

## Raman-mikrospektroskopischer Nachweis für den Metabolismus eines Tyrosinkinase-Inhibitors, Neratinib, in Krebszellen

Karim Aljakouch<sup>+</sup>, Tatjana Lechtonen<sup>+</sup>, Hesham K. Yosef<sup>+</sup>, Mohamad K. Hammoud, Wissam Alsaidi, Carsten Kötting, Carolin Mügge, Robert Kourist, Samir F. El-Mashtoly\* und Klaus Gerwert

**Abstract:** Tyrosinkinase-Rezeptoren sind eines der Hauptziele in der Krebstherapie. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Modulation der Wachstumsfaktor-Signalwege und induzieren dadurch Zellproliferation und -wachstum. Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Neratinib binden an EGFR- und HER2-Rezeptoren und zeigen Antitumoraktivität. Es ist jedoch wenig über ihre genaue zelluläre Aufnahme und den Stoffwechsel bekannt. Hier berichten wir zum ersten Mal über die intrazelluläre räumliche Verteilung und den Metabolismus von Neratinib in verschiedenen Krebszellen durch markerfreies Raman-Imaging. Zwei neue Neratinib-Metaboliten wurden nachgewiesen, und das Fluoreszenz-Imaging derselben Zellen zeigt, dass sich Neratinib in Lysosomen akkumuliert. Die Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass sowohl EGFR als auch HER2 dem klassischen endosomalen/lysosomalen Stoffwechselweg zum Abbau folgen. Eine Kombination aus Raman-Mikroskopie, DFT-Rechnungen und LC-MS wurde verwendet, um die chemische Struktur von Neratinib-Metaboliten zu identifizieren. Diese Ergebnisse zeigen das Potenzial der Raman-Mikroskopie zur Untersuchung der Arzneimittel-Pharmakokinetik.

Tyrosinkinase-Rezeptoren sind essentiell bei der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse wie Migration, Überleben, Proliferation und Differenzierung.<sup>[1]</sup> Die ErbB-Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren ist in einer Vielzahl von Krebsar-

ten überexprimiert und besteht aus vier Mitgliedern: EGFR, HER2, HER3 und HER4.<sup>[2]</sup> Aufgrund der Überexpression von EGFR, die ihrerseits die Tumorigenese durch Modulation der Zellproliferation, Angiogenese und Metastasierung stimuliert, ist die Kontrolle des EGFR-Signalwegs einer der Hauptansätze für die gezielte Krebstherapie.

Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC), die EGFR-Mutationen (L858R) beherbergen, reagieren zunächst auf Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) der ersten Generation. Trotz der beeindruckenden ersten Reaktion auf die Behandlung schreitet die Krankheit nach durchschnittlich einem Jahr Therapie fort. Dies wird durch eine zweite Punktmutation in EGFR (T790M) in ungefähr 60% der Fälle verursacht.<sup>[3–5]</sup> Die T790M-EGFR-Mutation, die als Gatekeeper-Mutation eine Resistenz gegenüber TKIs der ersten Generation herbeiführt, induziert eine sterische Hinderung in der Adenosintriphosphat-Bindungstasche und verhindert so die Bindung des Inhibitors.<sup>[4,6]</sup>

Neratinib (Nerlynx), ein TKI der zweiten Generation mit der zweifachen Spezifität gegenüber EGFR und HER2, erwies sich trotz der T790M-Resistenzmutation in EGFR als wirksam und bindet irreversibel an EGFR und HER2.<sup>[7,8]</sup> Neratinib wurde letztes Jahr von der U.S. Food and Drug Administration für die Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs im Frühstadium zugelassen.<sup>[9]</sup> Allerdings ist über die intrazelluläre Verteilung und den Metabolismus von Neratinib wenig bekannt.<sup>[10]</sup> Über die Organellenverteilung und den Transport von TKIs ist ebenfalls wenig bekannt. Die Wirkstoffverteilung in Zellen erfolgt häufig mit fluoreszenzmarkierten Wirkstoffmolekülen, die auf ihre pharmakologische Wirksamkeit getestet werden. Trotz der molekularen Spezifität, die von Fluoreszenzmolekülen bereitgestellt wird, sind diese oft deutlich größer als die eigentlichen Arzneimittel-moleküle und können so die pharmazeutische Arzneimittelaktivität signifikant verändern. Im Gegensatz dazu ist die konfokale Raman-Mikroskopie eine markerfreie Imaging-Methode, die fähig ist, kleine Moleküle in Zellen zu lokalisieren.<sup>[11–13]</sup> Die Raman-Empfindlichkeit ist jedoch begrenzt, und in früheren Studien wurden höhere Konzentrationen (2 mM–100  $\mu$ M) von Molekülen verwendet, um geeignete Signal-Rausch-Verhältnisse zu erzielen.<sup>[11–13,15–17]</sup>

