



universität  
wien

# MASTER THESIS

Titel der Master Thesis / Title of the Master's Thesis

„Antikörper-Wirkstoff-Konjugate –

eine Realisierung Paul Ehrlichs Konzept der  
*magischen Kugel?*“

verfasst von / submitted by

Mag.pharm. Markus Tarnai

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien, 2017 / Vienna 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
Postgraduate programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 992 580

Universitätslehrgang lt. Studienblatt /  
Postgraduate programme as it appears on  
the student record sheet:

Pharmazeutisches Qualitätsmanagement /  
Pharmaceutical Quality Management

Betreut von / Supervisor:

Dr. Manuela Leitner



# VORWORT

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar bis April 2017 verfasst, unter der Betreuung von Frau Dr. Manuela Leitner.

Ihr gilt mein besonderer Dank für ihre fachliche Beratung und freundliche Ermahnung, die wesentlichen Aspekte meiner Arbeit im Auge zu behalten.

Ich möchte mich bei meiner Mutter bedanken für ihre Expertise in der Germanistik und die erheiternden Diskussionen um Spitzfindigkeiten der deutschen Sprache.

Meinen Kollegen des Universitätslehrgangs möchte ich danken, vor allem Mag. Thomas Göls und Mag. Emilia Tot für die amüsanten Momente während und zwischen der Kurse.

Zu guter Letzt möchte ich der Lehrgangleitung für das interessante Kursprogramm danken und besonders Mag. Elisabeth Wurzer-Priester für ihr stets geduldiges Ohr.



# ZUSAMMENFASSUNG

Zurzeit sind mit Adcetris® (INN Brentuximab Vedotin, EMA-Zulassung 25.10.2012) und Kadcyla® (INN Trastuzumab Emtansin, EMA-Zulassung 15.11.2013) zwei Präparate einer neuen Generation von Krebstherapeutika auf dem Markt und mehr als 50 weitere Präparate dieser Art in klinischer Entwicklung.

Diese neue Generation, bezeichnet als Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (*antibody-drug conjugates*, ADC), ist ein Teilgebiet der zielgerichteten Krebstherapie und vereint die Spezifität von Antikörpern mit der Aktivität von zytotoxischen Substanzen, um auf diesem Weg selektiv Tumorzellen zu vernichten und gesundes Gewebe weitgehend zu schonen.

Eine Schlüsselrolle spielt die Auswahl eines tumorassoziierten Antigens an der Oberfläche einer Krebszelle, welches durch einen geeigneten Antikörper zielgerichtet attackiert wird. Nach Aufnahme in die Tumorzelle und Abspaltung der toxischen Komponente entfaltet diese schließlich ihre Wirkung. Die unerwünschte systemische Wirkung der zytotoxischen Substanz wird somit weitgehend unterbunden und das Nutzen-Risiko-Profil dieser Wirkstoffe erheblich verbessert.

In der Medizin ist dieser Ansatz nicht neu, schon vor über einhundert Jahren formulierte Paul Ehrlich das Postulat: „*Wir müssen lernen, magische Kugeln zu gießen, die gleichsam wie Zauberkugeln des Freischützen nur die Krankheitserreger treffen.*“ Im Jahre 1909 gelang dem medizinischen Forscher mit der Entwicklung des Wirkstoffs *Arsphenamin* in der Therapie von Syphilis die erste Realisierung dieses Konzepts. Um ein weiteres bekanntes Beispiel zu nennen, 1928 wurde von Alexander Fleming der Wirkstoff *Penicillin* entdeckt, welches selektiv die Zellwand-Neubildung von Bakterien blockiert.

Handelt es sich in den beiden genannten Beispielen um bakterielle Zellen als Ziel des Wirkstoffes, steht die Krebstherapie jedoch vor der Herausforderung körpereigene Zellen selektiv auszuschalten.



## ABSTRACT

Currently, there are two drugs of a new generation of cancer therapeutics available – Adcetris® (INN brentuximab vedotin, EMA approval 25/10/2012) and Kadcyla® (INN trastuzumab emtansine, EMA approval 15/11/2013) and about 50 more of this kind in clinical research.

This new generation called antibody-drug conjugates (ADC) is a part of targeted cancer medication and combines the specificity of antibodies with the activity of cytotoxic compounds, thus offering the potential to selectively destroy tumour cells while generally sparing healthy cells.

A key role of designing ADCs is the selection of a tumour antigen on the surface of a cancer cell which can be selectively attacked by the antibody. Following uptake into the cancer cell, the toxic component is cloven from the conjugate and then unfolds its action. The undesirable systemic effect of the cytotoxic compound is therefore largely prevented and the risk-benefit ratio substantially improved.

This concept is not unknown to medicine, since Paul Ehrlich formed his postulate about 100 years ago: *'we have to learn to create magic bullets, which solely hit pathogens as if they were magic bullets from The Marksman.'* In the year 1909, Ehrlich realised this concept for the first time as he developed the compound *arsphenamine* as a treatment for syphilis. To mention another example, in 1928 Alexander Fleming isolated the compound *penicillin*, which selectively blocks the regeneration of the bacterial cell wall.

While in these two examples bacterial cells are the aim of the therapeutic compound, cancer therapy faces the challenge of selectively destroying the body's own cells.

# INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG.....	1
1 Paul Ehrlichs Konzept der magischen Kugel .....	1
2 Neuartige Konzepte in der Krebstherapie .....	3
2.1 Immuntherapie .....	3
2.2 Gezielte Krebstherapie .....	7
2.3 Antibody-Drug Conjugates .....	9
3 Chemotherapie.....	10
4 Krebserkrankung.....	13
II ANTIBODY-DRUG CONJUGATES.....	16
1 Geschichte und Entwicklung.....	16
2 Aufbau von ADCs.....	19
2.1 Payload .....	19
2.2 Linker .....	23
2.3 Antikörper .....	25
3 Klinische Entwicklung .....	26
4 Präparate am Markt.....	29

III KADCYLA® .....	31
1 Wirkmechanismus .....	31
2 Zulassung.....	33
3 Phase III-Studien .....	35
3.1 EMILIA .....	35
3.2 TH3RESA .....	38
3.3 MARIANNE.....	41
3.4 Guidelines .....	43
4 ZNS-Metastasen bei Brustkrebs.....	45
4.1 Einleitung.....	45
4.2 Subgruppenanalyse von EMILIA .....	46
4.3 Retrospektive Fallstudien.....	48
4.4 Fallberichte .....	50
5 Diskussion .....	52
IV LITERATURVERZEICHNIS .....	54



# I EINLEITUNG

## 1 Paul Ehrlichs Konzept der magischen Kugel

Im Jahr 1897 publizierte der Mediziner Paul Ehrlich die *Seitenkettentheorie der Immunität* als Zusammenfassung seiner Erkenntnisse, die er in jahrelanger Arbeit mit histologischen Färbetechniken gewonnen hatte. Seine Ansicht war: wenn bestimmte chemische Farbstoffe eine unterschiedliche Affinität für unterschiedliche Zellen besitzen, müssen diese Zellen ebenfalls spezifische chemische Strukturen aufweisen, mit welchen der Farbstoff interagiert. Er postulierte daher die Existenz von *Seitenketten*, die sich an der Oberfläche von Zellen befinden und einzigartig für einen bestimmten Zelltyp sind.

1891 wurde Paul Ehrlich von seinem Freund Robert Koch eingeladen, um an dessen neu gegründetem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin tätig zu werden. Hier konnte er im Rahmen von klinischen Forschungen seine Erkenntnisse in das Feld der Immunologie integrieren und erweitern. Mit seiner *Seitenkettentheorie* glaubte Ehrlich die Reaktion des Immunsystems auf ein Fremdtoxin erklären zu können und somit auch die molekulare Basis der Immunantwort. Er führte die Begriffe Toxin und Antitoxin ein, was der heutigen Begrifflichkeit von Antigen und Antikörper entspricht. Ehrlich erkannte, dass das Immunsystem aus Zellen bestehen müsse, die an ihren Oberflächen Antitoxine besitzen, um damit, gleich einem Schlüssel-Schloss-Prinzip, fremdartige Toxine zu erkennen und zu binden. Auch die Folgerung daraus, dass diese Bindung weitere Zellen und Reaktionen des Immunsystems aktivieren müsse, um schlussendlich die Fremdstruktur zu beseitigen, hat sich als richtig erwiesen.

Der Begriff *Seitenkette* wurde bald durch den Begriff *Rezeptor* ersetzt und die Theorie auf die damals ebenfalls noch unerklärliche spezifische Bindung von Wirkstoffen im Körper

ausgedehnt. Als logische Konsequenz seiner Erkenntnisse formulierte Ehrlich die Idee, dass mittels chemischer Wirkstoffe gezielt Fremdstrukturen im Körper angegriffen werden können. Er prägte damit den Begriff *Chemotherapie*, der in seiner ursprünglichen Bedeutung die Therapie von Infektionskrankheiten durch Beseitigung der Krankheitserreger mit chemischen Wirkstoffen bezeichnet.<sup>1</sup>

Ehrlich formulierte schließlich das Konzept der *magischen Kugeln*: Wirkstoffe, die selektiv an ihre Zielstrukturen binden und so den Rest des Organismus weitgehend schonen. „Wir müssen lernen, magische Kugeln zu gießen, die gleichsam wie Zauberkugeln des Freischützen nur die Krankheitserreger treffen.“ Ob dem Forscher dieser Gedanke tatsächlich während einer Aufführung der Oper von Carl Maria von Weber gekommen ist, darf zum Zweck der Verklärung unbeantwortet bleiben.

Im Jahr 1908 erhielten Paul Ehrlich und der Immunologe Ilja Iljitsch Metschnikow den *Nobelpreis für Physiologie oder Medizin* „als Anerkennung ihrer Arbeiten über die Immunität“.

1909 gelang Ehrlichs Mitarbeiter Sahachiro Hata mittels Wirkstoffscreening die Identifikation von *Arsphenamin* als selektiv gegen den Erreger von Syphilis wirkende Substanz. Diese arsenhaltige Verbindung wurde 1910 unter dem Namen *Salvarsan*<sup>®</sup> als erstes Mittel in der Therapie der sexuell übertragbaren Krankheit auf den Markt gebracht und war eines der ersten antimikrobiellen Präparate überhaupt. Diese Entwicklung war die erste Realisierung der *magischen Kugel*, und der Beginn der Chemotherapie war eingeläutet.<sup>2</sup>

Paul Ehrlichs Gabe zur Abstraktion seiner Beobachtungen und sein Entwurf für ein simples wie geniales Konzept der zielgerichteten Therapie inspirierte Dekaden der Forschung – vor allem im Bereich der Krebstherapie, wo personalisierte und spezifisch auf den molekularen Defekt zugeschnittene Therapie zum erklärten Paradigma geworden ist.<sup>1</sup>

## 2 Neuartige Konzepte in der Krebstherapie

### 2.1 Immuntherapie

Unter dem Begriff Krebsimmuntherapie werden verschiedenartige Behandlungsmethoden verstanden, die unter Beeinflussung des Immunsystems ihre Wirkung entfalten. Die normale Aktivität und Wirkungsweise des menschlichen Abwehrsystems ist im Fall von Krebserkrankungen meist unzureichend.

Als Ursprungsidee steht der Ansatz, die körpereigene Abwehr durch eine Infektion anzuregen, sodass ein überaktiviertes Immunsystem in der Lage ist, einen Tumor zu attackieren. Die ersten Berichte von Tumorregression nach Infektion finden sich auf dem *Papyrus Ebers* und datieren auf das Jahr 1550 v. Chr.<sup>3</sup> Diese altägyptische Behandlungsmethode beschreibt ein Kataplasma aus diversen Ingredienzien, gefolgt von einer Inzision in das Tumorgewebe.<sup>4</sup> Eine derartige Behandlungsmethode führt unweigerlich zu einer Infektion im umliegenden Gewebe.

Die heutige Medizin bedient sich spezifischerer Methoden, die teilweise auch auf einer generalisierten Immunantwort, aber hauptsächlich auf der Reaktion auf spezifische biochemische Erkennungsmerkmale einer Tumorzelle basieren. Es wird unterschieden zwischen passiven Formen, aktiven Formen und Hybridformen der Immunisierung. Alle Formen haben das Ziel, die Aufmerksamkeit des Immunsystems auf Krebszellen zu lenken. Diese bedienen sich verschiedener Mechanismen, um von den Zellen des Immunsystems nicht als entartet erkannt zu werden (*immune escape*),<sup>5</sup> oder leiten sogar Gegenangriffe ein (*tumor counterattack*).<sup>6</sup> Ungeachtet aller Überlebensstrategien der Krebszellen, die sich mikroevolutionär im Tumor etablieren, verraten sie sich dem Immunsystem hauptsächlich durch sogenannte Tumorantigene. Diese Proteinstrukturen lassen sich in tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene einteilen und zeigen dem Immunsystem an, dass der Meta-

bolismus der betreffenden Zelle entartet ist. Sie befinden sich meistens an der Oberfläche der Zellmembran, aber auch im Zellplasma oder frei im interstitiellen Raum. Tumorspezifische Antigene sind Proteine, die durch Mutationen der Krebszellenchromosomen entstanden sind und von Immunzellen erkannt werden können. Tumorassoziierte Antigene hingegen sind normale ubiquitäre Proteine, die durch eine abnorm hohe Expression auffällig werden können. Tumorantigene spielen nicht nur in der Therapie sondern auch in der Krebsdiagnostik eine große Rolle, da durch ihr Vorhandensein in diversen Körperflüssigkeitsproben oder Biopsaten frühzeitig das Erkennen und Klassifizieren eines Krebstyps möglich wird.

Es gibt eine Reihe von Methoden in der Krebsimmuntherapie, die sich auf verschiedenste Weise die Funktionen und Zellen des Immunsystems zunutze machen, um Tumoren zu bekämpfen. Als relevanteste Methode für die vorliegende Arbeit sei die Antikörpertherapie anschließend genauer ausgeführt. Der Vollständigkeit halber sollen andere Formen der Krebsimmuntherapie nicht unerwähnt bleiben, auch wenn einige Methoden davon sich erst in experimentellen klinischen Phasen befinden:<sup>7,8</sup>

- Adoptiver Zelltransfer – das einzige bis dato zugelassene Präparat *Sipuleucel-T* (Provenge®) wurde im Juni 2015 vom Zulassungsinhaber im EU-Raum zurückgezogen;
- Die Verwendung von Interferonen oder anderen Zytokinen;
- Einsatz von aktivierten Killer-T-Zellen;
- Vakzine auf Basis von inaktivierten Krebszell(fragment)en;
- Onkolytische Viren – *Talimogene Laherparepvec* kurz *T-Vec* (Imlytic®, EMA-Zulassung 16.12.2015) als bis dato einziger zugelassener Vertreter.

## Antikörpertherapie

Antikörper, auch Immunglobuline genannt, spielen eine Schlüsselrolle in der Erkennung und Eliminierung von fremdartigen Proteinstrukturen. Damit können Bakterien, Viren oder entartete Körperzellen gemeint sein. Antikörper erkennen solche anhand ihrer körperfremden Peptidstrukturen, die als Antigene bezeichnet werden. Antikörper binden Antigene relativ spezifisch, analog einem Schlüssel-Schloss-Prinzip. Der entstehende komplementäre Proteinkomplex – auch Immunkomplex genannt – löst eine Reihe von Reaktionen aus, die letztendlich den Abbau der fremdartigen Zelle zum Ziel haben. Antikörper werden von einer Untereinheit der Leukozyten produziert, den B-Lymphozyten, die auf diese Weise die humorale Immunantwort darstellen. T-Lymphozyten hingegen bilden die zelluläre Immunantwort, sie können direkt durch Ausschütten von zytotoxischen Substanzen eine unerwünschte Zelle eliminieren. B- und T-Lymphozyten bilden gemeinsam den adaptiven Teil der Immunabwehr, sie agieren spezifisch und passen sich laufend erneut Herausforderungen an. Dem gegenüber steht die angeborene Immunabwehr, diese operiert nicht-spezifisch und initiiert beispielsweise Entzündungen oder Phagozytose.

Körpereigene Antikörper können meist nicht effektiv zur Elimination von Krebszellen beitragen. Die Antikörpertherapie versucht daher durch den Einsatz künstlicher Antikörper, Tumorantigene zu attackieren, um so die vernichtende Immunantwort einzuleiten. Diese mit der Hybridom-Technik hergestellten Antikörper sind monoklonal, das bedeutet, sie wurden von einer Zelllinie eines einzigen B-Lymphozyten produziert, somit sind sie untereinander ident und nur gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet. Diese Spezifität ist auch Voraussetzung, um keine unberechenbaren Wirkungen zu entfalten.

