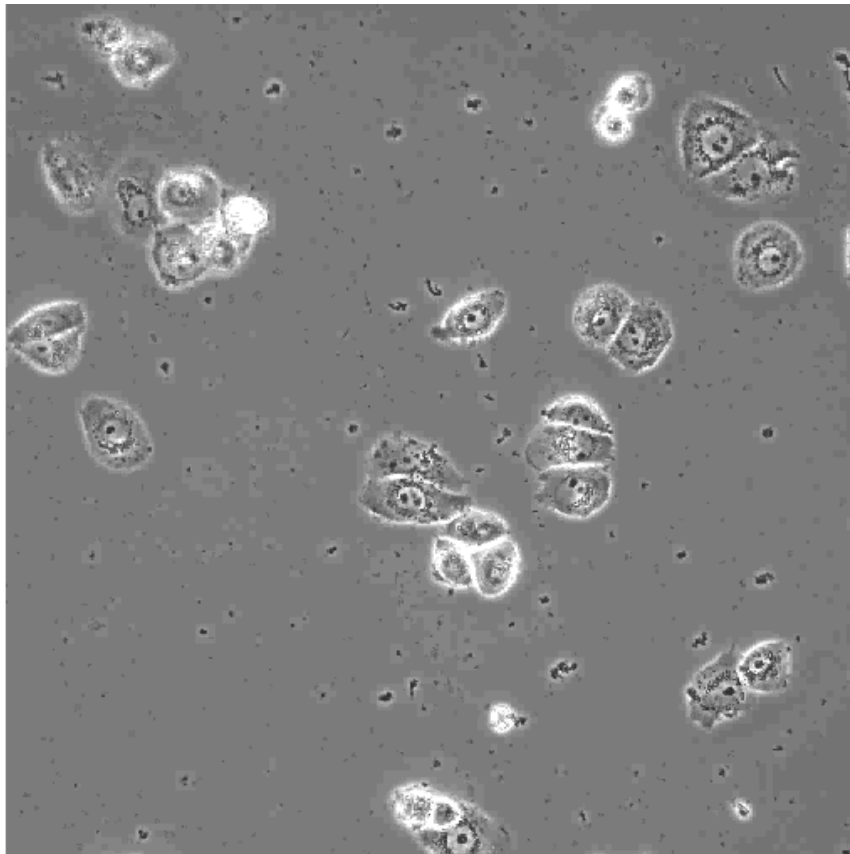


Beweglichkeit von Zellen auf RGD beschichteten Oberflächen

Das $\alpha v \beta 3$ Integrin ist verantwortlich für Beweglichkeit

normale OV-MZ-6 Zelllinien

Zellen mit dreifach höherer $\alpha v \beta 3$ -Dichte



U. Reuning, Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, München

Selektivität von Integrin Subtypen, die alle die RGD Sequenz erkennen

Integrin	natürliche Proteine außerhalb der Zellen (ECM)			
$\alpha v \beta 3$	Vn	Ln	Fn	vWF
$\alpha v \beta 5$	Vn	Fn	Opn	Fb
$\alpha 5 \beta 1$	Fn			
$\alpha IIb \beta 3$	Fb	Fn	Vn	vWF

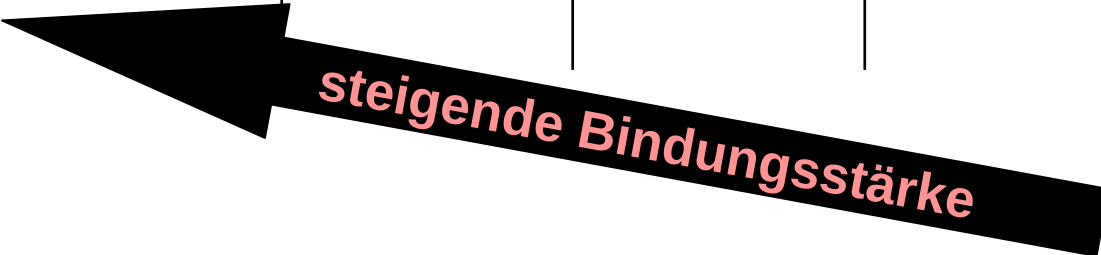
Vitronectin

Fibrinogen

Fibronectin

Osteopontin

von Willebrandt Faktor



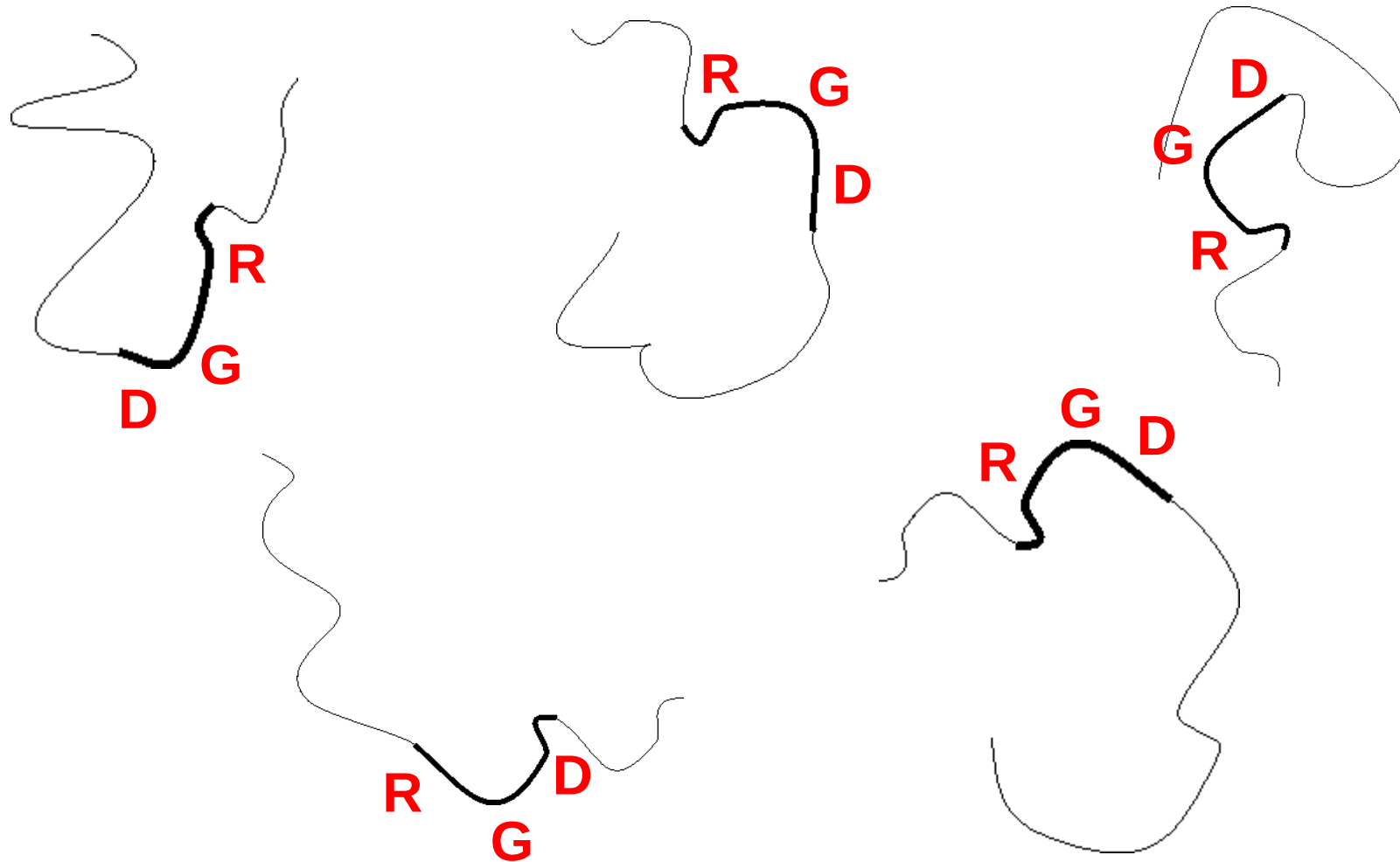
steigende Bindungsstärke

Wo kommt der Unterschied her ? Räumliche Anordnung ?