Hier verfolgen wir die Aufnahme, die intrazelluläre räumliche Verteilung und den Metabolismus von Neratinib in signifikant niedrigeren Konzentrationen (0.5–10  $\mu$ M) in verschiedenen Krebszellen unter Verwendung markerfreier Raman-Mikrospektroskopie, womit eine Annäherung an die klinisch relevanten Konzentrationen erzielt wurde. HER2-positivem Brustkrebszellen (SK-BR-3) und NSCLC-Zellen mit

[\*] K. Aljakouch,<sup>[‡]</sup> T. Lechtonen,<sup>[‡]</sup> Dr. H. K. Yosef,<sup>[‡]</sup> M. K. Hammoud, W. Alsaidi, Dr. C. Kötting, Dr. S. F. El-Mashtoly, Prof. Dr. K. Gerwert Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum (Deutschland)  
E-Mail: samir@bph.rub.de  
Homepage: <http://www.bph.rub.de/>

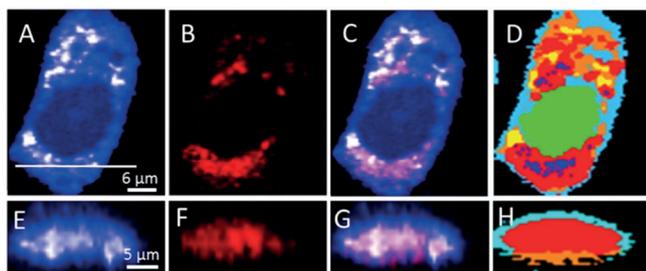
Dr. C. Mügge  
Nachwuchsgruppe für mikrobielle Biotechnologie  
Ruhr-Universität Bochum (Deutschland)  
Prof. Dr. R. Kourist  
Institut für molekulare Biotechnologie  
Technische Universität Graz (Österreich)

[‡] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.  
Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter <https://doi.org/10.1002/ange.201803394> zu finden.

© 2018 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

(NCI-H1975) und ohne (Calu-3) T790M-EGFR-Mutationen wurden verwendet. Zwei Neratinib-Metaboliten wurden in Zellen nachgewiesen. Eine Kombination aus Raman-Mikroskopie, Dichtefunktionaltheorie(DFT)-Rechnungen und Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) wurde verwendet, um die chemische Struktur der Neratinib-Metabolite zu identifizieren.

Das Raman-Spektrum von Neratinib und seine chemische Struktur sind in Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen dargestellt. Neratinib hat eine intensive C≡N-Streckschwingungsbande bei  $2208\text{ cm}^{-1}$ . Diese Bande befindet sich in der "Raman-stillen" Region von Zellen ( $1800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ) und diese Gruppe kann als labelfreier Marker verwendet werden, um das Arzneimittel in Zellen sichtbar zu machen. Abbildung 1A zeigt ein integriertes Raman-Intensitätsbild



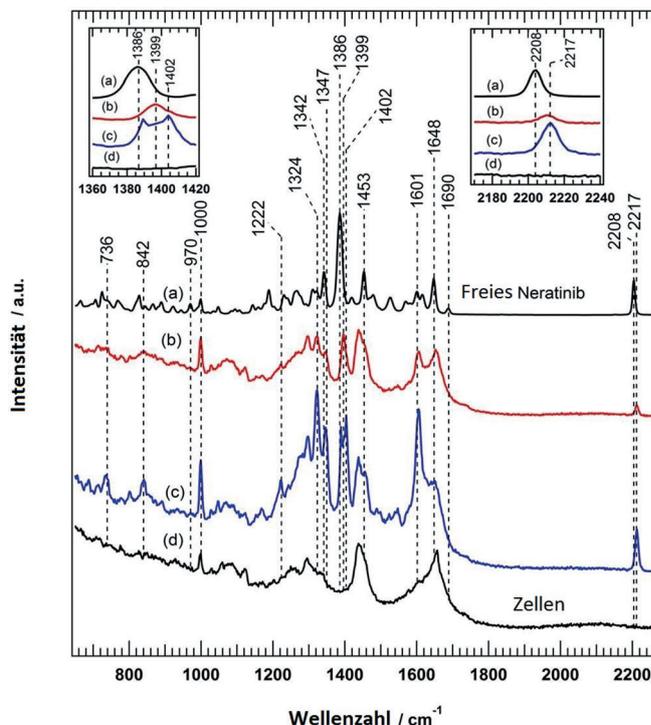
**Abbildung 1.** Raman-Imaging von SK-BR-3-Zellen, behandelt mit  $5\text{ }\mu\text{m}$  Neratinib für 8 h. Raman-Bilder rekonstruiert aus den Intensitäten der C-H-Deformations- (A) und C≡N-Streckschwingung (B). C) Überlagerung der Felder A und B. E–G) Querschnitts-Raman-Bilder entlang der  $x$ -,  $z$ -Richtung der gleichen Zelle. Scanpositionen sind durch die weiße Linie in Feld A angezeigt. D, H) HCA-Ergebnisse basierend auf den Raman-Daten, die in den Feldern A und E gezeigt sind.

