

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Medizinischen

Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Bähre

***In-vitro*-Untersuchungen zum Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib  
auf das Bindungsverhalten eines gegen CEA-gerichteten Antikörpers in  
Zelllinien des kolorektalen Karzinoms (CRC)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kathrin Hüttl

geboren am 19.08.1989 in Freiberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Meller (Göttingen/Halle)

2. Prof. Dr. P. Michl

3. PD Dr. K. Homayounfar (Göttingen)

05.05.2015

01.02.2016

# Referat

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA/CEACAM5) besitzt als Tumormarker in der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms eine große Bedeutung. Daneben steht es als innovativer Ansatz für neue zielgerichtete Bildgebungs- und Therapieverfahren im Mittelpunkt der Forschung. Für CEACAM1, einen weiteren Vertreter der CEACAMs, konnte eine Wechselwirkung mit dem für das Tumorwachstum und Metastasierung essentiellen VEGF/VEGFR-Signalsystem nachgewiesen werden. Anhand radiochemischer *In-vitro*-Studien an kolorektalen Tumorzelllinien mit unterschiedlicher CEA-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit eine mögliche Interaktion zwischen dem Oberflächenantigen CEA und dem VEGF/VEGFR-System überprüft.

Für die Untersuchungen erfolgte die Radioiodierung des gegen CEA-gerichteten Antikörpers TF2 mit  $^{131}\text{I}$ . Der Nachweis der spezifischen Bindung des Antikörpers an CEA gestattete die Verwendung der ermittelten Uptake-Werte von  $^{131}\text{I}$ -TF2 als Parameter für den Einfluss verschiedener Untersuchungsbedingungen. Zur Hemmung des VEGF-Rezeptors wurde Pazopanib als Vertreter der neuen Generation von Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren ausgewählt. Abweichende Uptake-Werte für  $^{131}\text{I}$ -TF2 bei Verwendung des Inhibitors, als Folge der veränderten CEA-Expression, gaben Rückschlüsse auf einen Crosstalk zwischen CEA und VEGF/VEGFR. Weiterhin erfolgte die Untersuchung der antiproliferativen Potenz des Antikörpers TF2 und Pazopanib. Die ermittelten Werte für den  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake waren spezifisch und korrelierten mit der aus Literaturangaben bekannten jeweiligen CEA-Expression der Zelllinien. Für Pazopanib konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation nachgewiesen werden. TF2 hatte unter den gewählten Bedingungen keine antiproliferative Wirkung auf die Zellen. Bei zwei der drei Zelllinien konnte eine Erhöhung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake unter Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors festgestellt werden.

Die vorgestellten Ergebnisse dokumentieren eine erhöhte CEA-Expression unter Zusatz von Pazopanib. Diese Erkenntnisse bieten vielversprechende Möglichkeiten zur Steigerung der Effizienz und Sensitivität neuer nuklearmedizinischer Methoden wie die CEA/CEACAM5-vermittelte Radioimmuntherapie und Radioimmuno-PET. Daneben könnte Pazopanib durch den nachgewiesenen antiproliferativen Effekt das multimodale Therapieregime für das kolorektale Karzinom ergänzen.

Hüttl, Kathrin: *In-vitro*-Untersuchungen zum Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib auf das Bindungsverhalten eines gegen CEA-gerichteten Antikörpers in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms (CRC), Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 79 Seiten, 2015

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis.....  | I  |
| Abkürzungs- und Symbolverzeichnis.....                                     | IV |
| Abbildungsverzeichnis  |    |
| Tabellenverzeichnis  |    |
| 1 Einleitung und Stand der Forschung.....                                  | 1  |
| 1.1 Einführung in die Thematik .....                                       | 1  |
| 1.2 Kolorektales Karzinom.....   | 1  |
| 1.2.1 Hintergründe.....  | 1  |
| 1.2.2 Therapieoptionen.....  | 2  |
| 1.3 Carcinoembryonales Antigen (CEA) .....                                 | 3  |
| 1.3.1 Bedeutung des Carcinoembryonalen Antigens .....                      | 3  |
| 1.3.2 Vertreter der CEACAM-Familie.....                                    | 4  |
| 1.3.3 Physiologie und Pathophysiologie von CEACAM5/CEA .....               | 5  |
| 1.3.4 Einsatz von Anti-CEA-Antikörpern .....                               | 7  |
| 1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....                         | 8  |
| 1.4.1 Isoformen von VEGF .....   | 8  |
| 1.4.2 VEGF-Rezeptoren .....  | 10 |
| 1.4.3 Physiologische Bedeutung .....                                       | 12 |
| 1.4.4 Pathophysiologische Wertigkeit .....                                 | 13 |
| 1.4.5 Anti-VEGF- bzw. Anti-VEGFR-Therapie .....                            | 14 |
| 1.4.6 Pazopanib als Vertreter der Tyrosinkinase-Inhibitoren.....           | 15 |
| 1.5 Einführung in die Radioimmuntherapie .....                             | 17 |
| 1.6 Entwicklung eines Pretargeting-Systems für die Radioimmuntherapie..... | 20 |
| 1.7 Zielsetzung .....  | 22 |
| 2 Material und Methoden .....  | 23 |
| 2.1 Materialien .....  | 23 |
| 2.1.1 Verwendete Zelllinien .....  | 23 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.1.2 | Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitor.....             | 23 |
| 2.1.3 | Verwendete Reagenzien .....                             | 23 |
| 2.1.4 | Verwendete Materialien und Geräte .....                 | 24 |
| 2.1.5 | Verwendete Software .....                               | 25 |
| 2.2   | Methoden .....  | 26 |
| 2.2.1 | Zelllinien .....  | 26 |
| 2.2.2 | SW480 .....   | 26 |
| 2.2.3 | HT29 .....  | 26 |
| 2.2.4 | T84.....  | 27 |
| 2.3   | Zellkultivierung.....                                   | 27 |
| 2.3.1 | Passagieren der Zellkulturen/Zellgewinnung .....        | 27 |
| 2.3.2 | Kryokonservierung.....                                  | 28 |
| 2.4   | Markierung von TF2 mit <sup>131</sup> I .....           | 28 |
| 2.4.1 | Radioiodid .....  | 28 |
| 2.4.2 | Markierungsprinzip .....                                | 29 |
| 2.4.3 | Markierungsmethode.....                                 | 29 |
| 2.4.4 | Qualitätskontrolle.....                                 | 30 |
| 2.5   | Versuchsdurchführung.....                               | 30 |
| 2.5.1 | Bestimmung der Antikörperspezifität .....               | 32 |
| 2.5.2 | Eingesetzte Pazopanibkonzentrationen.....               | 32 |
| 2.5.3 | Inkubation mit <sup>131</sup> I-TF2 und Pazopanib ..... | 32 |
| 2.5.4 | Zellpelletbestimmung.....                               | 32 |
| 2.5.5 | Ermittlung der zellgebundenen Aktivität.....            | 33 |
| 2.5.6 | Zellzahlbestimmung.....                                 | 33 |
| 2.6   | Auswertung und Statistik .....                          | 34 |
| 2.6.1 | Bestimmung der Standardkurve .....                      | 34 |
| 2.6.2 | Zeitkorrektur .....                                     | 34 |
| 2.6.3 | Berechnung des Uptake .....                             | 35 |
| 2.6.4 | Statistische Auswertung .....                           | 36 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3     | Ergebnisse.....   | 37 |
| 3.1   | Standardkurve .....   | 37 |
| 3.2   | Ausbeute und radiochemische Reinheit von <sup>131</sup> I-TF2 .....                               | 38 |
| 3.3   | Spezifität des CEA-Antikörpers TF2 .....  | 38 |
| 3.4   | Veränderung der Zellproliferation.....  | 40 |
| 3.4.1 | Einfluss von TF2 und <sup>131</sup> I-TF2.....  | 40 |
| 3.4.2 | Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib .....   | 41 |
| 3.5   | Ergebnisse Uptake von <sup>131</sup> I-TF2 .....  | 44 |
| 3.5.1 | Zellspezifische Unterschiede des <sup>131</sup> I-TF2-Uptake .....                                | 44 |
| 3.5.2 | Veränderung des <sup>131</sup> I-TF2-Uptakes unter Zugabe von Pazopanib<br>.....                  | 45 |
| 4     | Diskussion .....  | 49 |
| 4.1   | Methodik.....   | 49 |
| 4.2   | Zellkulturen.....   | 51 |
| 4.3   | Zytotoxische Potenz von Pazopanib .....   | 52 |
| 4.4   | Unterschiede der antiproliferativen Potenz von Pazopanib bei den<br>eingesetzten Zelllinien ..... | 54 |
| 4.5   | Anwendung von Pazopanib in der CEA vermittelten<br>Radioimmuntherapie.....                        | 57 |
| 4.6   | Multimodale Therapie und Diagnostik .....   | 59 |
| 5     | Zusammenfassung und Ausblick .....  | 63 |
| 6     | Literaturverzeichnis.....   | 65 |
| 7     | Thesen .....  | 79 |
| 8     | Tabellarischer Lebenslauf   |    |
| 9     | Selbstständigkeitserklärung   |    |
| 10    | Erklärung über frühere Promotionsversuche   |    |
| 11    | Danksagung  |    |

## Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| Abb.              | Abbildung  |
| <sup>225</sup> Ac | Actinium-Isotop mit der Massenzahl 225   |
| Ang-2             | Angiopoetin-2  |
| <sup>211</sup> At | Astat-Isotop mit der Massenzahl 211  |
| ATP               | Adenosintriphosphat  |
| Bcr/Abl           | Protoonkogen; Fusionsgen (Bcr: <i>breakpoint cluster region</i> ;<br>Abl: <i>Abelson Murine Leukemia</i> ) |
| <sup>213</sup> Bi | Wismut-Isotop mit der Massenzahl 213   |
| Bq                | Becquerel  |
| CD20              | B-Lymphozyten-Antigen ( <i>cluster of differentiation</i> )  |
| CEA               | Carcinoembryonales Antigen   |
| CEACAM            | Carcinoembryonales Zelladhäsionsmolekül  |
| c-KIT             | Stammzellfaktor-Rezeptor   |
| CO <sub>2</sub>   | Kohlenstoffdioxid  |
| cpm               | <i>counts per minute</i> (Zähler pro Minute)   |
| CRC               | Kolorektales Karzinom  |
| CT                | Computertomographie  |
| Da                | Dalton   |
| DC                | Dünnschichtchromatographie   |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )  |
| DOTA              | 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure   |
| EDTA              | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGFR              | Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor   |
| ELISA             | Enzyme-linked Immunosorbent Assay  |
| Erk-1/2           | Extrazellulär-Signal-regulierte Kinase   |
| <sup>18</sup> F   | Fluor-Isotop mit der Massenzahl 18   |
| Fab               | Antigen-bindendes Fragment   |
| FDG               | Fluordesoxyglucose   |
| Flt-1             | <i>fms-like-tyrosine kinase-1</i> , entspricht dem VEGFR-1   |
| g                 | G-Zahl, Erdbeschleunigung bzw. Einheit der relativen<br>Zentrifugalbeschleunigung                          |
| <sup>68</sup> Ga  | Gallium-Isotop mit der Massenzahl 68   |
| HER2/neu          | Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Typ 2  |
| HSG               | Histamin-Succinyl-Glycin   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| <sup>131</sup> I  | Iod-Isotop mit der Massenzahl 131                                      |
| IgG               | Immunglobulin G  |
| Immuno-PET        | Immun-Positronen-Emissions-Tomographie                                 |
| <sup>111</sup> In | Indium-Isotop mit der Massenzahl 111                                   |
| JNK               | c-Jun N-terminale Kinasen  |
| KDR               | <i>kinase domain region</i> , entspricht dem VEGFR-2                   |
| LET               | Linearer Energietransfer   |
| <sup>177</sup> Lu | Lutetium-Isotop mit der Massenzahl 177                                 |
| MAPK              | Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase                                      |
| mRNA              | Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )           |
| MRT               | Magnetresonanztomographie  |
| n                 | Anzahl der Versuche  |
| NaCl              | Natriumchlorid   |
| NaI               | Natriumiodid   |
| NaOH              | Natriumhydroxid  |
| NO                | Stickstoffmonoxid  |
| p53               | Tumorsuppressor-Protein (Molekularmasse: 53 kDa)                       |
| Pazo              | Pazopanib  |
| PBS               | Phosphat-Puffer  |
| PDGF              | Plättchen-Wachstumsfaktor  |
| PI3K              | Phosphatidylinositol-3-Kinase  |
| PIGF              | Planzentraler Wachstumsfaktor  |
| PKB               | Proteinkinase B  |
| PLC $\gamma$      | Phospholipase C  |
| PRIT              | Pretargeted-Radioimmuntherapie   |
| Raf               | Familie von Proteinkinasen ( <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> ) |
| Ras               | Protoonkogen ( <i>rat sarcoma</i> )                                    |
| RCC               | Nierenzellkarzinom   |
| RR                | radiochemische Reinheit  |
| RTK               | Rezeptor-Tyrosinkinase   |
| RT-PCR            | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion                        |
| SAPK              | Stress-aktivierte Phospho-Kinasen                                      |
| SPECT             | Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie                            |
| SRC               | Protoonkogen für die Tyrosinkinase c-Src ( <i>cellular sarcoma</i> )   |
| Tab.              | Tabelle  |
| TFG- $\beta$      | Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$                              |

|                 |   |
|-----------------|---|
| TKI             | Tyrosinkinase-Inhibitoren   |
| TLC             | Dünnschichtchromatographie ( <i>thin layer chromatography</i> )                   |
| TNM-System      | Klassifikationssystem maligner Tumore (Tumor, Lymphknoten, Metastasen)            |
| UICC-System     | Klassifikationssystem maligner Tumore der Internationalen Vereinigung gegen Krebs |
| VEGF            | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor  |
| VEGFR           | Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor                                 |
| <sup>90</sup> Y | Yttrium-Isotop mit der Massenzahl 90  |
| °C              | Grad Celsius  |



# Abbildungsverzeichnis

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Abb. 1:</b>  | Struktur von CEACAM5/CEA (modifiziert nach Hammarström, 1999)...  | 5  |
| <b>Abb. 2:</b>  | Signaltransduktion am VEGF-Rezeptor mit nachgeschalteten<br>Signalkaskaden (modifiziert nach Rini und Small, 2005).....   | 12 |
| <b>Abb. 3:</b>  | Schematisierter Aufbau des trivalenten Antikörpers TF2 (modifiziert<br>nach Goldenberg, Rossi et al. 2008).....   | 21 |
| <b>Abb. 4:</b>  | Ablauf der elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion<br>(modifiziert nach Blömeke, 2003).....  | 29 |
| <b>Abb. 5:</b>  | Standardkurve für $^{131}\text{I}$ .....  | 37 |
| <b>Abb. 6:</b>  | Beispiel eines TLC-Scans einer dünnenschichtchromatografischen<br>Untersuchung zur Qualitätskontrolle des markierten Antikörpers TF2..                                      | 38 |
| <b>Abb. 7:</b>  | Kompetitiver Test der spezifischen Antikörperbindung.....   | 39 |
| <b>Abb. 8:</b>  | Einfluss von $^{131}\text{I}$ -TF2 auf die Proliferation der Zelllinien.....  | 40 |
| <b>Abb. 9:</b>  | Einfluss unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen auf die<br>Zellproliferation der SW480-Zellen.....   | 41 |
| <b>Abb. 10:</b> | Einfluss unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen auf die<br>Zellproliferation der HT29-Zellen.....  | 42 |
| <b>Abb. 11:</b> | Einfluss unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen auf die<br>Zellproliferation der T84-Zellen .....  | 43 |
| <b>Abb. 12:</b> | Vergleich des standardisierten $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake der drei Zelllinien .....   | 44 |
| <b>Abb. 13:</b> | $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake/ $10^6$ Zellen bei Inkubation mit unterschiedlichen<br>Pazopanib-Konzentrationen bei der Zelllinie SW480 .....                                 | 45 |
| <b>Abb. 14:</b> | Ausschnittsvergrößerung der Abb. 12 mit Darstellung des $^{131}\text{I}$ -TF2-<br>Uptake/ $10^6$ Zellen für 1 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Pazopanib + $^{131}\text{I}$ -TF2..... | 46 |
| <b>Abb. 15:</b> | $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake/ $10^6$ Zellen bei Inkubation mit unterschiedlichen<br>Pazopanib-Konzentrationen bei der Zelllinie HT29 .....                                  | 47 |
| <b>Abb. 16:</b> | $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake/ $10^6$ Zellen bei Inkubation mit unterschiedlichen<br>Pazopanib-Konzentrationen bei der Zelllinie T48.....                                    | 48 |

## Tabellenverzeichnis

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| <b>Tab. 1:</b> | Überblick VEGF-Rezeptortypen.....         | 10 |
| <b>Tab. 2:</b> | Übersicht <i>In-vitro</i> -Versuche ..... | 31 |

# 1 Einleitung und Stand der Forschung

## 1.1 Einführung in die Thematik

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Für die Diagnostik und Therapie dieser Krebserkrankung spielt das Carcinoembryonale Antigen (CEA) als Tumormarker eine essentielle Rolle. Seit einigen Jahren wird das membranständige Antigen zunehmend auch als therapeutisches Target, beispielsweise für zielgerichtete nuklearmedizinische Verfahren, eingesetzt. Frühere Studien belegen, dass die Translokation/Expression von CEA durch Chemotherapie und Bestrahlung beeinflusst werden kann. Es stellt sich die Frage, wie sich neu entwickelte, selektive antitumorale Substanzen auf das CEA an der Tumorzelloberfläche auswirken. Einige Vertreter dieser modernen „Targeted Therapies“ sind die Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche u. a. den VEGF-Rezeptor inhibieren, der für die Pathogenese von Tumorerkrankungen von großer Bedeutung ist. Für ein weiteres Mitglied der CEACAMs (CEACAM1) konnte bereits in Studien ein Crosstalk mit dem VEGF/VEGFR-Signalweg nachgewiesen werden. Für CEA selbst liegen bisher keine Ergebnisse zu einer möglichen Wechselwirkung vor. In ersten Untersuchungen einer denkbaren Interaktion zwischen CEA und VEGF/VEGFR sollte Pazopanib als „Breitband“-Tyrosinkinase-Inhibitor eingesetzt werden.