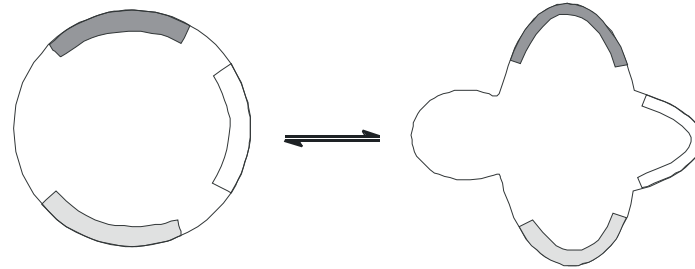
Suche nach Passform von RGD



Ein lineares flexibles Molekül kann sehr verschiedene Raumstrukturen annehmen, die sich sehr schnell umwandeln



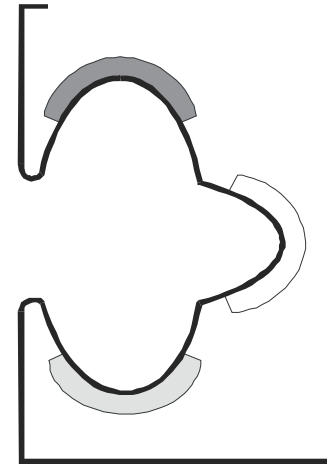
Flexible Moleküle in Lösung



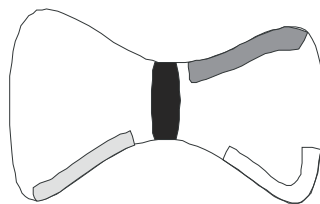
nicht aktiv

aktiv

Rezeptor

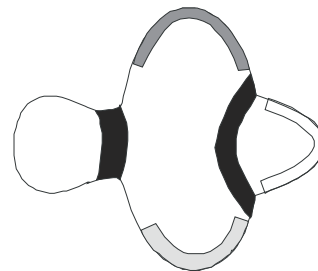


Festhalten der Form durch Ringbildung



inaktiv

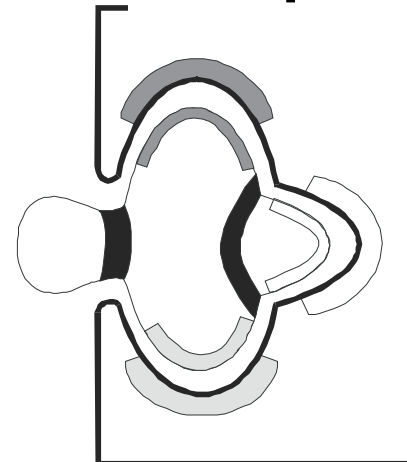
kein Treffer



super-aktiv

Treffer !!!

Komplex



Die Herausforderung

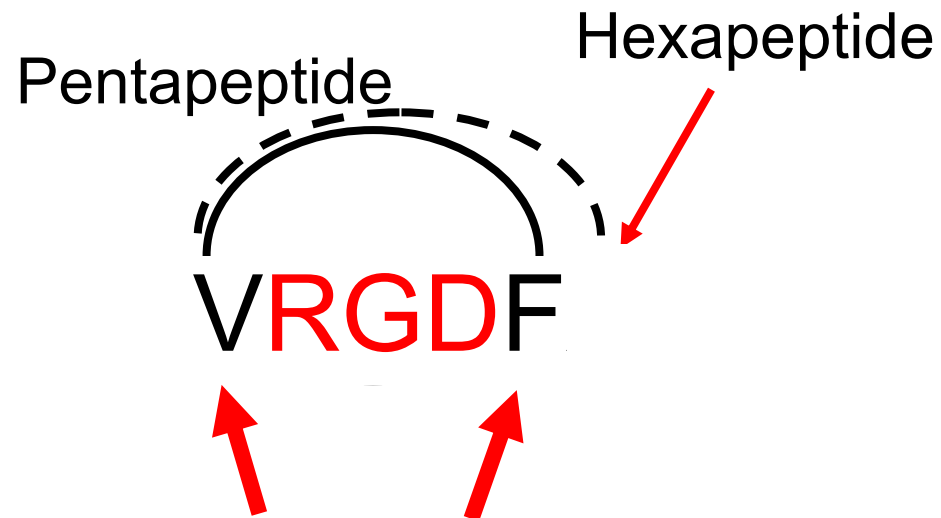


Ist es möglich, die
Raumstruktur zu ändern, ohne
neue Bindungen zu knüpfen ?



cyclische Peptide
„räumliches Screening“

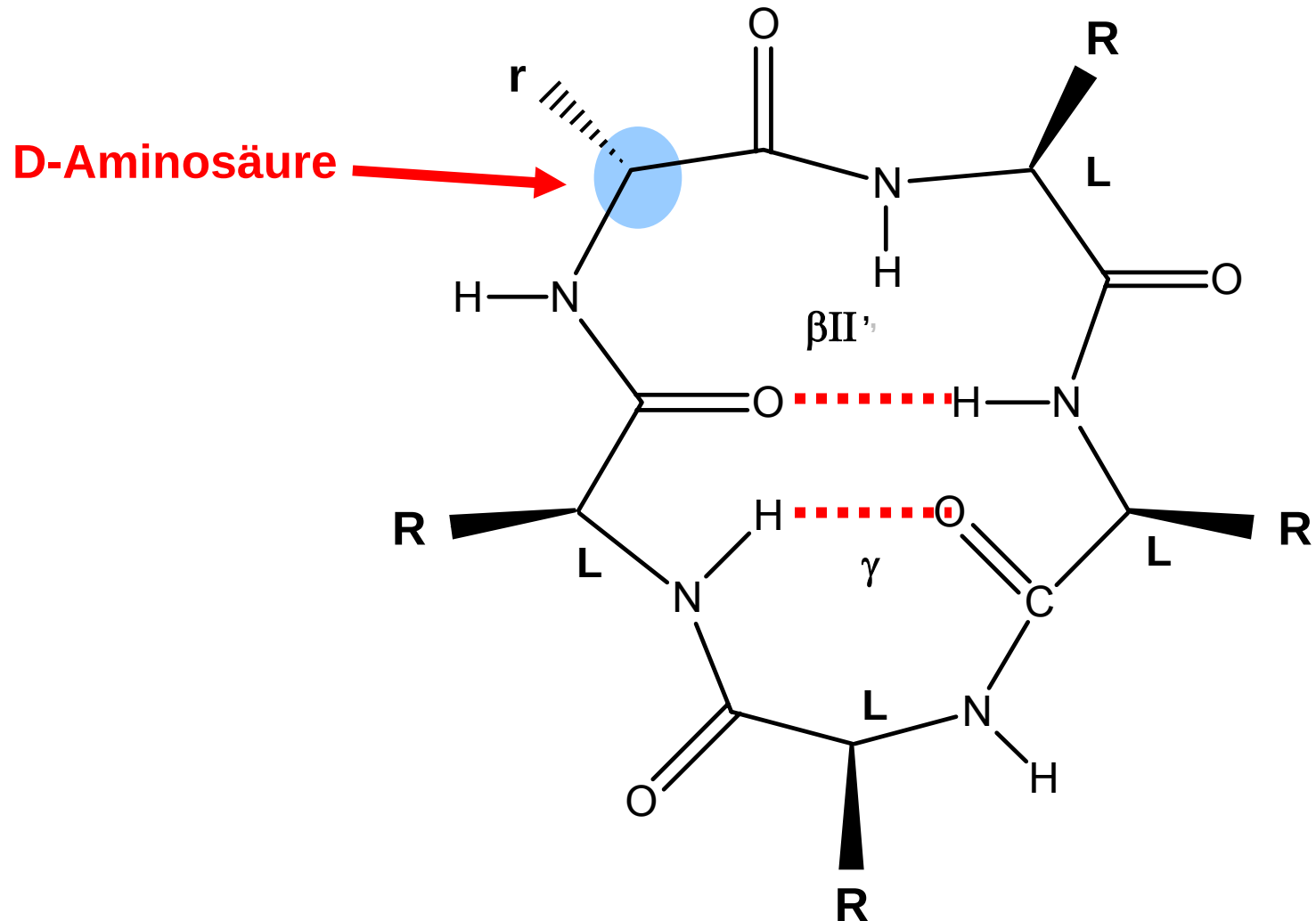
Wahl der Sequenz



In der Gendatenbank von ECM Proteinen zeigt sich, dass RGD oft von A und F flankiert ist

Bevorzugte Anordnung eines zyklischen Pentapeptides mit einer **D**-Aminosäure

unabhängig von der Natur von R

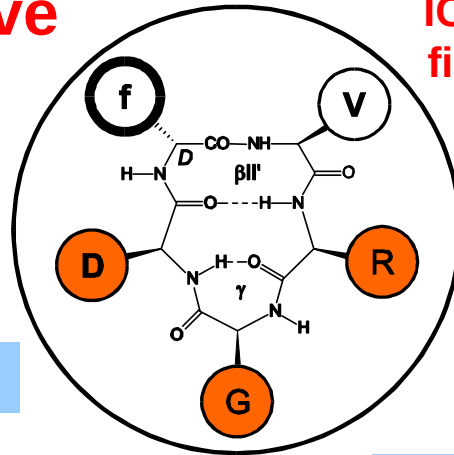


D-Aminosäure "Scan" von cyclo(VRGDF)