Als prominentes Beispiel für ein Immuntherapeutikum sei *Rituximab* (INN, Handelsname MabThera®, EMA-Zulassung 02.06.1998) erwähnt, der erste in der Krebstherapie zugelassene monoklonale Antikörper. *Rituximab* richtet sich gegen CD20, ein membran gebundenes Glykoprotein, welches sich ausschließlich auf B-Lymphozyten findet. Sobald

der Antikörper dieses bindet, werden mehrere Mechanismen ausgelöst, die letztendlich zum Untergang der betreffenden Zelle führen:

- Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) beschreibt den Vorgang, dass eine Effektorzelle (Makrophagen, Granulozyten oder NK-Zellen) die antikörperbeladene B-Zelle erkennt und zerstört;<sup>9</sup>
- Komplementabhängige Zytotoxizität (*complement dependent cytotoxicity*, CDC) erklärt die proteinvermittelte Aktivierung des Komplementsystems, wodurch es nach Einbau von kanalartigen Membranangriffskomplexen in die Zellmembran zu einem Einstrom von Ionen und Wasser und letztendlich zur Zytolyse kommt;<sup>10</sup>
- Durch Tyrosinkinase-gekoppelte Signaltransduktion wird Apoptose eingeleitet.<sup>11</sup>

Das tumorassoziierte Antigen CD20 findet sich sowohl auf gesunden als auch auf entarteten B-Zellen, allerdings nicht bei unreifen und sich entwickelnden B-Zellen. Eine Therapie unter Angriff von CD20-Protein hat also den Nachteil, dass gesunde, reife B-Zellen ebenfalls eliminiert werden, jedoch überleben die meisten unreifen B-Lymphozyten die Therapie und können daraufhin eine neue Generation von B-Zellen etablieren. Somit kommt es typischerweise in den ersten 6 Monaten der Therapie zu einer Lymphopenie und 9–12 Monate nach Beendigung der Therapie zu einer kompletten Restitution.<sup>12</sup>

*Rituximab* kommt bei CD20-positiven hämatologischen Krebsformen zur Anwendung: chronische lymphatische Leukämie, Non-Hodgkin-Lymphome und lymphozytenreiches Hodgkin-Lymphom. *Rituximab* wird meist in Kombination mit dem CHOP-Schema verabreicht (es wird dann als R-CHOP bezeichnet), bestehend aus Cyclophosphamid (ein Alkylans), Doxorubicin (=Hydroxydaunorubicin, ein Interkalans), Vincristin (Oncovin®, ein Mitosehemmer) und Prednisolon (ein Glucocorticoid).

## 2.2 Gezielte Krebstherapie

Unter diesem Begriff subsumiert man alle Therapieansätze, die gezielt gegen ein spezifisches Proteintarget gerichtet sind, um auf diese Weise eine Krebszelle an ihrem Wachstum oder in ihrer Progression zu hemmen. Man macht sich hier zwei Umstände zunutze: einerseits sind Krebszellen auf bestimmte Proteine oder Stoffwechselwege stärker angewiesen, sodass eine Eliminierung oder Unterbrechung dieser zu einem Zelluntergang führt; andererseits sind bestimmte Proteine oder Stoffwechselwege überexprimiert oder überreguliert, sodass hier ein regulierender Eingriff möglich ist. Die Behandlungskonzepte der gezielten Krebstherapie sollen daher spezifischer und somit wirksamer und verträglicher sein als konventionelle Chemotherapie. Trotzdem wird in der Regel auch die gezielte Krebstherapie mit konventionellen Therapiemethoden kombiniert (Resektion, Strahlen- oder Chemotherapie). Auch die Exklusivität der Targets hat sich nicht als absolut erwiesen, sodass auch in dieser Gruppe von Medikamenten mit schweren Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Die gezielte Krebstherapie lässt sich anhand ihrer biochemischen Angriffspunkte unterteilen:

- Hemmung von Wachstumsfaktorrezeptoren: Blockade des EGF-Rezeptors durch *Cetuximab* hemmt dessen Zellwachstum-stimulierendes Signal;
- Inhibition der Übertragung von Wachstumssignalen: Hemmer von spezifischen Tyrosinkinase wie *Imatinib* unterbinden die dazugehörige Signalkaskade;
- Antiangiogenese: Bindung des Wachstumsfaktors VEGF durch *Bevacizumab* hemmt die Gefäßneubildung des Tumors;
- Induktion von Apoptose: Proteasom-Inhibitoren wie *Bortezomib* führen über eine Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen und weiteren teilweise noch nicht vollständig geklärten Mechanismen zum Zelltod;<sup>13</sup>

- Eliminierung von Krebsstammzellen: Die CSC-Theorie (*cancer stem cells*) geht von einer kleinen Population von strahlen- und chemotherapieresistenten Stammzellen im Tumorgewebe aus, die verantwortlich sein soll für Metastasen- und Rezidivbildung;<sup>14</sup> das Antibiotikum *Salinomycin* gilt als Hoffnungsträger in der Eradikation von Krebsstammzellen.<sup>15</sup>

In Hinblick auf die verwendeten Wirkstoffe handelt es sich sowohl um *small molecules*, die meist über computerbasierte Modelle optimal an die aktive Domäne der Zielproteine angepasst wurden, als auch um monoklonale Antikörper.

Antikörperpräparate, wie das in Kapitel 2.1 besprochene *Rituximab*, die unter die Bezeichnung Immuntherapeutika fallen, können in Hinblick auf ihre Target-gerichtete Wirkungsweise ebenfalls als gezielte Krebstherapeutika bezeichnet werden.

Als echten Überschneidungsbereich zwischen Antikörper-Immuntherapie und gezielter Krebstherapie lassen sich Antikörper-Wirkstoff-Konjugate beschreiben, die in diesem Kapitel der neuartigen Therapiekonzepte kurz vorgestellt und in Kapitel II Gegenstand umfangreicher Darstellung sein werden.

## 2.3 Antibody-Drug Conjugates

*Antibody-drug conjugates* (in Folge als ADCs bezeichnet) sind eine neue Generation von hochpotenten Wirkstoffen, die die Vorteile ihrer Komponenten in einer wahren Emergenz zum Einsatz bringen. ADCs sind aus einem monoklonalen Antikörper aufgebaut, an den einige wenige Moleküle hochpotenten Zytotoxikums kovalent über Linker gebunden sind. Der Antikörper dient der zytotoxischen Substanz als Vehikel, um gezielt an die Krebszelle herangebracht zu werden. Er wurde biotechnologisch so entwickelt, dass er spezifisch gegen ein tumorspezifisches oder -assoziiertes Proteintarget gerichtet ist und selektiv an dieses bindet. Die toxische Wirkstoffkomponente wird nach Ablieferung an die Krebszelle abgespalten und entfaltet erst daraufhin ihre Wirkung. Der Vorteil liegt demnach in einer stark verringerten systemischen Toxizität des Wirkstoffs und in der Möglichkeit, vielfach höher toxische Substanzen zu verwenden als bei konventioneller Chemotherapie.

### 3 Chemotherapie

Als Chemotherapie wird die medikamentöse Behandlung von Krebserkrankungen bezeichnet. Das Ziel hierbei ist, die Krebszellen abzutöten oder sie an ihrer Vermehrung zu hindern. Bei der systemischen Gabe sogenannter Zytostatika werden prinzipiell alle zugänglichen Zellsysteme des Körpers mit der gegebenen Substanz durchflutet, doch macht sich diese Methode einen gravierenden Unterschied zunutze: die meisten Krebszellen teilen sich eklatant schneller als gesunde Körperzellen, mit Ausnahme von Zellen im blutbildenden System, in Haarfollikeln und in der Schleimhaut des Intestinaltraktes. In sich schnell teilenden Geweben werden daher mit hoher Wahrscheinlichkeit während der Gabe eines Zytostatikums Zellen erreicht, die gerade im Begriff sind sich zu teilen oder die nötigen Vorbereitungen für die Zellteilung treffen. Da Zellzyklus-abhängige Chemotherapeutika in der einen oder anderen Weise mit dem Zellteilungsmechanismus interferieren, werden nur jene Zellen einen Schaden davontragen, die sich gerade in diesen empfindlichen Phasen des Zellzyklus befinden. Bei Zellzyklus-unabhängigen Zytostatika hingegen wird die DNA dermaßen geschädigt, dass der Zelle die Replikation nicht gelingt und dadurch Apoptose eingeleitet wird.

Der rettende Ausweg für das gesunde Körpergewebe liegt in der Funktionstüchtigkeit der zellulären Reparaturmechanismen: während entdifferenzierte Tumorzellen hier einer Unzulänglichkeit unterliegen, kann sich gesundes Körpergewebe auch nach einer starken Beeinträchtigung durch chemische Noxen grundsätzlich wieder regenerieren.

Durch diese Auswirkungen auf sich schnell teilende Körpergewebszellen sind auch die häufigsten Nebenwirkungen erklärt, die während einer Chemotherapie auftreten: durch die Knochenmarksdepression kommt es zu Anämie (führt zu Müdigkeit und Leistungsabfall), Leukopenie (führt zu geschwächtem Immunsystem mit weitreichenden Folgewirkungen) und Thrombozytopenie (führt zu Blutungsrisiko); durch die Zellschäden in Haarfollikeln kommt es zu Haarausfall; durch die Unterdrückung der Schleimhautproduktion im

Darmtrakt kommt es zu Entzündungen und in weiterer Folge zu Störungen der Verdauungsvorgänge und Nährstoffresorption.

Zum Einsatz kommt die Chemotherapie in der Behandlung von malignen Tumoren wenn bereits Metastasen gebildet wurden und daher eine Resektion oder Bestrahlung des Primärtumors alleine nicht ausreichend ist, bei hämatologischen Krebsformen – Leukämien und Lymphome und als (neo-)adjuvante Therapie zur operativen Entfernung des entarteten Gewebes. Die neoadjuvante Chemotherapie kann angewendet werden, um den Tumor vor der Operation in seiner Größe zu beschränken oder ihn von seiner Nährstoffzufuhr aus dem gesunden Gewebe abzukapseln. Die adjuvante Therapie soll nach der operativen Entfernung sicherstellen, dass möglichst keine Krebszellen im Körper überleben.

Die Einteilung der zur Verfügung stehenden Substanzen erfolgt hauptsächlich über ihre biochemischen Angriffspunkte, wobei bei einigen Wirkstoffen ein gemischter Wirkmechanismus vorliegt:

- Direkte Schädigung der DNA durch alkylierende oder interkalierende Wirkstoffe, sodass bei der Replikation die DNA von zellulären Proteinen als beschädigt erkannt und Apoptose eingeleitet wird – *Cyclophosphamid, Doxorubicin*;
- Hemmung der DNA-Synthese durch Antimetaboliten, welche zelleigenen Molekülen chemisch ähnlich sind, dadurch vom Enzymsystem erkannt werden und dieses schließlich blockieren – *Methotrexat*;
- Blockade des Spindelapparates durch Mitosehemmer, der die gebildeten Schwesterchromatiden auf die zwei entstehenden Tochterzellen verteilen soll – *Vincristin*;
- Hemmung der Topoisomerasen: Enzyme, welche während der Replikation gezielt Ein- oder Zweistrangbrüche herbeiführen, um die Kopie der DNA-Helices zu ermöglichen; führt zu irreparablen DNA-Strangbrüchen – *Etoposid*.

In den meisten Fällen werden bestimmte Therapieschemata angewendet, also erprobte Wirkstoffkombinationen von meist drei Zytostatika mit unterschiedlichem Wirkmechanismus, um einen gewissen synergistischen Effekt zu erzielen. Ein weiterer Vorteil der Kombination mehrerer Wirkstoffe ist die Wahrscheinlichkeit einer Verringerung der Resistenzbildung. Dieses große Hindernis für die Wirksamkeit einer Therapie kann mehrere Ursachen haben:

- Vor allem bei größeren Tumoren besteht ein Großteil der Zellmasse aus nicht proliferierenden Zellen, diese sind weitaus unempfindlicher gegenüber Zellzyklus-abhängigen Chemotherapeutika wie Antimetaboliten und Mitosehemmer.
- Der Enzymapparat der Zelle stellt sich auf das Auftreten des Fremdmoleküls ein und beginnt mit Gegenregulationen, vor allem bei Anwendung von Antimetaboliten: Dihydrofolatreduktase kann verstärkt exprimiert werden bei *Methotrexat*-Gabe und senkt so dessen Wirksamkeit.
- Das Ausscheiden aus der Zelle kann bei bestimmten Wirkstoffen erhöht sein: P-Glykoprotein transportiert bestimmte Fremdmoleküle kurzerhand wieder aus dem Zytosol und wird zusätzlich vermehrt exprimiert.
- Die Aufnahme von Zytostatika in die Zelle kann bei bestimmten Tumorzelltypen beschränkt sein.
- DNA-Reparaturmechanismen können hochreguliert werden und so der Wirksamkeit von alkylierenden oder interkalierenden Substanzen entgegenwirken.

Hinzu kommt, dass die therapeutische Breite, also das Fenster zwischen Wirksamkeit und Toxizität, bei Zytostatika mitunter sehr gering ausfällt.

Trotz all dieser Herausforderungen ist die klassische Chemotherapie ein unerlässliches Instrument in der Behandlung von malignen Neoplasien.

## 4 Krebserkrankung

Im ursprünglichen Sinn wird mit der Bezeichnung *Tumor* (lat. ‚Wucherung‘, ‚Schwellung‘) jede unnatürliche Zunahme des Volumens eines Gewebes bezeichnet, unabhängig von ihrer Ursache. Damit kann im weiteren Sinn des Wortes ein entzündlicher Vorgang als Ursache für die betreffende Schwellung verantwortlich sein, allerdings wird hierfür der Begriff nicht mehr verwendet. Im engeren Sinn bezeichnet das Wort *Tumor* eine Neoplasie, also eine abnorme Wucherung von Gewebe, deren Entstehung ein fehlreguliertes Zellwachstum zugrunde liegt.

Anhand ihres Wachstumsverhaltens kann die Dignität einer Neoplasie in benigne und maligne unterschieden werden. Benigne, gutartige Tumoren können zwar umliegendes Gewebe verdrängen, infiltrieren dieses aber nicht, wachsen generell langsam und bilden keine Tochterkolonien. Pathologie kann somit erst sekundär entstehen, wenn sie Druck auf benachbarte Organe ausüben oder Hohlorgane verschließen. Maligne, bösartige Tumoren hingegen zeigen schnelles und destruierendes Wachstum, sie infiltrieren und zerstören umliegende Gewebestrukturen und bilden Metastasen. In diesem Fall spricht man von Krebs.

In einem gesunden adulten Körpergewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung (*Proliferation*) und kontrolliertem Zelluntergang (*Apoptose* – altgr. ‚abfallen‘). Diese Homöostase wird durch verschiedenste biochemische Signale aufrechterhalten und garantiert ein fehlerloses Funktionieren der Zellen im Einzelnen und des Gewebes im Ganzen. Die molekularen Regulatoren kontrollieren den Zustand der Zelle und den Ablauf der Mitose, nicht korrekt funktionierende Zellen werden ausgesondert und dem programmierten Zelltod unterworfen.

Krebs ist grundsätzlich ein biochemischer Defekt in der Regulation des normalen Zell-Lebenszyklus, der sich in einer massiv gesteigerten Proliferationsrate, einer Unsterblichkeit

oder zumindest drastisch verlängerten Lebensdauer und einer starken Entdifferenzierung der Zelle manifestiert. Die Entstehung dieser Defekte ist ein äußerst komplexer, mehrstufiger Vorgang, der noch nicht vollständig verstanden wurde. In jedem Fall sind zelluläre, genetische oder epigenetische Veränderungen an der Karzinogenese beteiligt, die zu einer Autarkie und Unempfindlichkeit gegenüber Kontroll- und Reparaturmechanismen führen und letztendlich einem unkontrollierten Wachstum den Weg ebnet.<sup>16</sup> Charakteristisch ist dabei auch eine stufenweise morphologische Veränderung der Zelle, die zwar irreversibel aber nicht zwingend progredient ist.<sup>17</sup>

Auslöser für zelluläre, genetische oder epigenetische Veränderungen können sein:<sup>18</sup>

- physikalische Schäden: UV-, Röntgen- und radioaktive Strahlung, Mineralfasern und Mineralstäube,
- chemische Noxen: Umweltgifte, Medikamente, Nahrungsbestandteile, Alkoholkonsum und Tabakrauch,
- biologische Einflüsse: Viren, Bakterien und Parasiten,
- Lebensstil: Art der Ernährung, Übergewicht und mangelnde körperliche Aktivität,
- Kongenitale Defekte,
- Fehler in der DNA-Replikation,
- Lebensalter.

## Statistik<sup>19</sup>

- Krebs ist weltweit nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache und verantwortlich für 8.8 Millionen Todesfälle im Jahr 2015. Somit hängt etwa jeder sechste Todesfall weltweit mit einer Krebserkrankung zusammen.
- Im Jahr 2012 wurden 14 Millionen neue Fälle von Krebserkrankungen registriert.<sup>20</sup> Für die nächsten 2 Dekaden wird ein Anstieg an Erstdiagnosen von 70% erwartet.