## 1.2 Kolorektales Karzinom

### 1.2.1 Hintergründe

Das kolorektale Karzinom stellt mit einer Inzidenz von mehr als 1,2 Mio. (2008) die weltweit dritthäufigste Krebserkrankung dar (Jemal et al., 2011). Allein im Jahr 2010 erkrankten in der Bundesrepublik Deutschland 62.420 Menschen an der bösartigen Neubildung des Dickdarms einschließlich des Rektums. Insgesamt 26.000 der Patienten starben, wobei 90 % älter als 70 Jahre waren (Zentrum für Krebsregisterdaten/Robert-Koch-Institut, 2013). Damit gehört das kolorektale Karzinom bei den Männern zur zweithäufigsten bzw. bei den Frauen zur dritthäufigsten diagnostizierten Krebserkrankung in Deutschland. Zu den Risikofaktoren zählen u. a. eine ballaststoffarme Ernährung, der übermäßige Verzehr von rotem Fleisch, Adipositas, Bewegungsmangel sowie Tabak- und Alkoholkonsum. Ein Teil der Tumore ist jedoch erblich bedingt, wie beispielsweise die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse kolorektale Karzinom (HNPCC). Ein Großteil der kolorektalen Karzi-

nome entsteht aus einer Adenom-Karzinom-Sequenz und bildet histologisch gesehen zu 90 % Adenokarzinome (Herold, 2015).

Seit 2003 gibt es in Deutschland als jährliche Vorsorgeuntersuchung für Nicht-Risikopersonen zwischen 50 und 54 Jahre den Hämoccult-Test als Screening-Methode für okkultes Blut im Stuhl sowie die klinisch rektale Untersuchung. Ab 55 Jahre empfehlen die gesetzlichen Krankenkassen die Durchführung einer Koloskopie, welche als sicherste Maßnahme zur Detektion von gutartigen Polypen gilt, die im Laufe der Zeit bösartig entarten können.

### **1.2.2 Therapieoptionen**

Laut den Datenerhebungen des Robert-Koch-Institutes sanken die altersstandardisierten Sterberaten für das kolorektale Karzinom in den letzten zehn Jahren in Deutschland um circa 20 Prozent. Dies lässt sich zum einen auf weiterentwickelte Früherkennungsmaßnahmen, zum anderen auf die voranschreitende Entwicklung verbesserter Therapiemöglichkeiten zurückführen. Als Grundlage der Therapieplanung wurde das UICC-Klassifikationssystem entwickelt, welches unter Zuhilfenahme des TNM-Systems (Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Fernmetastasen) die Ausbreitung des kolorektalen Karzinoms im Körper charakterisiert. Zudem können mit Hilfe des jeweiligen UICC-Stadium (I-IV) Aussagen über die mögliche Prognose des Patienten getroffen werden.

Die Behandlung des kolorektalen Karzinoms beruht auf den drei klassischen Therapie Säulen: chirurgische Intervention, Chemotherapie und Radiotherapie. Bei Tumoren mit kurativem Therapieansatz ist die operative Resektion die Methode der Wahl. Bei fortgeschrittenen Tumoren ist neoadjuvant – zur Verkleinerung der Tumormasse – bzw. adjuvant zur Operation eine Kombination mit einer Chemotherapie und/oder einer Bestrahlung des Tumors möglich, um das Rezidiv-Risiko sowie eine Metastasierung zu verhindern. Bei der zytostatischen Therapie haben sich in den letzten Jahren u. a. neben dem FOLFOX- (Folinsäure, 5-Fluorouracil und Oxaliplatin) auch das FOLFIRI-Schema (Folinsäure, 5-Fluorouracil und Irinotecan) etabliert (Colucci et al., 2005). Ein großes Problem der systemischen Chemotherapie ist jedoch die mangelnde Selektivität der Behandlung gegenüber allen schnell wachsenden Zellen im menschlichen Körper. Die Patienten haben oft mit starken Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen, Blutbildveränderungen, verbunden mit erhöhter Infektanfälligkeit, Haarausfall und Schleimhautentzündung zu kämpfen. Ziel neuerer Forschungen im Bereich der Behandlung onkologischer Erkrankungen ist demnach, durch sogenannte „Targeted Therapies“ eine gesteigerte Tumorselektivität zu erreichen und den Krebspatienten eine längere Überlebenszeit bei verbesserter Lebensqualität zu bieten. Ansatzpunkte für

diese gezielten Krebstherapien sind unter anderem spezifische, auf den Tumorzellen exprimierte Rezeptoren, Oberflächenmoleküle (u. a. EGFR, VEGFR, CEA) und intrazelluläre Signalwege, die mittels monoklonaler Antikörper oder Tyrosinkinase-Inhibitoren beeinflusst werden können. Durch diese neuen Aspekte ergeben sich nicht nur für die Therapie des kolorektalen Karzinoms mehr Möglichkeiten, es eröffnen sich auch neue Perspektiven u. a. für die nuklearmedizinische Bildgebung, welche für die personalisierte Behandlungsplanung zunehmend an Bedeutung gewinnt.

## **1.3 Carcinoembryonales Antigen (CEA)**

### **1.3.1 Bedeutung des Carcinoembryonalen Antigens**

Der Begriff des Carcinoembryonalen Antigens (CEA) ist untrennbar mit der Diagnostik und Nachsorge des kolorektalen Karzinoms verbunden. Als einer der ältesten und wichtigsten Tumormarker überhaupt ist das CEA nicht mehr aus der klinischen Routine wegzudenken. Vor fünfzig Jahren wurde es von den Wissenschaftlern Gold und Freedman als Tumor-assoziiertes Antigen beschrieben. Da dieses Antigen außer in Stichproben von kolorektalen Karzinomen auch in verschiedenen fetalen Geweben nachweisbar war, erhielt es die Bezeichnung „Carcinoembryonales Antigen“ (Gold und Freedman, 1965). Es stellte sich jedoch heraus, dass das Carcinoembryonale Antigen auch bei gesunden Probanden vor allem im Darmgewebe gebildet wird. Einige Jahre später wurden von derselben Forschergruppe signifikant erhöhte Serum-CEA-Werte bei Patienten mit kolorektalen Karzinom gemessen (Thomson et al., 1969). Dies markiert den Beginn intensiver Bemühungen zur Etablierung des Carcinoembryonalen Antigens als möglichen Tumormarker für verschiedene Krebserkrankungen. Heutzutage ist die Bestimmung von CEA allgemein als wichtige und kosteneffektive Überwachung vor allem von kolorektalen Karzinomen anerkannt. Hierbei steht insbesondere die postoperative Beobachtung nach chirurgischer Resektion im Vordergrund. Die Sensitivität für die Messung erhöhter CEA-Werte bei dem Auftreten von Rezidiven liegt bei ungefähr 80 % (Duffy, 2001). Ebenfalls wird zum Therapieverlauf die konstante Messung von CEA-Werten im Serum bei der Durchführung von Chemotherapie und/oder Radiotherapie routinemäßig in der Klinik durchgeführt. Der Stellenwert von CEA als möglicher Prognosefaktor für das kolorektale Karzinom konnte bis heute nicht eindeutig belegt werden (Divitiis et al., 2014).

Neben seiner Bedeutung als Tumormarker ist das Carcinoembryonale Antigen auch ein Ansatzpunkt für verschiedene Diagnostik- und Therapiestrategien. Durch die Entwicklung neuartiger monoklonaler Antikörper gegen CEA war die Möglichkeit für inno-

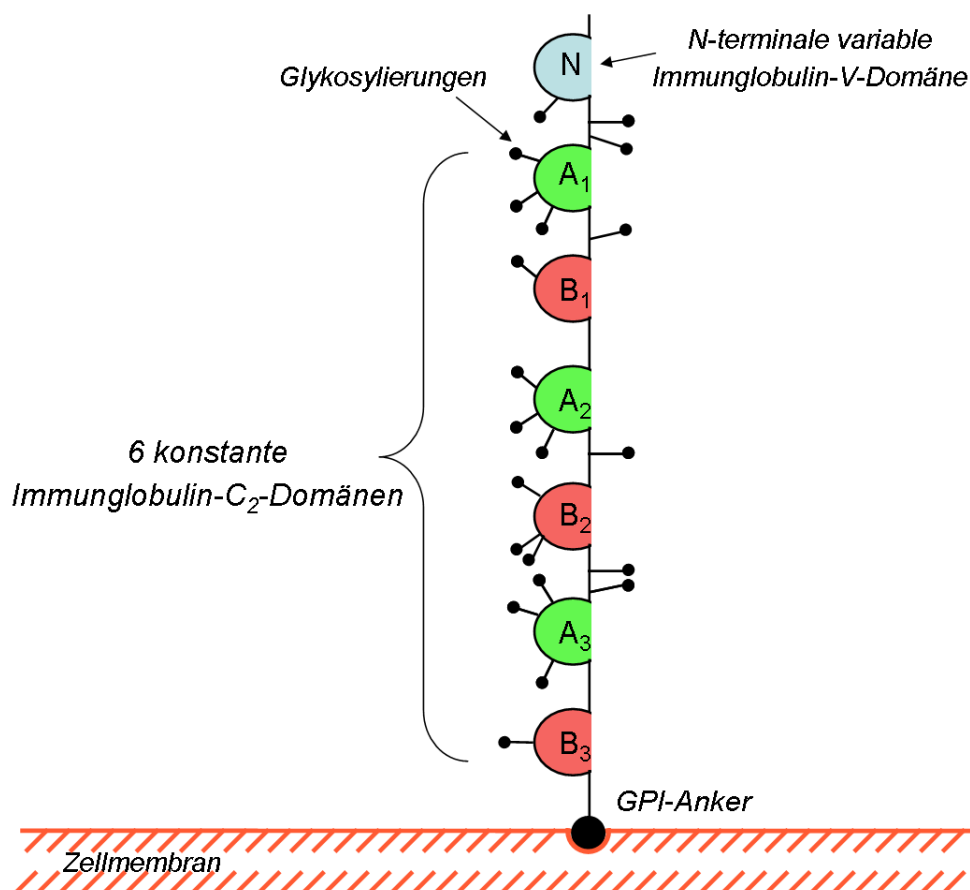
vative Entwicklungen in den Bereichen der Immuno-PET zur sensitiven Tumordiagnostik und der Radioimmuntherapie zur gezielteren Krebstherapie geboren.

### 1.3.2 Vertreter der CEACAM-Familie

Das Carcinoembryonale Antigen ist nur ein Beispiel aus der Kategorie der „Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules“ (kurz CEACAMs), welche zur Immunglobulin-Superfamilie gezählt werden. CEA selbst ist ein komplexes Glykoprotein mit einem Gesamtgewicht von ungefähr 200 kDa und das Genprodukt des CEACAM5-Gens (Hammarström, 1999; Kuespert et al., 2006). Daneben kodieren insgesamt 29 Gene/Pseudogene die CEA-Familie, wobei 12 Gene die CEA-Untergruppe, 11 Gene die verwandte schwangerschaftsspezifische Glykoproteinfamilie („pregnancy-specific glycoprotein“, PSG) und 6 Gene eine dritte Untergruppe verschlüsseln (Hammarström, 1999). Neben CEACAM5 gehören noch weitere 11 CEACAM-Proteine zur CEA-Familie. Die bekanntesten und für die klinische Forschung interessantesten Vertreter sind abgesehen von CEA/CEACAM5 das CEACAM1 („biliary glycoprotein“, GBP) und das CEACAM6 („non-specific cross-reacting antigen“, NCA) (Kuespert et al., 2006).

Die CEACAM-Proteine gleichen sich in ihrem Aufbau und bestehen aus jeweils einer N-terminalen variablen Immunglobulin-V-Domäne (Ausnahme: CEACAM16) und einer unterschiedlichen Anzahl an konstanten Immunglobulin-C2-Domänen. Daneben sind bei allen CEACAM-Mitgliedern die Proteindomänen stark glykolisiert. Die Abb. 1 verdeutlicht die Struktur von CEACAM5 auf der Zellmembran, wobei das Oberflächenmolekül neben seiner N-Domäne aus sechs, sich wiederholenden C2-Domänen besteht (A und B benannt). Wie einige andere Vertreter der CEA-Familie ist CEACAM5 über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) mit den Phospholipiden der Zellmembran verknüpft.

Andere CEACAMs sind im Unterschied dazu über einen hydrophoben transmembranen Anteil mit einer sich anschließenden intrazellulären Domäne mit der Zellmembran verbunden. Bei CEACAM1 existieren, durch alternatives Spleißen bedingt, unterschiedlich lange intrazelluläre Domänen mit zwei Tyrosin-Resten, welche durch Phosphorylierung auf intrazelluläre Signalwege Einfluss nehmen können (Hammarström, 1999; Beauchemin und Arabzadeh, 2013).



**Abb. 1: Struktur von CEACAM5/CEA (modifiziert nach Hammarström, 1999)**

CEACAM5/CEA lässt sich ab der frühen Fetalperiode (9.-14. Woche) in verschiedenen Geweben nachweisen. Im gesunden menschlichen Körper ist CEACAM5 auf der apikalen Seite der Enterozyten sowie im Epithel des Nasopharynx, der Lunge, des Urogenitaltraktes und der Schweißdrüsen nachweisbar (Hammarström, 1999; Kuespert et al., 2006; Beauchemin und Arabzadeh, 2013). Den Hauptbildungsort von CEA stellen die Epithel- und Becherzellen des Kolons dar, welche bis zu 50-70 mg CEA pro Tag in das Darmlumen freisetzen. In einem gesunden Organismus wird CEACAM5 nur auf der apikalen, dem Darmlumen zugewandten Seite exprimiert und kann somit lediglich in geringen Mengen ins Blut gelangen. Bei Tumorzellen lässt sich CEACAM5 andererseits auf der gesamten Zelloberfläche nachweisen. Durch die sehr gute Gefäßversorgung größerer Tumore gelangt CEA durch Kontakt mit den Kapillaren leicht ins menschliche Blutssystem und kann somit erhöhte Serumspiegel bewirken (Hammarström, 1999). Abhängig von dem jeweiligen Testsystem liegt der Referenzbereich für CEA im Serum/Plasma < 2,5 ng/ml und für bei Rauchern bei < 5 ng/ml (Wild, 2013).

### 1.3.3 Physiologie und Pathophysiologie von CEACAM5/CEA

Ähnlich den anderen Mitgliedern der CEA-Familie ist CEACAM5 in verschiedene Prozesse im menschlichen Organismus involviert. Es nimmt eine wichtige Funktion im Rahmen der Zell-Zell-Kontakte ein, in dem es sowohl die homo- (CEACAM5 – CEACAM5) als auch heterotype Bindung zu anderen CEACAM-Molekülen (CEACAM5 – CEACAM6 oder 1) ermöglicht (Benchimol et al., 1989). Neben dieser zelladhäsiven und migrationsfördernden Wirkung vermittelt CEACAM5 auch einen hemmenden Einfluss auf den Prozess der Anoikis (Apoptose von Zellen ohne Verbindung zur extrazellulären Matrix) (Ordonez et al., 2000). Da CEACAM5 keine eigene intrazelluläre Einheit besitzt, benötigt es für die oben beschriebenen Funktionen verschiedene Interaktionspartner, wie beispielsweise Fibronectin oder verschiedene Integrine, welche die intrazellulären Signalwege beeinflussen können (Ordonez et al., 2007). Weiterhin wird sowohl für CEACAM5 als auch CEACAM6 eine immunprotektive Wirkung im Gastrointestinaltrakt beschrieben (Hammarström, 1999).

Verschiedene Untersuchungen haben ergeben, dass CEA in einer Reihe von Tumorerkrankungen teilweise 10 bis 30-fach überexprimiert wird. Dies war in über 90 % der gastrointestinalen Tumore, 70 % der kleinzelligen Bronchialkarzinome und in mehr als 50 % der Mammakarzinome der Fall (Thompson et al., 1991). Es könnte darauf hinweisen, dass das Carcinoembryonale Antigen neben seinen physiologischen Funktionen auch bei der Tumorentwicklung und Metastasierung eine Rolle spielt. Ebenfalls konnte für andere CEACAM-Mitglieder, allen voran CEACAM1 und 6, ein erhöhtes Expressionsmuster bei verschiedenen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Neumaier et al., 1993; Hammarström, 1999).

CEACAM5 fördert als wichtiges Zelladhäsionsmolekül das Tumorzellüberleben, indem es den Prozess der Anoikis inhibiert und die von TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) vermittelte Wachstumshemmung der Zellen unterdrückt. Ebenfalls greift CEACAM5 in immunologische Prozesse während der Tumorprogression ein, da es die Toleranz von dendritischen Zellen gegenüber den Krebszellen steigert und durch Interaktion mit CEACAM1 auf der Zelloberfläche von natürlichen Killerzellen deren zytotoxische Funktion stört. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass lösliches CEA über einen Rezeptor auf den Kupfferschen Sternzellen im Lebergewebe die gesteigerte Expression von anderen Zelladhäsionsmolekülen bedingt und somit im Blut zirkulierende Tumorzellen leichter an Endothelzellen binden können (Hostetter et al., 1990; Blumenthal et al., 2005a; Beauchemin und Arabzadeh, 2013). Dieser Vorgang begünstigt die metastatische Ausbreitung des Tumors. Neuere Studien belegen, dass CEA einen potentiell stimulierenden Effekt auf die Tumorangiogenese hat. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte unter CEA-Einfluss eine verbesserte endotheliale Zelladhäsion, -



migration und -proliferation beobachtet werden. Im Rahmen eines Xenotransplantats im Mausmodell konnte bei CEA-exprimierenden Tumoren eine höhere Blutgefäßdichte als in den Kontrollen detektiert werden (Bramswig et al., 2013). Als weiteren CEACAM-Vertreter konnten auch bei CEACAM1 Angiogenese fördernde Funktionen nachgewiesen werden (u. a. Endothelzellproliferation, Chemotaxis und Kapillarbildung). CEACAM1 verstärkt die proangiogenetischen Effekte des für die Tumorangio-genese wichtigen Schlüsselmoleküls VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), wobei VEGF wiederum die Expression von CEACAM1 positiv beeinflusst (Kuespert et al., 2006). Daneben konnte eine Interaktion von CEACAM1 auf den VEGF-Rezeptor Typ 3 in Endothelzellen nachgewiesen werden (Kilic et al., 2007).

