Der Proteinkinaseinhibitor Ceritinib macht Schutzwall von Krebszellen unschädlich

**Zahlreiche Tumore umgeben sich mit dem Nukleosid Adenosin, was sie vor einer Attacke durch Tumor-reaktive Immunzellen schützt. Extrazelluläres Adenosin wird durch Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat gebildet. Ein zentrales Enzym hierbei ist die Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1 (NTDase1). Eine Hemmung dieses Enzyms könnte eine wirksame Strategie zur Immuntherapie von Krebs sein. Jetzt hat eine deutsch-kanadische Forschergruppe unter 50 zugelassenen Proteinkinaseninhibitoren den Wirkstoff Ceritinib als effectiven Hemmstoff der NTDase1 idetifisiert. Ceritinib könnte somit die Basis für die Entwicklung potenter und selektiver NTDase1-Hemmstoffe sein.**

Um der körpereigenen Immunabwehr zu entgehen, hüllen sich Krebszellen mit Adenosin ein. Das Nukleosid hemmt nicht nur Tumor-reaktive Immunzellen, sondern unterstützt auch die Vermehrung von Krebszellen, indem es die Neubildung von Blutgefäßen zur Versorgung von Tumoren mit Nährstoffen und Sauerstoff fördert. Extrazelluläres Adenosin wird hauptsächlich durch die Hydrolyse von ATP (Adenosintriphosphat) mithilfe verschiedener, membrangebundener Ektonukleotidasen produziert (Abb. 1). Das häufigste ATP-hydrolysierende Enzym ist die Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolase 1 (NTDase1, CD39), die ATP über ADP (Adenosindiphosphat) zu AMP (Adenosinmonophosphat) dephosphoryliert. Die Isoenzyme NTDase2, 3 und 8 sind auch membrangebunden (die anderen NTDase-Isoenzyme kommen intrazelluläre vor) und katalysieren ebenfalls die Bildung von AMP aus ATP. Alternativ kann extrazelluläres AMP mithilfe von Nukleotid-Pyrophosphatasen (NPPasen) aus ATP, NAD+ (Nicotinamidadenindinukleotid) oder ADPR (ADP-Ribose) produziert werden, wobei die NPPase1 das häufigste Isoenzym ist. ADPR kann aus ATP unter Zuhilfenahme der Nicotinamidadenindinukleotid-Glykohydrolase (NADase, CD38) gebildet werden. AMP wird schließlich durch die Ekto-5‘-Nukleotidase (CD73) in Adenosin dephosphoryliert. NTDase1 (CD39), NPPase1 und CD73 sind in vielen Krebsarten heraufreguliert und helfen dadurch mit, eine immununterdrückende und wachstumsfördernde Mikroumgebung für Tumore zu schaffen. Eine Hemmung dieser Enzyme sollte die extrazelluläre Konzentration von Adenosin reduzieren, bei gleichzeitiger Erhöhung der ATP-Konzentration. Extrazelluläres ATP wiederum ist ein Warnsignalmolekül und stimuliert das Immunsystem, sodass Tumor-reaktive Immunzellen Krebsgeschwüre erkennen und bekämpfen können.

Um Hemmstoffe für die NTDase1 (CD39) zu identifizieren (das Enzym, welches maßgeblich für die Bildung von extrazellulären Adenosin verantwortlich ist), hat nun ein deutsch-kanadisches Forscherteam 50 zugelassene Proteinkinaseinhibitoren auf deren Hemmwirkung gegenüber der NTDase1 untersucht. Die Idee dieses Versuchsansatzes ist, dass eventuell einiger dieser Hemmstoffe auch die ATP-Substratbindungsstelle der NTDase1 blockieren können. Solche Proteinkinaseinhibitoren könnten dann als Ausgangspunkt für eine Wirkstoffentwicklung gegen NTDasen genutzt werden.

Von den 50 untersuchten Proteinkinaseinhibitoren hemmte nur eine Verbindung, Ceritinib (Abb. 2), die Aktivität der NTDase1 in Nabelschnurmembran-Präparationen um mehr als 50%, bei einer Testkonzentration von 10 μM. Ceritinib (Handelsname Zykadia) ist ein verschreibungspflichtiges Medikament zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms. Die Substanz ist ein wirksamer Hemmstoff der Anaplastischen Lymphomkinase (ALK), eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die in eine Reihe von Tumoren in mutierter Form vorkommt und heraufreguliert ist. Die 50%ige Hemmkonzentration (IC50) von Ceritinib für die ALK liegt im subnanomolaren Bereich. Das Medikament wird oral verabreicht und erreicht Plasmakonzentrationen von maximal 1.4 μM. In Tumorgeweben scheint sich der Wirkstoff bis zu einer mittleren Konzentration von 36 μM anzureichern.