- Ein Drittel aller Krebserkrankungen hängt mit einem der fünf führenden Risikofaktoren zusammen: Übergewicht, niedriger Obst- und Gemüsekonsum, mangelnde körperliche Aktivität, Tabakkonsum oder Alkoholkonsum.
- Tabakkonsum ist der höchste Risikofaktor für Krebserkrankungen und verantwortlich für etwa 22% aller krebsbedingten Todesfälle.<sup>21</sup>
- Krebsauslösende Infektionen durch HBV, HCV oder HPV sind verantwortlich für bis zu 25% aller Krebserkrankungen in *low- and middle-income countries*.<sup>22</sup>

# II ANTIBODY-DRUG CONJUGATES

## 1 Geschichte und Entwicklung

Der Ursprung der Entstehungsgeschichte von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten wird hauptsächlich der Idee der *magischen Kugel* zugeschrieben, einem Konzept, welches der deutsche Mediziner und Forscher Paul Ehrlich zu Beginn des 20. Jahrhunderts formuliert hatte.<sup>1, 23</sup> Er beschrieb damit die Möglichkeit, mit einem Wirkstoff selektiv ein bestimmtes biochemisches Angriffsziel zu attackieren und dabei den restlichen Körper zu schonen.

Vor allem aber hatte Ehrlich aus seiner Forschungsarbeit die Existenz von Antikörpern und Rezeptoren abgeleitet. Er postulierte, dass ebendiese Rezeptoren – im heutigen Sprachgebrauch *Antigene* genannt – als Erkennungsmerkmal an der Oberfläche von Zellmembranen sitzen müssen und von Antikörpern des Immunsystems selektiv gebunden werden können.<sup>1</sup> Mit dieser Erkenntnis war der Grundstein für eine zielgerichtete Therapie mit zugeführten Antikörpern zur Bekämpfung von entarteten Körperzellen gelegt.

Die tatsächliche Entwicklung von beladenen Antikörpern ließ noch einige Dekaden auf sich warten. Mathé et al. gelang es im Jahr 1957 eine selektive wachstumshemmende Wirkung für L1210-Leukämiezellen nachzuweisen. Er verwendete ein Konjugat, bestehend aus dem Antimetaboliten *Methotrexat*, welcher über eine Azokupplung an ein spezifisches anti-Leukämie-Immunglobulin gebunden war.<sup>24</sup> Diese Entwicklung war der Anstoß für mehrere Forschungsgruppen, die daraufhin in den 1960er und 1970er-Jahren die Erkenntnisse über ADCs vorangetrieben haben.

Vor 1970 war es nahezu unmöglich, größere Mengen spezifischen Antikörpers aus tierischem oder menschlichem Serum zu gewinnen. 1984 wurde für die Entwicklung der

Hybridom-Technik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern der *Nobelpreis für Physiologie oder Medizin* vergeben. Diese Technik wurde 1975 entwickelt und ermöglichte von da an die Herstellung von künstlichen Antikörpern, die spezifisch gegen ein Antigen gerichtet sind.

Im Jahr 1983 wurde das erste ADC in einer klinischen Studie am Menschen eingesetzt, ein anti-CEA-Antikörper (CEA = Carcinoembryonales Antigen) mit dem antimitotischen Wirkstoff Vindesin als toxischer Beladung.<sup>25</sup> Im selben Jahr wurde über die Bedeutung der Linker publiziert,<sup>26</sup> da diese Toxin mit Antikörper verbinden und schließlich die Stabilität des Konjugats und die Freisetzung des Toxins maßgeblich beeinflussen. Die Anwendung der rekombinanten Technologie zur Produktion von chimären<sup>27</sup> und später humanisierten<sup>28</sup> Antikörpern reduzierte die Bedenken um Immunogenität von murinen monoklonalen Antikörpern.

Die 1980er- und 1990er-Jahre waren gekennzeichnet von einem ständigen Lernprozess in Bezug auf die Auswahl des Antigens, des Toxins und der chemischen Eigenschaften des Linkers. Für begrenzten präklinischen und klinischen Erfolg diverser Präparate waren vor allem niedrige Wirksamkeit, hohe Antigenexpression auf gesunden Zellen und Instabilität der Linker verantwortlich.<sup>29</sup> Ein Beispiel für ein solches ADC der ersten Generation ist *BR96-DOX* – ein chimärer Antikörper, gerichtet gegen das Lewis-Y-Antigen (CD174), verknüpft mit dem etablierten Interkalans Doxorubicin. In präklinischen Studien von 1993 zeigte das Präparat komplette Remission xenotransplantierte humaner Lungen-, Brust- und Kolonkarzinome.<sup>30</sup> Phase I- und II-Studien zeigten allerdings, dass die geringe Wirksamkeit und die schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen der niedrigen Tumorspezifität des Antigens<sup>31</sup> und der schwachen Stabilität des Linkers geschuldet waren.<sup>32</sup>

Man suchte weiterhin nach Antitumorwirkstoffen mit höherer Wirksamkeit, um dadurch niedrigere Dosen des ADC-Präparates verabreichen zu können und in weiterer Folge auch die Selektivität des Antikörpers zu bewahren. Gleichzeitig erwartete man sich Fortschritte

durch die Identifizierung spezifischerer Antigene, um eine unerwünschte Affinität des Antikörpers an gesundem Gewebe zu vermeiden.

Auf der Suche nach potenteren Wirkstoffen fokussierte sich die Forschung vor allem auf verschiedene Antibiotika mit antitumoraler Wirkung. Hier erwies sich die Familie der *Calicheamicine* als wegweisend, bekannt für ihre außerordentlich starke Wirkung.<sup>33</sup> Diese Wirkstoffe verursachen DNA-Doppelstrangbrüche in picomolaren Konzentrationen und erschienen so als geeignete Kandidaten für Antikörper-Konjugation. Erste präklinische Versuche aus dem Jahr 1993 mit ADCs aus diesen Antibiotika lieferten vielversprechende Ergebnisse.<sup>34</sup>

Die weitere Forschung hat zur Zulassung des ersten ADC im Jahr 2000 durch die FDA geführt: *Gemtuzumab Ozogamicin* (Mylotarg®) zur Therapie von akuter myeloischer Leukämie, ein anti-Siglec-3-Antikörper verknüpft mit N-Acetyl- $\gamma$ -<sup>1</sup>-*Calicheamicin*. Im selben Jahr wurde von der EMA der Orphan-Drug-Status für das Präparat erlassen. Den Zulassungsantrag hat die EMA 2008 negativ bescheinigt, und in den USA wurde das Präparat 2010 wegen Sicherheitsbedenken und unzureichendem Nachweis des Nutzens vom Markt genommen. Trotz des Fehlschlages war die Entwicklung ein Meilenstein in der Innovation von Krebstherapeutika.

## 2 Aufbau von ADCs

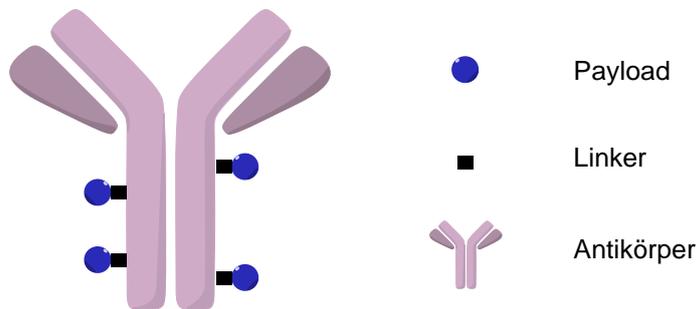


Abb. 1: Aufbau eines ADC

### 2.1 Payload

Als Payload wird die toxische Wirkstoffkomponente des ADCs bezeichnet, welche für die antitumorale Wirkung hauptverantwortlich ist. Zum Einsatz kommen Substanzen, die per se ungeeignet für eine Krebstherapie wären, da sie einen zu hohen toxischen Effekt auf gesundes Körpergewebe ausüben. Durch die Konjugation an monoklonale Antikörper werden diese Wirkstoffe zielgerichtet an Krebszellen abgeliefert und erhöhen so signifikant ihre therapeutische Breite. Durch einen geeigneten Linker bleibt die kovalente Bindung zwischen Antikörper und Payload im Blutkreislauf aufrecht und der Wirkstoff wird erst nach rezeptorvermittelter Endozytose freigesetzt. Molekulares Ziel der verwendeten Payloads ist entweder Tubulin oder DNA, wobei es zu einer Unterbrechung der Mitose oder der DNA-Synthese und in beiden Fällen letztlich zur Apoptose kommt.

Auf der Suche nach den potentesten zellwachstumshemmenden Substanzen stieß die Forschung auf drei Klassen von Naturstoffen – Maytansinoide, Auristatine und Calicheamicine. Die zurzeit verwendeten Payloads sind zumeist Vertreter einer dieser Familien. Daneben sind *Pyrrrolbenzodiazepine* – Derivate von Actinomycetes-Antibiotika, SN-38 –



- *Dolastatin 10* wurde 1987 als erster Vertreter der Auristatine aus der marinen Breitfußschnecke *Dolabella auricularia* – auch Seehase genannt – isoliert, mit einer verschwindend geringen Ausbeute von ca. 1 mg pro 100 kg.<sup>36</sup> Anfang der 1990er-Jahre wurde für dieses lineare Pentapeptid ein breites Spektrum an Antitumoraktivität im subnanomolaren Bereich nachgewiesen. Verwendete Derivate sind MMAE und MMAF – *Monomethylauristatin E und F*, als *Vedotin* und *Mafodotin* – die jeweils eine geringfügige Änderung im C-terminalen Peptid erhalten haben, um die Lipophilie herabzusetzen und somit die Möglichkeit, unkontrolliert aus der Zelle auszutreten. Auch Auristatine wirken als Mitosehemmer über eine blockierende Interaktion mit Tubulin.

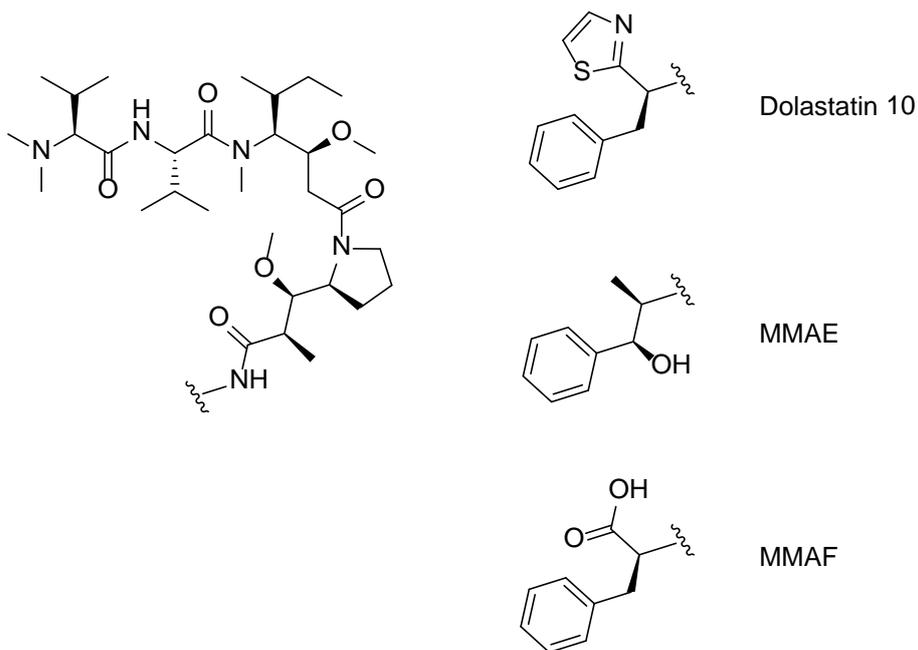


Abb. 3: Struktur von Auristatinen

- *Calicheamicin  $\gamma_1^I$*  ist ein stark antitumorales Antibiotikum und wird von *Micromonospora echinospora calichensis* produziert. Dieses Bakterium wurde 1987 in Texas zufällig aus einer Bodenprobe isoliert.<sup>33</sup> Calicheamicine binden selektiv an die

*minor groove* der DNA und besitzen eine Endiin-Struktur, welche durch Aktivierung über eine Bergman-Zyklisierung ein Diradikal bildet. Dieses Diradikal ist schließlich in der Lage, an der DNA Doppelstrangbrüche zu verursachen, wobei die mittlere Hemmkonzentrationen für Endiin-tragende Strukturen im subpicomolaren Bereich liegt.<sup>37</sup> Als Payload von ADCs ist das Derivat *Ozogamicin* in Verwendung, N-Acetyl- $\gamma$ -Calicheamicin-1,2-dimethylhydrazin.

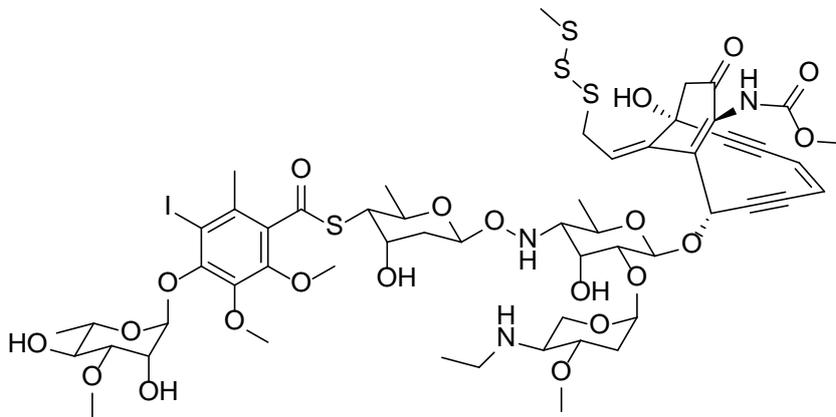


Abb. 4: Struktur von *Calicheamicin*  $\gamma_1$ <sup>1</sup>

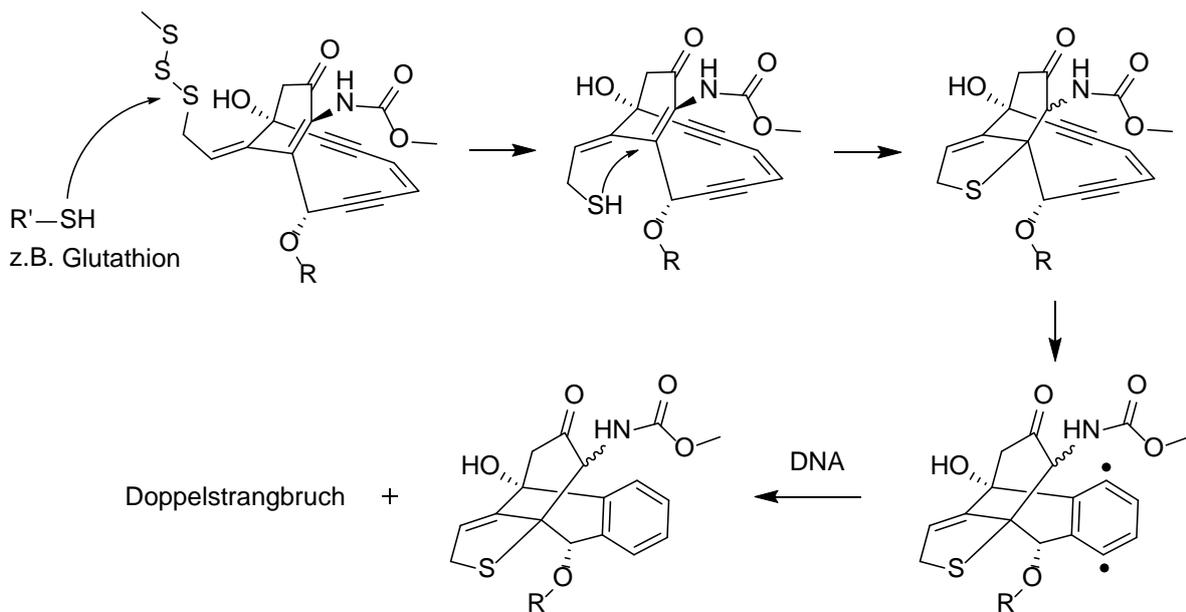


Abb. 5: Interaktion der Endiin-Struktur mit der DNA *via* Bergman-Zyklisierung

## 2.2 Linker

Der Linker bildet die kovalente Brücke zwischen der zytotoxischen Wirkstoffkomponente und dem Antikörper, welcher den Wirkstoff gezielt an die Krebszelle abliefern soll. Die Funktion des Linkers besteht einerseits darin, das Wirkstoffmolekül während der Formulierung, Lagerung und nach Applikation während der Zirkulation im Blutkreislauf an den Antikörper zu fixieren. Nach Bindung an ein Antigen und Internalisierung des ADC in das Zytosol muss andererseits eine rasche und effiziente Ablösung des Wirkstoffes vom Antikörper gewährleistet sein. Diese feine Balance der extrazellulären Stabilität und dem intrazellulären Abspaltungsvermögen sind die Rahmenbedingungen für einen effizienten Linker.