der Bande bei  $1425\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$  (C-H-Deformation) von SK-BR-3-Zellen, die mit Neratinib behandelt wurden, das die unterschiedlichen Dichten sowohl verschiedener nativer Zellkomponenten als auch von Neratinib widerspiegelt. Deutlich erkennbar ist der vom Zytoplasma umgebene Kern. Feld B zeigt ein integriertes Raman-Intensitätsbild der Region  $2200\text{--}2225\text{ cm}^{-1}$ , das Neratinib repräsentiert. Feld C ist eine Überlagerung der Felder A und B und zeigt, wie Neratinib in der Zelle verteilt ist. Um nachzuweisen, dass Neratinib innerhalb der Zelle lokalisiert ist, und nicht auf der Zelloberfläche präzipitiert, führten wir Raman-Querschnittsmessungen entlang der  $x$ – $z$ -Achse der gleichen Zelle durch, wie in den Feldern E–G gezeigt ist. Diese Bilder zeigen deutlich, dass Neratinib innerhalb der Zelle internalisiert ist. Ähnliche Ergebnisse wurden für NSCLC NCI-H1975 und Calu-3 Zellen erhalten (Abbildungen S2,S3).

Eine Kombination aus Raman-Mikrospektroskopie und multivariaten Analysen wurde verwendet, um verschiedene zelluläre Komponenten darzustellen.<sup>[11,18–20]</sup> Wir haben hierarchische Clusteranalysen (HCA) von Raman-Datensätzen von Zellen aus mehreren Replikaten (Abbildungen S2–S6) sowie für Zellen mit unterschiedlichen Neratinib-Konzentrationen berechnet (Abbildungen S7–S9). Das HCA-Index-Farbbild (Abbildung 1D) gibt die Position des Nukleus (Abbildung S10) sowie mehrere Bereiche im Zytoplasma

wieder. Die roten und blauen Cluster im HCA-Bild (1D) reproduzieren auch die Lokalisierung von Neratinib in der in 1B gezeigten Zelle.

Abbildung 2 zeigt die Raman-Mittelwertspektren der roten (b) und blauen (c) Cluster aus der Abbildung 1D zusätzlich zu den Spektren des freien Neratinibs (a) und der SK-BR-3 Zellen (Kontrolle, d). Die Mittelwertspektren von



**Abbildung 2.** a) Raman-Spektrum von freiem Neratinib. Gezeigt sind die Raman-Mittelwertspektren von Arzneimittelregionen innerhalb der Zelle der roten (b) und blauen (c) Cluster in 1D. d) Raman-Spektrum von unbehandelten SK-BR-3-Zellen (Kontrolle). Die Inserts zeigen vergrößerte Spektren um die charakteristischen  $1386$  und  $2208\text{ cm}^{-1}$  Banden.

Neratinib in den Zellen (b, c) zeigen ähnliche Eigenschaften wie das freie Neratinib-Spektrum (a), einschließlich des charakteristischen Signals der C≡N-Gruppe. Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die mit HCA gekoppelte Raman-Mikroskopie dazu benutzt werden kann, die Raman-Spektren von Neratinib in Zellen zu berechnen. Darüber hinaus kann die  $2208\text{ cm}^{-1}$ -Bande als labelfreie Markerbande zur Überwachung der Neratinib-Verteilung in Zellen verwendet werden.

Die Anwendung labelfreier Raman-Mikroskopie zur Überwachung der Verteilung von Arzneistoffen in Zellen ist nicht nur auf Moleküle mit einem labelfreien Marker in der Raman-stillen Region von Zellen beschränkt ( $1800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ ). TKI mit kleinen Molekülen haben normalerweise starke und scharfe Raman-Banden in der Fingerabdruckregion, die ebenfalls zur Überwachung der Arzneimittelverteilung in Zellen herangezogen werden können.<sup>[21]</sup> Neratinib hat eine starke Raman-Bande bei  $1386\text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 2a), die ebenfalls verwendet werden kann und sogar dem labelfreien

Marker für Neratinib in Zellen überlegen ist (Abbildung S11). Außerdem wurden ähnliche Raman-Messungen durchgeführt, bei denen NCI-H1975-Zellen mit  $0.5 \mu\text{M}$  ( $250 \text{ ng mL}^{-1}$ ) Neratinib behandelt wurden (Abbildung S12). Diese Konzentration ist 200- bzw. 4000-fach niedriger als die für das Raman-Imaging von Erlotinib<sup>[11]</sup> und einem anderen Anti-Tumor-Wirkstoffkandidaten<sup>[13]</sup> in Darmkrebszellen verwendete Konzentration. Das ist nicht nur eine der niedrigsten durch Raman-Mikroskopie nachgewiesenen Medikamentenkonzentrationen in Krebszellen, sie kommt auch der nachgewiesenen Neratinib-Konzentration im Plasma von menschlichen Patienten ( $5.8\text{--}143.3 \text{ ng mL}^{-1}$ ) nach der peroralen Behandlung nahe.<sup>[22–24]</sup>