### **1.3.4 Einsatz von Anti-CEA-Antikörpern**

Durch die Überexpression von CEACAM5 in vielen Tumoren ist dieses Oberflächenmolekül ein ideales Target für zielgerichtete Diagnostik- und Therapiemethoden. Besonders vielversprechend ist die Entwicklung verschiedener monoklonaler Antikörper, welche spezifisch gegen die Mitglieder der CEACAM-Familie gerichtet sind. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der monoklonale CEACAM5-Antikörper CC4 bei *In-vitro*-Versuchen die Zellproliferation, -migration und -aggregation inhibiert. Ebenfalls war der Antikörper CC4 in der Lage bei kolorektalen Tumorxenotransplantaten bei Mäusen das Tumorwachstum zu unterdrücken (Zheng et al., 2011). Sowohl bei CC4 als auch bei anderen Anti-CEA-Antikörpern konnte eine verbesserte Immunantwort von natürlichen Killerzellen, vermittelt durch den Prozess der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC), gegenüber kolorektalen Tumorzellen nachgewiesen werden (Conaghan et al., 2008). Einige weitere humanisierte monoklonale Antikörper wurden im Mausmodell untersucht und zeigten antitumorale Aktivität mit einer signifikanten Wachstumshemmung des Tumors (Imakiire et al., 2004). Insbesondere wurde eine Vielzahl von Anti-CEA-Antikörpern im Rahmen der nuklearmedizinischen Bildgebung nach radioaktiver Markierung erfolgreich getestet (Gasparini et al. 1988; Cai et al. 2007; Li et al. 2008a). Ein weiterer interessanter Ansatz ist die Kopplung von zytostatischen Substanzen an die gegen CEA gerichteten Antikörper, um dadurch direkt zum gewünschten Zielgewebe zu gelangen und somit die Schädigung von gesunden Zellen zu minimieren (Hardman et al., 1992). Daneben werden verschiedene Optionen für die Radioimmuntherapie (siehe 1.5) CEA-exprimierender Tumore geprüft (Senba et al., 1998).

Einer der vielversprechendsten Antikörper gegen CEACAM5 ist der humanisierte monoklonale Antikörper Labetuzumab (hMN-14), welcher sich gegen das für CEACAM5

spezifische A3B3-Epitop richtet (Govindan et al., 2009). Frühere Studien im Mausmodell mit Tumorxenotransplantaten sowie eine erste klinische Pilotstudie zur gezielten Bildgebung mittels  $^{131}\text{I}$ -hMN-14 IgG zeigten Erfolg versprechende Ergebnisse (Sharkey et al., 1995). Daneben wurde Labetuzumab auch in Kombination mit dem Zytostatikum Dacarbazin im Mausmodell mit Schilddrüsenkarzinomzellen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Labetuzumab bereits antiproliferativ auf die Zellen wirkte und im Zusammenspiel mit Dacarbazin die antitumoröse Wirkung verstärkt wurde, ohne die Toxizität des Zytostatikums auf das gesunde Gewebe zu erhöhen (Stein und Goldenberg, 2004). Diese Wirkung von Labetuzumab wurde auch für kolorektale Karzinomzelllinien belegt (Blumenthal et al., 2005b). Ein interessantes Ergebnis bei der Untersuchung von Anti-CEA-Antikörpern ist die Internalisierung von CEACAM5 in das Zellinnere durch Membran-Turnover (Tsaltas et al., 1992; Ford et al., 1996). Dieser Mechanismus wurde unter anderem auch mit Labetuzumab erfolgreich untersucht, um neue Möglichkeiten im Rahmen der Weiterentwicklung der Radioimmuntherapie für möglichst effektive intrazelluläre Wirkungen gegen die Tumorzellen zu etablieren (Stein et al., 2005).

Neben dem CEA als neuen Angriffspunkt für gezielte Diagnostik- und Therapiemethoden stehen auch eine Vielzahl weiterer Signalmoleküle, Rezeptoren und Signalkaskaden innerhalb der Tumorzelle im Mittelpunkt der Forschung. Einer der vielversprechendsten Ansätze ist das VEGF/VEGFR-System und soll im folgenden Abschnitt genauer beleuchtet werden.

## **1.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)**

### **1.4.1 Isoformen von VEGF**

Der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) ist einer der wichtigsten Regulatoren der Angiogenese (Bildung neuer Blutgefäße aus bereits vorgebildeten Gefäßen) und spielt im menschlichen Körper bei sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Er wurde erstmals 1983 als sogenannter Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (Vascular Permeability Factor; VPF) beschrieben (Senger et al., 1983). Der Begriff VEGF bezeichnet eine homodimere Glykoproteinfamilie und wird in sieben verschiedene Subtypen untergliedert: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, plazentaler Wachstumsfaktor (PlGF), virales VEGF-E und das im Schlangengift vorkommende VEGF-F (Fan et al., 2005; Cebe Suarez et al., 2006; Takahashi, 2011; Pavlidis und Pavlidis, 2013; Shibuya, 2013). Diese unterschiedlichen VEGF-Formen ähneln sich sehr in ihrer Struktur, sind jedoch

durch eine große funktionelle Bandbreite gekennzeichnet, die durch die Bindung an verschiedene VEGF-Rezeptoren bedingt ist.

Am häufigsten tritt im menschlichen Körper das VEGF-A auf, welches im Allgemeinen oft auch vereinfacht als VEGF bezeichnet wird. Von diesem wiederum existieren verschiedene Isoformen, welche durch den Vorgang des alternativen Spleißens entstehen und als Folge eine unterschiedliche Sequenzlänge aufweisen (Ferrara, 2002; Ferrara et al., 2003). Zum überwiegenden Teil werden von den menschlichen Zellen die Isoformen VEGF-A<sub>165</sub> und VEGF-A<sub>121</sub> exprimiert (Birk et al., 2008). In der aktuellen Literatur wird das VEGF-A<sub>165</sub> als die VEGF-Isoform mit der höchsten biologischen Aktivität beschrieben. Einerseits spielt es eine Schlüsselrolle in der embryonalen Vaskulogenese (Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen), jedoch ist das VEGF-A<sub>165</sub> auch in vielen Tumoren einer der wichtigsten Vermittler in Bezug auf Tumorstromung und Metastasierung (Takahashi, 2011; Pavlidis und Pavlidis, 2013). VEGF-B ähnelt in seinem Aufbau sehr dem VEGF-A und kann sich mit diesem zu einem Heterodimer zusammenschließen (Birk et al., 2008). VEGF-B zeichnet sich unter anderem durch seine proangiogenetische Wirkung im ischämischen Myokard aus (Li et al., 2008b). VEGF-C und -D spielen dagegen eine wichtige Rolle im Rahmen der lymphatischen Angiogenese (Karkkainen et al., 2002).

Ein weiteres Mitglied der VEGF-Familie ist der plazentale Wachstumsfaktor (PlGF). PlGF regt neben VEGF-A und -B ebenfalls die Angiogenese an, jedoch in einem geringeren Umfang als das biologisch hochaktive VEGF-A<sub>165</sub> (Takahashi, 2011). Daneben ist es in der Gefäßaufrechterhaltung, in Entzündungsprozessen, ischämischen Vorgängen und der Neovaskularisation von Tumoren involviert (Takahashi und Shibuya, 2005; Pronto-Laborinho et al., 2014).

Die Expression des VEGF-Gens wird überwiegend durch Umgebungsfaktoren bestimmt, wobei sowohl bei *In-vitro*- als auch *In-vivo*-Studien Hypoxie als entscheidender Faktor angesehen wird (Shweiki et al., 1992). Unter hypoxischen Bedingungen wird unter anderem mit Hilfe des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF-1), ein Transkriptionsfaktor, die Transkription von VEGF-mRNA initiiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass das HIF-1 in vielen Tumorerkrankungen wie beispielsweise Darm-, Lungen-, Nierenzell- und Prostatakarzinom vermehrt exprimiert wird (Birk et al., 2008). Daneben regulieren verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone die Expression von VEGF. Insbesondere stellt die Steigerung der VEGF-Expression durch Onkogene wie Ras, c-Src, HER2/neu und Bcr/Abl für die Krebsforschung einen interessanten Ansatz dar. Diese können im Rahmen verschiedener Tumorerkrankungen in ihrer aktiven

Form über unterschiedliche intrazelluläre Signalwege (MAPK und PI3K/PKB) die VEGF-Expression in großem Ausmaß erhöhen (Rak et al., 1995).

### 1.4.2 VEGF-Rezeptoren

Damit die verschiedenen VEGF-Moleküle ihre zelluläre Wirkung entfalten können, muss das Signal über die Zellmembran in das Innere der Zelle weitergeleitet werden. Diese Aufgabe übernehmen drei verschiedene transmembran-gängige Rezeptor-Tyrosinkinasen, welche sich durch ihre unterschiedliche Affinität zu den einzelnen VEGF-Subtypen differenzieren. Die Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über die VEGF-Rezeptoren (VEGFRs), ihre Liganden, die Expressionsorte und ihre Funktionen.

**Tab. 1: Überblick VEGF-Rezeptortypen (modifiziert nach Birk et al., 2008)**

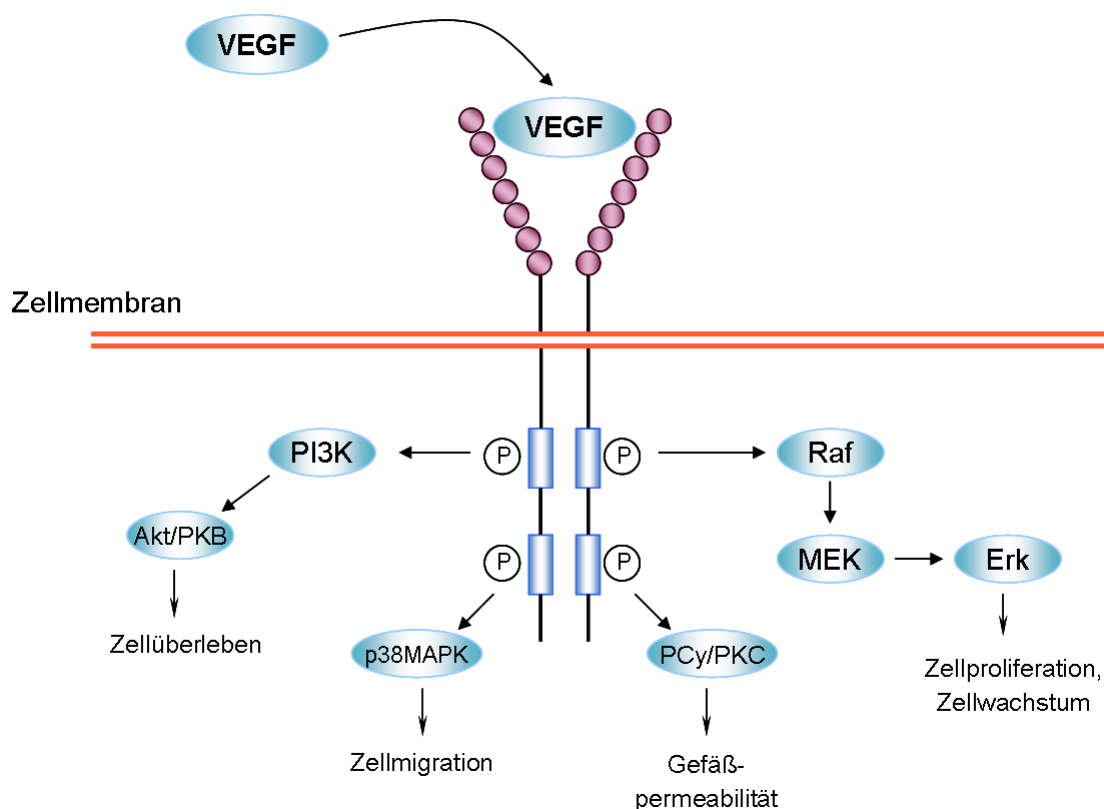
| Rezeptortypen           | Liganden                  | Vorkommen   | Funktion   |
|-------------------------|---------------------------|---|--|
| VEGFR-1 (Flt-1)         | VEGF-A, -B,<br>PlGF       | Vaskuläres Endothel,<br>Monozyten, Makro-<br>phagen, Hämatopoe-<br>tische Stammzellen,<br>Tumorzellen | Modulation des VEGFR-2, An-<br>giogenese, Zellproliferation,<br>Chemotaxis, Entzündungsreak-<br>tionen, Rekrutierung Hämato-<br>poetischer Stammzellen |
| VEGFR-2 (KDR,<br>Flk-1) | VEGF-A, -C, -D,<br>-E, -F | Vaskuläres, lymphatisches<br>Endothel,<br>Hämatopoetische<br>Stammzellen, Tu-<br>morzellen            | v.a. Angiogenese, Zellwachs-<br>tum, -überleben und -migration,<br>vaskuläre Permeabilität   |
| VEGFR-3 (Flt-4)         | VEGF-C und -D             | Lymphatisches En-<br>dothel   | Lymphangiogenese   |

Die beiden VEGF-Rezeptoren VEGFR-1 (fms-like-tyrosine kinase-1, Flt-1) und VEGFR-2 (kinase domain region, KDR; fetal liver kinase-1, Flk-1) unterscheiden sich wesentlich in ihrer biologischen Aktivität. Während Flt-1 das VEGF mit einer viel höhe-

ren Affinität bindet, zeigt dieser Rezeptor jedoch nur ein Zehntel der Tyrosinkinaseaktivität von KDR (Waltenberger et al., 1994). Dies stützt die Annahme, dass KDR der wichtigste Vermittler der angiogenetischen, zellproliferativen und mitogenen Effekte des VEGF ist. Anhand von Mäusemodellen fand man ebenfalls heraus, dass Flt-1 während der frühen Embryogenese als Gegenpart zum KDR die Vaskulogenese hemmt und das KDR-Signal negativ reguliert (Fong et al., 1995). Dagegen spielt Flt-1 eine wichtige Rolle während des Tumorwachstums und der Metastasierung. Durch Stimulation von VEGFR-1 erfolgt die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, welche ins Tumorbett wandern und zur Ausschüttung von VEGF und anderen Zytokinen führen. Folglich werden VEGFR-2 und -3 aktiviert, welche die Angio- und Lymphoangiogenese des Tumors induzieren (Takahashi, 2011).

Neben den VEGF-Rezeptoren existieren die Co-Rezeptoren Neuropilin-1 und -2 (Nrp-1 und -2). Vor allem Neuropilin-1 erhöht die Bindungsaffinität für VEGF-A<sub>165</sub> an den VEGF-Rezeptor Typ 2, mit dem Effekt einer stärkeren Signaltransduktion (Soker et al., 1998; Shibuya, 2013). Zusätzlich zu der membranständigen Form von VEGFR-1 (Flt-1) und -2 (KDR) kommen im menschlichen Körper die kürzeren löslichen Varianten sFlt-1 und sKDR der beiden Rezeptoren vor. Sowohl sFlt-1 als auch sKDR werden als Antagonisten von VEGF angesehen und wirken antiangiogenetisch, indem sie das VEGF vor den Rezeptoren auf der Zellmembran „abfangen“ (Kajdaniuk et al., 2011a).

In ihrem strukturellen Aufbau ähneln die VEGF-Rezeptoren der Rezeptorfamilie des Platelet-derived growth factors (PDGF), welche ähnliche Funktionen wie Angiogenese, Zellproliferation und -migration vermitteln. Die VEGF-Rezeptortyrosinkinasen gliedern sich in eine extrazelluläre, eine Liganden-bindende Immunglobulin-Domäne, eine Transmembranhelix und eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne mit zwei Tyrosinkinase-Einheiten, welche durch das Kinase-Insert getrennt sind. Der extrazelluläre Anteil des Rezeptors besitzt sieben homologe Immunglobulin-Domänen, wobei die zweite und dritte Domäne für die Ligandenbindung und die vierte bis siebte Domäne für die Dimerisierung des Rezeptors zuständig sind (Ferrara und Davis-Smyth, 1997; Shibuya, 2001). Die Signaltransduktion erfolgt, wenn das VEGF an die extrazelluläre Region bindet und somit eine Rezeptordimerisierung auslöst. Anschließend werden die Tyrosinkinasen aktiviert, autophosphorylieren sich gegenseitig und aktivieren Adaptermoleküle im Zytosol. Die Abbildung 2 verdeutlicht diesen Ablauf und zeigt, dass die nun aktivierten Adapterproteine, wie Raf, PI3K und PLC $\gamma$ , verschiedene Signalwege in Gang setzen und somit die vielfältigen Funktionen des VEGFs (gesteigerte Gefäßpermeabilität, Zellproliferation und -migration) einleiten (Birk et al., 2008)



**Abb. 2: Signaltransduktion am VEGF-Rezeptor mit nachgeschalteten Signalkaskaden (modifiziert nach Rini und Small, 2005)**

### 1.4.3 Physiologische Bedeutung

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits angedeutet wurde, spielt VEGF eine wichtige Schlüsselrolle im komplexen Angiogeneseprozess, der für die Aufrechterhaltung zahlreicher Funktionen im menschlichen Körper verantwortlich ist. Beispiele hierfür sind die Differenzierung und Aufrechterhaltung von Gewebeverbänden, Knochenwachstum, Plazentaaufbau während der Schwangerschaft, Heilungsprozesse bei Wunden und Knochenfrakturen und der monatliche reproduktive Zyklus der Frau (Kajdaniuk et al., 2011a). Schon während der Embryogenese ist VEGF essentiell für die strukturelle und organisierte Entwicklung eines funktionierenden Blutgefäßsystems (Ferrara et al., 2003). Im adulten Organismus ist VEGF im Rahmen des Angiogeneseprozesses u. a. für den Abbau der Basalmembran und der extrazellulären Matrix, der endothelialen Zellmigration und -proliferation, der Vasodilatation sowie für die gesteigerte vaskuläre Permeabilität und für die tubuläre Formation der Endothelzellen verantwortlich (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). VEGF reguliert neben den Endothelzellen als dem vornehmlichen Ziel ebenfalls die Stimulation, Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Stammzellen. Zusätzlich beeinflusst VEGF den Prozess der Lymphangiogenese.

nese und im Rahmen von entzündlichen Prozessen die Chemotaxis von Monozyten und Makrophagen (Birk et al., 2008).

#### **1.4.4 Pathophysiologische Wertigkeit**

VEGF als wichtiger Initiator und Beteiligter der physiologischen Angiogenese ist auch in pathologische Prozesse der Blutgefäßneubildung im Rahmen von ischämischen, entzündlichen und bösartigen Erkrankungen involviert. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die vaskuläre Homöostase strengen Kontrollmechanismen. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den proangiogenetischen (u. a. VEGF, Wachstumsfaktoren, NO, Ang-1, TFG $\beta$ 1) und antiangiogenetischen Faktoren (u. a. sFlt-1, Ang-2, Vasostatin) ein (Kajdaniuk et al., 2011a). Ist diese Balance gestört, kann es einerseits zu einer insuffizienten Blutgefäßbildung, andererseits zu einer extrem erhöhten Angiogenese (Neovaskularisation) bei verschiedenen Krebserkrankungen kommen.