Über diese primäre Funktion als physikalische Verbindung der übrigen zwei Strukturelemente eines ADC hinaus spielt die chemische Beschaffenheit des Linkers eine entscheidende Rolle in der Pharmakodynamik des ADC. Durch ausgeklügelte Zusammensetzung lässt sich die Aktivierung des ADC und somit die Abspaltung des Wirkstoffes durch Zuhilfenahme der zellulären Mechanismen beschleunigen und auf diese Weise die Effektivität des ADC erhöhen. Ein Linker kann zudem den Wirkstoff durch geänderte Ladung oder Polarität vor einer Affinität zu bestimmten Membrantransportern bewahren, welche eine *Multiple Drug Resistance* verursachen können. Außerdem kann ein gezieltes Linkerdesign einen Metaboliten des Wirkstoffes hervorbringen, welcher die Fähigkeit besitzt, in proximale Zellen zu diffundieren. Dieser Angriff auf die Nachbarzelle wird *bystander effect* genannt und verbessert die Effektivität einerseits bei soliden Tumoren, bei denen somit eine Penetration in tiefere Schichten ermöglicht wird, und andererseits bei Tumortypen mit heterogener Antigenpräsentation, bei denen Zellen mit niedriger Antigenexpression nicht ausreichend viele Moleküle des ADC an ihrer Oberfläche binden können.<sup>38</sup>

Der Linker ist somit über seinen chemischen Aufbau an der Effektivität und Sicherheit des ADC maßgeblich beteiligt.

Generell sind Linker gemäß ihrer Struktur in zwei Kategorien einzuteilen:

- Nicht-spaltbare Linker, welche trotz zellulären Metabolismus intakt bleiben; bei solcherart ADCs muss die Antikörperstruktur lysosomal abgebaut werden, um die aktive Komponente freizusetzen, die mit der konjugierenden Aminosäure des Antikörpers über den Linker kovalent verbunden bleibt.
- Spaltbare Linker, welche durch intrazelluläre Mechanismen abgetrennt werden:
  - Säurelabile Linker mit Hydrazonteilstruktur werden im niedrigen pH-Milieu des Lysosoms abgespalten.<sup>39</sup>
  - Protease-sensitive Linker mit Valin-Citrullin-Dipeptid werden durch Proteasen wie Cathepsin B im Lysosom abgespalten.<sup>40</sup>
  - Glutathion-empfindliche Linker mit Disulfidgruppierung werden durch die höhere Konzentration von Glutathion im Zellinneren reaktiv gespalten; eine zusätzliche Dimethylgruppe bietet eine sterische Hinderung, welche eine frühzeitige Abspaltung im Blutkreislauf verhindert.<sup>41</sup>

## 2.3 Antikörper

Das zurzeit am meisten verwendete Antikörperformat ist der Subtyp IgG1 des Immunglobulin G, daneben sind IgG2 und IgG4 in Verwendung. Sowohl chimäre und humane, aber meistens humanisierte Varianten dieser Glykoproteine werden eingesetzt, nachdem murine Antikörper eine signifikante Immunogenität erzeugt hatten.<sup>42</sup>

Neben ihrem primären Verwendungszweck, und zwar dem Transport des zytotoxischen Wirkstoffes an den Zielort, weist die Antikörperkomponente selbst ein antitumorales Potential auf, welches jedoch *in vivo* nicht zwangsläufig komplett auf das ADC übertragen wird.<sup>43</sup> Es kann einerseits ein zellulärer Effekt durch die Bindung an das Antigen ausgelöst werden, etwa Apoptose durch Modulation einer Signaltransduktion, andererseits können über die intakte Fc-Region sekundäre Immunfunktionen aktiviert werden. Vor allem IgG1-Antikörper medieren komplementvermittelte Zytolyse (CDC) und antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC).<sup>23</sup>

### 3 Klinische Entwicklung

Mehr als 40 ADCs befinden sich zurzeit in klinischer Entwicklung, sowohl in der Behandlung von hämatologischen Krebsformen als auch von soliden Tumoren.<sup>44</sup> Die frühere Ansicht, dass ADCs nicht ausreichend gut in das Tumorgewebe eindringen könnten und somit hämatologischen Krebsformen vorbehalten blieben, konnte sich spätestens nach dem klinischen Erfolg von *Trastuzumab Emtansin* nicht mehr halten.<sup>45</sup>

Die starke Entwicklung im Feld der ADCs resultiert aus Fortschritten

- in der Erforschung von Linkern mit adäquater Stabilität, sodass die Abspaltung des Wirkstoffes vom Antikörper möglichst quantitativ in der Krebszelle und nicht während der Zirkulation im Blutkreislauf erfolgt;
- von präziseren Technologien zur Konjugation, die zu einer homogenen *drug-to-antibody ratio* (DAR) führen und so Einfluss auf die Pharmakokinetik nehmen;
- in der Identifikation tumorspezifischer und internalisierender Antigene, sodass nach selektiver Antikörper-Antigen-Komplexbildung die Aufnahme in das Zytosol sichergestellt ist.

Die meisten ADCs, welche sich momentan in klinischer Entwicklung befinden, bestehen aus einem humanisierten IgG1-Antikörper. Als zytotoxische Wirkstoffe sind fast exklusiv Mitosehemmer des Tubulin-bindenden Typs in Verwendung, da diese den Vorteil einer Zellzyklus-abhängigen Wirkung und somit geringeren Toxizität auf sich langsam bis normal schnell teilende Körperzellen bieten.<sup>46</sup>

*Inotuzumab Ozogamicin* (CMC-544), ein Calicheamicin-konjugierter anti-CD22-Antikörper, wurde im Februar 2017 bei der FDA zur Zulassung eingereicht, nachdem sich in der Phase III-Studie *INO-VATE ALL* zur Behandlung von refraktärer oder rezidivierender akuter lymphoblastischer Leukämie (r/r ALL) ein Vorteil gegenüber *investigator's choice*

gezeigt hatte. Das Antigen CD22 zeigt sich charakteristisch für reife B-Zellen und ist somit ein geeignetes Ziel für sämtliche Leukämien und Lymphome mit B-Zellen-Beteiligung.<sup>1\*</sup>

Ebenfalls vielversprechend zeigt sich *Sacituzumab Govitecan* (IMMU-132), ein anti-TROP2-Antikörper konjugiert an SN-38, dem aktiven Metaboliten von Irinotecan, einem Topoisomerase-I-Inhibitor. Eine Phase III-Studie startet im März 2017, nachdem sich das Präparat in Phase II wirksam in der Behandlung von triple-negativem Brustkrebs (TNBC) erwiesen hat.<sup>44</sup> Bei TNBC zeigen die Tumorzellen keine Überexpression an Estrogenrezeptoren, Progesteronrezeptoren oder dem Wachstumsfaktorrezeptor HER2. Dieses biochemische Muster trifft auf 15% aller Mammakarzinomdiagnosen zu und kennzeichnet einen überaus aggressiv wachsenden Tumortyp, mit einer hohen Wahrscheinlichkeit an Metastasenbildung und hoher Rezidivrate. Zusätzlich kann dieser Tumortyp mangels typischer biochemischer Identifikationsmerkmale nicht mit Hormontherapie oder HER2-gerichteter Therapie, sondern nur durch aggressive Chemotherapieschemata und Bestrahlung kontrollierbar werden. Das tumorassoziierte Antigen TROP2 zeigt eine hohe Expressionsrate in verschiedenen Adenokarzinomen, und dient als alternatives Antigen bei triple-negativen Brustkrebstypen.

Ein anderer Therapieansatz für TNBC zielt auf das *Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B* (GPNMB) ab, ein Transmembran-Glykoprotein mit höherer Expression in bestimmten malignen Gewebearten relativ zum entsprechenden gesunden Gewebe. GPNMB ist daher ein tumorassoziiertes Antigen, ausreichend spezifisch für gezielte Therapie bei Melanomen und triple-negativem Brustkrebs. Mit *Glembatumumab Vedotin* (CDX-011) befindet sich ein weiteres ADC in Phase II zur Therapie von TNBC, außerdem laufen Phase II-Studien mit diesem Präparat zur Behandlung von Osteosarkom und Melanom.<sup>44</sup>

Mit *Depatuximab Mafodotin* (ABT-414) läuft momentan eine Phase IIb/III-Studie (*Intelligence 1*) in der Behandlung von Glioblastom; 2014 wurde das Präparat als *Arzneimittel für seltene Leiden* ausgewiesen.

---

<sup>1\*</sup> Das Komitee für humane Arzneimittel (CHMP) der EMA erteilte Besponsa® (*Inotuzumab Ozogamicin*) am 21.04.2017 eine positive Beurteilung für die Monotherapie von CD22+ r/r ALL.

Weitere Phase III-Studien laufen mit *Vadastuximab Talirine* (SGN-CD33A) – *CASCADE* zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie (AML) in Kombination, und *Mirvetuxumab Soravtansine* (IMGN853) – *FORWARD I* in der Therapie von resistentem Ovarialkarzinom.

Auch in früher klinischer und präklinischer Entwicklung befinden sich immer mehr vielversprechende Kandidaten. Daten aus momentanen tierischen Tumormodellen mit neuen ADCs zeigen höhere Wirksamkeit als die derzeit zugelassenen Präparate vor etwa zehn Jahren in deren präklinischer Versuchsphase.

## 4 Präparate am Markt

Im Jahr 2011 wurde von der FDA das zweite ADC zugelassen, *Brentuximab Vedotin* mit dem Handelsnamen Adcetris® (EMA-Zulassung im Oktober 2012), in der Behandlung der *orphan diseases* Hodgkin-Lymphom (HL) und anaplastisch-großzelliges Lymphom (ALCL). Für die Indikation HL ist damit seit 30 Jahren der erste zugelassene Wirkstoff am Markt.<sup>47</sup> *Brentuximab* ist ein spezifisch gegen CD30 gerichteter chimärer monoklonaler Antikörper. CD30 ist ein internalisierendes Antigen mit hoher Expression auf malignen B- und T-Zellen, welches charakteristisch für HL, ALCL und andere Non-Hodgkin-Lymphome ist. In vorangegangenen klinischen Untersuchungen zeigte der Antikörper bereits deutliche Antitumoraktivität.<sup>48</sup> *Vedotin* ist das hochpotente Auristatin-Derivat MMAE (*Monomethyl-Auristatin E*), welches über ein enzymatisch abbaubares Dipeptid an die Proteinstruktur des Antikörpers gebunden ist. MMAE wirkt als Mitosehemmer, sodass die Zelle durch Apoptose untergeht.

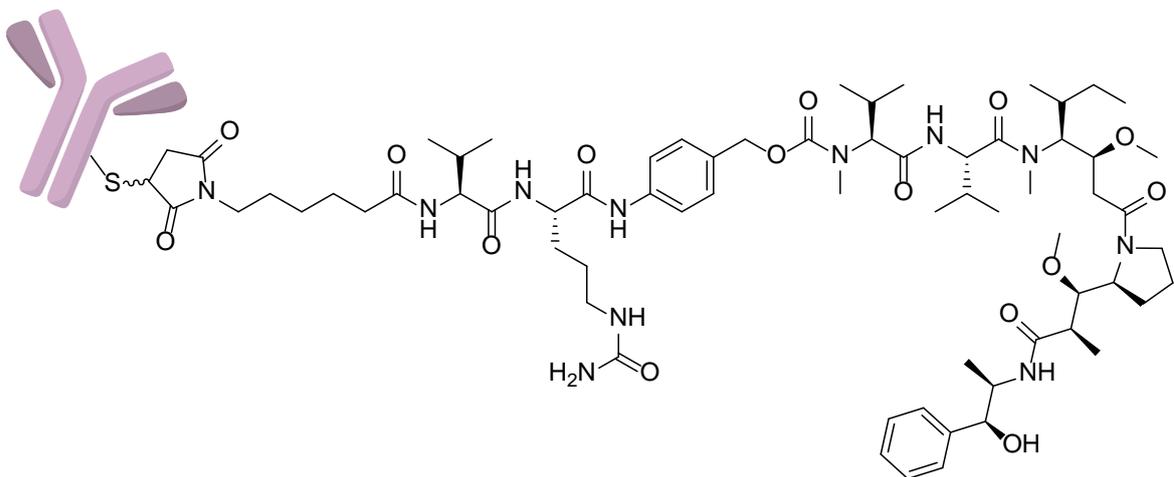


Abb. 6: Struktur von *Brentuximab Vedotin*

*Trastuzumab Emtansin*, kurz *T-DM1*, wurde im Februar 2013 von der FDA unter dem Handelsnamen *Kadcyla*® zugelassen, im November des gleichen Jahres erfolgte die Zulassung durch die EMA. In den USA ist der Wirkstoff unter dem Namen *ado-trastuzumab emtansine* auf dem Markt; das Präfix *ado-* wurde auf Ersuchen der FDA hinzugefügt, um Verwechslungen mit dem seit 1998 zugelassenen Wirkstoff *Trastuzumab* (*Herceptin*®) zu vermeiden. Zugelassen wurde *T-DM1* zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs. Dieses neueste Präparat ist ein Konjugat aus dem erprobten anti-HER2-Antikörper *Trastuzumab* und dem Mitosehemmer *Emtansin*, einem Derivat des Naturstoffs *Maytansin*. Durch die Kombination dieser beider Komponenten kann die Antigen-selektivität des Antikörpers mit der hohen Zytotoxizität des Wirkstoffes optimal zum Einsatz gebracht werden.

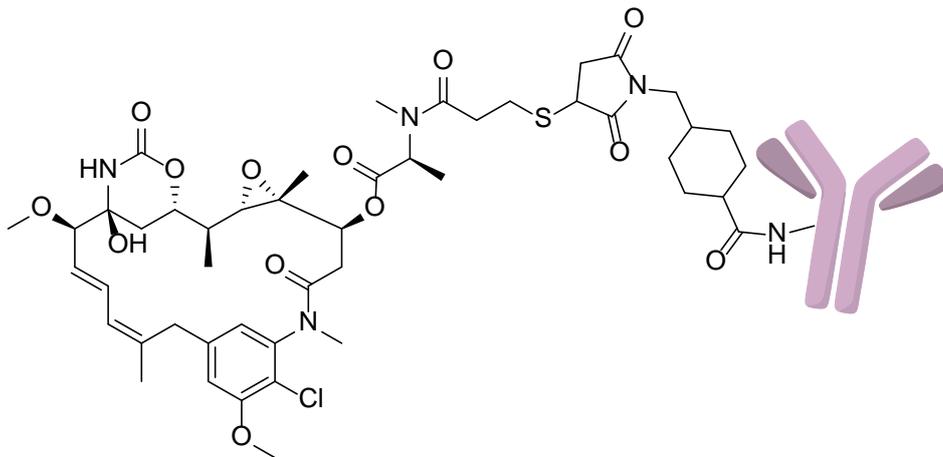


Abb. 7: Struktur von *Trastuzumab Emtansin*

Die Aussicht auf Krebstherapeutika mit hoher Wirksamkeit bei niedriger Dosierung und dabei guter Verträglichkeit war nach der Zulassung dieser ersten ADCs so groß wie nie zuvor.

# III KADCYLA®

## 1 Wirkmechanismus

HER2 ist ein Membranrezeptorprotein der *epidermal growth factor receptor*-Familie (EGFR) und wird im Epithelgewebe exprimiert, wo es bei der Regulierung der Zellproliferation und Differenzierung eine entscheidende Rolle spielt. Die Bildung eines Heterodimers aus den beiden Rezeptorproteinen HER2 und HER3 ist obligatorisch, um nach Bindung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) die Rezeptor-Tyrosinkinase im Zellinneren zu aktivieren. Durch Aktivierung anschließender Signalwege (MAP-Kinase, PI3-Kinase u.a.) kommt es letztendlich zu Zellproliferation und Apoptosehemmung. Eine Überregulierung dieser Signalwege manifestiert sich daher in abnorm hoher Teilungsrate und Umgehung der Apoptose.

Der antiproliferative und zytotoxische Effekt von *Trastuzumab Emtansin (T-DM1)* beruht im Wesentlichen auf drei Wirkmechanismen, von denen die beiden Erstgenannten der Antikörperkomponente des ADC zuzuschreiben sind und generell eine untergeordnete Rolle spielen:<sup>49</sup>

- Bindung von *T-DM1* über seine Antikörperstruktur an das Rezeptorprotein HER2 blockiert dessen Fähigkeit, mit dem Rezeptorprotein HER3 zu dimerisieren. Somit kann keine weitere Signaltransduktion stattfinden und der proliferative Effekt wird verhindert.
- Durch ADC-Antigen-Bindung wird die Krebszelle über die Fc-Region des Antikörpers für das Immunsystem erkennbar. Makrophagen oder natürliche Killerzellen können binden und leiten über antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) die Elimination der Zelle ein.

- Internalisierung des ADC-HER2-Komplexes führt zu proteolytischem Abbau der Proteinstrukturen im Lysosom, wobei die konjugierende Aminosäure Lysin über den nicht-spaltbaren Linker Maleimidomethyl-cyclohexan-1-carboxylat (MCC) kovalent mit dem Wirkstoff *Emtansin* (DM1) verbunden bleibt. Daraufhin wird die aktive zytotoxische Komponente als Lys-MCC-DM1 in das Zytosol freigesetzt und verhindert über eine Bindung an Tubulin die Polymerisation der Mikrotubuli.