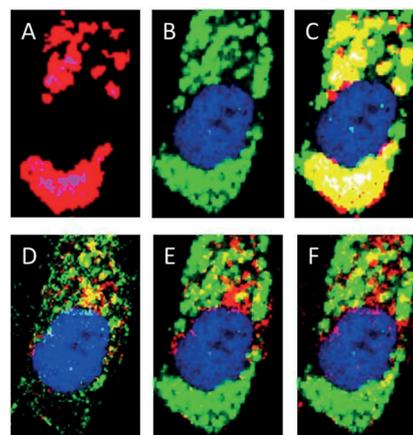
Das Raman-Spektrum der Zellen (Abbildung 2d) zeigt Banden bei  $\approx 1657$  (Amid I),  $\approx 1450$  (C-H- und  $\text{CH}_2$ -Biegeschwingung),  $\approx 1200\text{--}1400$  (Amid III), und  $\approx 1000 \text{ cm}^{-1}$  (Ringatmungsschwingung von Phenylalanin).<sup>[25]</sup> Diese Banden wurden auch in den Spektren der Neratinib enthaltenden Cluster in Zellen (b, c) beobachtet, was darauf hindeutet, dass zelluläre Komponenten teilweise zu diesen Spektren beitragen. Zusätzlich sind die Raman-Spektren (b, c) vom in den Zellen lokalisierten Neratinib denen von freiem Neratinib ähnlich (Spektrum a). Jedoch ist in beiden Spektren (b, c) von Neratinib in Zellen die  $\text{C}\equiv\text{N}$ -Bande bei  $2208 \text{ cm}^{-1}$  im Vergleich zum Spektrum vom freiem Neratinib (a) zu  $2217 \text{ cm}^{-1}$  nach rechts verschoben. Die  $1386 \text{ cm}^{-1}$  Bande im Spektrum (a) ist ebenfalls nach rechts verschoben zu  $1399 \text{ cm}^{-1}$  im Spektrum (b), während ein Doublet bei  $1402/1388 \text{ cm}^{-1}$  im Spektrum (c) erschien. Es sollte angemerkt werden, dass die  $1402 \text{ cm}^{-1}$ -Bande nicht in Spektren von freiem Neratinib (a) oder Kontrolle (d) existiert. Diese Änderungen in den Spektren (b) und (c) legen nahe, dass die Struktur von Neratinib aufgrund des Stoffwechsels verändert ist, und nicht folglich einer Umgebungsänderung wie z. B. durch Lipide (Abbildungen S13 und S14).

Die Raman-Spektren von Neratinib-Vorstufen und DFT-Rechnungen (Abbildung S15) legen nahe, dass die Bande bei  $1386 \text{ cm}^{-1}$  von freiem Neratinib hauptsächlich aus seinem Chinolinring stammt (C-C-Streckung und C-H-Biegung). Da die  $1386 \text{ cm}^{-1}$  und  $2208 \text{ cm}^{-1}$  ( $\text{C}\equiv\text{N}$ , konjugiert zum Chinolinring) Banden von freiem Neratinib signifikante Wellenzahlverschiebungen in Zellen zeigen, ist es der Chinolinring von Neratinib, der sich höchstwahrscheinlich in den Metaboliten von Neratinib verändert. Ähnliche Ergebnisse wurden für NSCLC-Zellen mit und ohne T790M-EGFR-Mutation beobachtet (Abbildungen S2,S3). Darüber hinaus enthalten die Raman-Spektren dieser Metaboliten einen Beitrag vom nativen Neratinib (Abbildung S16). Die Anwesenheit vom nativen Neratinib zusammen mit Metaboliten in Zellen wurde durch LC-MS bestätigt. So haben wir erstmals die intrazelluläre Verteilung von nativen Neratinib neben zwei Metaboliten in verschiedenen Krebszellen markerfrei beobachten können.