Es ist allgemein anerkannt, dass Tumore bis zu einer Größe von 1-2 mm unabhängig von einer zusätzlichen Blutversorgung wachsen können, da Sauerstoff und andere essentielle Substanzen per Diffusion in die Tumorzellen gelangen (Naumov et al., 2006). Übersteigt das Wachstum jedoch diese Ausdehnung, initiiert der Tumor die Angiogenese durch einen sogenannten „Angiogenic Switch“ (Hanahan und Folkman, 1996). Dieser Prozess ist charakterisiert durch die Abnahme der antiangiogenetischen und der Zunahme der proangiogenetischen Faktoren, welche zu einer übermäßigen, irregulären und teils chaotischen Gefäßneubildung führen. Triggerfaktoren sind unter anderem die gewebsbedingte Hypoxie der wachsenden Tumormasse und die einwandernden Entzündungszellen, welche VEGF und andere Wachstumsfaktoren sezernieren. Ebenfalls spielen Mutationen des Protoonkogens Ras und des Tumorsuppressorgens p53 eine wichtige Rolle. Sie bedingen eine erhöhte VEGF-Expression. Der Anschluss an das Gefäßsystem und die gesteigerte vaskuläre Permeabilität markieren den Ausgangspunkt für die Metastasierung des Tumors (Kajdaniuk et al., 2011b). Studien über kolorektale Karzinome belegen, dass bei erhöhter VEGF und KDR-Expression im Tumorgewebe auch die Proliferationsrate der Krebszellen und die Metastasenwahrscheinlichkeit steigt (Takahashi et al., 1995). Daneben existieren verschiedene Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen dem Grad der VEGF-Expression und der Überlebensdauer sowie der Rezidiv-Wahrscheinlichkeit für Karzinome des Kolons, Rektums und der Niere vermuten (Kajdaniuk et al., 2011b). Eine erhöhte VEGF mRNA-Expression ist nicht nur in soliden bösartigen Neubildungen von beispielsweise Lunge, Brust, Gastrointestinaltrakt, Gehirn, Niere und Eierstock, sondern auch bei hämatoon-

kologischen Erkrankungen, wie Multiples Myelom, Chronisch myeloische Leukämie und T-Zell-Lymphom zu finden (Gerber und Ferrara, 2003; Birk et al., 2008).

Neben den onkologischen Erkrankungen ist VEGF auch bei einer Vielzahl anderer Krankheitsbilder wie Atherosklerose, Hypertension, Hepatitis, Glomerulonephritis, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Morbus Basedow, Endometriose, Präeklampsie, altersbedingte Makuladegeneration und dem Hirnödem involviert (Kajdaniuk et al., 2011a). Ebenfalls ist VEGF an den pathologischen Vorgängen und Folgekrankheiten (u. a. diabetische Retinopathie) von Diabetes mellitus beteiligt (Kajdaniuk et al., 2011b).

### **1.4.5 Anti-VEGF- bzw. Anti-VEGFR-Therapie**

Da die VEGF-Expression wie oben beschrieben bei pathologischen Prozessen von vielfältigen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, ist VEGF Ausgangspunkt für unterschiedliche Therapiebestrebungen geworden. Dabei wird zwischen proangiogenetischen, VEGF-aktivierenden und antiangiogenetischen, VEGF-hemmenden Therapieansätzen unterschieden. Im Nachfolgenden soll der Fokus auf die VEGF-inhibitorische Anwendung gerichtet sein.

In den letzten Jahrzehnten stieg das Interesse der Krebsforschung am VEGF/VEGFR-System als möglichem Angriffspunkt für neue antitumorale Therapiemöglichkeiten, da die VEGF-Expression eng mit der Tumorpheriferation und Metastasierung verbunden ist. Dabei stehen vor allem VEGFR-2 und VEGF-A als Hauptvermittler der Tumorangiogenese im Mittelpunkt der Forschung (Hamberg et al., 2010; Takahashi, 2011). Man kann zwischen vier möglichen Anti-VEGF-Strategien differenzieren: die Aptamere (Antisense-Oligonukleotide), VEGF-Antikörper, VEGF-Trap und die VEGF-Rezeptorenblocker (Birk et al., 2008). Zur Gruppe der Aptamere gehört Pegaptanib, welches hochspezifisch an VEGF-A<sub>165</sub> bindet und seit Mai 2006 zur intravitrealen Injektion bei der feuchten Form der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) zugelassen ist (Ng und Adamis, 2006). Es gibt intensive Bemühungen und Untersuchungen, um Pegaptanib auch bei onkologischen Erkrankungen als möglichen Therapieansatz zu etablieren.

Der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter der VEGF-Antikörper ist Bevacizumab (Avastin®). Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler IgG-Antikörper und hemmt sowohl *in vitro* die VEGF-induzierte Epithelzellproliferation als auch *in vivo* das Tumorwachstum. Der Antikörper neutralisiert die Wirkung von VEGF, indem er die Bindung von VEGF an die VEGF-Rezeptoren Typ 1 und 2 verhindert (Gerber et al.,



2008). Aufgrund der verbesserten Ansprechrate und verlängerten Überlebenszeit gehört Bevacizumab seit 2005 in Kombination mit Chemotherapie zur Erst- und Zweitlinientherapie von metastasierten kolorektalen Karzinomen. Ebenfalls ist Bevacizumab für Lungen-, Brust-, Eierstock-, Nierenzellkrebs und Glioblastomen in fortgeschrittenen Stadien zugelassen (Pavlidis und Pavlidis, 2013).

Eine weitere vielversprechende Therapiemöglichkeit im Rahmen der Angiogenesehemmung ist der „Köderrezeptor“ Aflibercept (Eylea®), auch VEGF-Trap genannt. Es handelt sich dabei um ein lösliches VEGF-Rezeptorfusionsprotein mit der höchsten Affinität für VEGF im Vergleich zu allen anderen VEGF-Rezeptoren oder VEGF-Antikörper. Aflibercept verhindert die Liganden-induzierte Aktivierung des VEGF-Rezeptors, indem er das VEGF-A bzw. PlGF vor dem Rezeptor „wegfängt“ (Dowlati, 2010; Birk et al., 2008). Im Mausmodell mit Xenotransplantation verschiedener Tumorzellen wurde VEGF-Trap bereits erfolgreich getestet (Huang et al., 2003).

Ebenfalls etabliert in der antiangiogenetischen Therapie von Tumoren sind die VEGF-Rezeptorenblocker. Diese sogenannten Tyrosinkinase-Inhibitoren werden im anschließenden Kapitel genauer beleuchtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die unterschiedlichen Anti-VEGF-Strategien eine vielversprechende Ergänzung zu den herkömmlichen Behandlungsverfahren sind. Weiterhin belegen zahlreiche Studien, dass diese speziellen Angiogenesehemmer kombiniert mit einer Zytostatikatherapie und/oder Radiatio, einen größeren Therapieeffekt bewirken können (Ferrara et al., 2003; Gerber et al., 2008).

#### **1.4.6 Pazopanib als Vertreter der Tyrosinkinase-Inhibitoren**

Die Gruppe der sogenannten Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) gehört zu den in der Krebstherapie zunehmend eingesetzten selektiven „Targeted Therapies“, um zielgerichtet Rezeptoren, Signalmoleküle und andere wichtige Strukturen in den Tumorzellen zu beeinflussen. Die TKIs umfassen verschiedene Wirkstoffe, welche kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle der Tyrosinkinase-Domänen von verschiedenen Zellrezeptoren und Molekülen binden. Somit wird die Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär verhindert, da der Phosphatrest des ATP nicht auf andere Signalmoleküle übertragen werden kann (Kumar et al., 2007; Hamberg et al., 2010). Oft werden diese Substanzen aufgrund ihrer niedermolekularen Größe auch als „small molecule drugs“ bezeichnet, wodurch sich der Vorteil einer schnellen Diffusion an den Hauptwirkungsort in der Zelle bedingt.

Der bekannteste Vertreter der ersten Generation von TKI ist Imatinib (Glivec®), welches seit einigen Jahren als Standardmedikament bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) eingesetzt wird (Agrawal et al., 2010). Weitere interessante Mitglieder der TKI-Familie sind Sunitinib (Sutent® (GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, 2013)), zugelassen für Nierenzellkarzinom und gastrointestinale Stromazelltumore, sowie Sorafenib (Nexavar®), welches bei Nierenzell- und Leber- sowie beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom Anwendung findet. Eine Differenzierung der Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitoren ist anhand der unterschiedlich gehemmten Tyrosinkinasen möglich. Imatinib wirkt beispielsweise auf c-ABL und den PDGF-Rezeptor inhibierend, während Sorafenib die VEGF-Rezeptoren und Raf-Kinasen hemmt (Kumar et al., 2007).

Ein wichtiger Vertreter aus der zweiten Generation der Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitoren ist Pazopanib (Votrient®). Es ist ein oral bioverfügbarer niedermolekularer Proteinkinasehemmer, der hochselektiv an die VEGF-Rezeptoren 1-3, PDGF-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (Wachstumsfaktorrezeptoren) und dem Stammzellfaktor-Rezeptor (c-Kit) bindet. Die genannten Rezeptoren spielen in der Pathogenese verschiedenster Tumorerkrankungen eine interessante und wichtige Rolle (Ostman, 2004; Lennartsson und Ronnstrand, 2006). Ebenfalls ist eine mäßig hemmende Wirkung von Pazopanib gegen die Tyrosinkinasen der FGF-Rezeptoren 1 und 3 (Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor) und des c-fms (Rezeptor der koloniestimulierenden Faktoren) beschrieben (Kumar et al., 2007). Seit Oktober 2009 in den USA, sowie ab Juni 2010 in Europa, wurde Pazopanib als mögliche Erstlinien-Therapie für das metastasierte Nierenzellkarzinom zugelassen. Grundlage hierfür war eine Phase III-Studie, die belegte, dass Pazopanib das progressionsfreie Überleben im Median von 4,2 auf 9,2 Monate im Vergleich zu einem Placebo-Präparat erhöhte (Pick und Nystrom, 2012). Da Pazopanib als TKI zu den „Targeted-Therapies“ – den zielgerichteten Therapiemöglichkeiten – gehört, ist es sehr gut verträglich und bei den Patienten kam es im Vergleich zu den herkömmlichen Zytostatika zu einer verringerten Rate an unerwünschten Ereignissen. Die häufigsten Nebenwirkungen unter Pazopanib-Therapie sind unter anderem Hypertonie, Diarrhö, Haardepigmentation und Übelkeit (Hurwitz et al., 2009; Pick und Nystrom, 2012). Neben der Zulassung für das fortgeschrittene Nierenzellkarzinom wurde Pazopanib 2013 auch für die Behandlung von bestimmten Subtypen des Weichteilsarkoms freigegeben (van der Graaf, Winette TA et al., 2012; GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, 2013).

Zur Erweiterung der antitumoralen Anwendungsmöglichkeiten von Pazopanib wurden in den letzten Jahren zahlreiche Versuchsreihen durchgeführt. Bei der *In-vitro*-Anwendung von Pazopanib konnte nachgewiesen werden, dass der Tyrosinkinase-

Inhibitor die VEGF-induzierte Proliferation von humanen kultivierten Endothelzellen (HUVEC) selektiv verhindert (Kumar et al., 2007). Bei Versuchen mit Krebsstammzellen von Weichteilsarkomen und RCC-Zelllinien (Nierenkrebszellen) war kein proliferationshemmender Effekt von Pazopanib detektierbar (Canter et al., 2011; Canter et al., 2014). In einer anderen Zellversuchsreihe schien Pazopanib bei RCC-Zelllinien jedoch eine proapoptotische Wirkung zu vermitteln (Shablak et al., 2014). Im Rahmen von weiteren *In-vitro*-Studien mit Zellen des multiplen Myeloms bzw. mit einer Zelllinie der chronisch lymphatischen Leukämie konnte nachgewiesen werden, dass Pazopanib signifikant das Zellwachstum und die Zellproliferation hemmt bzw. die Apoptose induziert (Podar et al., 2006; Paesler et al., 2010). Neben den Zellversuchen wurde die Wirkung von Pazopanib auch in verschiedenen humanen Tumor-Xenotransplantaten in immundefizienten Mäusen untersucht. Dabei zeigte Pazopanib eine dosisabhängige Wachstumshemmung bei allen untersuchten Tumoren. Vor allem für Caki-2 (Nierenzellkarzinom), HT29 (kolorektales Karzinom) und NCI-H322 (kleinzelliges Bronchialkarzinom) konnte eine Tumorstillstandshemmung von bis zu 77 % bei einer Dosis von 10 mg/kg erreicht werden. Vielversprechende Ergebnisse zeigten auch die Tumor-Xenotransplantate von Melanom, Mamma- und Prostatakarzinom (Kumar et al., 2007). Verschiedene Studien zur klinischen Wirksamkeit von Pazopanib dokumentierten positive antitumorale Eigenschaften bei einer Vielzahl von Tumoren. Untersucht wurden dabei unter anderem das hepatozelluläre Karzinom, das Mammakarzinom, das Schilddrüsen- und das Endometriumkarzinom (Schutz et al., 2011). Somit scheint Pazopanib als neuer Vertreter der Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz für innovative krebsspezifische Therapien zu sein. Dies wird auch in ersten klinischen Untersuchungen bei refraktär metastasierten kolorektalen Karzinom in Kombination mit Chemotherapeutika und einem Anti-EGFR-Antikörper Cetuximab bestätigt (Bennouna et al., 2015).

Die Entwicklungen von Antikörpern und anderen niedrigmolekularen Substanzen in der gezielten Krebstherapie eröffnen auch in der Nuklearmedizin neue Optionen. Durch diese zielgerichteten Strategien können intra- und interzelluläre Signalwege beeinflusst werden, um die Tumorzellen beispielsweise für die im folgenden Abschnitt dargestellte Radioimmuntherapie empfänglicher zu machen.

## 1.5 Einführung in die Radioimmuntherapie

Bei der Radioimmuntherapie (RIT) werden monoklonale Antikörper oder Antikörperfragmente, die gegen ein auf den Tumorzellen exprimiertes Antigen oder einen Rezeptor gerichtet sind, mit einem für die Therapie geeigneten Radionuklid gekoppelt. Als

Radioisotope kommen vor allem die  $\beta^-$ -Strahler ( $^{90}\text{Y}$ ,  $^{131}\text{I}$  und  $^{177}\text{Lu}$ ) mit einer mittleren Gewebereichweite von 0,5 bis maximal 12 mm und einem geringen linearen Energietransfer (LET) zum Einsatz. Dagegen zeichnen sich die  $\alpha$ -Strahler durch eine niedrigere Gewebereichweite (50-100  $\mu\text{m}$ ) bei einem höheren LET aus, welche durch die hohe Energieabgabe zu einem größeren zytotoxischen Schaden führen. Beispiele für medizinisch eingesetzte  $\alpha$ -Strahler sind  $^{211}\text{At}$ ,  $^{213}\text{Bi}$  und  $^{225}\text{Ac}$  (Pouget et al., 2011; Kawashima, 2014). Die Wirkung der ionisierenden Strahlung zielt vor allem auf die DNA im Zellkern, wodurch es zu Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüchen sowie Vernetzungen innerhalb der DNA kommt. Weitere Folgen sind die Aktivierung verschiedener Signalwege und Rezeptoren, eine veränderte Protein-Expression und die Bildung von Radikalen. Abhängig vom Ausmaß der Schädigung sowie der Kapazität der Reparaturmechanismen kann die ionisierende Strahlung zu Mutationen, Störungen der Zellfunktion oder bis zum Zelltod führen. In der Regel sind maligne Tumorzellen durch eine verkürzte Zellzykluszeit und einen hohen Anteil an Zellteilungen besonders strahlensensibel.

Der Vorteil der Radioimmuntherapie liegt in der Verbindung der Wirkungsmechanismen von Immun- und Strahlentherapie. Bei dem Einsatz von Betastrahlern mit einer relativ großen Gewebereichweite (0,05-12,00 mm) können durch den sogenannten Kreuzfeuer-Effekt (Crossfire-Effekt) auch benachbarte Tumorzellen bestrahlt werden, welche den Antikörper aufgrund einer niedrigen Antigen-Expression oder durch geringe Vaskularisation bei großen Tumormassen nicht gebunden haben (Pouget et al., 2011).

Die Radioimmuntherapeutika werden dem Patienten zumeist intravenös appliziert, reichern sich gezielt im Tumorgewebe an und entfalten dort ihre Wirkung. Durch diese zielgerichtete Therapie kann das gesunde Gewebe im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie geschont werden. Daneben können somit auch die starken Nebenwirkungen gesenkt werden. Die Radioimmuntherapie wird primär für im Körper disseminierte Tumore angewendet, wo der Einsatz der klassischen lokalen Strahlentherapie nicht sinnvoll erscheint. Vor allem bei hämatoonkologischen Erkrankungen zeigte die Radioimmuntherapie vielversprechende Ergebnisse. So wurden im Jahr 2002 bzw. 2003 die Radiopharmaka Ibritumomab-Tiuxetan (Zevalin,  $^{90}\text{Y}$ -Anti-CD20-Antikörper) und Tositumomab (Bexxar,  $^{131}\text{I}$ -Anti-CD20-Antikörper) in den USA für die Behandlung bestimmter Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms zugelassen (Goldsmith, 2010).

Im Vergleich dazu ist der Einsatz der Radioimmuntherapie in der Therapie solider Tumore weniger erfolgreich. Durch die erhebliche Molekülgröße (IgG: 160 kD) der eingesetzten Antikörper ist die freie Diffusion im Gewebe nur bedingt möglich, wodurch vor

allem zentrale Tumorbereiche kaum erreichbar sind. Daneben erhöht sich durch das unregelmäßige Zellwachstum der Druck im Tumorgewebe. Der gesteigerte Druck im Tumor resultiert in einen verringerten Plasmafluss und einer dementsprechend ungleichmäßigen Biodistribution der Radioimmunkonjugate (Bockisch, 2008). Weitere ungünstige pharmakokinetische Aspekte der großen Antikörper sind die lange Verweildauer im Körper, verbunden mit einer verzögerten Exkretion, sowie ein daraus resultierendes erhöhtes Hintergrund-Verhältnis. Diese „Background-Ratio“ entsteht durch die Aufnahme einer geringen Menge der eingesetzten radioaktiven Strahlung im gesunden Gewebe und beeinflusst maßgeblich die Bildqualität diagnostischer Verfahren (Framapas et al., 2013; Kawashima, 2014). Nicht zu vernachlässigen ist ebenfalls die dosislimitierende Myelotoxizität durch die lange Verweildauer der Radioimmuntherapeutika im Körper. Zur Verbesserung der pharmakokinetischen Eigenschaften wurden stattdessen Antikörperfragmente („single chain variable fragments“; scFv) oder die kleineren Fab-Antikörper in Studien eingesetzt. Diese wiesen im Vergleich zu den Antikörpern eine bessere Tumorgängigkeit und aufgrund ihrer niedrigen Molekülgröße eine schnellere Blutclearance auf. Im Gegenzug zeigte sich jedoch eine geringere Affinität zu den Zielantigenen auf den Tumorzellen. Die kurze Verweildauer im Körper und die gesunkene Bindungsaffinität resultierte jedoch in einem geringen Tumoruptake (Pouget et al., 2011).