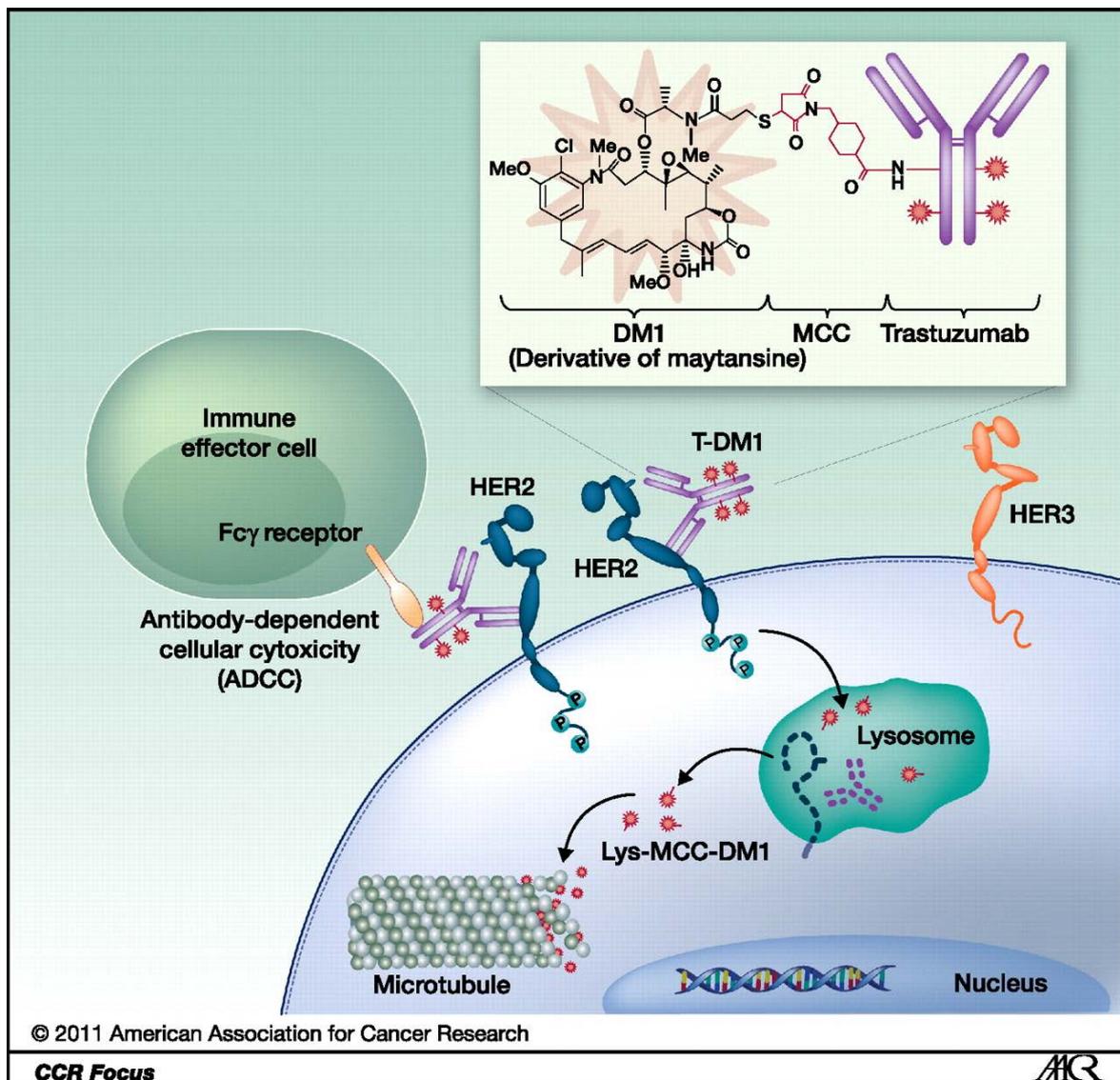


Abb. 8:<sup>50</sup> Wirkungsmechanismus von *T-DM1*

## 2 Zulassung

Brustkrebs ist nach Lungenkrebs die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Frauen, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von knapp 90%. Metastasierter Brustkrebs allerdings zeigt eine mittlere Überlebenszeit von lediglich 22 Monaten und bleibt damit unheilbar.<sup>51</sup> Der Fokus in der Therapie von metastasiertem Brustkrebs liegt demnach in der Verlängerung der Zeit bis zur Tumorprogression und der Verbesserung der Lebensqualität durch verträglichere Therapien.

20–30% aller Brustkrebsformen sind HER2-positiv, zeigen also eine erhöhte Expression des Antigens HER2. Dieser Brustkrebstyp zeigt aggressiveres Wachstum, hohe Rezidivrate, starke Resistenzentwicklung und erhöhte Mortalität.<sup>52</sup> Das Membranrezeptorprotein HER2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Zellproliferation und Differenzierung. Eine Amplifikation des HER2-Gens ist mit der Entwicklung einer Krebsform der Brust, des Ovars und des Gastrointestinaltraktes assoziiert.

*Trastuzumab* wurde 1998 als Herceptin® zugelassen, nachdem für diesen monoklonalen Antikörper eine signifikante Besserung bei metastasiertem HER2-positiven Brustkrebs nachgewiesen wurde. Der Antikörper bindet selektiv an das Rezeptorprotein HER2 und hemmt so dessen Funktion als Signaltransduktor der Zellproliferation. Darüber hinaus werden durch die Antikörperbindung Zellen des Immunsystems aktiviert, die eine Elimination der Krebszelle initiieren. Trotz der überzeugenden Resultate zeigte sich in der Praxis bald eine Einschränkung in der Anwendung von *Trastuzumab*, denn ein großer Anteil der Patientinnen sprach entweder nicht auf die Therapie an oder entwickelte nach einer initialen Ansprechphase ein Rezidiv.<sup>53,53b</sup>

*Lapatinib*, ein HER2-gerichteter Tyrosinkinase-Inhibitor, verlängert die Zeit bis zur Tumorprogression in Kombination mit dem Antimetaboliten *Capecitabin* in Patientinnen, die erfolglos mit *Trastuzumab*, einem *Anthracyclin* und einem *Taxan* behandelt wurden.

Allerdings kann die Überlebensrate nicht signifikant verbessert werden und eine starke Toxizität beeinträchtigt die Lebensqualität.<sup>54</sup>

Um den Antikörper *Trastuzumab*, der 2015 in die *Liste der unentbehrlichen Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation* aufgenommen wurde, in seiner Wirksamkeit zu steigern, wurde er für die Entwicklung eines ADC herangezogen. Durch seine pharmakodynamische Selektivität bot er ein ideales Vehikel, um einen zytotoxischen Wirkstoff gezielt an eine Krebszelle zu transportieren. Tatsächlich zeigte sich bei der klinischen Erprobung des ADC *Trastuzumab Emtansin* eine Verlängerung der Überlebenszeit bei *Trastuzumab*-resistenten Patientinnen im Vergleich zu einer Standardtherapie.<sup>55</sup> Basierend auf dieser Phase III-Studie erteilte die FDA am 22. Februar 2013 Kadcyła® die Zulassung, gefolgt von der EMA am 15. November desselben Jahres.

*Trastuzumab Emtansin*, kurz *T-DM1*, ist zugelassen zur Behandlung von inoperablem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs, der das Antigen HER2 aufweist und auf eine Behandlung mit *Trastuzumab* plus *Taxan* nicht angesprochen hat.

*T-DM1* wurde von dem kalifornischen Unternehmen *Genentech* entwickelt, eine Tochterfirma des Schweizer Konzerns *Hoffmann-La Roche* und zweitgrößtes Biotech-Unternehmen weltweit. Die Technologie der toxischen Wirkstoffkomponente wurde vom Unternehmen *ImmunoGen* entwickelt und im Jahr 2000 an *Genentech* lizenziert. Im Jahr 2006 stieg das Unternehmen mit dem Präparat in die klinische Phase ein.

Neuere klinische Untersuchungen mit *T-DM1* fokussieren sich auf HER2-positiven Magenkrebs, nachdem *Trastuzumab* im Jahr 2010 eine Zulassung durch die EMA in Kombination bei metastasiertem Magenkrebs bekommen hatte. *T-DM1* zeigte auch bei diesem HER2-positiven Karzinom einen Vorteil gegenüber *Trastuzumab* in präklinischen Tierversuchen aus dem Jahr 2013.<sup>56</sup>

## 3 Phase III-Studien

### 3.1 EMILIA

Die beschleunigte Zulassung von Kadcyła® im Februar 2013 durch die FDA gründete auf den positiven Ergebnissen der klinischen Phase III-Studie *EMILIA*, die im Februar 2009 gestartet und im Juli 2012 abgeschlossen wurde.

In diese internationale Studie wurden 991 Patientinnen aus 24 Staaten inkludiert, die einen HER2-positiven, inoperablen und lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Brustkrebs aufwiesen und zuvor erfolglos mit *Trastuzumab* plus *Taxan* behandelt worden waren. Diese Kombination stellt eine effektive First-Line-Therapie für HER2-positiven fortgeschrittenen Brustkrebs dar, das heißt für Patientinnen, die zuvor noch keine Therapie für fortgeschrittenen Brustkrebs erhalten haben. Die Kombination *Lapatinib* plus *Capecitabin* ist ebenfalls eine HER2-gerichtete Therapieoption für Patientinnen, deren Krankheit unter *Trastuzumab* vorangeschritten ist.<sup>55</sup>

Die Zuteilung der Patientinnen erfolgte offen und randomisiert, die beiden Studienarme bestanden einerseits aus einer Therapie mit *T-DM1* ( $n = 495$ ) und andererseits aus einer Therapie mit *Lapatinib* plus *Capecitabin* ( $n = 496$ ). *T-DM1* wurde einmalig 3.6 mg/kg i.v. verabreicht an Tag 1, *Lapatinib* 1250 mg oral täglich, und *Capecitabin* 1000 mg/m<sup>2</sup> oral zweimal täglich an Tag 1 bis 14, bei einem dreiwöchigen Zyklus.

Das progressionsfreie Überleben (*Progression-free survival* – PFS), das heißt die Zeit ohne Krankheitsfortschritt, betrug unter *T-DM1*-Therapie im Median 9.6 Monate versus 6.4 Monate unter Vergleichstherapie und wurde somit signifikant erhöht (Hazard-Ratio 0.65; 95% Konfidenzintervall 0.55–0.77;  $p < 0.001$ ). Das mediane Gesamtüberleben (*Overall survival* – OS) beschreibt die Zeit, nach der 50% der Studienteilnehmerinnen noch am Leben sind. Dieses wurde ebenfalls signifikant von 25.1 Monaten in der Kontrollgruppe auf 30.9

Monate in der Experimentalgruppe erhöht (Hazard-Ratio 0.68; 95% Konfidenzintervall 0.55–0.85;  $p < 0.001$ ). Ein Hazard-Ratio von 0.68 für das Gesamtüberleben bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, unter Therapie mit *T-DM1* zu sterben, zu jedem Zeitpunkt um 32% niedriger lag als mit Vergleichstherapie. Errechnet durch das Kaplan-Meier-Verfahren lebten nach 12 Monaten der Behandlung 85% der Patientinnen unter *T-DM1*-Therapie und 78% unter Vergleichstherapie. Nach 24 Monaten sank der Anteil der lebenden Patientinnen auf 65%, respektive 52%.

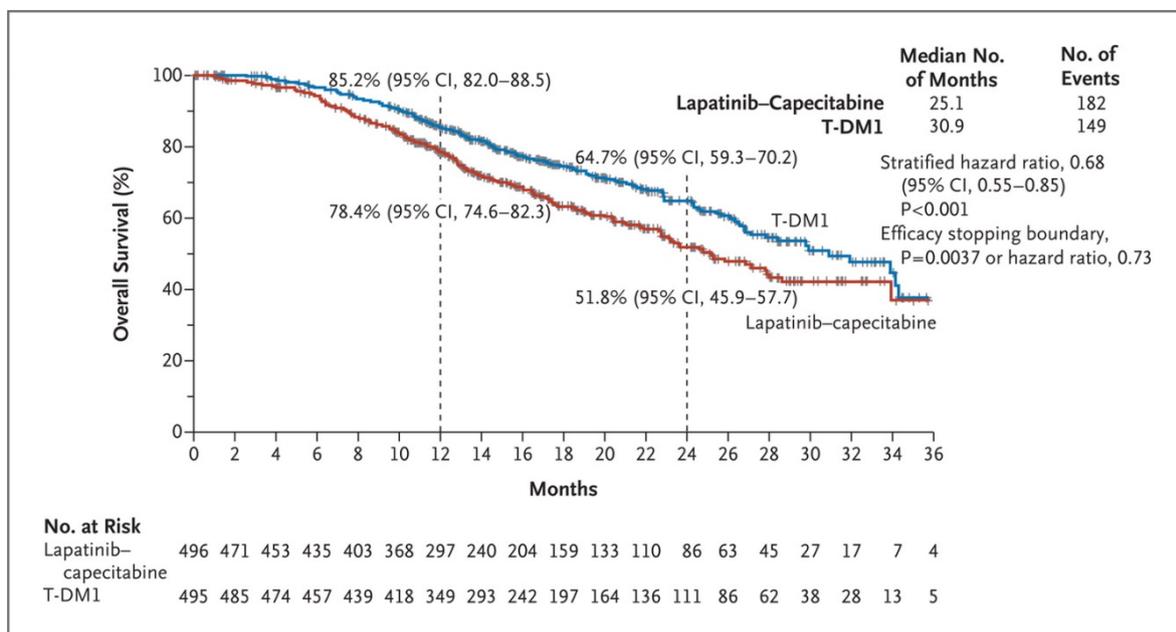


Abb. 9:<sup>55</sup> Kaplan-Meier-Kurven der Gesamtüberlebensraten bei finaler Datenanalyse

Wohl noch wichtiger ist die Beobachtung einer signifikanten Reduktion der Nebenwirkungen. *T-DM1* wurde generell gut vertragen und zeigte keine Neuropathien, die durch eine systemische Wirkung der zytotoxischen Komponente *Emtansin* hervorgerufen werden können.<sup>57</sup>

Die meisten registrierten unerwünschten Ereignisse (*Adverse events* – AE) in der Experimentalgruppe waren Übelkeit, Müdigkeit, Thrombozytopenie und Diarrhoe. Die haupt-

sächlichen unerwünschten Ereignisse des Grades 3 oder 4 – das heißt schwere AE und lebensbedrohliche AE – waren Thrombozytopenie mit 13% Inzidenz und erhöhte Aspartat-Aminotransferase (AST) mit 4.3% Inzidenz – ein Enzym, welches auf Lebertoxizität hinweist. Allgemein zeigten unter Therapie mit *T-DM1* 41% der Patientinnen ein unerwünschtes Ereignis des Grades 3 oder 4, im Vergleich zu 57% in der Vergleichsgruppe.

Die mediane Zeitspanne bis zu einer deutlichen Verschlechterung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität – ermittelt über FACT-B TOI-Punkteschema – betrug in der *T-DM1*-Gruppe 7.1 Monate und 4.6 Monate in der Kontrollgruppe.

Diese großangelegte Studie konnte daher zeigen, dass *T-DM1* als Second-Line-Therapie die progressionsfreie und gesamte Überlebenszeit für Patientinnen mit HER2-positivem metastasierten Brustkrebs signifikant verlängert, nachdem eine Therapie mit *Trastuzumab* plus *Taxan* erfolglos gewesen ist. Vor allem durch das gezeigte Sicherheitsprofil erbringt die Studie den klinischen Nachweis, dass eine gezielte Therapie mit einem ADC den therapeutischen Index eines zytotoxischen Wirkstoffes durch eine minimierte Exposition des gesunden Gewebes verbessern kann.<sup>55</sup>

## 3.2 TH3RESA

Diese zweite Phase III-Studie untersuchte den Effekt von *T-DM1* auf HER2-positiven metastasierten Brustkrebs, der trotz intensiver Vorbehandlung weiter fortgeschritten war. Dafür wurden 602 Patientinnen aus 22 Staaten, die mit *Trastuzumab* und *Lapatinib* mit eventueller Kombination von einem *Taxan* erfolglos behandelt worden waren, offen und randomisiert in zwei Studienarme eingeteilt. Die Patientinnen hatten im Median vier vorangegangene Therapien für metastasierten Brustkrebs erhalten.

Zwei Drittel der Patientinnen wurde eine Therapie mit *T-DM1* – 3.6 mg/kg einmalig alle 21 Tage – zugeteilt und ein Drittel erhielt Therapie nach ärztlichem Ermessen (*treatment of physician's choice* – TPC). 83% der Patientinnen der TPC-Gruppe erhielten eine HER2-gerichtete Medikation als Teil eines Therapieschemas – *Trastuzumab* oder *Lapatinib* plus Chemotherapeutikum, 17% erhielten ein Chemotherapeutikum als Monotherapie. *TH3RESA* startete im September 2011, Stichdaten für erste und zweite Zwischenanalyse waren Februar 2013 und Februar 2015.