Die Raman-Intensität der  $\text{C}\equiv\text{N}$ -Bande nahe  $2208 \text{ cm}^{-1}$  von Neratinib zeigt eine lineare Korrelation mit der Wirkstoffkonzentration (Abbildung S17). Basierend auf der Kalibrierungskurve der Neratinib-Lösungen ( $2\text{--}15 \text{ mM}$ ) kann die Gesamtkonzentration von Neratinib und seinen Metaboliten, die in verschiedenen Krebszellen lokalisiert sind, abgeschätzt

werden. Die berechneten Neratinib-Konzentrationen in den Krebszellen liegen bei  $6.2\text{--}9.6(\pm 1.0 - 1.2) \text{ mM}$ , das ist  $1200\text{--}1900(\pm 200\text{--}240)$ -fach höher als die extrazelluläre Neratinib-Konzentration ( $5 \mu\text{M}$ ). Diese hohen intrazellulären Neratinib-Konzentrationen erklären die starken Neratinib-Raman-Signale in verschiedenen Krebszellen.

Neratinib bindet an EGFR und HER2<sup>[8]</sup> und es ist wichtig, die Verteilung nicht nur von Neratinib in Zellen, sondern auch von diesen Rezeptoren sowie Lysosomen zu untersuchen. Neratinib ist eine schwache Base, die in einer sauren Umgebung protoniert werden kann, und Lysosomen sind höchstwahrscheinlich Kompartimente für die Akkumulation von Neratinib.<sup>[26]</sup> Die Verteilung von Neratinib in drei Replikaten verschiedener Zellen wurde durch Raman-Imaging nachgewiesen, während die Verteilung von Lysosomen, EGFR und HER2 in denselben Zellen durch Fluoreszenz-



**Abbildung 3.** A) HCA von Neratinib beinhaltenden Clustern in der Zelle, B) Fluoreszenzbild derselben Zelle mit Lysosomen (grün) um den Zellkern (blau) herum und C) Überlagerung (gelb und weiß) der Felder A und B. D) Fluoreszenzbild der gleichen Zelle, die EGFR- (rot) und HER2-Verteilung (grün) um den Zellkern zeigt. Die Überlagerung (gelb) von Feld B mit EGFR (rot) und HER2 (rot) wird in den Feldern E bzw. F gezeigt.

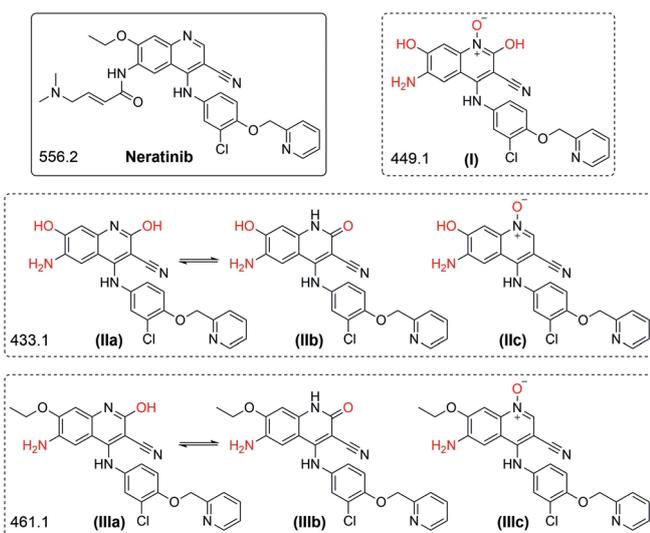
mikroskopie beobachtet wurde (Abbildungen 3 und S18–S28). Abbildung 3A zeigt nur HCA-Cluster von Neratinib-Metaboliten, die aus dem Indexfarbbild der Raman-Ergebnisse entnommen wurden (Abbildung 1D). Die roten und pinken (statt blauen) Cluster repräsentieren M1- bzw. M2-Metaboliten. Abbildung 3B zeigt die Verteilung von Lysosomen (grün), die den Kern (blau) in der Zelle umgeben.

Die Überlagerung (Feld C) der Felder A und B zeigt an, dass der größte Teil des Arzneimittels in den Lysosomen (gelb und weiß) akkumuliert ist. Es wird vermutet, dass ein schwach basischer Wirkstoff einen deutlichen Anstieg der lysosomalen Biogenese induziert, was zu einem bemerkenswerten Anstieg der Lysosomengröße und -anzahl und schließlich zu einer Akkumulation des Wirkstoffs innerhalb der Lysosomen führt.<sup>[26]</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn Neratinib im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine Zunahme der lysosomalen Biogenese induziert (Abbildung S29). Abbildung 3D zeigt das Fluoreszenz-Imaging von Nukleus (blau), EGFR (rot) und HER2 (grün). In Abwesenheit von Nerati-

nib ist der größte Teil von EGFR und HER2 mit der Zelloberfläche und im Zytoplasma assoziiert (Abbildung S30), während die Behandlung mit Neratinib die zytoplasmatische Akkumulation von EGFR und HER2 verstärkt (Abbildungen 3D und S18–S28). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Neratinib eine Internalisierung von EGFR und HER2 induziert. Die Felder E und F (Abbildung 3) sind Überlagerungsbilder von Lysosomen mit EGFR bzw. HER2. Einige dieser Rezeptoren sind mit Lysosomen kolokalisiert. Es wurde bereits berichtet, dass das internalisierte HER2 in SK-BR-3 Zellen, die mit Neratinib behandelt wurden, dem klassischen endosomalen/lysosomalen Stoffwechselweg zum Abbau folgt.<sup>[27]</sup> Somit legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, dass sowohl EGFR als auch HER2 einer Neratinib-induzierten Endozytose unterliegen.