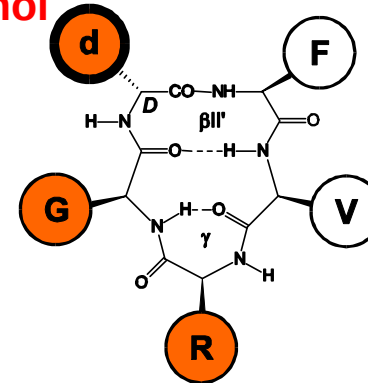
lineare Referenz GRGDSPK: 1.2 μmol

super-active
selective

IC_{50} ($\alpha\text{IIb}\beta 3$) against
fibrinogen $>10\mu\text{mol}$

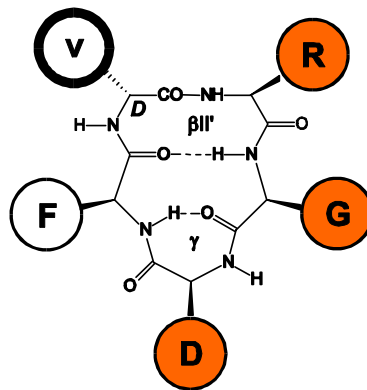


0.002 μmol

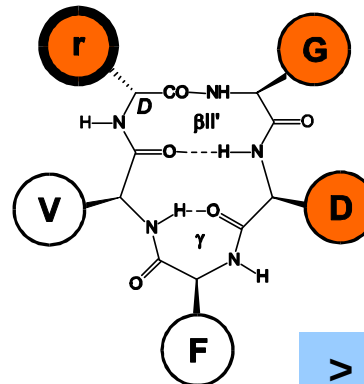


$> 10 \mu\text{mol}$

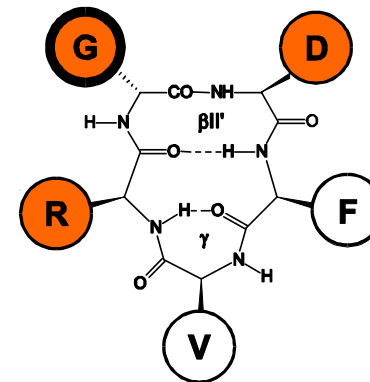
IC_{50} ($\alpha\text{v}\beta 3$) against
vitronectin



0.011 μmol



$> 10 \mu\text{mol}$



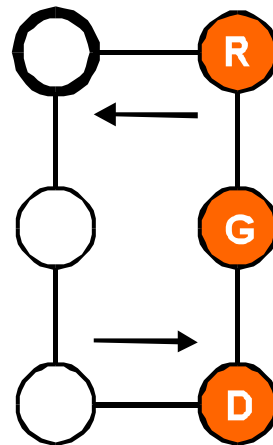
0.15 μmol

Selektivität von Integrin Antagonisten

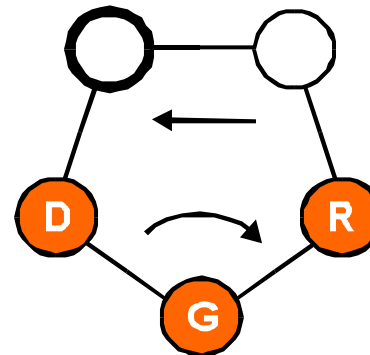


linear: flexibel = nicht selektiv

Thrombose



gestreckt $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -selektiv

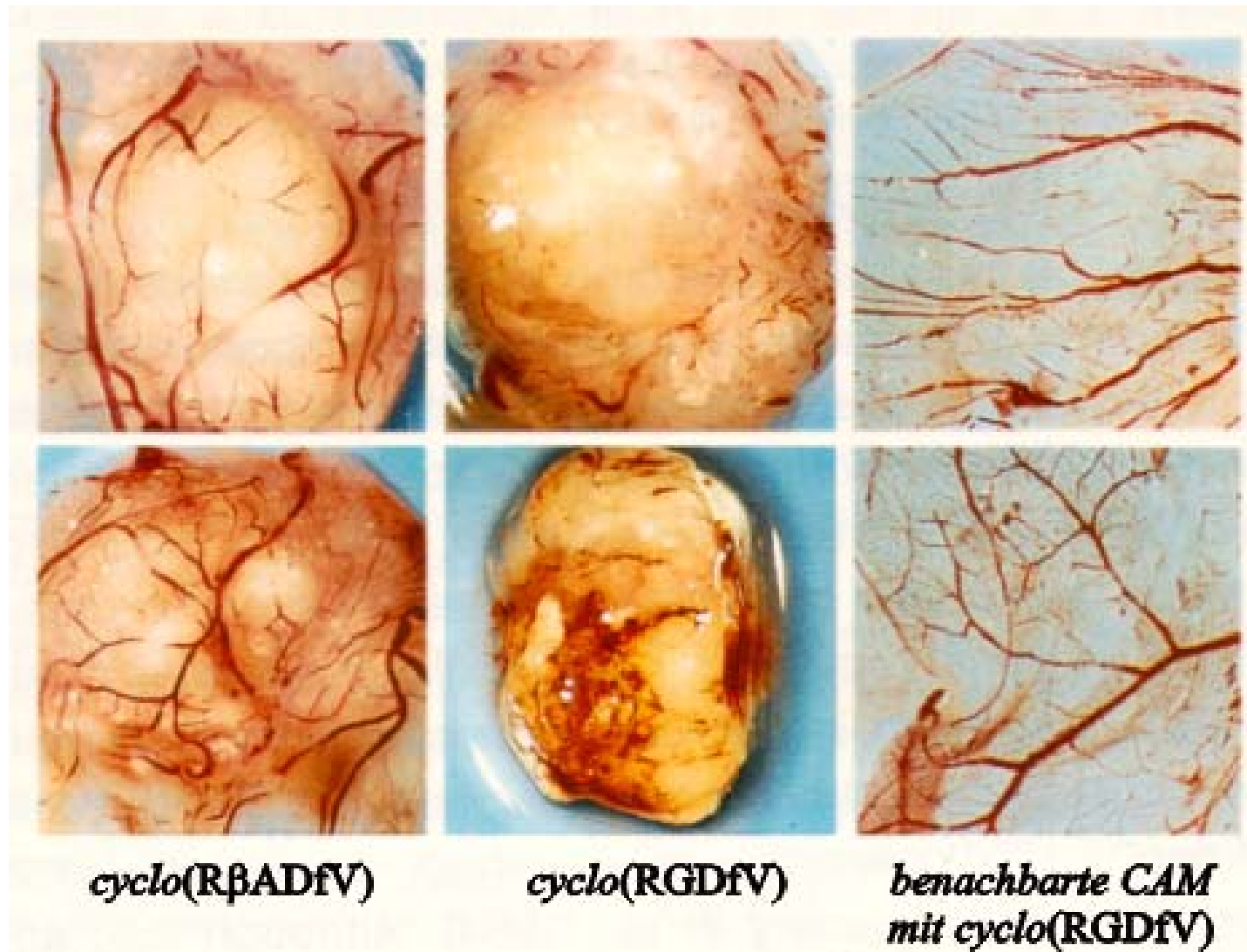


Krebs

geknickt: $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -selektiv

zyklisch: starr = selektiv

Verhinderung der Angiogenese menschlicher Tumore auf Hühner-Embryonen



Brooks et al. Cell 79, 1157 – 1164 (1994)