Das mediane progressionsfreie Überleben war in der *T-DM1*-Gruppe mit 6.2 Monaten signifikant länger als in der TPC-Gruppe mit 3.3 Monaten (Hazard-Ratio 0.53; 95% Konfidenzintervall 0.44–0.66;  $p < 0.0001$ ). Die objektive Ansprechrates (*objective response rate* – ORR) betrug in der Experimentalgruppe 31% und in der Kontrollgruppe 9% und war somit signifikant höher. Mit der ORR wird der Anteil an Patientinnen dargestellt, die eine messbare Verringerung der Tumorgröße erreicht hatten. Zum Zeitpunkt der ersten Zwischenanalyse zeigte der primäre Endpunkt Gesamtüberleben (*Overall survival* – OS) trotz eines Trends zugunsten der *T-DM1*-Gruppe keinen signifikanten Unterschied zur TPC-Gruppe.<sup>58</sup>

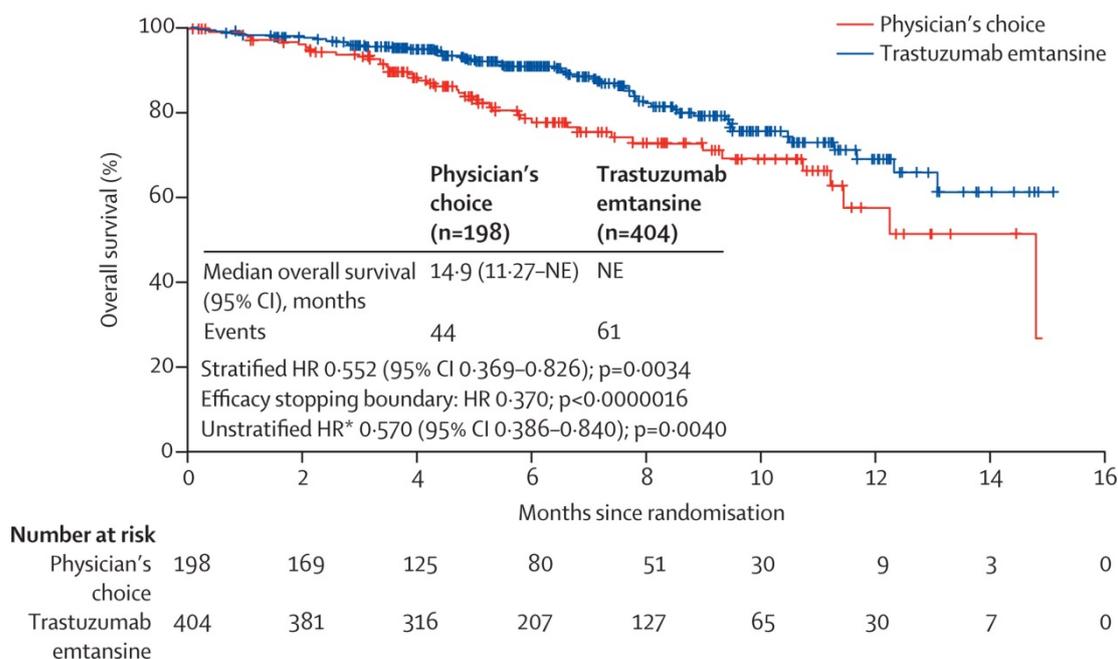


Abb. 10:<sup>58</sup> Kaplan-Meier-Kurven der Gesamtüberlebensraten bei erster Zwischenanalyse

Im Dezember 2015 wurden die Ergebnisse der zweiten Zwischenanalyse präsentiert, welche einen klaren Vorteil der *T-DM1*-Therapie herausstreichen konnten. Durch den längeren Beobachtungszeitraum zeigte sich ein medianes OS von 22.7 versus 15.8 Monaten (Hazard-Ratio 0.68; 95% Konfidenzintervall 0.54–0.85;  $p = 0.0007$ ).<sup>59</sup> Damit war der Schwellenwert für eine Verifizierung der Effektivitäts-Hypothese erreicht und die zweite Zwischenanalyse stellte somit die finale Datenanalyse dar.

Auch bei *TH3RESA* zeigte sich eine Verbesserung des Nebenwirkungsprofils unter *T-DM1*-Therapie gegenüber der Vergleichsgruppe. Zum Zeitpunkt der finalen Datenanalyse waren bei 47% der Patientinnen in der TPC-Gruppe und bei 40% der Patientinnen in der *T-DM1*-Gruppe unerwünschte Ereignisse (AE) des Grades 3 oder 4 aufgetreten. Thrombozytopenie war das am häufigsten auftretende AE des Grades  $\geq 3$ , mit 6.0% der *T-DM1*-Patientinnen und 2.7% der Patientinnen bei TPC. Die meisten unerwünschten Ereignisse jeglichen Grades unter *T-DM1*-Therapie waren Müdigkeit, Thrombozytopenie, Schwäche und Diarrhoe.

In dieser Population von Patientinnen mit HER2-positivem metastasierten Brustkrebs, bei denen zuvor eine Standardtherapie von *Trastuzumab* und *Lapatinib* versagt hatte, konnte *T-DM1* einen klinisch relevanten Einfluss auf die Gesamtüberlebenszeit und das progressionsfreie Überleben bewirken, bei einer gleichzeitigen Milderung der Nebenwirkungen, im Vergleich zu einer Standardtherapie. Somit festigte *T-DM1* nach *EMILIA* als Second-Line-Therapie nun durch *TH3RESA* auch seine Rolle als Third-Line-Maßnahme in der Behandlung von fortgeschrittenem Brustkrebs.

### 3.3 MARIANNE

Diese dritte Phase III-Studie wurde entworfen, um den Nutzen von *T-DM1* als First-Line-Therapie bei HER2-positivem fortgeschrittenen Brustkrebs zu untersuchen, das heißt für Patientinnen, die zuvor noch keine Therapie für fortgeschrittenen Brustkrebs erhalten hatten. Dafür wurden 1,095 Patientinnen aus 38 Staaten randomisiert drei verschiedenen Studienarmen zugeteilt. Zum Zeitpunkt des Studiendesigns im Jahr 2009 war eine Kombination aus *Trastuzumab* plus *Taxan* das häufigste Therapieschema bei dieser Indikation.<sup>60</sup> Daher erhielt ein Drittel der Patientinnen *Trastuzumab* plus *Taxan* als Kontrollgruppe, ein Drittel *T-DM1* plus Placebo und ein Drittel *T-DM1* plus *Pertuzumab*. *Pertuzumab* ist ebenfalls ein HER2-gerichteter Antikörper entwickelt von *Genentech*, der im Jahr 2012 zur Therapie von unbehandeltem oder rezidivierendem metastasierten Brustkrebs in Kombination mit *Trastuzumab* und *Docetaxel* zugelassen wurde. Grund für diese zweite Experimentalgruppe war die Fragestellung, ob die Zugabe von *Pertuzumab* einen zusätzlichen klinischen Vorteil bietet, nachdem präklinische Daten einen synergistischen Effekt von *T-DM1* plus *Pertuzumab* gezeigt hatten.<sup>61</sup> Die Rekrutierung der Patientinnen wurde im Juli 2010 gestartet und September 2014 war das Stichdatum für die finale Datenanalyse. Das Hauptaugenmerk wurde auf den Endpunkt progressionsfreies Überleben (PFS) gelegt.

Beide Experimentalgruppen zeigten Nicht-Unterlegenheit in puncto PFS gegenüber der Kontrollgruppe, aber keine statistische Überlegenheit. Das mediane PFS betrug für *Trastuzumab* plus *Taxan* 13.7 Monate, für *T-DM1* plus Placebo 14.1 Monate und für *T-DM1* plus *Pertuzumab* 15.2 Monate. Die Hazard-Ratios betrugen 0.91 (97.5% Konfidenzintervall 0.72–1.13;  $p = 0.31$ ) für *T-DM1* plus Placebo versus *Trastuzumab* plus *Taxan*, und 0.87 (97.5% Konfidenzintervall 0.69–1.08;  $p = 0.14$ ) für *T-DM1* plus *Pertuzumab* versus *Trastuzumab* plus *Taxan*. Allerdings war Tod der Grund für Beendigung des PFS in 31 Fällen bei *Trastuzumab* plus *Taxan*, in 11 Fällen bei *T-DM1* plus Placebo und in 23 Fällen bei *T-DM1*

plus *Pertuzumab*. Ansonsten war das Fortschreiten der Erkrankung Grund für Beendigung des PFS.

Auch konnte durch Subgruppenanalyse ein zahlenmäßiger Trend des PFS beobachtet werden, der eine Therapie mit *T-DM1* für Patientinnen mit HER2-gerichteter oder *Taxan*-Vorbehandlung begünstigt darstellt, im Vergleich zu therapienaiven Patientinnen. Die Patientinnen dieser Subgruppe hatten die jeweilige Medikation als neoadjuvante oder adjuvante Therapie erhalten.

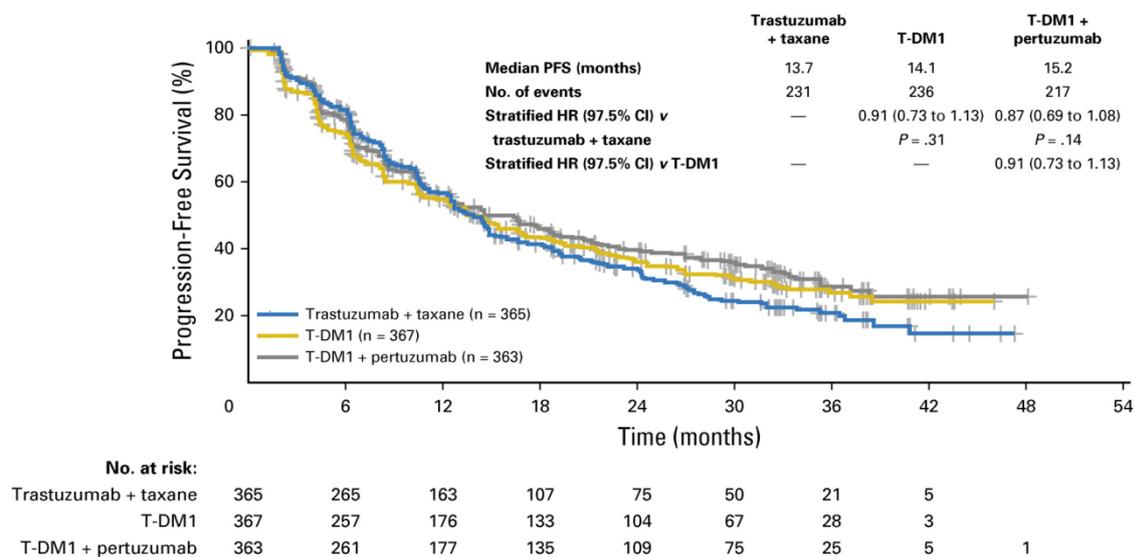


Abb. 11:<sup>61</sup> Kaplan-Meier-Kurven des progressionsfreien Überlebens bei finaler Datenanalyse

Die Inzidenz von unerwünschten Ereignissen (AE) des Grades  $\geq 3$  betrug 54% in der Kontrollgruppe, 45% in der *T-DM1*/Placebo-Gruppe und 46% in der *T-DM1*/*Pertuzumab*-Gruppe. Weitaus weniger Patientinnen beendeten die Behandlung aufgrund von AE unter beiden *T-DM1*-Therapiekombinationen und in beiden Experimentalgruppen wurde die gesundheitsbezogene Lebensqualität bedeutend länger aufrechterhalten.

Die Ergebnisse von *MARIANNE* waren für die Autoren unerwartet, da die Kombination *Trastuzumab* plus *Taxan* ein längeres PFS zeigte als in klinischen Daten ersichtlich, welche zum Zeitpunkt des Studiendesigns verfügbar waren. Außerdem zeigte die gleichzeitige

Verabreichung von *Pertuzumab* mit *T-DM1* keinen zusätzlichen Nutzen, wie aus präklinischen Daten hervorgegangen war.<sup>61</sup>

Der erwiesene Benefit der *T-DM1*-Therapie für Patientinnen, welche als neoadjuvante oder adjuvante Therapie *Trastuzumab* oder ein *Taxan* erhalten hatten, deckt sich mit den Ergebnissen der Phase III-Studien *EMILIA* und *TH3RESA*.

Auch konnte einmal mehr die bessere Verträglichkeit von *T-DM1* enthaltenden Therapie-schemata unterstrichen werden.

### 3.4 Guidelines

Die *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* hat im Jahr 2014 Guidelines für die klinische Praxis publiziert, um dem stetig wachsenden Arsenal von HER2-gerichteten Krebstherapien in der Behandlung von metastasiertem Brustkrebs eine Ordnung zuzuweisen. Die vier etablierten Wirkstoffe sind *Trastuzumab*, *Lapatinib*, *Pertuzumab* und *Trastuzumab Emtansin (T-DM1)*. Die empfohlenen Therapieschemata für metastasiertes Stadium sind:<sup>62</sup>

- Kombination von *Pertuzumab*, *Trastuzumab* plus *Taxan* zur First-Line-Therapie;
- *T-DM1* als Second-Line-Therapie;
- Andere HER2-gerichtete Therapien oder *T-DM1* als Third-Line-Therapie.

Seit der Publikation der Daten der *CLEOPATRA*-Studie 2012, welche zur Zulassung von *Pertuzumab* geführt hatte, ist die Kombination *Pertuzumab*, *Trastuzumab* plus *Taxan* der *standard of care* zur First-Line-Therapie bei HER2-positivem fortgeschrittenen Brustkrebs.<sup>60</sup> Allerdings hat das *National Comprehensive Cancer Network* der USA in deren

Guidelines *T-DM1* als First-Line-Therapie von HER2-positivem metastasierten Brustkrebs aufgenommen, als Option für Patientinnen, die nicht für eine Therapie mit *Pertuzumab*, *Trastuzumab* plus *Taxan* geeignet sind.<sup>61</sup>

Die *European School of Oncology (ESO)* hat im Dezember 2016 gemeinsam mit der *European Society for Medical Oncology (ESMO)* ihre Publikation ‘*3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer*’ veröffentlicht, in der unter Beschluss festgelegt worden ist, dass *T-DM1* bei all jenen Patientinnen bevorzugt eingesetzt werden soll, die nach zumindest einer *Trastuzumab*-basierten Therapie eine Progression erlitten haben.<sup>63</sup>

Die weitere Entwicklung von *T-DM1* kann mit Spannung verfolgt werden, zumal gegenwärtig der Einsatz zur adjuvanten Therapie mit anderen HER2-gerichteten Medikationen verglichen wird. Die Phase III-Studien *KATHERINE* und *KAITLIN* mit einer Laufzeit von jeweils 10 Jahren werden voraussichtlich 2023 und 2024 abgeschlossen sein.

## 4 ZNS-Metastasen bei Brustkrebs

### 4.1 Einleitung

Metastasen im Zentralnervensystem (ZNS) sind eine häufige Erscheinungsform des fortgeschrittenen Brustkrebses. Diese Form der Erkrankung ist mit neurodegenerativen Symptomen und einer geringen Überlebensquote assoziiert. Patientinnen mit HER2-positivem fortgeschrittenen Brustkrebs haben ein erhöhtes Risiko ZNS-Metastasen zu entwickeln, bei einer Inzidenz von 30–55% verglichen mit 5–15% in der Gesamtpopulation mit fortgeschrittenem Brustkrebs. Es wird vermutet, dass das ZNS durch seine Isolation eine Art Zufluchtsort für Mikrometastasen bietet. Lokale Therapien wie Resektion, Ganzhirnbestrahlung oder stereotaktische Radiotherapie sind indiziert bei ZNS-Metastasen, weisen aber hohe Raten an intrakranieller Progression auf.<sup>64</sup>

Die Effektivität von systemischer Therapie mag durch verminderte Penetrationsfähigkeit in das ZNS eingeschränkt sein, vor allem durch die blockierenden Mechanismen der Blut-Hirn-Schranke. Dennoch gibt es klinische Hinweise, dass eine HER2-gerichtete Medikation eine potentielle Rolle in der Therapie von ZNS-Metastasen bei HER2-positivem metastasierten Brustkrebs spielen kann. *Lapatinib*, allein oder in Kombination mit *Capecitabin*, sowie *Trastuzumab* erwirken verzögerte Progression und erhöhte Überlebenszeit bei HER2-positiven ZNS-Metastasen. Trotz der Annahme, dass ein Antikörper schlicht zu groß sei um die Blut-Hirn-Schranke passieren zu können, zeigten PET-Imaging-Untersuchungen mit <sup>89</sup>Zr-*Trastuzumab* bei Patientinnen mit HER2-positivem metastasierten Brustkrebs eine Akkumulation in Hirnmetastasen. Eine Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke als Folge der Metastasenbildung im ZNS stellt eine Erklärung für die Penetrationsfähigkeit dar.<sup>64</sup>

Ein Review aus dem Jahr 2015 über die derzeitigen Therapieoptionen von metastasiertem Brustkrebs bescheinigt der Kombination *Lapatinib* plus *Capecitabin* eine objektive Tumorreduktion bei 20–33% der Patientinnen mit HER2-positiven Hirnmetastasen nach intensiver Vorbehandlung. In der *LANDSCAPE*-Studie erreichte die genannte Kombination bei unbehandelten Hirnmetastasen eine objektive Tumorreduktion bei 65.9% der Patientinnen, eine mediane Zeit bis zur Progression von 5.5 Monaten und eine 1-Jahres-Überlebensrate von über 70%. Allerdings zeigten sich bei 49% der Patientinnen unerwünschte Wirkungen des Grades 3 oder 4, was zu einer deutlichen Verringerung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität führt.<sup>65</sup>

## 4.2 Subgruppenanalyse von EMILIA

Eine retrospektive explorative Datenanalyse der *EMILIA*-Studie aus dem Jahr 2014 untersuchte die Entwicklung von ZNS-Metastasen in beiden Studienarmen, sowie die Wirksamkeit und Sicherheit der Therapien in einer Subgruppe mit bestehenden ZNS-Metastasen zu Studienbeginn.<sup>64</sup>

Von den 991 Patientinnen, die an *EMILIA* teilnahmen, zeigten 45 von 495 Patientinnen in der *T-DM1*-Gruppe und 50 von 496 Patientinnen in der *Lapatinib/Capecitabin*-Gruppe (*XL*-Gruppe) vorbehandelte und stabile ZNS-Metastasen zu Studienbeginn.