Neratinib besitzt eine  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonyleinheit (Acrylamidgruppe), die durch eine Michael-Additionsreaktion eine kovalente Bindung mit Cys797 von EGFR bzw. mit Cys805 von HER2 bildet.<sup>[7,8]</sup> Neratinib behält auch elektrophile Reaktivität gegenüber dem Cys-Rest von Glutathion (GSH) durch Bildung eines GSH-Addukts bei.<sup>[28]</sup> Wir untersuchten die chemische Reaktivität von Neratinib mit GSH (Abbildung S31). Eine neue, der C-S-Streckschwingung<sup>[29]</sup> zugeordnete Raman-Bande erschien bei  $673\text{ cm}^{-1}$ , die als Ergebnis der Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der Acrylamid-Einheit von Neratinib mit einem Cys von GSH erzeugt wurde. Diese Bande wurde in den Raman-Spektren von Neratinib in Zellen nicht nachgewiesen, was impliziert, dass die Mehrheit des nachgewiesenen nativen Neratinibs und dessen Metaboliten in Zellen nicht kovalent an EGFR oder HER2 gebunden ist.

Die LC-MS-Ergebnisse von Zellen, die mit Neratinib behandelt wurden, wiesen die Anwesenheit des nativen Neratinibs ( $M = 556.2$ ) und drei Hauptmetaboliten I ( $M = 449.1$ ), II ( $M = 433.1$ ) und III ( $M = 461.1$ ) auf. Ihre möglichen Strukturen sind in Schema 1 gezeigt. Die identifizierten Metaboliten tragen nicht die Dimethylaminoacrylamid-Einheit, die den Cys-Rest von EGFR oder HER2 binden würde.



**Schema 1.** Neratinib und seine Metabolitkandidaten mit den jeweiligen monoisotopischen Massen ( $\text{g mol}^{-1}$ ).

Darüber hinaus ist die intrazelluläre Konzentration von Neratinib wahrscheinlich viel höher als die von EGFR und HER2, sodass der Anteil von kovalent gebundenem Neratinib in einer sehr geringen Konzentration vorliegt, die unterhalb der Nachweisgrenzen der Raman-Mikroskopie liegt. Somit zeigen sowohl Raman- als auch LC-MS-Ergebnisse, dass die detektierten Neratinib-Metaboliten in Zellen nicht kovalent an EGFR- oder HER2-Proteine gebunden und inaktiv sind. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Raman-Mikroskopie ein Potenzial für die Messung der physiochemischen Eigenschaften von Wirkstoffkandidaten in einem frühen Stadium der Arzneimittelentdeckung und -entwicklung besitzt. Diese Messungen sind essenziell, um die derzeitigen hohen Ausfallraten von neuen Arzneimittelkandidaten zu verringern.<sup>[30]</sup> Die Anwendung von Imaging-Methoden bei der Arzneimittelentdeckung hat eine Perspektive, um präklinische medizinische Chemieoptimierungszyklen zu beschleunigen und eine *in vitro* zu *in vivo* Translation von Arzneimittelkandidaten zu verbessern.<sup>[31,32]</sup>

Darüber hinaus erfolgte in den durch LC-MS identifizierten Neratinib-Metaboliten Hydroxylierung, N-Oxidation und Dealkylierung des Chinolinrings (Tabelle S1 und Abbildungen S32–S35). Diese strukturellen Veränderungen können durch die Cytochrom P450-Enzym-(CYP450)-Superfamilie induziert werden, die an dem größten Teil des Stoffwechselweges beteiligt ist.<sup>[33,34]</sup> Es wurde berichtet, dass Neratinib durch CYP450-Isoform 3A4 metabolisiert wird,<sup>[24]</sup> das in SK-BR-3, NCI-H1975 und Calu-3 Zellen exprimiert wird.<sup>[35]</sup>

Um die durch Raman-Mikrospektroskopie detektierten Metaboliten (M1 und M2) mit den durch LC-MS identifizierten zu korrelieren, haben wir DFT-Rechnungen (Tabelle 1 und Abbildung S36) für alle Metabolitenkandidaten durchgeführt (Schema 1). Die Daten zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten Raman-Banden ( $\approx 1386$  and  $2208\text{ cm}^{-1}$ ) der durch LC-MS identifizierten Metabolite I und IIb/IIIb mit den durch Raman-Mikrospektroskopie nachgewiesenen M1 und M2. Daher nehmen wir an, dass das Raman-Spektrum von M1 (Abbildung 2b) von Metaboliten I stammt, während Metabolit IIb und/oder IIIb zum Raman-Spektrum von M2 beiträgt (Abbildung 2c).