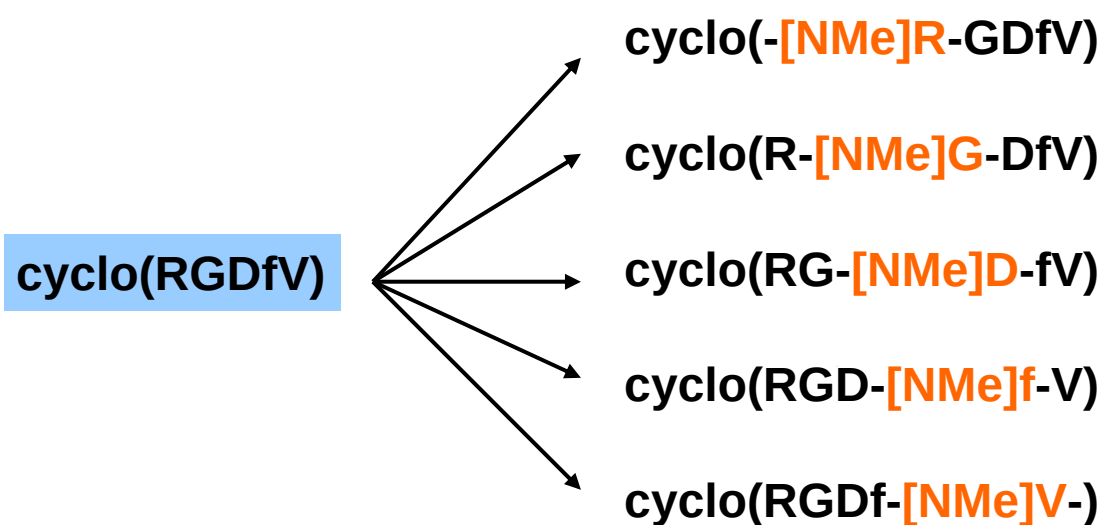
The Drug



Cilengitide

Effekt einer N-Methylierung der Peptidbindungen in cyclo(RGDfV)

nanomol = 10^{-9} mol = 1 Würfelzucker auf 1000 Tonnen

	IC ₅₀ [nM] (α v β 3)
 cyclo(RGDfV)	
cyclo(-[NMe]R-GDfV)	5.5
cyclo(R-[NMe]G-DfV)	45
cyclo(RG-[NMe]D-fV)	560
cyclo(RGD-[NMe]f-V)	1400
cyclo(RGDf-[NMe]V-)	0.58

(Cilengitide, EMD 121974) 

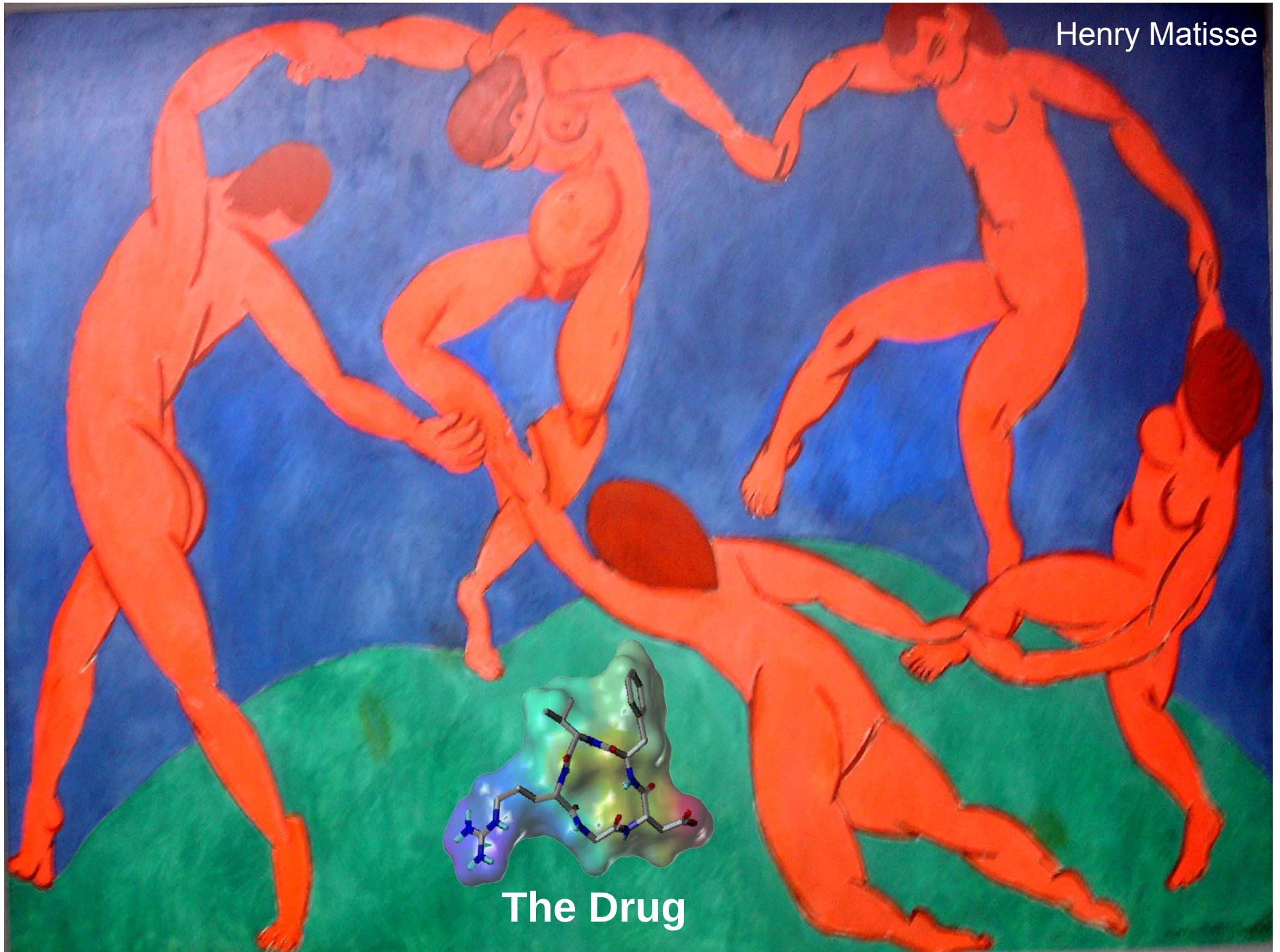
1995 von Michael Dechantsreiter in München hergestellt
Klinische Phase III zur Behandlung von Hirntumoren (Merck)

M. A. Dechantsreiter E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk,
S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033-3040.