Eine zusätzliche Möglichkeit bietet die Kombination der Radioimmuntherapie mit anti-angiogenetischen Therapeutika (siehe 1.4.5), welche eine gesteigerte Zufuhr der Radioimmuntherapeutika ins Tumorgewebe bewirken (Rajkumar et al., 2012; Jain et al., 2013). Weiterhin wurde zur Verbesserung der Effizienz der Radioimmuntherapie die Entwicklung sogenannter „Pretarget-Therapiestrategien“ vorangetrieben, welche im nachfolgenden Kapitel näher betrachtet werden.

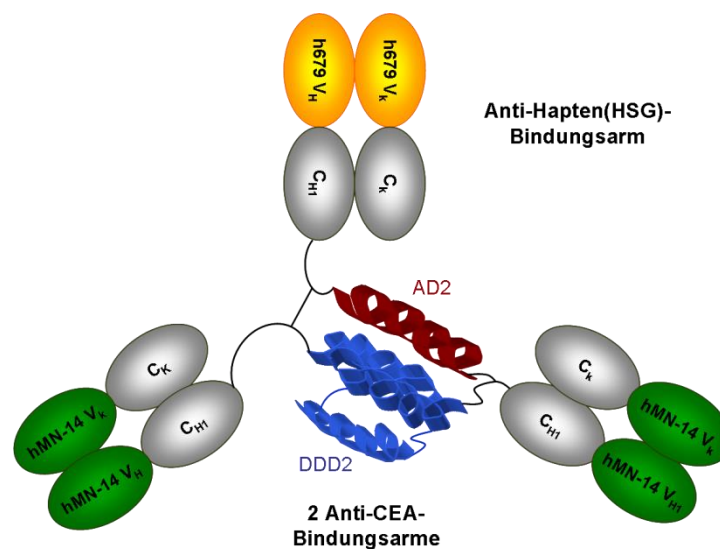
Im Gegensatz zu der genannten geringen Ansprechrate bei soliden Tumoren scheinen vor allem Mikrometastasen und Tumore mit geringem Durchmesser auf Radioimmuntherapeutika zu reagieren. Dies konnte unter anderem in einer Phase-I-Studie mit  $^{131}\text{I}$ -Anti-CEA-Antikörper bei Patienten mit kolorektalem Karzinom und Lebermetastasen belegt werden (Behr et al., 1999). Eine Phase-II-Studie bei CRC-Patienten mit resezierten Lebermetastasen konnte unter einer adjuvanten Radioimmuntherapie mit  $^{131}\text{I}$ -Labetuzumab das mediane Überleben auf 58 Monate (Vergleich Kontrollgruppe: 51 Monate) gesteigert werden (Liersch et al., 2007). Ebenfalls scheint eine lokale intraperitoneale Verabreichung von Radioimmuntherapeutika bei intraperitoneal metastasierenden Ovarialkarzinom als adjuvante Therapiemöglichkeit vielversprechend (Meredith et al., 2007).

## 1.6 Entwicklung eines Pretargeting-Systems für die Radioimmuntherapie

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits beschrieben, ist die Radioimmuntherapie bei soliden Tumoren sehr komplex und benötigt innovative Ansatzpunkte zur Verbesserung einer therapeutischen Antwort. Eine vielversprechende Lösung bietet die Entwicklung der „pretargeted“ Radioimmuntherapie (PRIT). Im Vergleich zur direkten Methode, der konventionellen Radioimmuntherapie, erfolgt hier die Gabe des Antikörpers und des Radiopharmakons unabhängig voneinander. In einem ersten Schritt wird der Antikörper injiziert, bindet langsam an die Tumorzellen und ungebundene Antikörper werden aus dem Körper ausgeschieden. Ist die Bindung des Antikörpers an die Tumorzellen maximal, wird anschließend in einem zweiten Schritt ein bis drei Tage später das an ein Peptid gekoppelte Radionuklid appliziert. Das radioaktiv markierte Peptid kann anschließend an den pre-lokalisierten Antikörper im Tumorgewebe binden und wird schnell renal eliminiert. Somit vereint dieses Verfahren die jeweiligen Vorteile der eingesetzten Komponenten: Der Antikörper hat ausreichend Zeit aufgrund der verlängerten Verweildauer im Blut mit hoher Affinität an des Zielantigen auf der Tumorzelloberfläche zu binden. Die beschleunigte Blutclearance und die schnelle Eliminierung der kleineren Peptide aus dem Körper werden dagegen zur Carriervermittlung der Radionuklide verwendet. Somit können dem Patienten größere Mengen Aktivität appliziert werden. Durch die schnelle Eliminierung der radioaktiven Peptide kann ebenfalls die Strahlenbelastung für das strahlensensible Knochenmark vermindert werden (Frampas et al., 2013; Kawashima, 2014). Weiterhin sinkt das Hintergrundverhältnis, da das gesunde Gewebe kaum Radioaktivität aufnehmen kann und der Uptake im Tumor durch die Prälokalisierung hoher Mengen an Antikörper steigt. Das mehrstufige Pretargeting-System wurde bereits für unterschiedlichen Tumorerkrankungen, wie Prostata-, Kolon-, medulläres Schilddrüsenkarzinom und Gliom erfolgreich getestet (Pouget et al., 2011).

Ein aussichtsreiches Pretargeting-System für die Radioimmuntherapie sowie auch für neue nuklearmedizinische Bildgebungsmethoden, wie beispielsweise die Immuno-Positronen-Emissions-Tomographie (Immuno-PET), wurde für CEA-exprimierende Karzinome entwickelt. Dieses besteht zum einen aus dem neuen humanisierten bispezifischen und trivalenten monoklonalen IgG-Antikörper TF2 sowie dem radioaktiv markierten Hapten-Peptid IMP-288. An ein neu entwickeltes Di-HSG-Peptid (IMP-288) können wiederum über eine funktionelle DOTA-Gruppe verschiedene Radionuklide ( $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$  und  $^{177}\text{Lu}$ ) für unterschiedliche diagnostische und therapeutische Interventionen gekoppelt werden (Sharkey et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde der rekombinante Antikörper TF2 als Teil dieses Pre-targeting-Systems untersucht. Wie in der Abb. 3 ersichtlich ist, besteht der Antikörper mit einer Molekülgröße von 157 kD zum einen aus dem Fab-Fragment des humanisierten monoklonalen Antikörpers hMN-14 (Labetuzumab), welcher – wie in Punkt 1.3.4 beschrieben – gegen CEACAM5 gerichtet ist. Die anderen zwei Fragmente sind jeweils Fab-Fragmente eines Anti-HSG (Histamin-Succinyl-Glycin)-Antikörpers. Mit Hilfe der sogenannten „Dock-and-Lock“-Methode wurde der fusionierte Antikörper entwickelt. Diese Technologie wird im zunehmenden Maße für die Generierung verschiedener Peptide aus fusionierten Fab-Fragmenten eingesetzt, welche bei zielgerichteten Diagnostik- und Therapieverfahren von Tumoren zum Einsatz kommen. Die Stabilität von TF2 im Serum über einen Zeitraum von sieben Tagen konnte in präklinischen Versuchen belegt werden (Rossi et al., 2006; Sharkey et al., 2010).



**Abb. 3: Schematisierter Aufbau des trivalenten Antikörpers TF2. AD2: Ankerungsdomäne, DDD2: Dimerisierungs- und Kopplungsdomäne (modifiziert nach Goldenberg, Rossi et al., 2008).**

Das Pre-targeting-System wurde bereits in verschiedenen Tumormodellen und klinischen Studien erfolgreich getestet und zeigt eine hohe Effizienz sowie eine geringe Nebenwirkungsrate (Goldenberg et al., 2008; Schoffelen et al., 2010b; Frampas et al., 2011; Meller et al., 2011; Schoffelen et al., 2013). Ein weiterer möglicher Einsatz von Pre-targeting-Systemen ist neben der Radioimmuntherapie die Immuno-PET als hoch sensitive Bildgebungsmethode für die Auswahl geeigneter Patienten und der Messung des Therapieerfolges (Frampas et al., 2013).

Frühere Untersuchungen konnten nachweisen, dass durch Radiatio und Chemotherapie die Translokation/Expression von CEA beeinflusst werden kann (Ohtsukasa et al., 2003; Aquino et al., 2004; Meller et al., 2011). Dies könnte u. a. zu einer Verbesserung

der Detektion von Tumorgewebe und zu einer erhöhten Therapieansprechrates der hier dargestellten zielgerichteten Diagnostik- und Therapiemaßnahmen genutzt werden. Für die Fragestellung, welchen Einfluss neuere Tyrosinkinase-Inhibitoren auf das CEA bei kolorektalen Tumorzelllinien zeigen, schien der hier vorgestellte „Breitband“-Tyrosinkinase-Inhibitor Pazopanib für erste Untersuchungen interessant.

## 1.7 Zielsetzung

Das Carcinoembryonale Antigen (CEA/CEACAM5) ist als Tumormarker in der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms seit vielen Jahrzehnten etabliert. Eine wachsende Bedeutung wird dem membranständigen Antigen in der gezielten Krebstherapie („targeted therapy“) eingeräumt. Verschiedene Studien konnten für ein weiteres Mitglied der CEACAM-Familie (CEACAM1) zeigen, dass eine Interaktion mit dem für das Wachstum der Tumorzellen essentiellen VEGF/VEGFR-Signalweg vorliegt. In den letzten Jahren wurden verschiedene Substanzen entwickelt, die für eine zielgerichtete Hemmung der VEGF-Rezeptoren eingesetzt werden können. Da CEACAM5 wesentlich für interzelluläre Bindungen ist und auch heterophil mit CEACAM1 interagiert, war ein Zusammenhang naheliegend. Diese Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Hierfür sollte der gegen CEA-gerichtete Antikörper TF2 mit  $^{131}\text{I}$  radioiodiert, sowie die spezifische Bindung des markierten Antikörpers an CEA für drei verschiedene CRC-Zelllinien mit unterschiedlicher CEA-Expression (SW480, HT29 und T84) nachgewiesen werden.

Weiterhin sollte Pazopanib als Vertreter der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren für die Hemmung des VEGF-Rezeptors eingesetzt und seine Wirkung auf die CEA-Expression untersucht werden. Zusätzlich sollten Rückschlüsse auf die antiproliferative Potenz von Pazopanib bei kolorektalen Tumoren und seinem potentiellen Einsatz im Rahmen der multimodalen Tumorthherapie gezogen werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

| Zelllinien             | Firma                     |
|------------------------|---------------------------|
| HT29 (ATCC® HTB-38™)   | LGC Standards GmbH, Wesel |
| SW480 (ATCC® CCL-228™) | LGC Standards GmbH, Wesel |
| T84 (ATCC® CCL-248™)   | LGC Standards GmbH, Wesel |

#### 2.1.2 Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitor

| Antikörper/TKI     | Firma  |
|--------------------|--|
| TF2 (10 mg/ml PBS) | IBC Pharmaceuticals, Inc., Morris Plains, NJ, USA  |
| Pazopanib          | Eton Bioscience, Inc., San Diego, Kalifornien, USA |

#### 2.1.3 Verwendete Reagenzien

| Reagenzien                     | Firma                                |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Accutase                       | PAA Laboratories GmbH, Pasching      |
| CryoMaxx S                     | PAA Laboratories GmbH, Pasching      |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim |
| Fetal Bovine Serum Gold (10 %) | PAA Laboratories GmbH, Pasching      |
| <sup>131</sup> Iod             | GE Healthcare Buchler, Braunschweig  |
| L-Glutamin (1 %; 200 mM)       | PAA Laboratories GmbH, Pasching      |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| NaCl-Lösung (0,9 %)                 | B. Braun AG, Melsungen                  |
| Normocin™ (0,2 %; 1 g/50 mg (ml))   | InvivoGen, Toulouse                     |
| Penicillin/Streptomycin (1 %)       | PAA Laboratories GmbH, Pasching         |
| Trypanblau (0,4 %)                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim |
| Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 % in PBS) | PAA Laboratories GmbH, Pasching         |

### **Kulturmedien/Pufferlösungen**

### **Firma**

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| DMEM/Ham´s F12 without L-Glutamine                                  | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| DMEM High Glucose (4,5 g/l; mit<br>L-Glutamin und Sodium Pyruvat)   | PAA Laboratories GmbH, Pasching |
| Dulbecco´s PBS-Puffer (ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> ) | PAA Laboratories GmbH, Pasching |

## **2.1.4 Verwendete Materialien und Geräte**

### **Materialien**

### **Firma**

|  |   |
|--|---|
| Bio-Spin® 6 and 30 Columns                         | Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA       |
| Chromatographie-Streifen (ITLC-SG)                 | Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen    |
| Mikrotube (1,5 ml)                                 | neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg |
| Pre-Coated Iodination Tubes                        | Pierce® Biotechnology, Rockford, Illinois, USA      |
| Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>              | Orange Scientific GmbH, Braine-l'Alleud, Belgien    |
| Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> (SW480/HT29) | Orange Scientific GmbH, Braine-l'Alleud, Belgien    |

|   |  |
|---|--|
| Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> (T84) | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich |
| Zentrifugenröhrchen (5/15 ml)               | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen            |

| <b>Geräte</b>                               | <b>Firma</b>   |
|---|--|
| Aktivitätsmessgerät (M2316)                 | MED Messelektronik Dresden GmbH                            |
| Bohrloch-Detektor (Typ 74038)               | MED Messelektronik Dresden GmbH                            |
| Brutschrank (Modell INC153med)              | Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland              |
| Durchlichtmikroskop (LABOVAL 4)             | Carl Zeiss Jena  |
| Laminar Flow Werkbank (Sicherheitsklasse 2) | KOJAIR® Tech Oy, Vilppula, Finnland                        |
| Neubauer Zählkammer                         | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Röhn     |
| TLC-Scanner (γ-miniGITA)                    | Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt             |
| Zentrifuge                                  | Heraeus™ Megafuge™ 16R, Thermo Electron LED GmbH, Osterode |

### 2.1.5 Verwendete Software

| <b>Software</b>                         | <b>Firma</b>                                   |
|---|--|
| GINA Star TLC™ Version 5.01             | Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt |
| Microsoft Excel 2007                    | Microsoft USA                                  |
| Statistiksoftware SPSS® Statistics 20.0 | IBM Deutschland GmbH, Ehningen                 |

## 2.2 Methoden

Die Zellkulturexperimente wurden vollständig unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow Werkbank der Sicherheitsklasse 2 durchgeführt. Dabei wurde ausschließlich mit sterilen Einwegmaterialien und Chemikalien gearbeitet.

### 2.2.1 Zelllinien

Die im Nachfolgenden beschriebenen Versuche wurden mit drei unterschiedlichen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen als Monolayer erfolgte in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>). Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Anteil von 5 % inkubiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Umsetzung der Zellen erfolgte zweimal pro Woche.

### 2.2.2 SW480

Die SW480-Zellen (ATCC® CCL-228™) sind epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen, welche aus dem Primärtumor (Dukes Typ B; UICC-Stadium II) eines 50-jährigen Patienten isoliert wurden. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM/Ham's F12) verwendet. Diesem wurde 10 % Fetal Bovine Serum Gold, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % L-Glutamin und 0,2 % Normocin™ zugesetzt. Die Umsetzung der Zellen erfolgte alle 4 bis 5 Tage im Verhältnis 1:8.

Für die Zelllinie SW480 ist bekannt, dass sie 0,7 ng CEA/ml/10<sup>6</sup> Zellen in 10 Tagen sezerniert (ATCC®). Weiterhin exprimieren die Zellen auf ihrer Zelloberfläche den VEGF-Rezeptor Typ 1 (Fan et al., 2005; Morelli et al., 2009; Nakatani et al., 2010). In Bezug auf die Expression des VEGF-Rezeptors Typ 2 ist die Literaturlage widersprüchlich. Nach Nakatani et al. wird VEGFR-2 von den SW480 exprimiert (Methode: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion; RT-PCR), indes konnte bei anderen Studien mit Hilfe von RT-PCR, Westernblot und Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kein Nachweis für VEGFR-2 erbracht werden (Fan et al., 2005; Morelli et al., 2009). Weiterhin erfasste Morelli et al. mit Hilfe der gleichen diagnostischen Methoden die Expression von VEGFR-3 auf der Zelloberfläche der SW480 (Morelli et al., 2009).

### 2.2.3 HT29

Als zweite Zelllinie wurde HT29 (ATCC® HTB-38™) untersucht. Dabei handelt es sich ebenfalls um epitheliale Zellen eines Primärtumors kolorektalen adenomatösen Ursprungs einer 44-jährigen Frau. Für die HT29 wurde als Nährmedium Dulbecco's mo-

dified Eagle's Medium (DMEM High Glucose) eingesetzt, wobei diesem zusätzlich 10 % Fetal Bovine Serum Gold, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,2 % Normocin™ zugesetzt wurde. Die Zellen wurden alle 5 Tage im Verhältnis 1:6 umgesetzt.

Die CEA-Produktion der HT29 beträgt 2,5 ng CEA/ml/10<sup>6</sup> Zellen in 24 Stunden (Fantini et al., 1989). Für die Zelllinie existieren bezüglich der Expression der VEGF-Rezeptoren gegensätzliche Angaben. Nach den Autoren Fan, Morelli und Troiani besitzen die HT29-Zellen auf der Zelloberfläche nur den VEGF-Rezeptor-Typ 1 (Fan et al., 2005; Troiani et al., 2006; Morelli et al., 2009). In anderen Studien wurde experimentell mit Hilfe der gleichen Methoden (RT-PCR, Westernblot) dagegen auch VEGFR-2 nachgewiesen (Kim et al., 2005; Ahluwalia et al., 2013).