Zusammenfassend wurde die intrazelluläre räumliche Verteilung von Neratinib-Metaboliten durch die markerfreie Raman-Mikrospektroskopie untersucht. Die meisten Nerati-

**Tabelle 1:** Die experimentellen und mit DFT berechneten Raman-Wellenzahlen der charakteristischen Banden von Neratinib und seinen Metaboliten.

Verbindung	Wellenzahl [ $\text{cm}^{-1}$ ]		
Raman: Neratinib	1386	–	2208
M1	1399 (+13)	–	2217 (+9)
M2	1388 (+2)	1402 (+16)	2217 (+9)
DFT: Neratinib	1381	–	2238
Metabolite I	1395 (+14)	–	2252 (+14)
Metabolite IIa	1364 (–17)	–	2244 (+6)
Metabolite IIb	1383 (+2)	1395 (+14)	2244 (+6)
Metabolite IIc	1378 (–3)	–	2251 (+13)
Metabolite IIIa	1369 (–12)	–	2244 (+6)
Metabolite IIIb	1382 (+1)	1401 (+20)	2243 (+5)
Metabolite IIIc	1365 (–16)	1373 (–8)	2250 (+12)

nib-Metabolite akkumulierten in Lysosomen. Sowohl EGFR als auch HER2 werden einer Neratinib-induzierten Endozytose unterzogen. Neue Metabolite von Neratinib wurden in Brustkrebs- und NSCLC-Zellen nachgewiesen. Eine Kombination aus Raman-Mikrospektroskopie, DFT-Rechnungen und LC-MS wurde verwendet, um die chemische Struktur von Neratinib-Metaboliten zu identifizieren. Diese Ergebnisse zeigen das Potenzial der Raman-Technik für die pharmakokinetische Beurteilung von Arzneimitteln in Zellen.

### Danksagung

Wir danken Dennis Petersen und Sascha D. Krauß für die Optimierung der Matlab-Skripte für die Datenanalyse, Jörn Güldenhaupt für die Vorbereitung von Lipiden und Svenja Seger für die Unterstützung bei den LC-MS-Messungen. Diese Forschung wurde von Protein Research Unit Ruhr in Europe (PURE), dem Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung (MIWF) von Nordrhein-Westfalen, Deutschland und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung, der Europäischen Union und Nordrhein-Westfalen unterstützt.