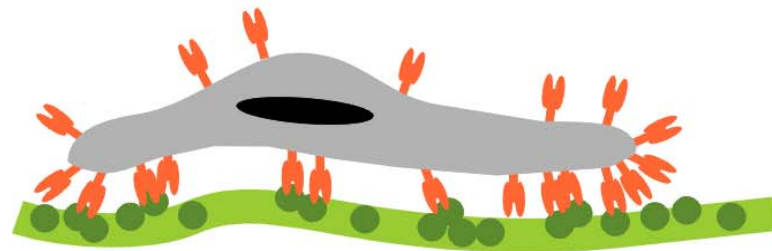
Henry Matisse

Henry Matisse

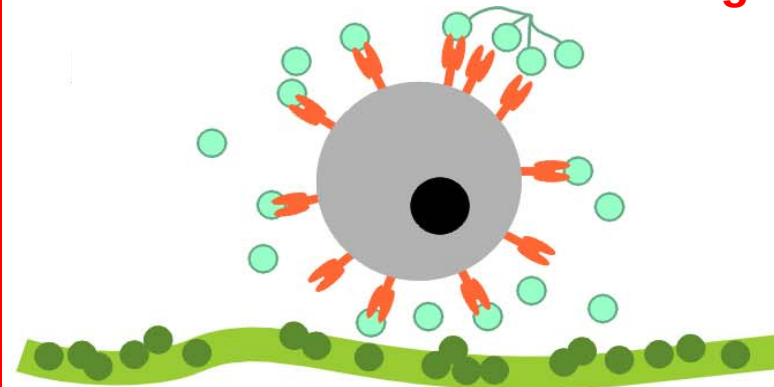


The Drug

Anwendungen des Integrin Liganden

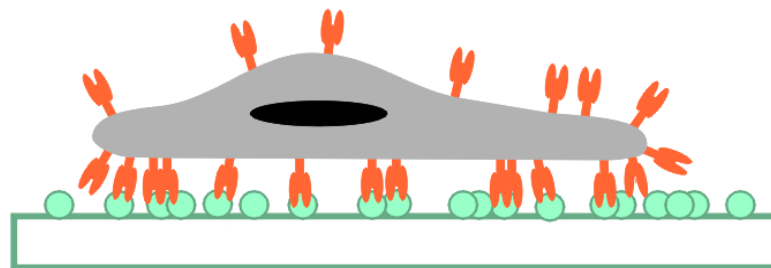


extrazelluläre Matrix



Cilengitide

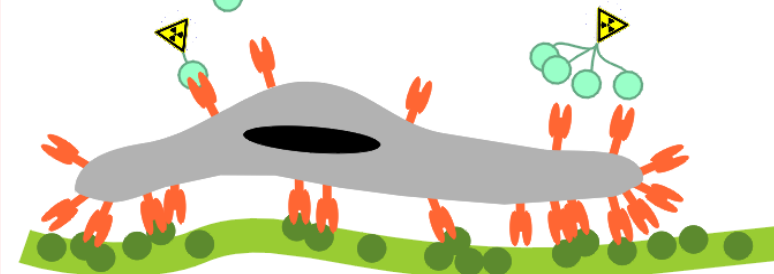
Beschichtung von Implantaten



Biomaterial

-  RGD Peptid
-  Integrin

Markierung mit Radioisotopen



-  RGD Peptid
-  multimere RGD Peptide

Das Ziel: Molekulare Bildgebung



**Selektive
Radiomarkierung
von
Tumormetastasen**

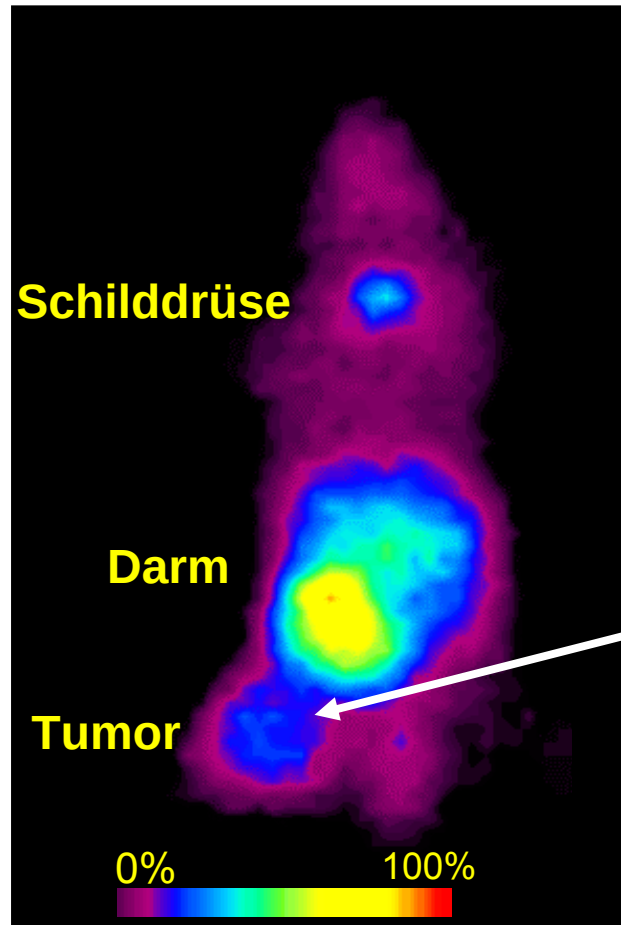
Anwendung der α v selektiven Inhibitoren

Verbindungen der ersten Generation



Nachteile:

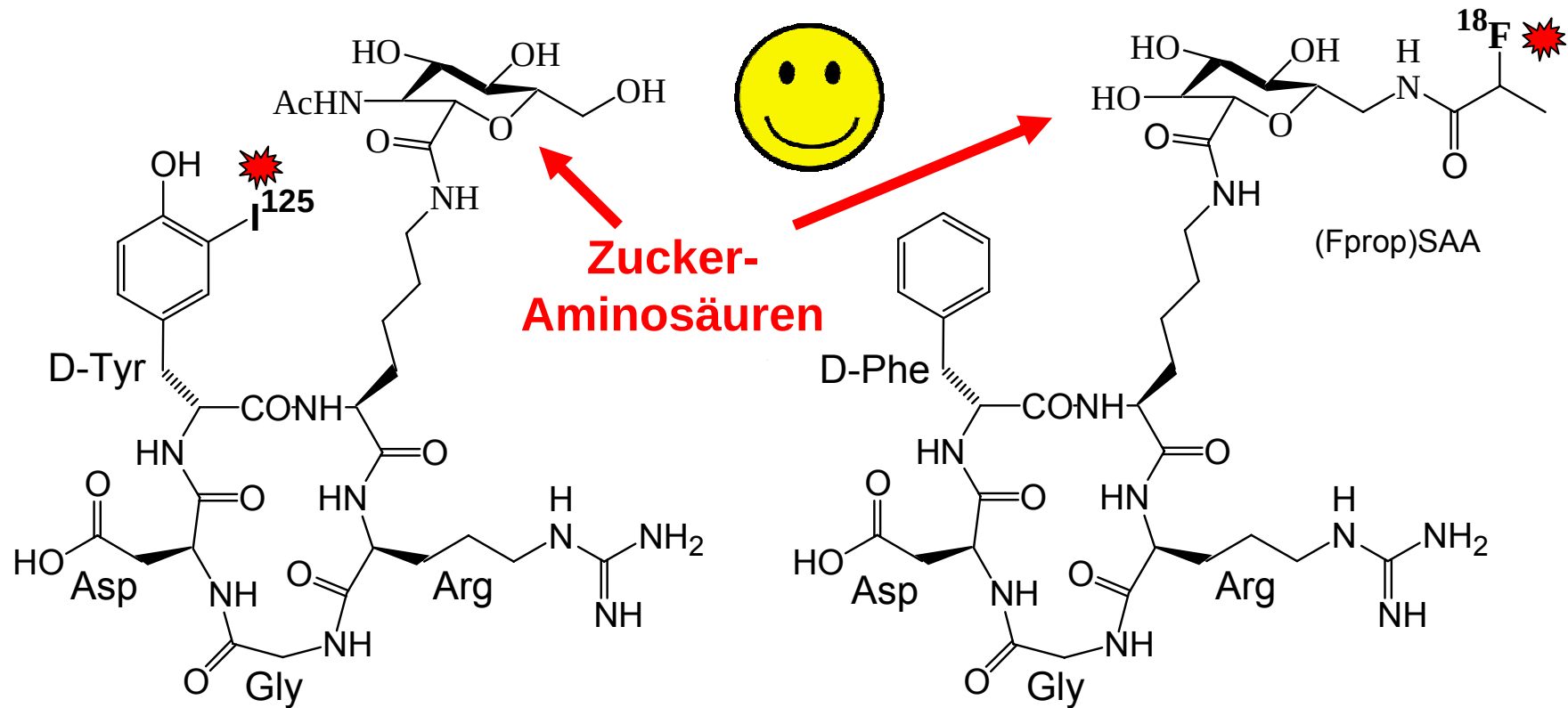
die Verbindungen bleiben nicht stabil im Krebs sondern werden sehr rasch wieder ausgewaschen



neben dem Tumor sieht man auch den Darm und die Schilddrüse

Verbesserungen waren nötig: glycosylierte RGD-Peptide

die zweite Generation



Cancer Res. **2001**, 61, 1781

J. Nucl. Med. **2001**, 42, 326

[¹⁸F]Galacto-RGD:

Metastase (Melanom) im Lymphknoten der Achsel

CT

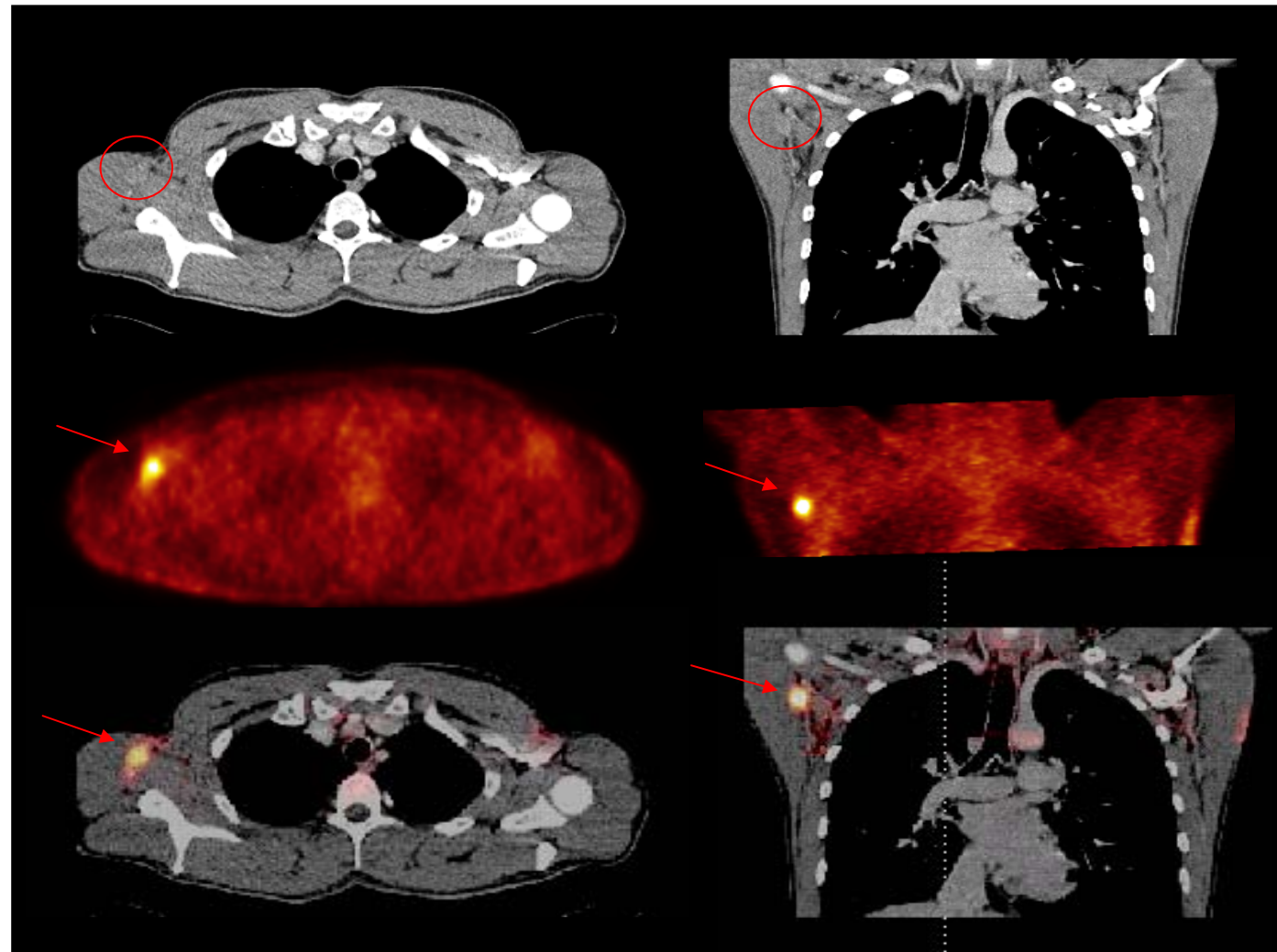
PET

Galacto-RGD

220 MBq; 2h p.i.

PET/CT-Fusion

Galacto-RGD

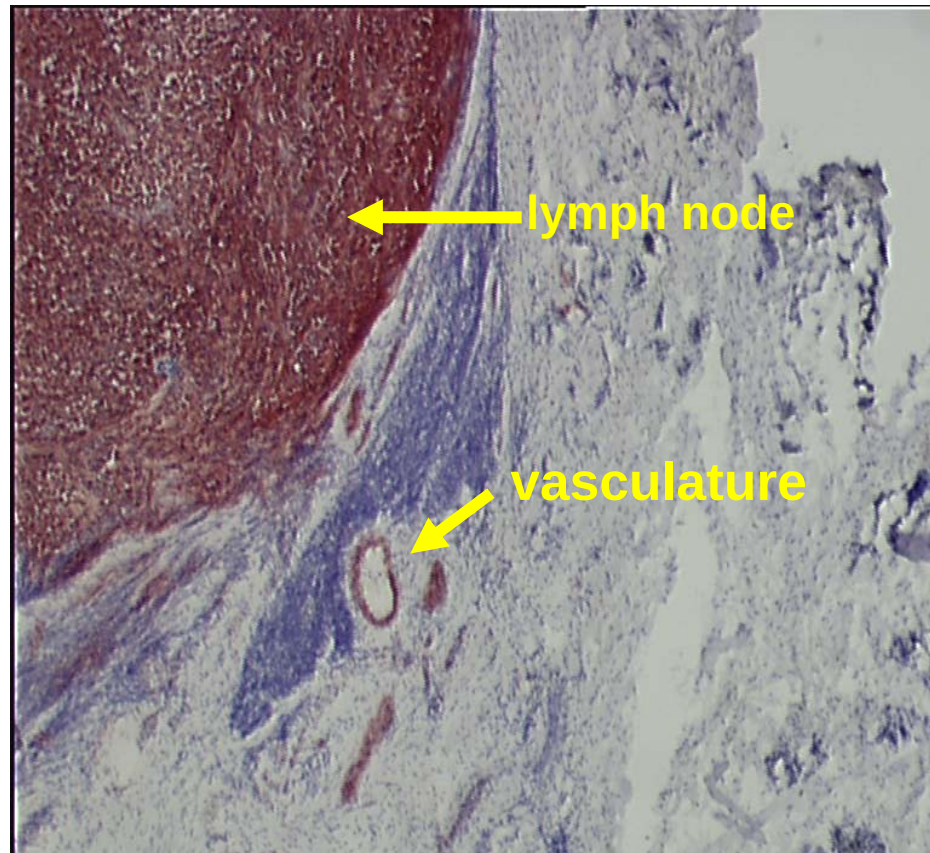


R. Haubner.. H. Kessler et al. *PLOS Medicine* 2005, 2, 244-252.

Patient mit einem Melanom im Lymphknoten der Achsel

(50-75 min p.i., acquisition time 25 min; 5.8 mCi [^{18}F]Galacto-RGD)

Immunhistologie mit $\alpha\text{v}\beta 3$ -Antikörper nach der OP



Molekulare Bildgebung mit Galacto-RGD

(optimaler Kontrast, hohe Spezifität)

Erkennung von Krebsmetastasen in mehreren hundert Patienten in München und weltweit

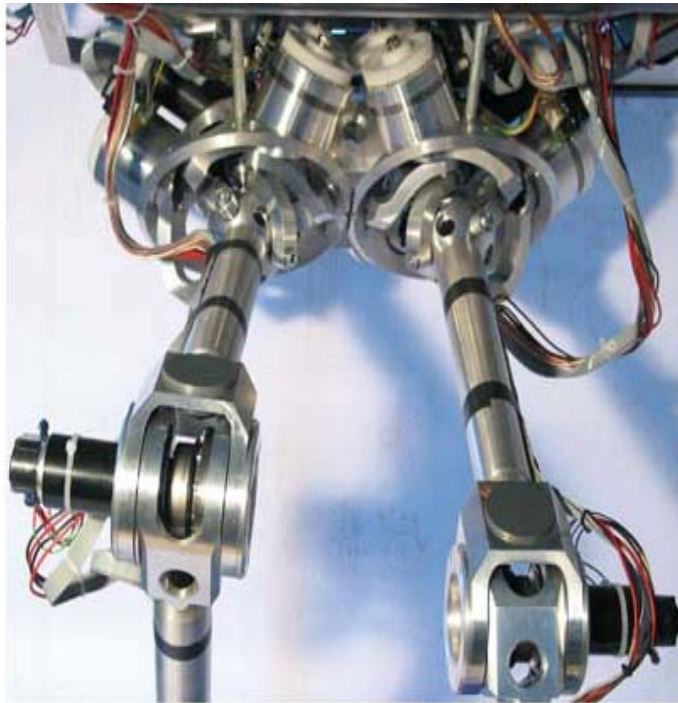
***in vivo* Quantifizierung** der Integrinexpression

Molekulare Bildgebung von **Glioblastomen**

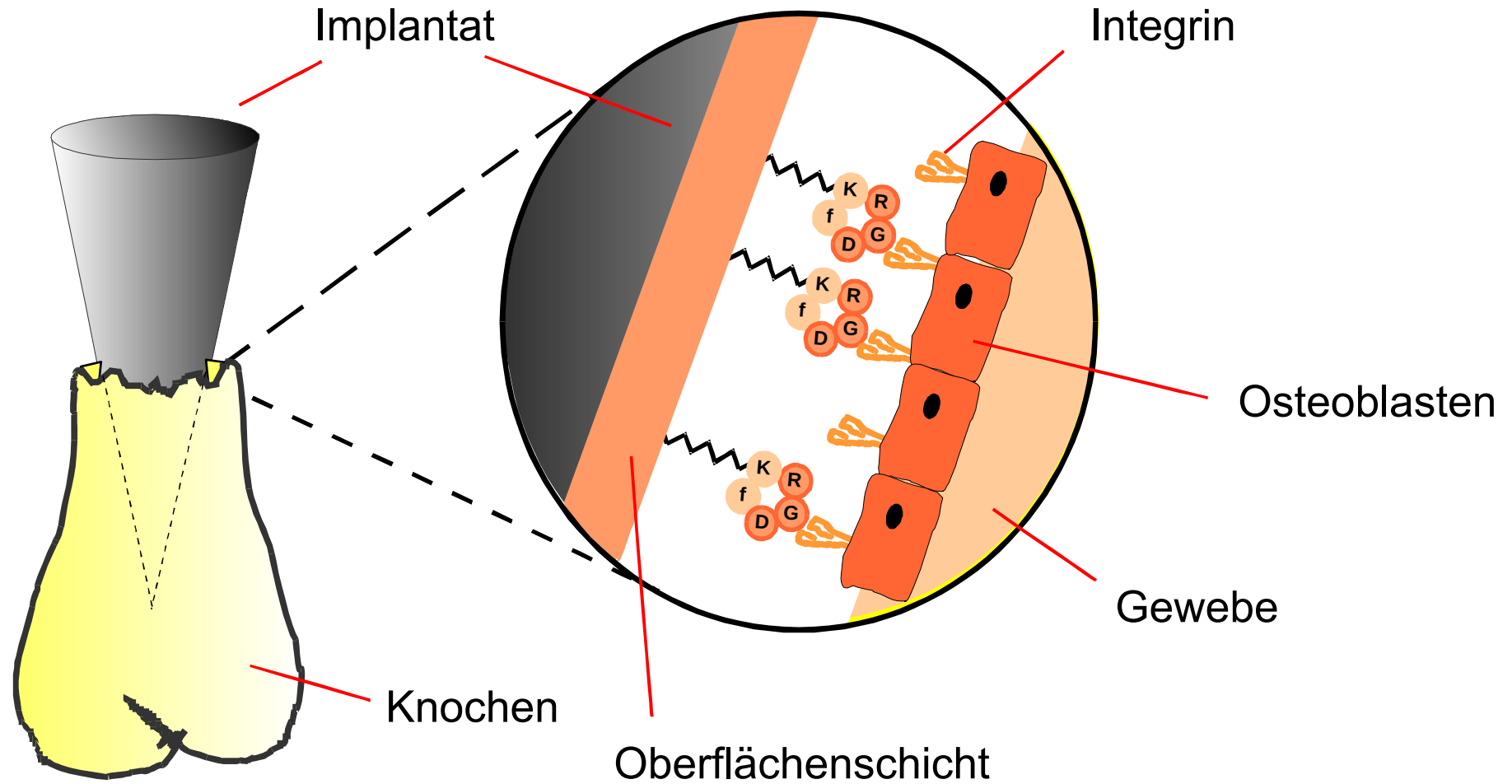
Beobachtung der **Heilung von Herzinfarkten**