#### **2.2.4 T84**

Weiterhin wurde in die Untersuchungen die epitheliale kolorektale Adenokarzinomzelllinie T84 (ATCC® CCL-248) einbezogen. Diese Zellen wurden einer Lungenmetastase eines 72 Jahre alten Patienten mit dem Primärtumor eines kolorektalen Adenokarzinoms (Dukes Typ D; UICC-Stadium IV) entnommen, auf Nacktmäuse transplantiert und in diesen kultiviert. Das Kulturmedium der T84-Zellen bestand aus Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM/Ham's F12) mit dem Zusatz von 10 % Fetal Bovine Serum Gold, 1 % L-Glutamin und 0,2 % Normocin™. Alle 5 Tage erfolgte die Umsetzung der Zellen im Verhältnis 1:4.

Für die T84 wurde beschrieben, dass sie 600 ng CEA/ml/10<sup>6</sup> Zellen in 10 Tagen sezernieren (ATCC®). Nur wenige Studien existieren, welche den VEGF-Rezeptorstatus der Zelllinie T84 untersuchen. Ein Indiz für die Expression des VEGF-Rezeptor Typs 2 auf der Zelloberfläche der T84 sind die Untersuchungen von Estevez-Garcia zur Inzidenz genetischer Polymorphismen von VEGFR und PDGFR  $\alpha$  und  $\beta$  (Estevez-Garcia et al., 2012).

### **2.3 Zellkultivierung**

#### **2.3.1 Passagieren der Zellkulturen/Zellgewinnung**

Zum Umsetzen der Zellkulturen wurde zuerst das Kulturmedium entfernt und der verbliebene Zellrasen zweimal mit jeweils 15 ml Dulbecco's PBS-Puffer gespült. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen mit Hilfe von 3 ml Trypsin-EDTA, welches vorsichtig über den gesamten Zellrasen pipettiert wurde. Nach einer Inkubation von 10 Minuten wurde das Trypsin durch die Zugabe von 5 ml Nährmedium neutralisiert. Die

Zellsuspension wurde anschließend in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Dieser Vorgang wurde mit 3 ml Kulturmedium wiederholt, um die Zellen möglichst in hoher Ausbeute zu gewinnen. In einem nächsten Schritt wurde die Zellsuspension bei 300 g und einer Temperatur von 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgegossen, die verbleibende überstehende Flüssigkeit abpipettiert und das Pellet in 1 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Je nach Umsetzungsverhältnis wurde die gewünschte Menge an Zellsuspension in die neuen 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen pipettiert und mit 17 ml Kulturmedium aufgefüllt und zum Inkubieren in den Brutschrank überführt.

### 2.3.2 Kryokonservierung

Ein Teil der Zellen wurde für weitere Versuche kryokonserviert. Dazu wurde die Zellpellets in 0,9 ml Nähr- und 0,1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die vorliegende Zellsuspension wurde im Anschluss in ein Mikrotube pipettiert und für 24 Stunden in einen Gefrierschrank bei -20 °C gelagert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in einen Gefrierschrank mit -80 °C überführt und dort für 4 Wochen aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Für nachfolgende Anwendungen in Versuchen wurden die eingefrorenen Zellen aus dem Flüssigstickstoffbehälter genommen und durch die Zugabe von 1 ml Nährmedium vorsichtig aufgetaut. Dabei hat sich eine sequentielle Resuspension mit dem jeweiligen Nährmedium bewährt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Mikrotube mit Hilfe von 1 ml Kulturmedium mehrfach gespült, um möglichst viele Zellen zu gewinnen. Im Anschluss wurde das Zentrifugenröhrchen auf 7 ml mit Nährmedium aufgefüllt und analog zum Vorgang der Zellumsetzung zentrifugiert. Der weitere Ablauf ist unter Punkt 4.2.1 beschrieben.

## 2.4 Markierung von TF2 mit <sup>131</sup>I

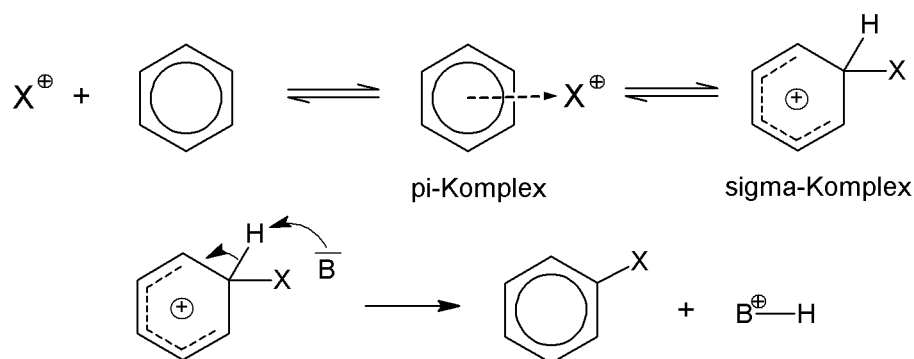
### 2.4.1 Radioiodid

Für die Markierung des CEA-Antikörpers TF2 wurde das Radionuklid <sup>131</sup>Iod verwendet. Dieses Radioisotop hat eine Halbwertszeit von 8,0197 Tagen. <sup>131</sup>I emittiert bei seinem Zerfall  $\beta^-$ - und  $\gamma$ -Strahlung. Es stand als Natriumiodid [<sup>131</sup>I] mit einer Ausgangsaktivität von 740 MBq  $\pm$ 10 % in 50  $\mu$ l wässriger NaOH-Lösung zur Verfügung. Die nötigen Verdünnungen wurden mit Hilfe einer 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt. Zur Kontrolle der eingesetzten Aktivitäten wurden diese mit Hilfe eines Aktivimeters quantifiziert. Dieses Messgerät arbeitet nach dem Prinzip einer Gasionisationskammer mit einer 4 $\pi$ -

Geometrie. In dem Zählgas werden durch die Radioaktivität Ionen erzeugt, welche einen Stromfluss induzieren. Dieser Strom verhält sich proportional zur Aktivität und ist von der Art des Isotops abhängig.

## 2.4.2 Markierungsprinzip

Die Markierung von TF2 erfolgte mit Hilfe der Iodogenmethode (Fraker und Speck, 1978). Dabei wird 1,3,4,6-Tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglucoluril, auch bekannt als IODO-GEN<sup>®</sup>, zur Radioiodierung von Zellmembranen und vor allem von Proteinen genutzt. Das Prinzip entspricht dabei einer elektrophilen aromatischen Substitution und wird schematisch in ihrem Ablauf in Abbildung 4 dargestellt. Für die Markierung werden der gelöste Antikörper und die <sup>131</sup>Iod-Lösung in mit IODOGEN beschichtete Glasröhrchen (Pierce<sup>®</sup> Pre-Coated Iodination Tubes) pipettiert. Durch IODO-GEN werden die Iodid-Ionen (I<sup>-</sup>) zu Iod-Kationen (I<sup>+</sup>) oxidiert, wobei diese wiederum mit den Tyrosinresten des Antikörpers elektrophil reagieren und jeweils ein Wasserstoffatom eines aromatischen Rings ersetzen.



**Abb. 4:** Ablauf der elektrophilen aromatischen Substitutionsreaktion (modifiziert nach Blömeke, 2003)

## 2.4.3 Markierungsmethode

In Vorbereitung der Markierung wurde das IODOGEN<sup>®</sup>-Glasröhrchen mit 300  $\mu$ l PBS-Puffer (pH=7,4) gespült und ca. 30  $\mu$ l im Röhrchen belassen, um einen stabilen pH-Wert sicher zu stellen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 mg des CEA-Antikörpers TF2 und <sup>131</sup>I mit einer Aktivität von 50 MBq in das Röhrchen. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei jedem Versuch ein gleiches Verhältnis zwischen der eingesetzten <sup>131</sup>I-Aktivität und der Menge an TF2 gegeben war, um eine konstante spezifische Aktivität zu erreichen. Die nun einsetzende Radioiodierung erfolgte unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührwerks. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Entnahme der Reaktionslösung beendet.

#### 2.4.4 Qualitätskontrolle

Im Anschluss an die Markierung erfolgte zur Überprüfung der radiochemischen Reinheit (RR) des markierten CEA-Antikörpers TF2 eine Qualitätskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Bei der Dünnschichtchromatographie wird dabei das freie Iod von dem gebundenen Iod getrennt. Der markierte IgG-Antikörper als großes Molekül verbleibt an der Startstelle, während das freie Iod mit der Lösungsmittelfront nach oben wandert. Unter dem genannten Begriff der radiochemischen Reinheit versteht man den prozentualen Anteil eines gebundenen Radionuklids im Verhältnis zur Gesamtaktivität. Die für unsere Versuche geforderte RR lag bei > 95 %, da sonst der Anteil an freiem, ungebundenen  $^{131}\text{I}$  zu groß wäre. Wurde die geforderte RR unterschritten, erfolgte eine Aufreinigung der Reaktionslösung mit Hilfe der Aufreinigungssäulen „Bio-Spin® 6 and 30 Columns“.

Es wurden 10 µl der Reaktionslösung auf den markierten Startpunkt eines Instant-Layer-Chromatographie-Streifens (ITLC-SG) aufgetragen und nach dem Trocknen in eine Laufkammer gestellt, welche bis zu einer Höhe von 0,5 cm mit isotonischer 0,9 % NaCl-Lösung als Laufmittel gefüllt war. Die mobile Phase steigt durch Kapillarkräfte an dem Träger entlang auf, bis eine Gesamtstrecke von 8 cm erreicht ist. Anschließend wurde der Streifen aus der Kammer entfernt und kurz getrocknet. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung eines TLC-Scanners und der dazugehörigen Software GINA Star TLC™ Version 5.01. Bei der Auswertung wurde das Detektorsignal in einem Chromatogramm gegen die Trennstrecke differentiell aufgetragen. Bei jedem vom Scanner detektierten Stoff wurde ein Peak verzeichnet. Anhand der Fläche unter dem Peak kann der prozentuale Anteil eines radioaktiven Inhaltsstoffes (RR), im Verhältnis zur Gesamtfläche aller Peaks, ermittelt werden.

### 2.5 Versuchsdurchführung

Mit allen drei Zelllinien wurden die in der Tabelle 2 angegebenen Experimente durchgeführt. Die Zellzahlen und der  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake wurden nach einer Inkubation von 24, 48, 72 und 144 Stunden ermittelt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm<sup>2</sup> kultiviert, wobei kurz vor Zugabe des  $^{131}\text{I}$ -TF2 und der unterschiedlichen Pazopanib-Konzentrationen das Kulturmedium gewechselt wurde. Innerhalb des Versuchszeitraumes wurde das Medium nicht ausgetauscht. Die Inkubation erfolgte wie unter Punkt 2.4.1 beschrieben. Zusätzlich wurde für jeden Untersuchungszeitpunkt der Blindwert (Negativkontrolle) bestimmt. Dazu wurden zwei Zellkulturflaschen der jeweiligen Zelllinie, welche nur Zellen und Medium enthielten, zur



Wachstumskontrolle mitgeführt. Für die Ermittlung der Ausgangszellzahl wurden bereits zum Messzeitpunkt 0 Stunden jeweils zwei Negativkontrollen für jede Zelllinien ausgezählt. Um statistisch signifikante Untersuchungszahlen zu erhalten, wurden in jedem Versuch drei Parallelkulturen für jeden Zeitpunkt und jede Variation der Inkubationsbedingungen analysiert. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt und somit neun Einzelwerte ( $n = 9$ ) in die jeweilige Auswertung eingeschlossen.

**Tab. 2: Übersicht der *In-vitro*-Versuche**

|     | <b>Versuche</b>   | <b>Zielstellung</b>  |
|-----|---|--|
| I   | Negativkontrolle  | Zellwachstum ohne Einfluss von $^{131}\text{I}$ -TF2 und/oder Pazopanib                                  |
| II  | Inkubation mit $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq/ml)   | Zellwachstum unter Einfluss von $^{131}\text{I}$ -TF2/ $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake                      |
| III | Inkubation mit $1\mu\text{g/ml}$ $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq/ml) + $50\mu\text{g/ml}$ kaltes TF2 | Prüfung der Spezifität von TF2   |
| IV  | Co-Inkubation $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq /ml) und $1\mu\text{g/ml}$ Pazopanib                   | Beeinflussung des Zellwachstums durch $1\mu\text{g/ml}$ Pazopanib bzw. des $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake  |
| V   | Co-Inkubation $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq /ml) und $5\mu\text{g/ml}$ Pazopanib                   | Beeinflussung des Zellwachstums durch $5\mu\text{g/ml}$ Pazopanib bzw. des $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake  |
| VI  | Co-Inkubation $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq /ml) und $10\mu\text{g/ml}$ Pazopanib                  | Beeinflussung des Zellwachstums durch $10\mu\text{g/ml}$ Pazopanib bzw. des $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake |

### 2.5.1 Bestimmung der Antikörperspezifität

Zur Prüfung der Spezifität der Bindung des Antikörpers TF2 an das CEA/CEACAM5 auf der Zelloberfläche mussten die Zellen neben  $^{131}\text{I}$ -TF2 auch mit nicht radioaktiv markiertem („kaltem“) Antikörper inkubiert werden. Dabei erfolgte für jeweils drei Proben jeder Zelllinie sowohl eine Inkubation mit ausschließlich  $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq/ml), als auch parallel eine Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$   $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq/ml) und zusätzlich 50  $\mu\text{g/ml}$  kaltem TF2. Die Zellzahlen sowie der  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake wurden nach 24, 48, 72 und 144 Stunden bestimmt.

### 2.5.2 Eingesetzte Pazopanibkonzentrationen

Als Vertreter der Tyrosinkinase-Inhibitoren wurde Pazopanib bei den Versuchen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Zur Ermittlung der relevanten Konzentrationen wurde die derzeitig empfohlene klinische Dosis pro Tag von Pazopanib (Votrient®) herangezogen. Diese beträgt 800 mg (European Medicines Agency, 2013). Die Tagesdosis wurde auf das Volumen der Zellkulturflasche von 8 ml umgerechnet. Dabei ergeben sich unter der Annahme eines durchschnittlichen Patientengewichts von 80 kg für die Zellkulturflasche 80  $\mu\text{g}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors, was einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}$  Pazopanib pro 1 ml Kulturmedium entspricht. Zur Untersuchung des Einflusses der Pazopanib-Konzentration auf den CEA-Antikörper TF2 bei Co-Inkubation wurde neben 100 % der täglichen therapeutischen Dosis des Tyrosinkinase-Inhibitors auch 50 % (5  $\mu\text{g}$  Pazopanib/ml Kulturmedium) und 10 % (1  $\mu\text{g}$  Pazopanib/ml Kulturmedium) der therapeutischen Menge untersucht. Von dem Tyrosinkinase-Inhibitor wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg in 100 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die benötigten Mengen an Pazopanib wurden durch Verdünnungsreihen aus der Stammlösung in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  vorgelegt.

### 2.5.3 Inkubation mit $^{131}\text{I}$ -TF2 und Pazopanib

Im Anschluss an die Qualitätskontrolle wurde  $^{131}\text{I}$ -TF2 auf eine spezifische Aktivität von 8,2 MBq/ml mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt. Vor Aktivitätszugabe wurde in der Zellkultur das Medium gewechselt. Dem frischen Zellkulturmedium wurde 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Lösung mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 zugesetzt, um im Medium eine spezifische Aktivität von 100 kBq/ml  $^{131}\text{I}$ -TF2 zu erreichen. Parallel wurden je nach Schema zusätzlich 100  $\mu\text{l}$  der unterschiedlichen Pazopanib-Lösungen in den Konzentrationen von Tabelle 2 zugefügt. Die Inkubationszeit der Zellen betrug 24, 48, 72 oder 144 Stunden.

### 2.5.4 Zellpelletbestimmung

Zu den oben angegebenen Zeiten wurden jeweils zwei Nullkontrollen (Zellwachstumskontrollen) und drei Kulturflaschen mit je 1, 5 oder 10 µg Pazopanib und/oder  $^{131}\text{I}$ -TF2 von jeder Zelllinie ausgewertet. Zu Beginn wurde das Medium abgegossen und der Zellrasen zweimal mit jeweils 6 ml Dulbecco's PBS-Puffer gespült. Zum Ablösen der Zellen wurde anschließend vorsichtig 3 ml Accutase auf den Zellenrasen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Zellkulturflasche mit 1,5 ml Kulturmedium gespült und die Zellsuspension anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen abgegossen. Um die Zellen quantitativ zu gewinnen, wurde der Vorgang mit 1 ml Kulturmedium wiederholt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in der Zentrifuge bei einer G-Zahl von 300 und einer Temperatur von 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und die noch überstehende Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet in 1,5 ml Nährmedium resuspendiert.

### **2.5.5 Ermittlung der zellgebundenen Aktivität**

Um die zellgebundene Aktivität zu bestimmen, wurde die Zellsuspension in einem Bohrloch-Detektor vermessen und die Impulsrate ermittelt. Diese Messeinheit enthält einen Detektor, welcher Szintillations-Lichtblitze registriert, die durch die Energie der absorbierten Strahlung einer Probe in einem eingebauten NaI-Szintillationskristall entstehen. Dabei wird die Zellsuspension in eine zentrale Bohrung innerhalb des Szintillationskristalls eingebracht und die Anzahl der Impulse in einem bestimmten Zeitraum gemessen. Die ermittelte Impulsrate ist dabei proportional zur Anzahl der Lichtblitze und diese ist wiederum abhängig von der Stoffmenge, der Aktivität und dem Radioisotop. Jede Probe wurde zweimal für jeweils eine Minute vermessen und anschließend der Mittelwert gebildet. Ebenfalls wurde der Wert einer Negativkontrolle bestimmt und die ermittelte Impulsrate von jedem Probenwert subtrahiert. Weiterhin wurde der Zeitpunkt der Messung schriftlich festgehalten, um mögliche Zeitverschiebungen später korrigieren zu können.