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

- [1] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Cell* **2010**, *141*, 1117–1134.
- [2] Y. Yarden, M. X. Sliwkowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 127–137.
- [3] L. V. Sequist, B. A. Waltman, D. Dias-Santagata, S. Digumarthy, A. B. Turke, P. Fidias, K. Bergethon, A. T. Shaw, S. Gettinger, A. K. Cosper, et al., *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 75ra26.
- [4] W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, H. Varmus, *PLoS Med.* **2005**, *2*, e73.
- [5] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 169–181.
- [6] E. L. Kwak, R. Sordella, D. W. Bell, N. Godin-Heymann, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, D. R. Driscoll, P. Fidias, T. J. Lynch, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 7665–7670.
- [7] C.-H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K.-K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2070–2075.
- [8] K. Feldinger, A. Kong, *Breast Cancer Dove Med. Press* **2015**, *7*, 147–162.
- [9] A. Chan, S. Delaloge, F. A. Holmes, B. Moy, H. Iwata, V. J. Harvey, N. J. Robert, T. Silovski, E. Gokmen, G. von Minckwitz, et al., *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 367–377.
- [10] B. Hug, R. Abbas, C. Leister, J. Burns, D. Sonnichsen, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4016–4023.
- [11] S. F. El-Mashtoly, D. Petersen, H. K. Yosef, A. Mosig, A. Reinacher-Schick, C. Kötting, K. Gerwert, *Analyst* **2014**, *139*, 1155–1161.
- [12] W. J. Tipping, M. Lee, A. Serrels, V. G. Brunton, A. N. Hulme, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2075–2089.
- [13] K. Meister, J. Niesel, U. Schatzschneider, N. Metzler-Nolte, D. A. Schmidt, M. Havenith, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3310–3312; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3382–3384.
- [14] C. Krafft, M. Schmitt, I. W. Schie, D. Cialla-May, C. Matthäus, T. Bocklitz, J. Popp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4392–4430; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 4458–4500.
- [15] L. Wei, F. Hu, Y. Shen, Z. Chen, Y. Yu, C.-C. Lin, M. C. Wang, W. Min, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 410–412.
- [16] G. P. S. Smith, C. M. McGoverin, S. J. Fraser, K. C. Gordon, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2015**, *89*, 21–41.
- [17] B. Kann, H. L. Offerhaus, M. Windbergs, C. Otto, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2015**, *89*, 71–90.
- [18] M. Miljković, T. Chernenko, M. J. Romeo, B. Bird, C. Matthäus, M. Diem, *Analyst* **2010**, *135*, 2002–2013.
- [19] S. F. El-Mashtoly, D. Niedieker, D. Petersen, S. D. Krauss, E. Freier, A. Maghnouj, A. Mosig, S. Hahn, C. Kötting, K. Gerwert, *Biophys. J.* **2014**, *106*, 1910–1920.
- [20] S. F. El-Mashtoly, H. K. Yosef, D. Petersen, L. Mavarani, A. Maghnouj, S. Hahn, C. Kötting, K. Gerwert, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7297–7304.
- [21] D. Fu, J. Zhou, W. S. Zhu, P. W. Manley, Y. K. Wang, T. Hood, A. Wylie, X. S. Xie, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 614–622.
- [22] K.-K. Wong, P. M. Fracasso, R. M. Bukowski, T. J. Lynch, P. N. Munster, G. I. Shapiro, P. A. Janne, J. P. Eder, M. J. Naughton, M. J. Ellis, et al., *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 2552–2558.
- [23] Y. Ito, M. Suenaga, K. Hatake, S. Takahashi, M. Yokoyama, Y. Onozawa, K. Yamazaki, S. Hironaka, K. Hashigami, H. Hasegawa, et al., *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2012**, *42*, 278–286.
- [24] R. Abbas, B. A. Hug, C. Leister, J. Burns, D. Sonnichsen, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *71*, 522–527.
- [25] C. Matthäus, T. Chernenko, J. A. Newmark, C. M. Warner, M. Diem, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 668–673.
- [26] K. Keyvanjah, D. DiPrimeo, A. Li, M. Obaidi, D. Swearingen, A. Wong, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2017**, *83*, 554–561.
- [27] Y. Zhang, J. Zhang, C. Liu, S. Du, L. Feng, X. Luan, Y. Zhang, Y. Shi, T. Wang, Y. Wu, et al., *Cancer Lett.* **2016**, *382*, 176–185.
- [28] Y. Shibata, M. Chiba, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **2015**, *43*, 375–384.
- [29] P. R. T. Jess, D. D. W. Smith, M. Mazilu, K. Dholakia, A. C. Riches, C. S. Herrington, *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 2723–2728.
- [30] Y. Henchoz, B. Bard, D. Guillaume, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, S. Martel, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 707–729.
- [31] J. R. W. Conway, N. O. Carragher, P. Timpson, *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 314–328.
- [32] B. Isherwood, P. Timpson, E. J. McGhee, K. I. Anderson, M. Canel, A. Serrels, V. G. Brunton, N. O. Carragher, *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 141–170.
- [33] *Reactive Drug Metabolites* (Hrsg.: A. S. Kalgutkar), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [34] *ADME and Translational Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Therapeutic Proteins: Applications in Drug Discovery and Development* (Hrsg.: H. Zhou, F.-P. Theil), Wiley, Hoboken, **2016**.
- [35] Y.-F. Lee, C.-Y. Lee, L.-C. Lai, M.-H. Tsai, T.-P. Lu, E. Y. Chuang, *Database* **2018**, *2018*, bax101-bax101.

Manuscript received: March 20, 2018

Accepted manuscript online: April 12, 2018

Version of record online: ■■■■■■, ■■■■■■

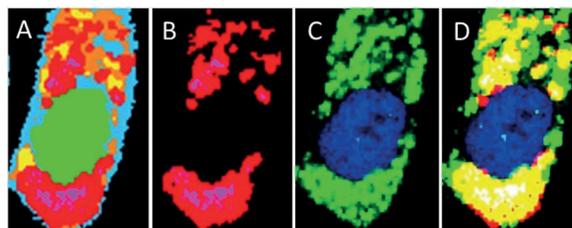
## Zuschriften



## Bioanalytik

K. Aljakouch, T. Lechtonen, H. K. Yosef,  
M. K. Hammoud, W. Alsaidi, C. Kötting,  
C. Mügge, R. Kourist, S. F. El-Mashtoly,\*  
K. Gerwert ————— ■■■■-■■■■

Raman-mikrospektroskopischer  
Nachweis für den Metabolismus eines  
Tyrosinkinase-Inhibitors, Neratinib, in  
Krebszellen



**Raman-Mikrospektroskopie** kann als  
markerfreie Technik zur Untersuchung  
der räumlichen Verteilung und des Me-  
tabolismus von Tyrosinkinase-Inhibitoren

in Zellen verwendet werden. Die Methode  
besitzt Potential als In-vitro-Test für die  
Pharmakokinetik.