Das nächste Ziel

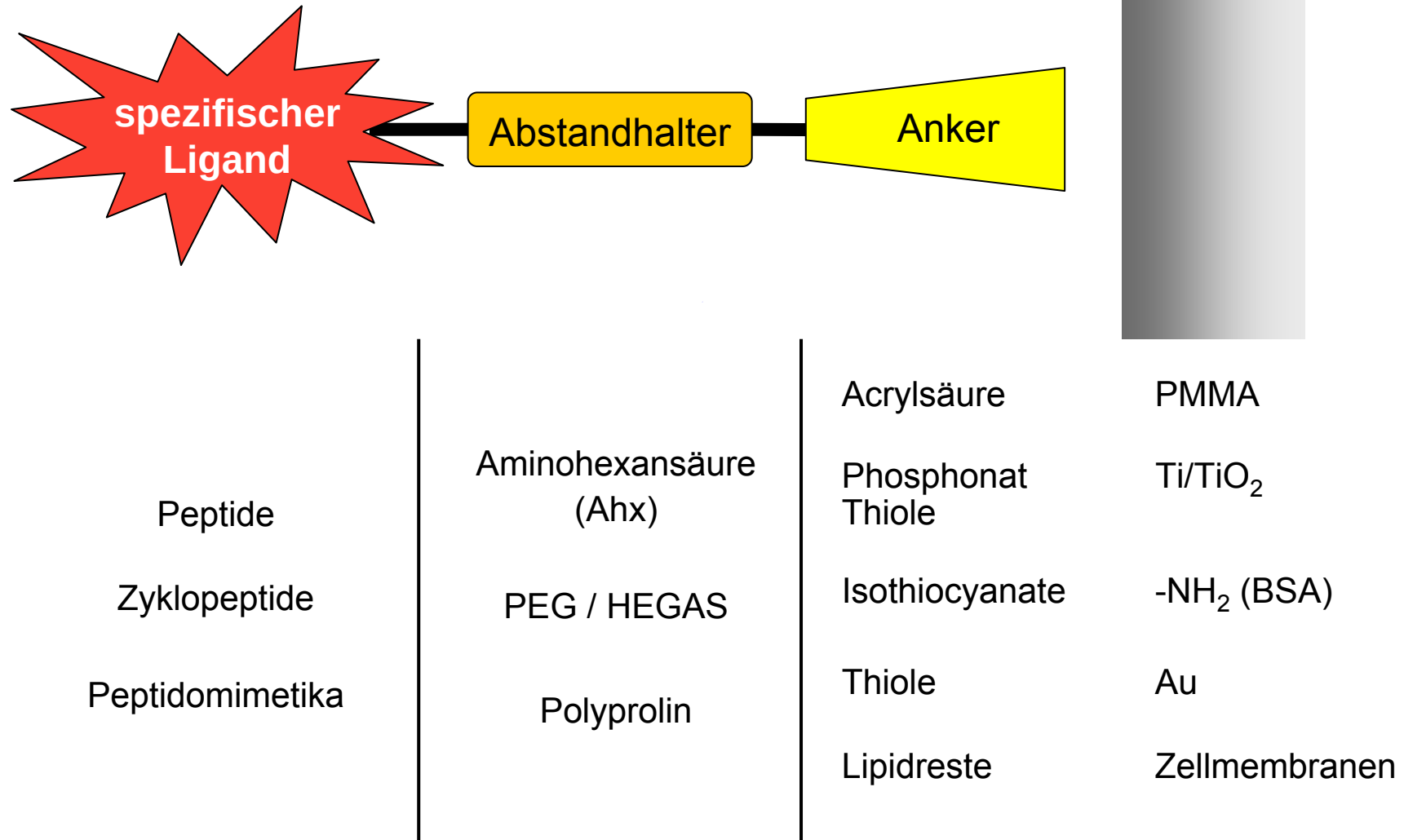
Verbesserung von Implantaten



Beschichtung der Oberflächen von Biomaterialien



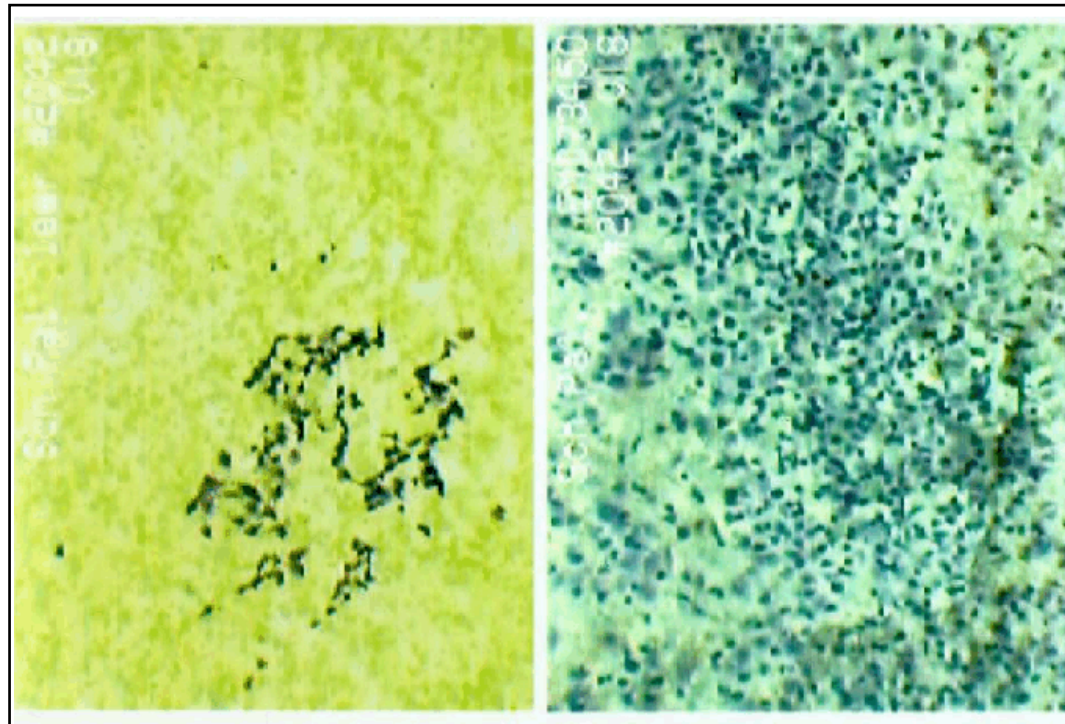
Design von Beschichtungsmolekülen



Anwendung von αv selektiven Molekülen

Biomaterialien

- Verankerung auf Oberfläche (bioverträglich)