### **2.5.6 Zellzahlbestimmung**

Nach der Messung der Aktivität wurden 10 µl der Zellsuspension abpipettiert und es erfolgte die Zugabe von 100 µl Trypanblau. Trypanblau wird von avitalen Zellen aufgenommen, färbt diese Zellen an und ermöglicht somit eine Differenzierung von den vitalen Zellen. Anschließend wurde die Zellsuspension soweit verdünnt, dass sich bei der Auszählung in der Neubauer-Zählkammer eine Zellzahl von 20 bis 100 Zellen pro Quadrat ergab. Eine Probe der angefärbten Zellsuspension wurde vorsichtig auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die nachfolgende Auszählung erfolgte unter einem

Durchlichtmikroskop. Grundsätzlich wurden für eine Probe jeweils alle vier Großquadrate in den Ecken der Zählkammer ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Als letzter Schritt wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung, den Volumina der Zellsuspension (1,5 ml) und der Eckquadrate die tatsächliche Zellzahl mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert (vitale Zellen)} * 1,5 * 10.000 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

## 2.6 Auswertung und Statistik

### 2.6.1 Bestimmung der Standardkurve

Zu Beginn erfolgte die Erstellung einer Standardkurve. Dafür wurden 5 µl, 25 µl, 50 µl, 100 µl, 500 µl und 1000 µl einer <sup>131</sup>I-Lösung von 13 kBq/ml mit Wasser auf ein Volumen von 1,5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Aktivität der Proben analog zu den späteren Messungen im Bohrloch-Detektor bestimmt. Aus den ermittelten Werten wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 durch lineare Regression eine Geradengleichung erstellt. Unter Verwendung dieser Gleichung erfolgte die Umrechnung der Impulsrate (counts pro minute, cpm) in Becquerel, um die prozentuale zellgebundene Aktivität bestimmen zu können.

### 2.6.2 Zeitkorrektur

Als Grundlage zur Bestimmung des Uptake von <sup>131</sup>I-TF2 wurde das Geschwindigkeits-Zeit-Gesetz des radioaktiven Zerfalls eines Nuklides N herangezogen ( $\lambda$  = Zerfallskonstante):

$$-\left(\frac{dN}{dt}\right) = \lambda * N \quad (1)$$

Durch Integration von (1) vom Ausgangszustand  $N_0$  bei  $t=0$  bis zur Zeit  $t$  mit  $N(t)$

$$\int_{N_0}^{N(t)} \frac{dN}{N} = - \int_{t=0}^t \lambda * dt \quad (2)$$

wird Gleichung (3) erhalten:

$$\ln N - \ln N_0 = - \lambda * t \quad (3)$$

die in entlogarithmierter Form als Zerfallsgesetz bekannt ist:

$$N = N_0 * e^{-\lambda * t} \quad (4)$$

Dabei bezeichnet  $N_0$  die Anzahl der zum Zeitpunkt  $t = 0$  vorhandenen Nuklide und  $\lambda$  die Zerfallskonstante des jeweiligen Nuklids. Wird nun die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  bei  $N = \frac{N_0}{2}$  in das Zerfallsgesetz eingesetzt, so ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$\frac{\ln 2}{t_{1/2}} = \lambda \quad (5)$$

Mit der Halbwertszeit für  $^{131}\text{I}$  von 8,0197 Tage bzw. 192,47 Stunden berechnet sich  $\lambda$  für  $^{131}\text{I}$  mit  $3,601 * 10^{-3}$  pro Stunde.

Mit der Definition der Aktivität  $A$  einer Probe zum Zeitpunkt  $t$ :

$$A(t) = - \left( \frac{dN}{dt} \right) \quad (6)$$

kann die Aktivität  $A_0$  durch Einsetzen der bekannten Zerfallskonstante berechnet werden:

$$A_0 = A(t) * e^{3,601 * 10^{-3} \text{ h}^{-1} * t} \quad (7)$$

$A(t)$  ist die gemessene Aktivität zum definierten Zeitpunkt  $t$ . Die Aktivität  $A(t)$  wurde als Impulsrate mit dem Bohrloch-Detektor bestimmt. Die damit errechnete Aktivität  $A_0$  wird als Impulsrate angegeben und muss anschließend mit Hilfe eines Faktors  $K_f$  in die Einheit Becquerel (Bq) umgerechnet werden. Dieser Korrekturfaktor wurde durch Mehrfachmessung einer  $^{131}\text{I}$ -Standardlösung einer bekannten Aktivität ermittelt (siehe Punkt 3.6.1). Der Korrekturfaktor betrug für die Versuche  $6,36 * 10^{-2} \text{ Bq} / \text{Impuls}$ .

### 2.6.3 Berechnung des Uptake

Ziel der Berechnungen ist die Ermittlung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake, der Aktivität, welche von den Zellen aufgenommen wurde. Dieser Wert wurde in Prozent angegeben und berechnet sich entsprechend (8) aus der gemessenen Aktivität  $A$  (siehe 4.5.3) und der Ausgangsaktivität  $A_0$  aus Gleichung (7):

$$^{131}\text{I-TF2-Uptake} = \frac{A}{A_0} * 100\% \quad (8)$$

Dieser Wert ist vom jeweiligen Zellwachstum abhängig und muss für Vergleichszwecke auf die entsprechende Zellzahl bezogen werden. Mit Hilfe der ermittelten Zellzahlen kann der prozentuale Uptake standardisiert für eine Million Zellen als Ergebnis generiert werden:

$$^{131}\text{I-TF2-Uptake pro } 10^6 \text{ Zellen} = ^{131}\text{I-TF2-Uptake} / \text{Zellzahl} * 10^6.$$

#### **2.6.4 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde das Programm SPSS in der Version 20.0 eingesetzt. Aus den Einzelwerten der Zellzahlen und des Uptakes wurden die Mittelwerte, Mediane und die Standardabweichungen bestimmt. Zur Prüfung der Signifikanz wurde für verbundene Stichproben der Wilcoxon-Test durchgeführt so wie auch andere nichtparametrische Tests. Als Signifikanzniveau wurde 5 % gewählt ( $p < 0,05$ ).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Standardkurve

Bei der Bestimmung der Standardkurve zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen den in den Proben vorgegebenen Aktivitätsmengen (Becquerel) und den gemessenen Impulsraten (cpm). Mittels linearer Regression wurde die folgende Geradengleichung für  $^{131}\text{I}$  ermittelt:

$$y = 0,0648 x - 97,475$$

In diesem Zusammenhang bezeichnet  $R^2$  das Bestimmtheitsmaß und beträgt 0,9995. In Abb. 5 ist die Gerade graphisch dargestellt, wobei die gemessenen Impulsraten pro Minute gegen die eingesetzten Becquerel aufgetragen wurden.

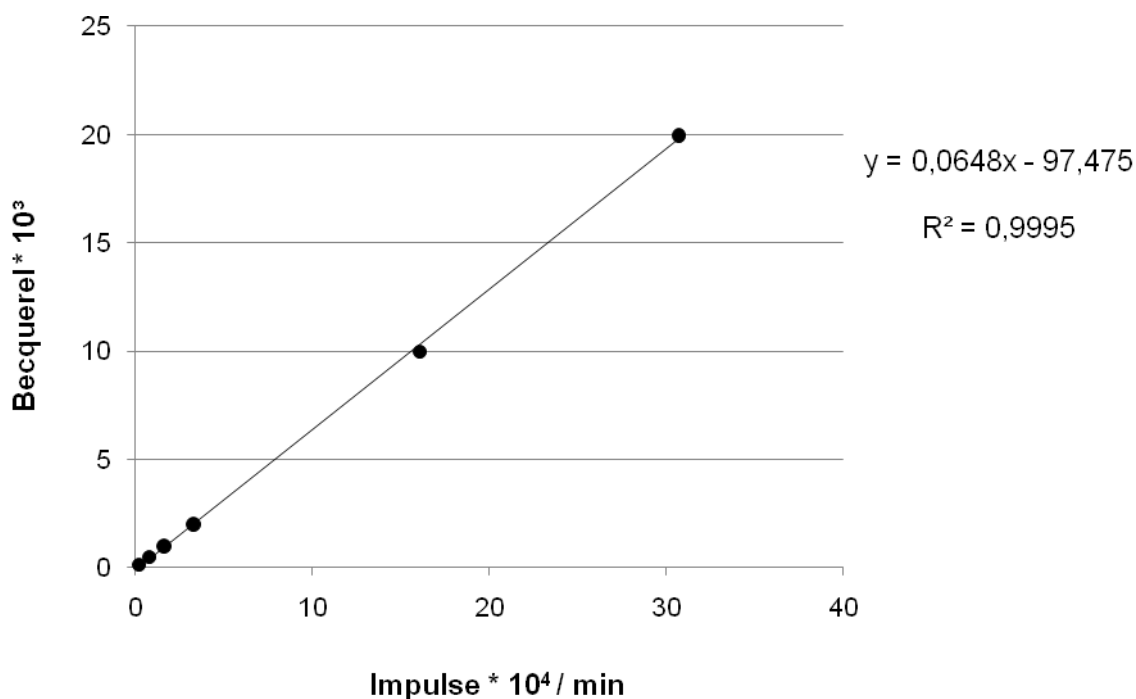
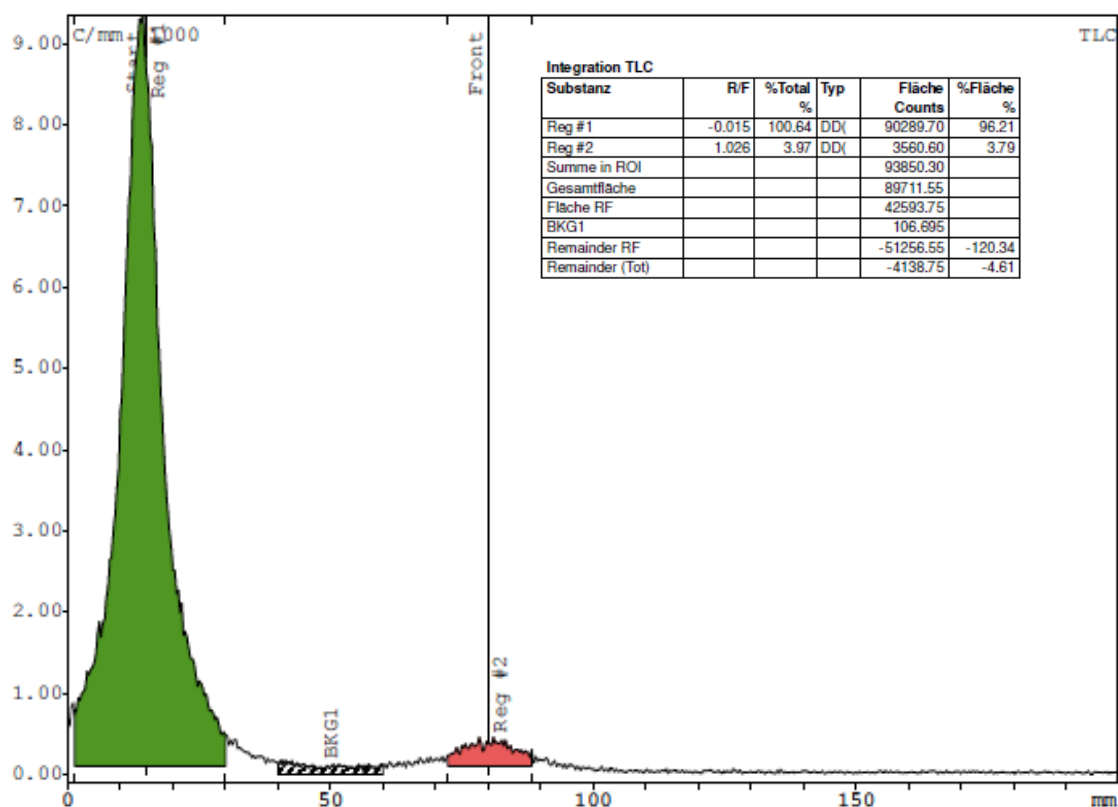


Abb. 5: Standardkurve für  $^{131}\text{I}$  mit eingezeichneter Trendlinie

## 3.2 Ausbeute und radiochemische Reinheit von $^{131}\text{I}$ -TF2

Der Antikörper TF2 konnte mit einer Ausbeute von mehr als 90 % erfolgreich mittels  $^{131}\text{I}$  markiert werden. Dabei wurde die radiochemische Reinheit (RR) von  $^{131}\text{I}$ -TF2 anhand der Dünnschichtchromatographie (siehe Punkt 2.4.4) überprüft. Die Abb. 6 veranschaulicht eine Beispielmessung (TLC-Scan) zur Qualitätskontrolle und ergab eine RR von 96,2 % des markierten Antikörpers  $^{131}\text{I}$ -TF2.



**Abb. 6:** Beispiel eines TLC-Scans einer dünnschichtchromatografischen Untersuchung zur Qualitätskontrolle des markierten Antikörpers TF2

Die Stabilität von  $^{131}\text{I}$ -TF2 im Medium und im Serum > 96 Stunden wurde bereits in anderen Studien belegt (Meller et al., 2011; Sharkey et al., 2010).

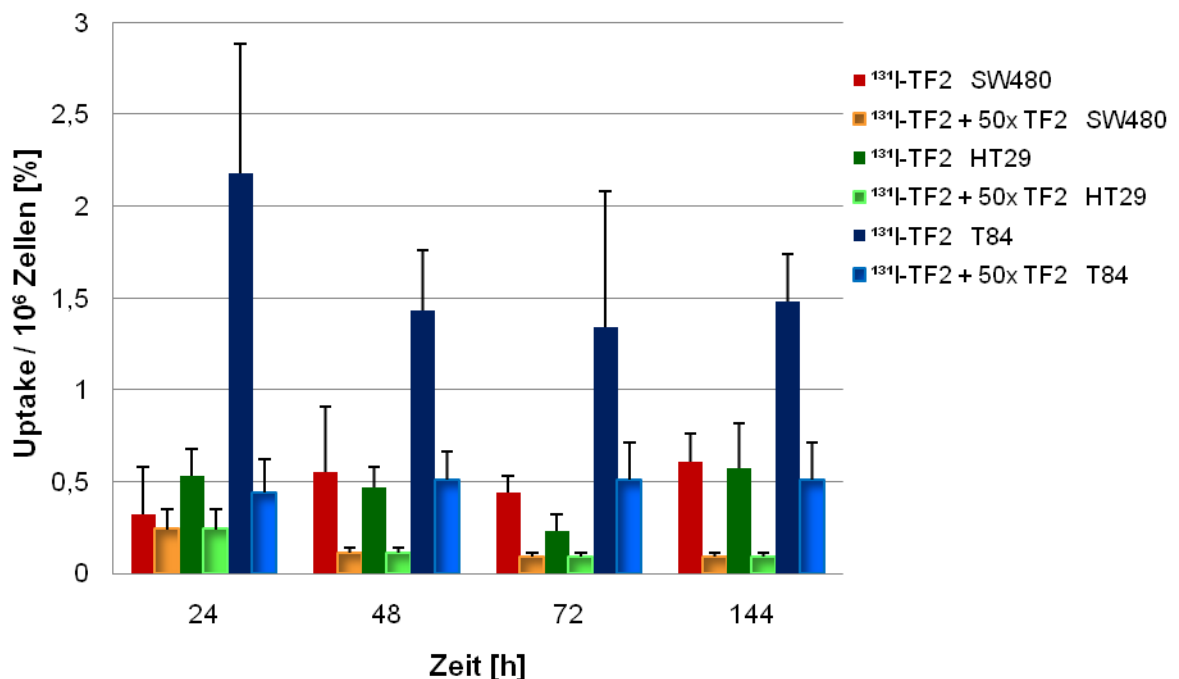
## 3.3 Spezifität des CEA-Antikörpers TF2

Die Überprüfung der spezifischen Bindung des Antikörpers TF2 erfolgte mit Hilfe kompetitiver Studien. Dazu wurden die drei Zelllinien mit einem fünfzigfachen Überschuss an kaltem, nicht radioaktiv markiertem Antikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von  $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq/ml). Durch den hohen Überschuss an kaltem Antikörper



sollte der Uptake bei einer spezifischen Antikörperbindung sinken. Als Vergleich diente die ausschließliche Inkubation von Zellproben mit  $^{131}\text{I}$ -TF2.

Die Abb. 7 gibt die ermittelten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werte in %, normiert auf  $10^6$  Zellen, zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten für alle drei Zelllinien wieder. Die linke Säule zeigt jeweils den  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake der Zellen bei ausschließlicher Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2, die rechte Säule (schattiert, heller) stellt dagegen den Verlauf des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake bei Co-Inkubation mit dem kalten Antikörper dar.



**Abb. 7: Kompetitiver Test der spezifischen Antikörperbindung: Vergleich  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake bei Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 und bei Co-Inkubation mit 50-fachen Überschuss an kaltem Antikörper für SW480, HT29 und T84 (n = 9).** Wiedergegeben sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Die Inkubation bei Überschuss mit kaltem TF2 führte bei allen drei Zelllinien über den gesamten Untersuchungszeitraum zu einem hochsignifikant reduzierten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake ( $p < 0,01$ ). Diese Unterschiede in den Uptake-Werten sind für die Zelllinien SW480 und HT29 nach 144 Stunden am deutlichsten ( $p < 0,01$ ). Bei den T84-Zellen entspricht der  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake bei Co-Inkubation mit dem kalten Antikörper bereits nach 24 Stunden nur etwa einem Viertel des Uptake der Zellen, welche ausschließlich mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 inkubiert wurden ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich zu den anderen Zelllinien weisen die T84 für beide Untersuchungsmodalitäten die höchsten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werte auf.

## 3.4 Veränderung der Zellproliferation

### 3.4.1 Einfluss von TF2 und $^{131}\text{I}$ -TF2

Neben der Spezifität des Antikörpers wurde ein möglicher Einfluss von TF2 und  $^{131}\text{I}$ -TF2 auf die Proliferation der Zellen überprüft. Hierzu wurden über den Zeitraum der Inkubation (24-144 Stunden) die Zellzahlen ermittelt, wobei die Ergebnisse der Zellzahlen bei Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 (100 kBq/ml) mit den Negativkontrollen verglichen wurden. Parallel erfolgte die Inkubation einer weiteren Messreihe mit der 50-fachen Menge an kaltem Antikörper bis einschließlich 72 Stunden.

Die ermittelten Zellzahlen wurden für eine bessere Vergleichbarkeit auf die Werte der unbehandelten Zellen (Negativkontrolle, 100 %) normiert, indem der jeweilige Mittelwert der Negativkontrolle als Bezugsgröße für den entsprechenden Messzeitpunkt verwendet wurde. Die Werte für Zellzahlen größer 100 % verdeutlichen ein erhöhtes Wachstum im Vergleich zu den Zellproben ohne Zugabe von TF2. Umgekehrt dokumentieren prozentuale Zellzahlen kleiner 100 % ein vermindertes Wachstum. In der folgenden Abb. 8 sind die Mittelwerte der Ergebnisse bei Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 für alle drei Zelllinien zusammengefasst dargestellt.

