



Entwicklung von Tumor-selektiv wirksamen, Apoptose-induzierenden Zytokinen der TNF Liganden Familie

Klaus Pfizenmaier

Wissenschaftliche Grundlagen

Eine zentrale Zielsetzung der Krebsforschung ist die Entwicklung von Therapien, die eine gezielte Zerstörung von Tumoren ermöglichen. Die Verknüpfung von spezifischen Antikörpern mit tumortherapeutischen Wirkstoffen erlaubt im Prinzip die Herstellung von tumorselektiv wirksamen Reagenzien. Da die Wirkstoffkomponente solcher Reagenzien jedoch im Allgemeinen tumorunabhängig aktiv ist, beruht die tumorselektive Wirkung fast ausschließlich auf Anreicherungseffekten. Das therapeutische Fenster wird daher ganz wesentlich durch die systemischen Nebenwirkungen der Wirkstoffkomponente bestimmt. Neben konventionellen Radio- und Chemotherapeutika stehen dabei vor allem Proteine in Form von Toxinen oder Zytokinen als Wirkstoffkomponente für Antikörperkonjugate zur Verfügung. Aufgrund ihrer Wirkung sind Zytokine, die direkte anti-tumorale und/oder immunstimulierende Wirkungen entfalten können, besonders attraktiv. Hierzu gehören die Apoptose-induzierenden Liganden der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie TNF, CD95L und TRAIL, wobei ein wichtiges Ziel der Forschung die Vermeidung bzw. Minimierung unerwünschter und Dosis limitierender Wirkungen an Nicht-Tumor Geweben ist. Um die therapiebegrenzenden systemischen Nebenwirkungen von proapoptotischen Zytokinen zu reduzieren, wurde in den letzten Jahren die Herstellung von Fusionsproteinen, die ein „Targeting“ von Zytokinen in vivo erlauben, vorangetrieben.

Ziele

Grundsätzliches Ziel des Vorhabens ist es, die Wirkung von Liganden der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie für tumortherapeutische Zwecke nutzbar zu machen, ohne die für diese Zytokine typischen Nebenwirkungen zu induzieren. Hierzu werden im Rahmen dieses Projekts mit gentechnischen Methoden neuartige Fusionsproteine entwickelt, die sich von den derzeit zugelassenen bzw. in klin. Prüfung befindlichen Liganden (TNF, CD95L, TRAIL) sowohl in struktureller als auch funktioneller Hinsicht unterscheiden: es werden Fusionsproteine entwickelt, die tumorselektive Wirkung über „targeting“ und über „targeting“ abhängige Prozessierung/ Aktivierung entfalten; unabhängig davon wird durch Mutagenese die spezifische Aktivität und Rezeptorselektivität der Fusionsproteine optimiert; schließlich werden durch gentechnische Methoden auch die pharmakokinetischen Eigenschaften der Fusionsproteine gezielt verändert.

Strategie

Zytokinderivate für die Tumortherapie werden als Fusionsproteine mit Tumorselektiven scFv hergestellt, wobei in Bezug auf die Zytokindomäne aktuell die Strategie der Herstellung einzelkettiger Liganden eingesetzt wird, bei dem der natürlicherweise als Homotrimer assoziierte TNF Ligand durch kurze Peptidlinker verbunden ist. Dieses einzelsträngige Molekül ist dem natürlichen Homotrimer funktionell äquivalent, weist aber höhere Stabilität

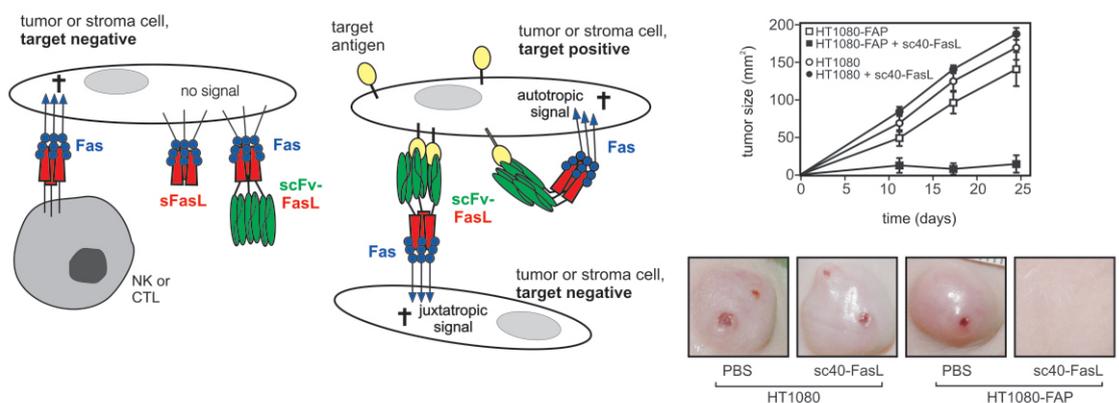


Abb. 1: Schematische Darstellung der „targeting“ abhängigen Apoptose Induktion durch scFv-TNF Liganden Fusionsproteine am Beispiel eines tumorselektiven scFv-FasL(CD95L) Fusionsproteins und dessen tumorinhibierende Wirkung im Xenotransplantationsmodell (aus Samel et al, JBC 2003).