nicht beschichtet

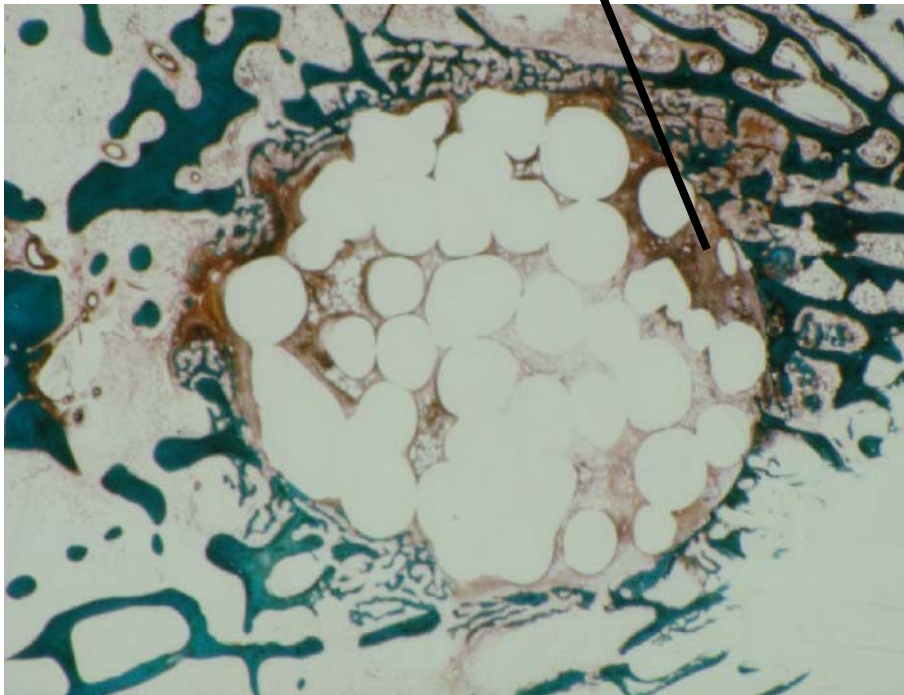
RGD beschichtet

M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 560-562.

Kaninchenmodell: Plexiglas-Kügelchen

Beschichtung mit Acrylamid-Platzhalter-Lysin-Peptideptide

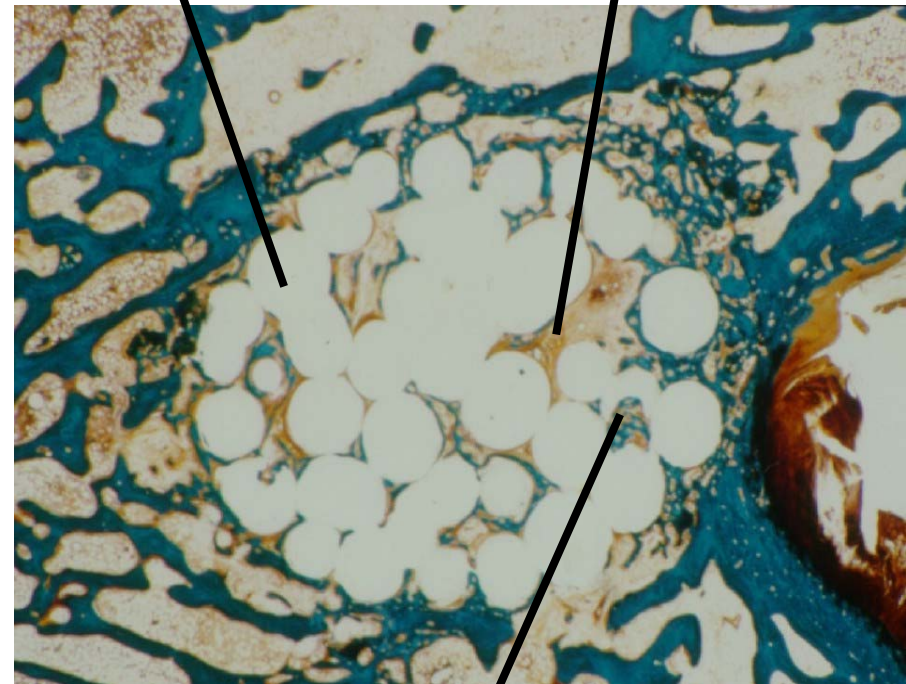
Knorpelmasse



unbeschichtet

PMMA-Kügelchen

neuer embryonaler Knochen



neuer Knochen

RGD beschichtet

Oberflächenverankerung von Integrin-Ligandens

Verbesserung des Implantats durch Beschichtung
(Stimulierung der Osteoblasten-Adhäsion)

Verankerung auf **verschiedenen Materialien**

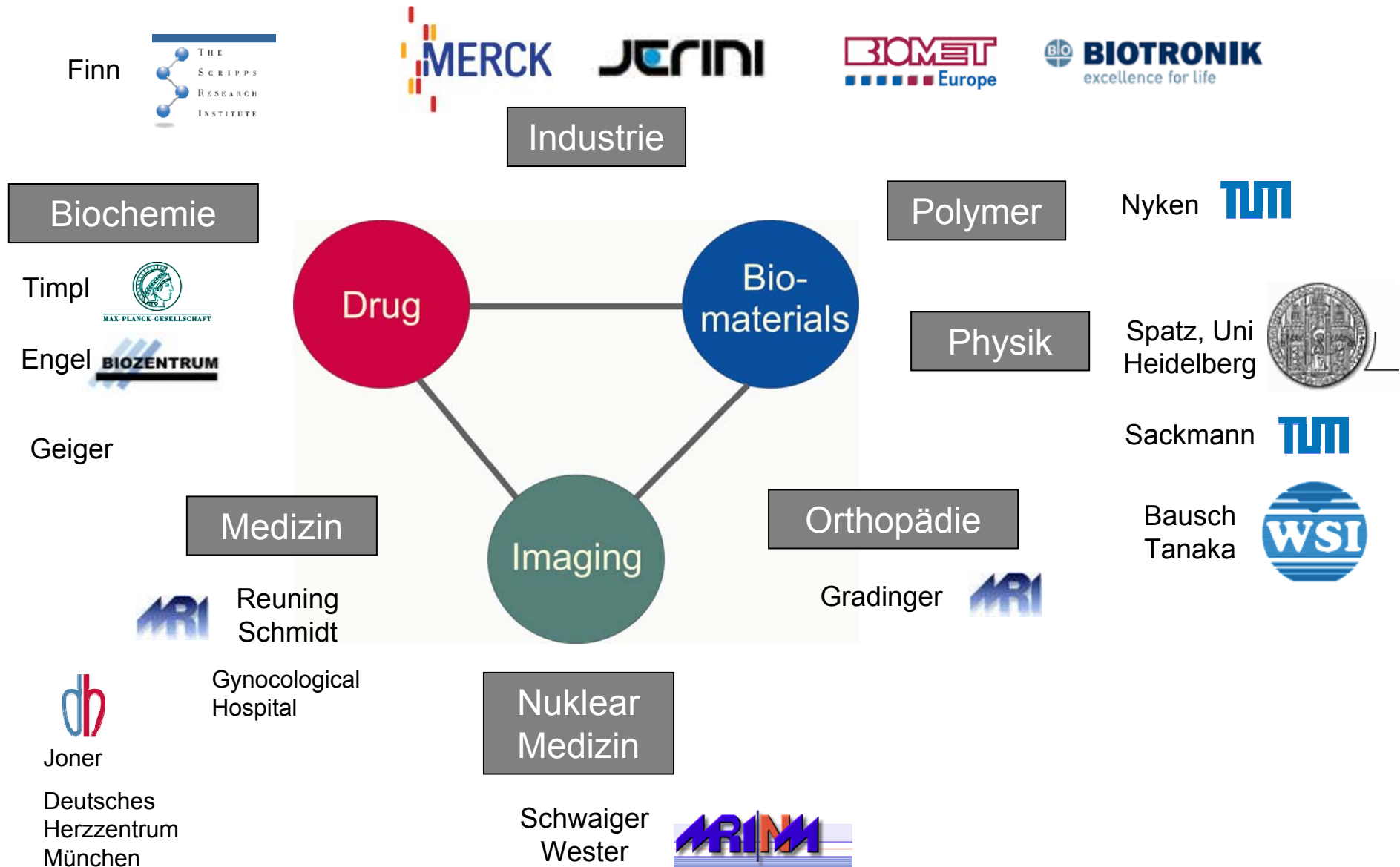
Wird in Kürze durch Biomaterials Germany
angewendet (**erstmalige Anwendung von RGD-
Beschichtungen**)



Beschichtung von **Stents** beschleunigt Anheftung von
Endothelzellen unter Bildung einer glatten Oberfläche
(**verhindert Restenose**)



Interdisziplinarität auf dem RGD-Gebiet



A close-up photograph of a flowering azalea bush. The image is filled with numerous light pink to magenta flowers, each with five petals and prominent stamens. Dark green, glossy leaves are interspersed among the blooms. The lighting is bright, creating a vibrant and cheerful scene.

Danke