Die Art und Weise, wie Ceritinib die NTDase1 inaktiviert, wurde mithilfe von rekombinantem Enzym bestimmt. Da der Hemmstoff die Michaelis-Menten-Konstante (*Km*) des Enzyms nicht beeinflusst, aber die maximale Geschwindigkeit (*Vmax*) der Enzymreaktion mit zunehmender Konzentration verringert, kann geschlossen werden, dass Ceritinib ein nichtkompetitiver, allosterischer Inhibitor der NTDase1 ist. Dies wird weiter dadurch bestätigt, dass der IC50-Wert (13.7 μM) und die Inhibitorkonstante *Ki* (11.0 μM) für das rekombinante Enzym sich nahezu entsprechen. Das bedeutet, dass Ceritinib außerhalb des aktiven Zentrums der NTDase1 bindet. Damit unterscheidet sich die Inaktivierung der NTDase1 von der Inhibierung der ALK, die durch Ceritinib kompetitiv gehemmt wird (der Wirkstoff bindet im aktiven Zentrum der ALK).

Ceritinib hemmt ebenfalls die Isoenzyme NTDase3 und 8 mit IC50-Werten von 20-23 μM, aber nicht das Isoenzym NTDase2. Der Wirkstoff ist auch kein potenter Inhibitor von NNPasen, der NADase CD38 und der Ekto-5‘-Nukleotidase CD73. Dies zeigt, dass Ceritinib ein recht selektiver Hemmstoff von NTDasen ist.

Der Hemmstoff ist auch in der Lage, die ATP-Hydrolyse-Aktivität von Zellen zu inhibieren. Wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PMBCs) mit zunehmenden Konzentrationen des Wirkstoffes inkubiert, so nahm die Menge an ATP zu, bei gleichzeitiger Abnahme der AMP-Menge. Dass Ceritinib die Hydrolyse von AMP durch PMBCs anscheinend kaum beeinträchtigt, ist ein weiterer Beweis dafür, dass CD73 durch den Hemmstoff nur schwach inhibiert wird. Ähnliche Resultate wurden auch mit zwei Krebszelllinien (MDA-MB-231 triple-negative Brustkrebszellen und Ma-Mel-65 Melanomzellen) gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Ceritinib wirksam die Hydrolyse von ATP durch lebende Zellen unterbinden kann.

Mit einem IC50-Wert von über 10 μM ist Ceritinib aber nicht wirksam genug, um als Medikament zur Hemmung der NTDase1 im Menschen eingesetzt werden zu können. Da Ceritinib zudem sehr effektiv die ALK und andere Proteinkinasen (insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1-Rezeptor, Insulin-Rezeptor und Serin/Threonin-Kinase 22D) inhibiert, würde die zur Hemmung der NTDase1 benötigten hohen Dosen zu erheblichen Nebenwirkungen führen. Dessen ungeachtet bietet sich Ceritinib jedoch als Ausgangsstruktur für die weitere Medikamenten-Entwicklung an. Dabei ist es vorteilhaft, dass Ceritinib als allosterischer Inhibitor die NTDase1 unabhängig von der ATP-Konzentration hemmt. Das bedeutet, dass die Hemmwirkung von Ceritinib nicht durch eine Anreicherung von extrazellulärem ATP aufgrund der Inhibierung der NTDase1 vermindert wird. Dies bietet die Möglichkeit, die ALK-inhibitorische Aktivität zu verringern oder zu beseitigen und die NTDase1-inhibitorische Aktivität selektiv zu erhöhen. Eine andere Option wäre die Entwicklung eines dualen ALK/NTDase1-Inhibitors mit stark verbesserter NTDase1-Hemmwirkung ohne dabei die ALK-Hemmwirkung zu beeinträchtigen. Ein solcher dualer ALK/NTDase1-Inhibitor würde gleichzeitig zielgerichtete (ALK-Inhibierung) und immuntherapeutische (NTDase1-Inhibierung) Anti-Krebseigenschaften verbinden.

[L. Schäkel et al., J. Immunother. Cancer. 10, e004660 (2022)]

*PD Dr. Dietmar Steverding, Norwich, England*



**Abb. 1** Erzeugung von Adenosin durch extrazelluläre Hydrolyse von Adenin-Nukleotiden mittels Ektonukleotidasen. Substrate und Produkte sind in schwarz wiedergegeben, Enzyme in rot kursiv. ADP, Adenosindiphosphat; ADPR, Adenosindiphosphat-Ribose; AMP, Adenosinmonophosphat; ATP, Adenosintriphosphat; CD38, Nicotinamidadenindinukleotid-Glykohydrolase; CD73, Ekto-5‘-Nukleotidase; NAD+, Nicotinamidadenindinukleotid; NAM, Nicotinamid; NMN, Nicotinamidmononukleotid; NPP, Nukleotid-Pyrophosphatasen (NPPasen); NTD, Nukleosidtriphosphat-Diphosphohydrolasen (NTDasen); Pi, anorganisches Phosphat; PPi, anorganisches Pyrophosphat; RIB1-P, Ribose-1-Phosphat.



**Abb. 2** Chemische Struktur von Ceritinib.