Der Unterschied zwischen beiden Subgruppen hinsichtlich der Zeit bis zur Symptomprogression (TTSP) war trotz numerischen Trends statistisch nicht signifikant: 7.2 Monate für *T-DM1*-Therapie und 5.5 Monate für *XL* (Hazard-Ratio 0.70; 95% Konfidenzintervall 0.33–1.39;  $p = 0.338$ ).

In der Gesamtüberlebenszeit (OS) allerdings zeigte sich zum Zeitpunkt der finalen Datenanalyse ein signifikanter Unterschied: unter *T-DM1*-Therapie betrug die mediane OS 26.8 Monate versus 12.9 Monate bei *XL* (Hazard-Ratio 0.38; 95% Konfidenzintervall 0.18–0.80;  $p = 0.008$ ).

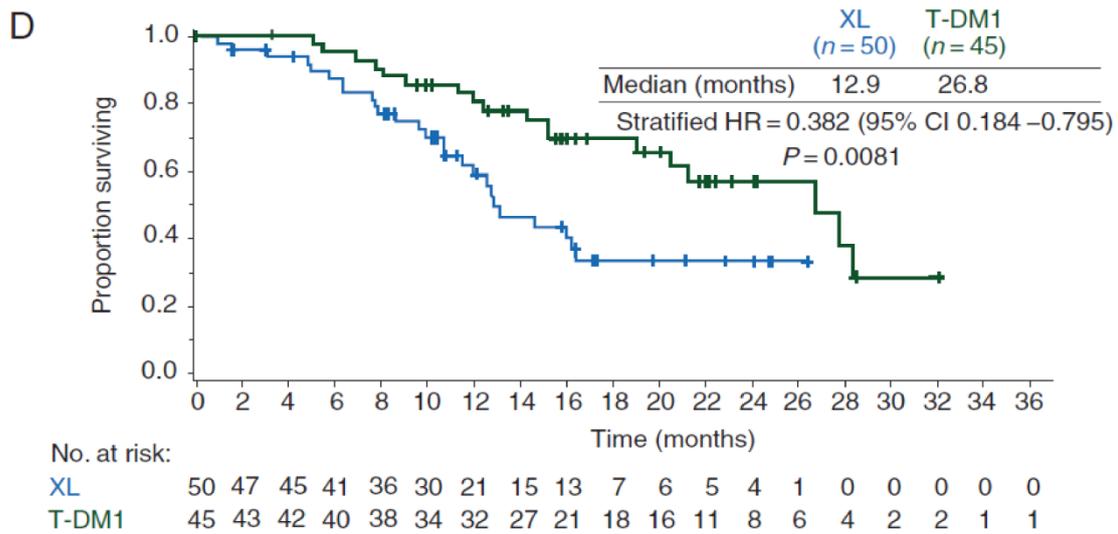


Abb. 12:<sup>64</sup> Kaplan-Meier-Kurven der Gesamtüberlebensraten bei finaler Datenanalyse

Was die Sicherheit betrifft, kam die Datenanalyse zu ähnlichen Ergebnissen wie in der Gesamtpopulation. Es zeigten sich unter *T-DM1*-Therapie weniger unerwünschte Ereignisse (AE) des Grades  $\geq 3$ , seltener Diarrhoe und Hand-Fuß-Syndrom als mit *XL*. Allerdings traten in der *T-DM1*-Gruppe öfter Lebertoxizität und Thrombozytopenie auf.

Die Analyse dieser Subgruppen deutet darauf hin, dass Patientinnen mit kontrollierten HER2-positiven ZNS-Metastasen einen signifikanten Überlebensvorteil haben, wenn sie mit *T-DM1* therapiert werden statt mit *Lapatinib* plus *Capecitabin*. Dieses Ergebnis stellt das bisherige Konzept in Frage, nachdem Patientinnen mit stabilen ZNS-Metastasen nach lokaler Therapie auf *Lapatinib*-basierte Therapie umgestellt werden sollen, um eine Progression zu verhindern.<sup>64</sup>

## 4.3 Retrospektive Fallstudien

Wiener Onkologen des *Comprehensive Cancer Center Vienna* publizierten im Juni 2015 eine Fallstudie, in der zehn Patientinnen mit HER2-positivem Brustkrebs mit Hirnmetastasen einer Therapie mit *T-DM1* unterzogen wurden. Alle Patientinnen hatten zuvor eine Therapie der Brustkrebserkrankung mit *Trastuzumab*, sechs davon zusätzlich mit *Lapatinib* erhalten.

Primärer Endpunkt war die *clinical benefit rate* (CBR) für über 6 Monate, also der Anteil an Patientinnen, die eine klinische Besserung für länger als 6 Monate aufzeigten. Drei Patientinnen zeigten Teilremission, zwei Patientinnen erzielten eine Stabilisierung der Erkrankung für über 6 Monate, zwei Patientinnen waren stabil für weniger als 6 Monate und drei Patientinnen erlitten eine Progression. Somit ergab sich eine CBR von 50%. Das mediane progressionsfreie Überleben betrug 5 Monate (0–9) und das mediane Gesamtüberleben 8.5 Monate (3–24), jeweils ab Initiation der *T-DM1*-Therapie. Unerwünschte Ereignisse zeigten sich im Grad 1 und 2, vorwiegend Thrombozytopenie und Transaminasenanstieg. Eine Patientin erlitt einen Leberenzymanstieg des Grades 3, es wurden keine Toxizitäten im Grad 4 registriert.

Die Autoren zeigen damit *T-DM1* als wirksame und gut verträgliche Alternative zu der derzeitigen Standardtherapie *Lapatinib* plus *Capecitabin* auf.<sup>66</sup>

Im April 2016 veröffentlichten französische Onkologen eine retrospektive Studie aus der klinischen Praxis über die Wirksamkeit und Sicherheit von *T-DM1* bei Brustkrebs mit ZNS-Metastasen.

Von den 39 beobachteten Patientinnen erhielten alle eine *T-DM1*-Medikation und 37 Patientinnen davon hatten sich zuvor einer Strahlentherapie unterzogen. Es wurden 17 Teilremissionen verzeichnet (44%) und bei 6 Patientinnen (15%) konnte eine Stabili-

sierung der Erkrankung erzielt werden (59% *clinical benefit rate*). Das mediane progressionsfreie Überleben betrug 6.1 Monate (95% Konfidenzintervall 5.2–18.3), die 1- und 2-Jahres-Überlebensraten lagen bei 33% und 17%. Die Behandlung wurde gut vertragen, es wurden keine unerwarteten Toxizitäten beobachtet. Müdigkeit, Transaminasenanstieg und Schleimhautentzündung waren die drei am häufigsten verzeichneten unerwünschten Ereignisse.

Die Autoren schließen mit der Bemerkung, dass *T-DMI* ihrer Ansicht nach eine effektive und gut verträgliche Therapieoption zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs mit ZNS-Metastasen darstellt, es aber in jedem Fall einer prospektiven Validierung bedarf.<sup>67</sup>

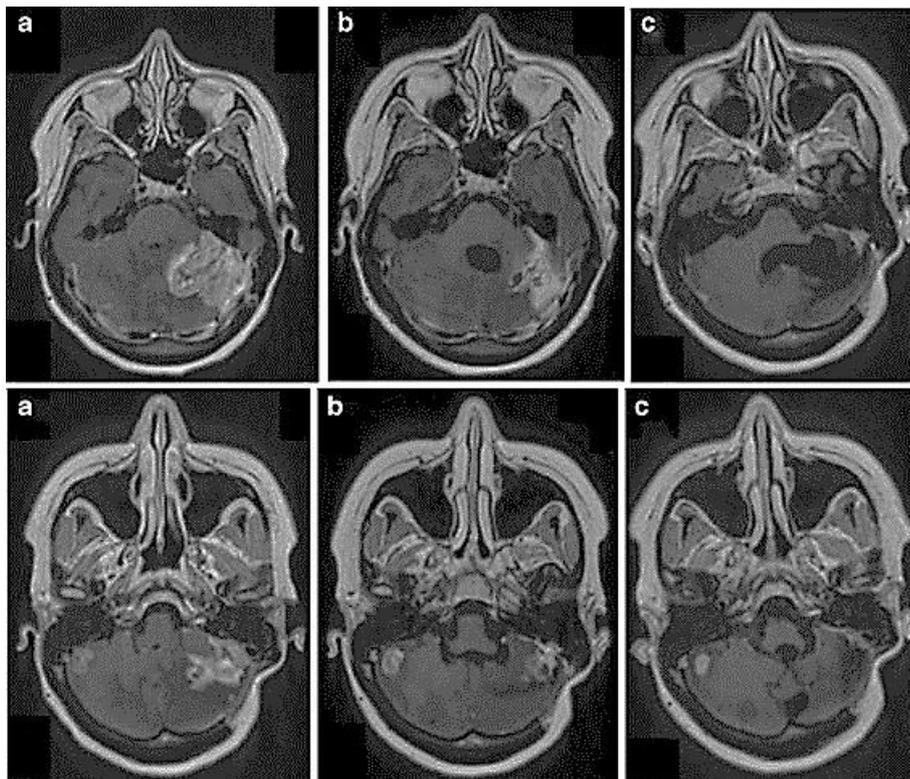


Abb. 13:<sup>67</sup> Teilremission einer 42-jährigen Patientin; **a** Hirnmetastase vor Behandlungsbeginn, **b** nach 3 und **c** nach 6 Zyklen mit *T-DMI* Monotherapie

## 4.4 Fallberichte

Schon im Jahr 2013 veröffentlichten drei Wiener Onkologen des *Comprehensive Cancer Center Vienna* einen Fallbericht über eine Patientin mit multiplen HER2-positiven Hirnmetastasen, welche ein Ansprechen auf eine Monotherapie mit *T-DM1* gezeigt hatte. Neben einer Totalremission der Lungen- und Teilremission der Lebermetastasen zeigte sich nach vier Therapiezyklen mit *T-DM1* eine signifikante Reduktion der Größe der Hirnmetastasen.<sup>68</sup>

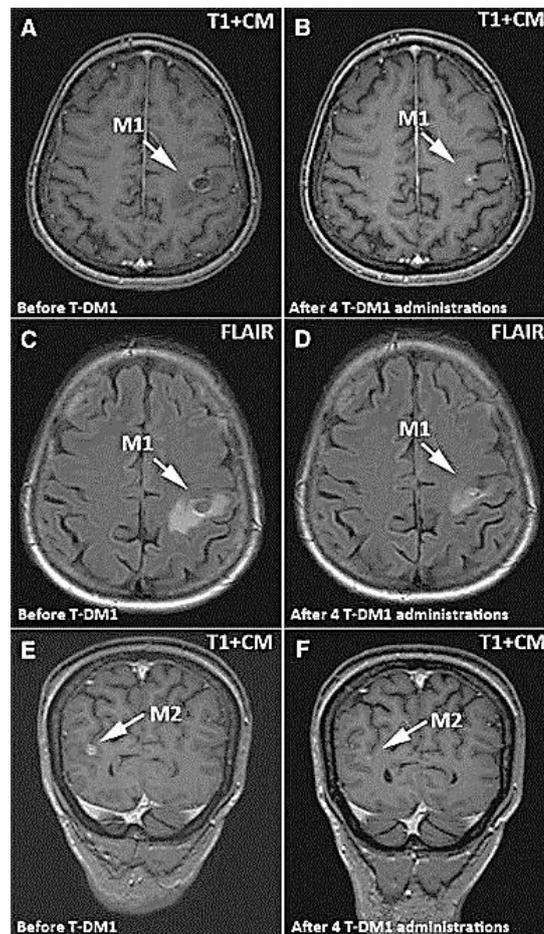


Abb. 14:<sup>68</sup> A+C: Hirnmetastase M1 mit 1.6 cm Durchmesser vor *T-DM1*-Therapie; E: Hirnmetastase M2 mit 0.8 cm Durchmesser vor *T-DM1*-Therapie; B+D: M1 mit Reduktion des Durchmessers auf 8 mm und Reduktion des perifokalen Ödems nach 4 Zyklen *T-DM1*; F: M2 mit Reduktion des Durchmessers auf 5 mm nach 4 Zyklen *T-DM1*

Onkologen aus South und North Carolina publizierten im Jänner 2017 eine Fallstudie über vier Patientinnen mit therapierefraktären HER2-positiven Hirnmetastasen, die einer *T-DM1*-Therapie unterzogen worden waren. Alle vier Patientinnen zeigten eine klinische Besserung und radiologisches Ansprechen. In allen vier Fällen wurde eine Verringerung der Tumorgröße um mehr als 30% und zumindest 5 mm absolute Reduktion erzielt. Zwei der Patientinnen wiesen eine stabile Erkrankung für zumindest 12 Monate auf.<sup>69</sup>

## 5 Diskussion

Kadcyla® ist nun das zweite Präparat der neuen Generation *Antibody-drug conjugates*, welches sich nach Zulassung in der Krebstherapie etablieren konnte. Durch seine zielgerichtete Wirkungsweise erhoffte man sich eine effektivere und besser verträgliche Behandlung von Patientinnen mit einem Brustkrebstyp, der durch aggressives Wachstum und schlechte Prognose gekennzeichnet ist. Diese Vermutung, welche sich aus theoretischen Überlegungen entwickelt und durch präklinische Tierstudien verstärkt hatte, konnte schließlich in klinischen Studien an Probandinnen bestätigt werden. So konnte sich Kadcyla®, wie in Kapitel 3.4 dargelegt, bereits in international anerkannten Guidelines zur Therapie von HER2-positivem Brustkrebs seinen Platz sichern.

Die weitere Entwicklung des Einsatzes von Kadcyla® in der Therapie von Brustkrebs darf mit Spannung verfolgt werden. Breit angelegte Studien zur Untersuchung des Nutzens als adjuvante Therapie, also bei gleichzeitiger Resektion des Primärtumors, sind angelaufen. Damit kann der Einsatz des Präparates in einem frühen Stadium der Erkrankung geprüft werden.

–

Die Inzidenz von ZNS-Metastasen bei Brustkrebs ist im Steigen begriffen, ausgelöst unter anderem durch die bessere Kontrolle der Primärerkrankung und die daraus resultierende längere Überlebenszeit, was wiederum eine höhere Wahrscheinlichkeit von Metastasenbildung mit sich bringt. Bis dato gibt es noch wenig Konsens über die bestmögliche Therapieoption bei HER2-positiven Hirnmetastasen.<sup>69</sup>

Als Alternative zu der relativ toxischen *Lapatinib*-Kombinationstherapie wurde der Antikörper *Trastuzumab* diskutiert, der nachweislich die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, vermutlich durch eine Beschädigung dieser Barriere durch Infiltration von Mikro-metastasen. Allerdings existieren zurzeit nur begrenzte Hinweise auf eine potentielle Effek-

tivität von *Trastuzumab* bei ZNS-Metastasierung, möglicherweise durch die schwächere Immunantwort im ZNS. Als Folgerung daraus kann ein ADC wie *T-DMI*, welches neben der immunstimulierenden Funktion des Antikörpers auch eine zytotoxische Komponente besitzt, eine Überwindung dieses Hindernisses darstellen.<sup>66</sup>

Fast zufällig ist man über die Wirksamkeit von Kadcyła® in der Behandlung von Hirnmetastasen gestolpert. Diese Spätkomplikation der Brustkrebskrankung ist nicht nur mit einer kurzen Überlebensdauer behaftet, sondern kann auch von schweren Begleiterscheinungen geprägt sein. Umso wertvoller erscheinen die klinischen Befunde, die durch Therapie mit Kadcyła® eine Verlängerung der Lebenszeit bei einer gleichzeitigen Verbesserung der Lebensqualität nahelegen.

Vor diesem Hintergrund erscheinen auch die hohen Kosten, die eine solche Behandlung mit sich ziehen, in einem anderen Licht. Einerseits ist es betrüblich, dass das britische Gesundheitssystem Ende 2016 die Erstattung von Kadcyła® wegen zu hoher Ausgaben pro qualitätsbereinigtem Lebensjahr streichen musste, andererseits sollten sich Produzenten in der Preisgestaltung der Präparate auch ihrer ethischen Rolle gegenüber terminal kranken Menschen bewusst sein.