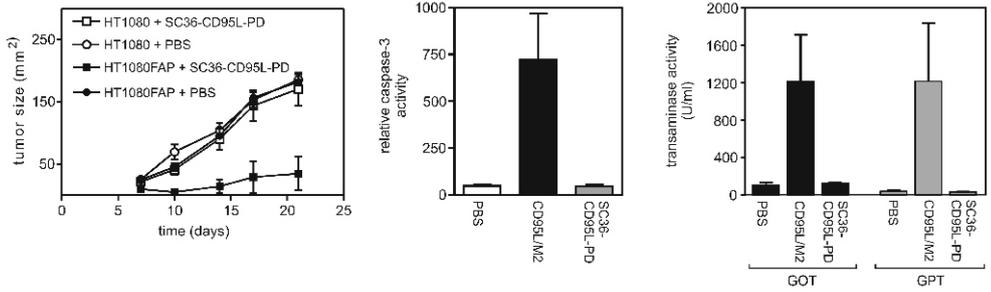
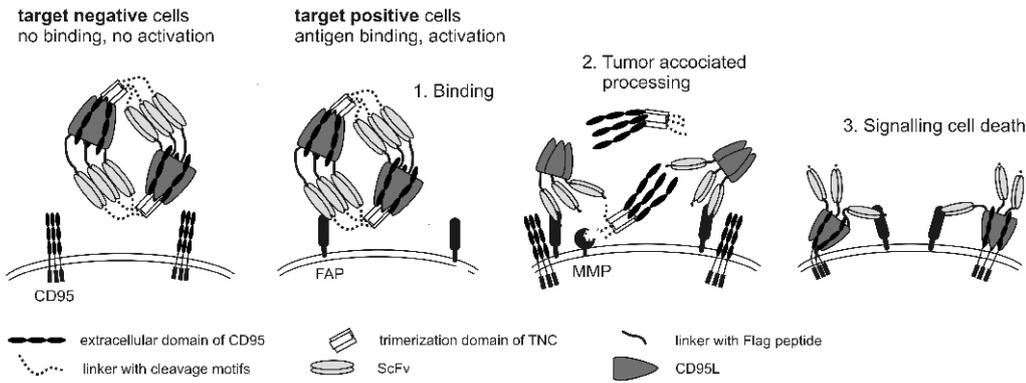


Abb. 2: Schematische Darstellung der tumorselektiven Prozessierung und Aktivierung einer CD95L Prodrug und deren antitumorale Aktivität ohne messbare systemische Nebenwirkungen (Leberwerte AST/ALT normal; aus Watermann et al, Cell Death Diff 2007).

auf. Durch Fusion mit weiteren Komponenten (z.B. Serumalbumine, Inhibitoren) werden gezielt die biologischen und/oder pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Fusionsproteine verändert. Die Evaluierung der antitumoralen Aktivität erfolgt sowohl in vitro in Zellkultursystemen als auch in relevanten Tumormodellen der Maus.

netic engineering to reach three goals: i) stabilization of a trimeric or multimeric organization and improvement of bioavailability, ii) directing ligand action to the diseased tissue through antibody (scFv) mediated targeting, and iii) development of prodrugs with a particularly restricted, tumor selective induction of bioactivity.

Genetic engineering of death ligands for improvement of therapeutic activity

The death ligands TRAIL, FasL/CD95L and TNF are in the focus of intense preclinical and clinical research efforts having the aim to exploit these molecules as new anticancer drugs. A common feature of these ligands is that their transmembrane form display higher and/or broader activity than their soluble counterpart. So, the bioactivity of the soluble form of these ligands ranges from being poorly active (FasL/CD95L) to displaying a receptor type-selective signaling capacity (TNF, TRAIL). The presently approved or clinically exploited recombinant variants of TNF and TRAIL correspond to the soluble trimeric form of these proteins. A further major problem in clinical use of death ligands is their potentially strong off target action, which is well documented for TNF and oligomeric FasL and impacts their usefulness as cancer therapeutics. In order to increase intrinsic bioactivity of death ligands, yet restrain this to the tumor and avoid actions on normal tissues, our work aims at modifying these ligands by ge-

Projektleitung

Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
Dr. Jeannette Gerspach-Joner

Universität Stuttgart
Institut für Zellbiologie und Immunologie
Allmandring 31
70569 Stuttgart

Tel.: 0049/(0)711/685 66986
Fax: 0049/(0)711/686 67484

klaus.pfizenmaier@izi.uni-stuttgart.de
jeannette.gerspach@izi.uni-stuttgart.de

www.uni-stuttgart.de/izi/