–

Paul Ehrlichs Konzept der *magischen Kugeln* hat durch die Entwicklung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten einmal mehr an Aktualität gewonnen. Insbesondere in der Therapie von Krebserkrankungen, wo Ziel des Wirkstoffes eine körpereigene Zelle ist, steht die Pharmakologie vor der diffizilen Herausforderung, trotz effizienter Eliminierung entarteter Zellen gesundes Gewebe möglichst zu schonen. Daher erscheint hier ein Ansatz, wie ihn der Forscher Ehrlich als visionären Gedanken postuliert hat, als wegweisend.

Mit der Etablierung von ADCs in der klinischen Praxis hat sich gezeigt, dass diese Wirkstoffe eine hohe Effektivität mit einer hohen Sicherheit kombinieren können. Demnach darf diese neue Generation von Krebstherapeutika als moderne Realisierung der *magischen Kugeln* bezeichnet werden.

# IV LITERATURVERZEICHNIS

1. Strebhardt, K.; Ullrich, A., Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* **2008**, *8* (6), 473-480.
2. Williams, K. J., The introduction of 'chemotherapy' using arsphenamine – the first magic bullet. *Journal of the Royal Society of Medicine* **2009**, *102* (8), 343-348.
3. Hopton Cann, S. A.; van Netten, J. P.; van Netten, C., Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal* **2004**, *79* (938), 672.
4. Ebbell, B.; Banov, L., *The Papyrus Ebers : the greatest Egyptian medical document*. Levin & Munksgaard: Copenhagen, 1937.
5. Rivoltini, L.; Canese, P.; Huber, V.; Iero, M.; Pilla, L.; Valenti, R.; Fais, S.; Lozupone, F.; Casati, C.; Castelli, C.; Parmiani, G., Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert Opinion on Biological Therapy* **2005**, *5* (4), 463-476.
6. Igney, F. H.; Krammer, P. H., Tumor counterattack: fact or fiction? *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2005**, *54* (11), 1127-1136.
7. Waldmann, T. A., Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* **2003**, *9* (3), 269-277.
8. Liu, J. K. H., Anti-Cancer Vaccines — A One-Hit Wonder? *The Yale Journal of Biology and Medicine* **2014**, *87* (4), 481-489.
9. Weiner, G. J., Rituximab: mechanism of action. *Seminars in hematology* **2010**, *47* (2), 115-123.
10. Zhou, X.; Hu, W.; Qin, X., The Role of Complement in the Mechanism of Action of Rituximab for B-Cell Lymphoma: Implications for Therapy. *The Oncologist* **2008**, *13* (9), 954-966.
11. Deans, J. P.; Li, H.; Polyak, M. J., CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts. *Immunology* **2002**, *107* (2), 176-182.
12. Plosker, G. L.; Figgitt, D. P., Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* **2003**, *63* (8), 803-43.
13. Kubiczikova, L.; Pour, L.; Sedlarikova, L.; Hajek, R.; Sevcikova, S., Proteasome inhibitors – molecular basis and current perspectives in multiple myeloma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2014**, *18* (6), 947-961.
14. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, *414* (6859), 105-111.
15. Naujokat, C.; Steinhart, R., Salinomycin as a Drug for Targeting Human Cancer Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, *2012*, 17.
16. Sugimura, T.; Ushijima, T., Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2000**, *462* (2-3), 235-246.

17. Bignold, L. P.; Coghlan, B. L. D.; Jersmann, H. P. A., Cancer morphology, carcinogenesis and genetic instability: a background. In *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, Birkhäuser Basel: Basel, 2006; pp 1-24.
18. Anand, P.; Kunnumakara, A. B.; Sundaram, C.; Harikumar, K. B.; Tharakan, S. T.; Lai, O. S.; Sung, B.; Aggarwal, B. B., Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research* **2008**, *25* (9), 2097-2116.
19. WHO Cancer Fact sheet, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, Update February 2017.
20. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D. M.; Forman, D.; Bray, F., Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **2015**, *136* (5), E359-E386.
21. Forouzanfar, M. H. e. a., Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **386** (10010), 2287-2323.
22. Plummer, M.; de Martel, C.; Vignat, J.; Ferlay, J.; Bray, F.; Franceschi, S., Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *The Lancet Global Health* **4** (9), e609-e616.
23. Perez, H. L.; Cardarelli, P. M.; Deshpande, S.; Gangwar, S.; Schroeder, G. M.; Vite, G. D.; Borzilleri, R. M., Antibody–drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discovery Today* **2014**, *19* (7), 869-881.
24. Mathe, G.; Tran Ba, L. O.; Bernard, J., Effect on mouse leukemia 1210 of a combination by diazo-reaction of amethopterin and gamma-globulins from hamsters inoculated with such leukemia by heterografts. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* **1958**, *246* (10), 1626-8.
25. Ford, C. H.; Newman, C. E.; Johnson, J. R.; Woodhouse, C. S.; Reeder, T. A.; Rowland, G. F.; Simmonds, R. G., Localisation and toxicity study of a vindesine-anti-CEA conjugate in patients with advanced cancer. *Br J Cancer* **1983**, *47* (1), 35-42.
26. Huntley Blair, A.; Ghose, T. I., Linkage of cytotoxic agents to immunoglobulins. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *59* (2), 129-143.
27. Morrison, S. L.; Johnson, M. J.; Herzenberg, L. A.; Oi, V. T., Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1984**, *81* (21), 6851-6855.
28. Jones, P. T.; Dear, P. H.; Foote, J.; Neuberger, M. S.; Winter, G., Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **1986**, *321* (6069), 522-525.
29. Petersen, B. H.; DeHerdt, S. V.; Schneck, D. W.; Bumol, T. F., The Human Immune Response to KS1/4-Desacetylvinblastine (LY256787) and KS1/4-Desacetylvinblastine Hydrazide (LY203728) in Single and Multiple Dose Clinical Studies. *Cancer Research* **1991**, *51* (9), 2286.
30. Trail, P. A.; Willner, D.; Lasch, S. J.; Henderson, A. J.; Hofstead, S.; Casazza, A. M.; Firestone, R. A.; Hellstrom, I.; Hellstrom, K. E., Cure of xenografted human carcinomas by BR96-doxorubicin immunoconjugates. *Science* **1993**, *261* (5118), 212.

31. Tolcher, A. W.; Sugarman, S.; Gelmon, K. A.; Cohen, R.; Saleh, M.; Isaacs, C.; Young, L.; Healey, D.; Onetto, N.; Slichenmyer, W., Randomized Phase II Study of BR96-Doxorubicin Conjugate in Patients With Metastatic Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **1999**, *17* (2), 478-478.
32. Senter, P. D., Potent antibody drug conjugates for cancer therapy. *Current Opinion in Chemical Biology* **2009**, *13* (3), 235-244.
33. Lee, M. D.; Dunne, T. S.; Siegel, M. M.; Chang, C. C.; Morton, G. O.; Borders, D. B., Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calicheamicin .gamma.II. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109* (11), 3464-3466.
34. Hinman, L. M.; Hamann, P. R.; Wallace, R.; Menendez, A. T.; Durr, F. E.; Upešlacis, J., Preparation and Characterization of Monoclonal Antibody Conjugates of the Calicheamicins: A Novel and Potent Family of Antitumor Antibiotics. *Cancer Research* **1993**, *53* (14), 3336.
35. Kupchan, S. M.; Komoda, Y.; Court, W. A.; Thomas, G. J.; Smith, R. M.; Karim, A.; Gilmore, C. J.; Haltiwanger, R. C.; Bryan, R. F., Maytansine, a novel antileukemic ansa macrolide from *Maytenus ovatus*. *J Am Chem Soc* **1972**, *94* (4), 1354-6.
36. Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J., The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109* (22), 6883-6885.
37. Nicolaou, K. C.; Stabila, P.; Esmaeli-Azad, B.; Wrasidlo, W.; Hiatt, A., Cell-specific regulation of apoptosis by designed enediynes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90* (8), 3142-6.
38. Kovtun, Y. V.; Audette, C. A.; Ye, Y.; Xie, H.; Ruberti, M. F.; Phinney, S. J.; Leece, B. A.; Chittenden, T.; Blättler, W. A.; Goldmacher, V. S., Antibody-Drug Conjugates Designed to Eradicate Tumors with Homogeneous and Heterogeneous Expression of the Target Antigen. *Cancer Research* **2006**, *66* (6), 3214.
39. Ducry, L.; Stump, B., Antibody–Drug Conjugates: Linking Cytotoxic Payloads to Monoclonal Antibodies. *Bioconjugate Chemistry* **2010**, *21* (1), 5-13.
40. Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A., Cathepsin B-sensitive dipeptide prodrugs. 1. A model study of structural requirements for efficient release of doxorubicin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8* (23), 3341-3346.
41. Saito, G.; Swanson, J. A.; Lee, K.-D., Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55* (2), 199-215.
42. Diamantis, N.; Banerji, U., Antibody-drug conjugates—an emerging class of cancer treatment. *British Journal of Cancer* **2016**, *114* (4), 362-367.
43. Hamilton, G. S., Antibody-drug conjugates for cancer therapy: The technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* **2015**, *43* (5), 318-32.
44. Thomas, A.; Teicher, B. A.; Hassan, R., Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *The Lancet Oncology* **2016**, *17* (6), e254-e262.
45. Mullard, A., Maturing antibody-drug conjugate pipeline hits 30. *Nat Rev Drug Discov* **2013**, *12* (6), 483-483.

46. de Goeij, B. E.; Lambert, J. M., New developments for antibody-drug conjugate-based therapeutic approaches. *Current opinion in immunology* **2016**, *40*, 14-23.
47. Senter, P. D.; Sievers, E. L., The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat Biotech* **2012**, *30* (7), 631-637.
48. Forero-Torres, A.; Leonard, J. P.; Younes, A.; Rosenblatt, J. D.; Brice, P.; Bartlett, N. L.; Bosly, A.; Pinter-Brown, L.; Kennedy, D.; Sievers, E. L.; Gopal, A. K., A Phase II study of SGN-30 (anti-CD30 mAb) in Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *British journal of haematology* **2009**, *146* (2), 171-9.
49. Junttila, T. T.; Li, G.; Parsons, K.; Phillips, G. L.; Sliwkowski, M. X., Trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2011**, *128* (2), 347-56.
50. LoRusso, P. M.; Weiss, D.; Guardino, E.; Girish, S.; Sliwkowski, M. X., Trastuzumab emtansine: a unique antibody-drug conjugate in development for human epidermal growth factor receptor 2-positive cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2011**, *17* (20), 6437-47.
51. Tinoco, G.; Warsch, S.; Glück, S.; Avancha, K.; Montero, A. J., Treating Breast Cancer in the 21st Century: Emerging Biological Therapies. *Journal of Cancer* **2013**, *4* (2), 117-132.
52. Mitri, Z.; Constantine, T.; O'Regan, R., The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy research and practice* **2012**, *2012*, 743193.
53. (a) Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England journal of medicine* **2001**, *344* (11), 783-92; (b) Vogel, C.; Cobleigh, M. A.; Tripathy, D.; Gutheil, J. C.; Harris, L. N.; Fehrenbacher, L.; Slamon, D. J.; Murphy, M.; Novotny, W. F.; Burchmore, M.; Shak, S.; Stewart, S. J., First-line, single-agent Herceptin(trastuzumab) in metastatic breast cancer: a preliminary report. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **2001**, *37 Suppl 1*, S25-9.
54. Geyer, C. E.; Forster, J.; Lindquist, D.; Chan, S.; Romieu, C. G.; Pienkowski, T.; Jagiello-Gruszfeld, A.; Crown, J.; Chan, A.; Kaufman, B.; Skarlos, D.; Campone, M.; Davidson, N.; Berger, M.; Oliva, C.; Rubin, S. D.; Stein, S.; Cameron, D., Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England journal of medicine* **2006**, *355* (26), 2733-43.
55. Verma, S.; Miles, D.; Gianni, L.; Krop, I. E.; Welslau, M.; Baselga, J.; Pegram, M.; Oh, D.-Y.; Diéras, V.; Guardino, E.; Fang, L.; Lu, M. W.; Olsen, S.; Blackwell, K., Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2012**, *367* (19), 1783-1791.
56. Barok, M.; Tanner, M.; Koninki, K.; Isola, J., Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer. *Cancer letters* **2011**, *306* (2), 171-9.
57. Peddi, P. F.; Hurvitz, S. A., Trastuzumab emtansine: the first targeted chemotherapy for treatment of breast cancer. *Future oncology (London, England)* **2013**, *9* (3), 319-26.
58. Krop, I. E.; Kim, S.-B.; González-Martín, A.; LoRusso, P. M.; Ferrero, J.-M.; Smitt, M.; Yu, R.; Leung, A. C. F.; Wildiers, H., Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **2015**, *15* (7), 689-699.

59. Carlson, R. H., TH3RESA Trial: In Advanced HER2+ Breast Cancer Overall Survival with T-DM1 Beats 'Physician's Choice'. *Oncology Times* **2016**, 38 (3), 32-33.
60. Jhaveri, K., MARIANNE: Impact on Current Treatment of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Metastatic Breast Cancer and Implications for the Future. *Journal of Clinical Oncology* **2016**, 35 (2), 127-130.
61. Perez, E. A.; Barrios, C.; Eiermann, W.; Toi, M.; Im, Y. H.; Conte, P.; Martin, M.; Pienkowski, T.; Pivot, X.; Burris, H., 3rd; Petersen, J. A.; Stanzel, S.; Strasak, A.; Patre, M.; Ellis, P., Trastuzumab Emtansine With or Without Pertuzumab Versus Trastuzumab Plus Taxane for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive, Advanced Breast Cancer: Primary Results From the Phase III MARIANNE Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2017**, 35 (2), 141-148.
62. Giordano, S. H.; Temin, S.; Kirshner, J. J.; Chandarlapaty, S.; Crews, J. R.; Davidson, N. E.; Esteva, F. J.; Gonzalez-Angulo, A. M.; Krop, I.; Levinson, J.; Lin, N. U.; Modi, S.; Patt, D. A.; Perez, E. A.; Perlmutter, J.; Ramakrishna, N.; Winer, E. P., Systemic therapy for patients with advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2014**, 32 (19), 2078-99.
63. Cardoso, F.; Costa, A.; Senkus, E.; Aapro, M.; Andre, F.; Barrios, C. H.; Bergh, J.; Bhattacharyya, G.; Biganzoli, L.; Cardoso, M. J.; Carey, L.; Corneliussen-James, D.; Curigliano, G.; Dieras, V.; El Saghir, N.; Eniu, A.; Fallowfield, L.; Fenech, D.; Francis, P.; Gelmon, K.; Gennari, A.; Harbeck, N.; Hudis, C.; Kaufman, B.; Krop, I.; Mayer, M.; Meijer, H.; Mertz, S.; Ohno, S.; Pagani, O.; Papadopoulos, E.; Peccatori, F.; Pernault-Llorca, F.; Piccart, M. J.; Pierga, J. Y.; Rugo, H.; Shockney, L.; Sledge, G.; Swain, S.; Thomssen, C.; Tutt, A.; Vorobiof, D.; Xu, B.; Norton, L.; Winer, E., 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2016**.
64. Krop, I. E.; Lin, N. U.; Blackwell, K.; Guardino, E.; Huober, J.; Lu, M.; Miles, D.; Samant, M.; Welslau, M.; Diéras, V., Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA(). *Annals of Oncology* **2015**, 26 (1), 113-119.
65. Leone, J. P.; Leone, B. A., Breast cancer brain metastases: the last frontier. *Exp Hematol Oncol* **2015**, 4, 33.
66. Bartsch, R.; Berghoff, A. S.; Vogl, U.; Rudas, M.; Bergen, E.; Dubsky, P.; Dieckmann, K.; Pinker, K.; Bago-Horvath, Z.; Galid, A.; Oehler, L.; Zielinski, C. C.; Gnant, M.; Steger, G. G.; Preusser, M., Activity of T-DM1 in Her2-positive breast cancer brain metastases. *Clinical & experimental metastasis* **2015**, 32 (7), 729-37.
67. Jacot, W.; Pons, E.; Frenel, J. S.; Guiu, S.; Levy, C.; Heudel, P. E.; Bachelot, T.; D'Hondt, V.; Darlix, A.; Firmin, N.; Romieu, G.; Thezenas, S.; Dalenc, F., Efficacy and safety of trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive breast cancer with brain metastases. *Breast Cancer Res Treat* **2016**, 157 (2), 307-18.
68. Bartsch, R.; Berghoff, A. S.; Preusser, M., Breast cancer brain metastases responding to primary systemic therapy with T-DM1. *Journal of neuro-oncology* **2014**, 116 (1), 205-6.
69. Keith, K. C.; Lee, Y.; Ewend, M. G.; Zagar, T. M.; Anders, C. K., Activity of trastuzumab-emtansine (TDM1) in HER2-positive breast cancer brain metastases: A case series. *Cancer Treatment and Research Communications* **2016**, 7, 43-46.