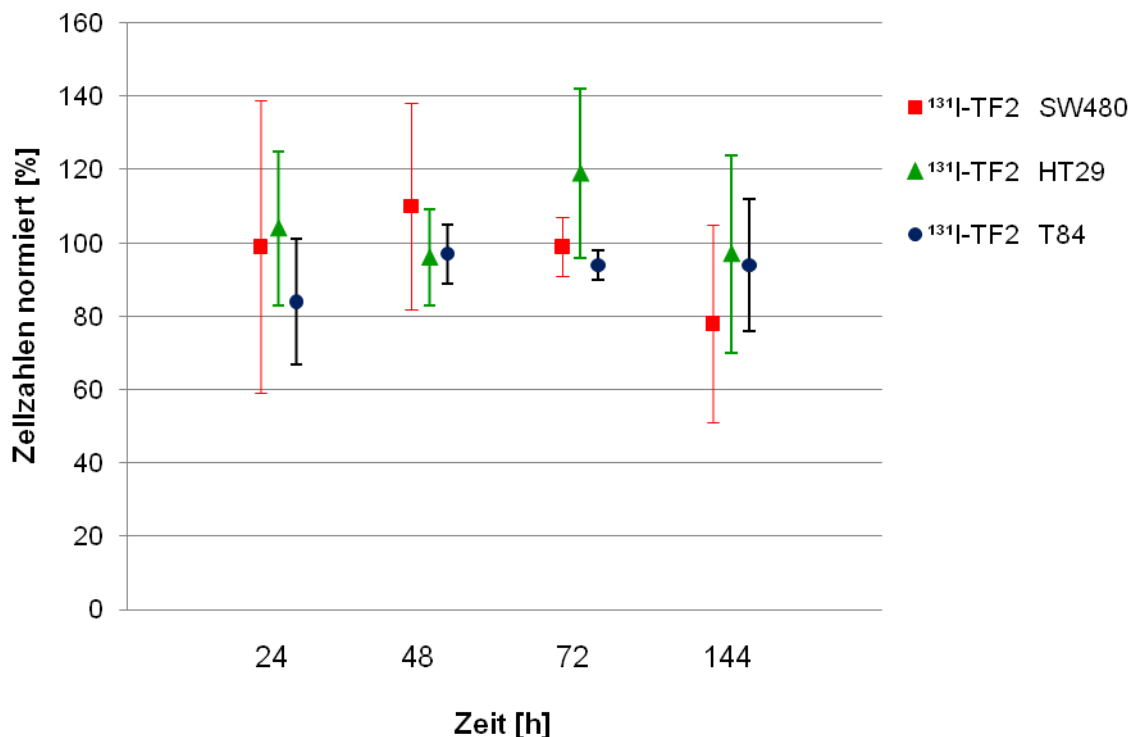


Abb. 8: Einfluss von  $^{131}\text{I}$ -TF2 auf die Proliferation der Zelllinien (n = 9; n = 6 für T84 nach 72 h). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

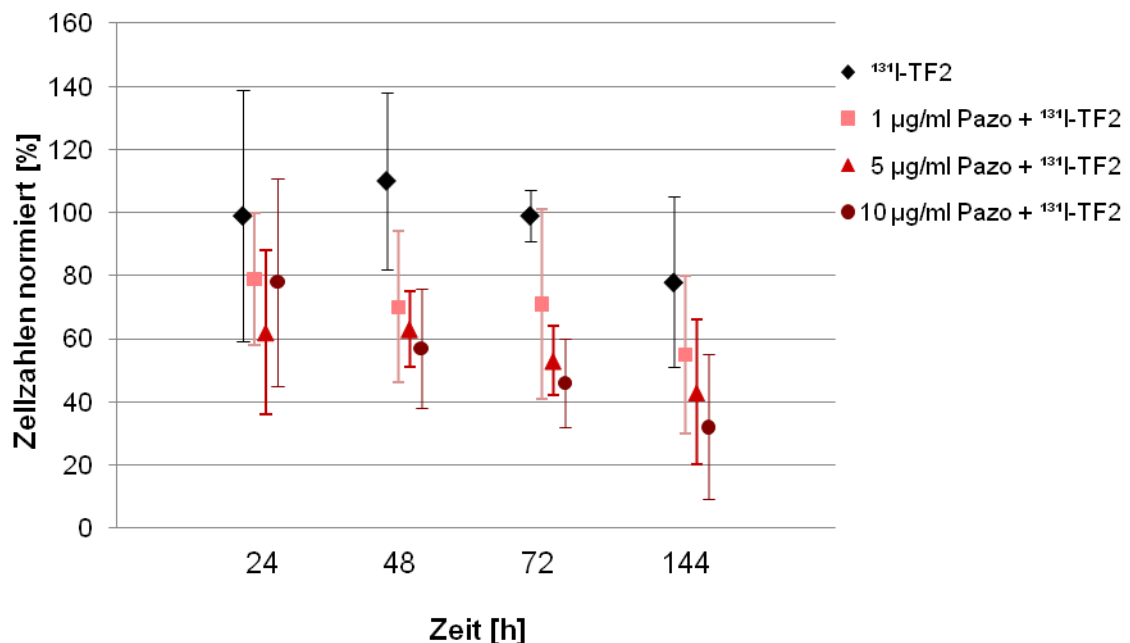
Bei den Zellen HT29 (grün) und T84 (blau) konnte keine signifikante antiproliferative Wirkung über den gesamten Untersuchungszeitraum verzeichnet werden. Tendenziell sinkt für die Zelllinie SW480 (rot) nach 144 Stunden die Zellzahl auf annähernd 80 %. Dieser Effekt ist nach statistischer Auswertung ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,086$ ).

Die Zugabe der fünfzigfachen Menge an kaltem Antikörper führte bei allen Zelllinien zu keiner signifikanten Beeinflussung des Zellwachstums (nicht dargestellt).

### 3.4.2 Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib

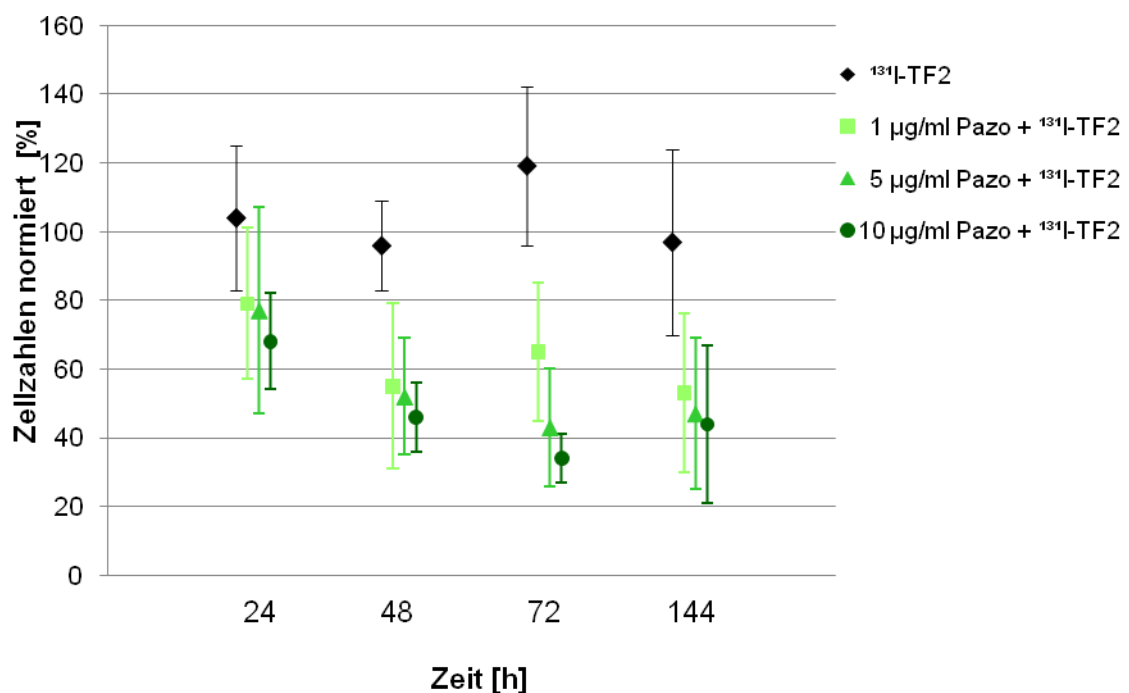
Da Tyrosinkinasen als mögliche Co-Faktoren bei der Zellproliferation von Tumorzellen eine Rolle spielen, wurde Pazopanib bei den Experimenten als potentieller Effektor auf das Zellwachstum untersucht. Die Zellen wurden dementsprechend mit verschiedenen Pazopanib-Konzentrationen 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  oder 10  $\mu\text{g/ml}$  (entsprechen 10, 50 sowie 100 % der therapeutischen Tagesdosis des Tyrosinkinase-Inhibitors) sowie jeweils mit 100 kBq/ml  $^{131}\text{I}$ -TF2 co-inkubiert.

Die nachfolgenden Abbildungen geben für die jeweilige Zelllinie die Ergebnisse der Proliferationshemmung unter dem Einfluss der eingesetzten Pazopanib-Konzentration (farblich abgestuft) wieder. Vergleichend sind weiterhin die Resultate bei ausschließlicher Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2, ohne zusätzliche Zugabe von Pazopanib, dargestellt.



**Abb. 9: Einfluss unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen auf die Zellproliferation der SW480-Zellen (1 und 10  $\mu\text{g/ml}$  Pazo:  $n = 15$ ; 5  $\mu\text{g/ml}$  Pazo:  $n = 12$ ). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.**

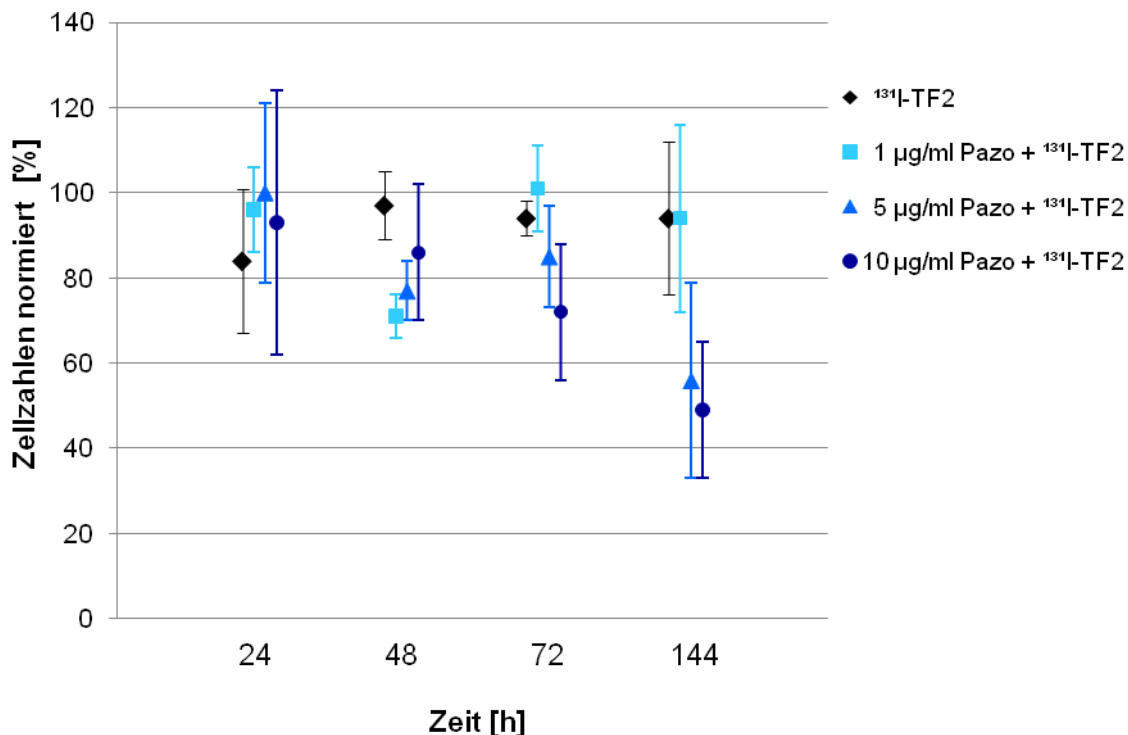
Bei der Zelllinie SW480 führt die Zugabe von Pazopanib sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums. Unter der Wirkung von 10 µg/ml Pazopanib wurde die Zellproliferation nach 144 Stunden auf weniger als 40 %, bezogen auf die Negativkontrollen, reduziert ( $p < 0,01$ ). Die geringste Pazopanib-Konzentration (1 µg/ml) und gleichzeitige Co-Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 reichte aus, um das Wachstum der Zellen nach 144 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen über 40 % zu hemmen ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 10: Einfluss unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen auf die Zellproliferation der HT29-Zellen (1 und 10 µg/ml Pazo:  $n = 15$ ; 5 µg/ml Pazo:  $n = 12$ ).** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen.

Bei den Versuchen mit der Zelllinie HT29 konnte ebenfalls eine signifikante antiproliferative Wirkung auf die Zellen nach Inkubation mit Pazopanib und  $^{131}\text{I}$ -TF2 über den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen werden. Dieser Effekt zeigte sich bereits bei einer Zugabe von 1 µg/ml des Tyrosinkinase-Inhibitors ( $p < 0,05$ ). Bei den Ergebnissen ist jedoch keine eindeutige Abhängigkeit von der eingesetzten Pazopanib-Konzentration zu erkennen. So zeigen alle untersuchten Konzentrationen von Pazopanib nach einem Messzeitraum von 144 Stunden eine annähernd 50 %ige signifikante Inhibierung des Zellwachstums im Vergleich zu den unbehandelten Zellproben ( $p < 0,05$ ). Die antiproliferativen Effekte der einzelnen Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors unterschieden sich nach 144 Stunden nicht signifikant. Die stärkste Verminderung der Zellproliferation wurde bereits nach 72 Stunden durch 10 µg/ml

Pazopanib verzeichnet. Es trat dabei eine Hemmung des Zellwachstums um mehr als 40 % im Vergleich zu den Negativkontrollen auf.



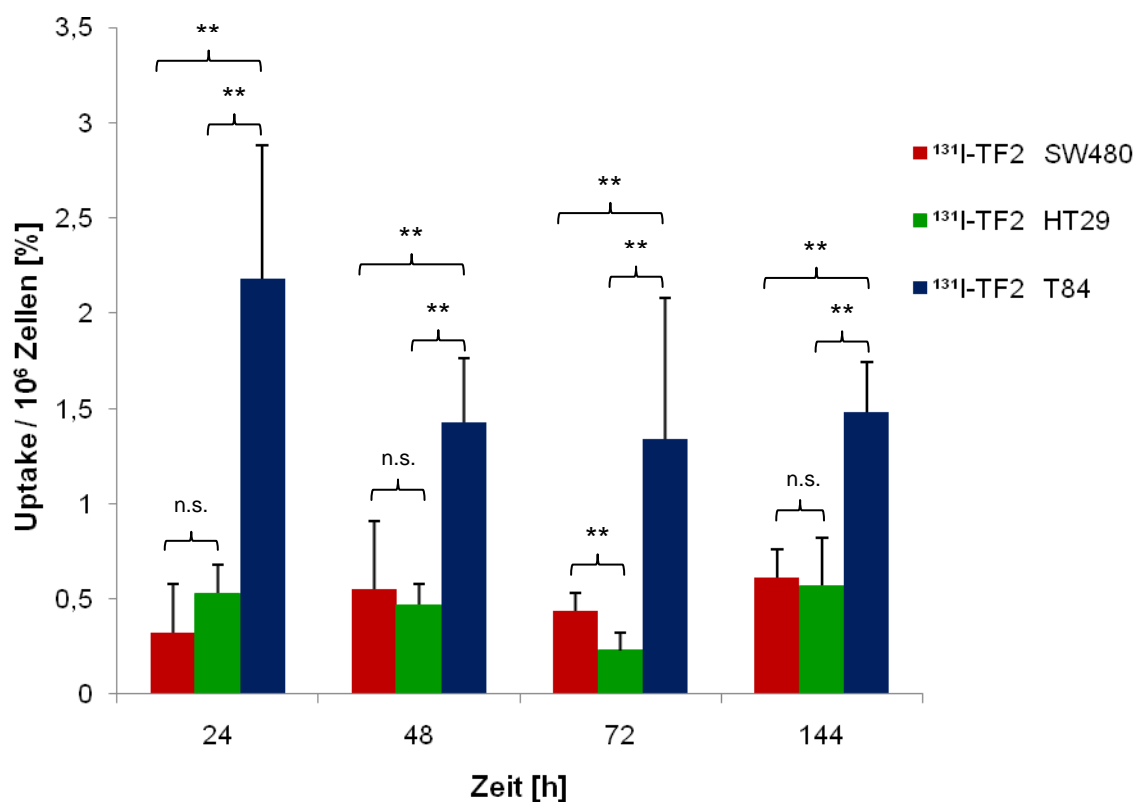
**Abb. 11: Einfluss unterschiedlicher Pazopanib-Konzentrationen auf die Zellproliferation der T84-Zellen (n = 15; n = 12 für 72 h-Werte).** Dargestellt sowie die jeweiligen Mittelwerte und die Standardabweichungen.

Im Gegensatz zu den Resultaten der Zelllinien SW480 und HT29 ergab sich für die konzentrationsabhängigen Messungen der Zelllinie T84 (Abb. 11) kein einheitliches Bild. Die Anwendung der niedrigsten Pazopanib-Konzentration führte zu keiner Veränderung des Zellwachstums. Unter Einfluss von 5  $\mu\text{g/ml}$  und 10  $\mu\text{g/ml}$  Pazopanib konnte jedoch nach 72 Stunden eine Proliferationshemmung nachgewiesen werden. Dabei wurde nach 144 Stunden Inkubation mit 10  $\mu\text{g/ml}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine signifikante Verminderung der Zellzahl um 50 % ermittelt, wobei kein signifikanter Unterschied zu den Vergleichsproben mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Pazopanib bestand ( $p < 0,01$ ).

## 3.5 Ergebnisse Uptake von $^{131}\text{I}$ -TF2

### 3.5.1 Zellspezifische Unterschiede des $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake

Eine weitere wichtige Untersuchung im Rahmen der *In-vitro*-Studien war die Ermittlung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake, der sogenannten quantitativen Aufnahme/Anreicherung des markierten Antikörpers, in den verschiedenen Zellen. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde eine Umrechnung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake auf  $10^6$  Zellen vorgenommen, im Folgenden als standardisierter Uptake bezeichnet. Die Abb. 12 gibt die entsprechenden Ergebnisse für alle Zelllinien untereinander vergleichend wieder.



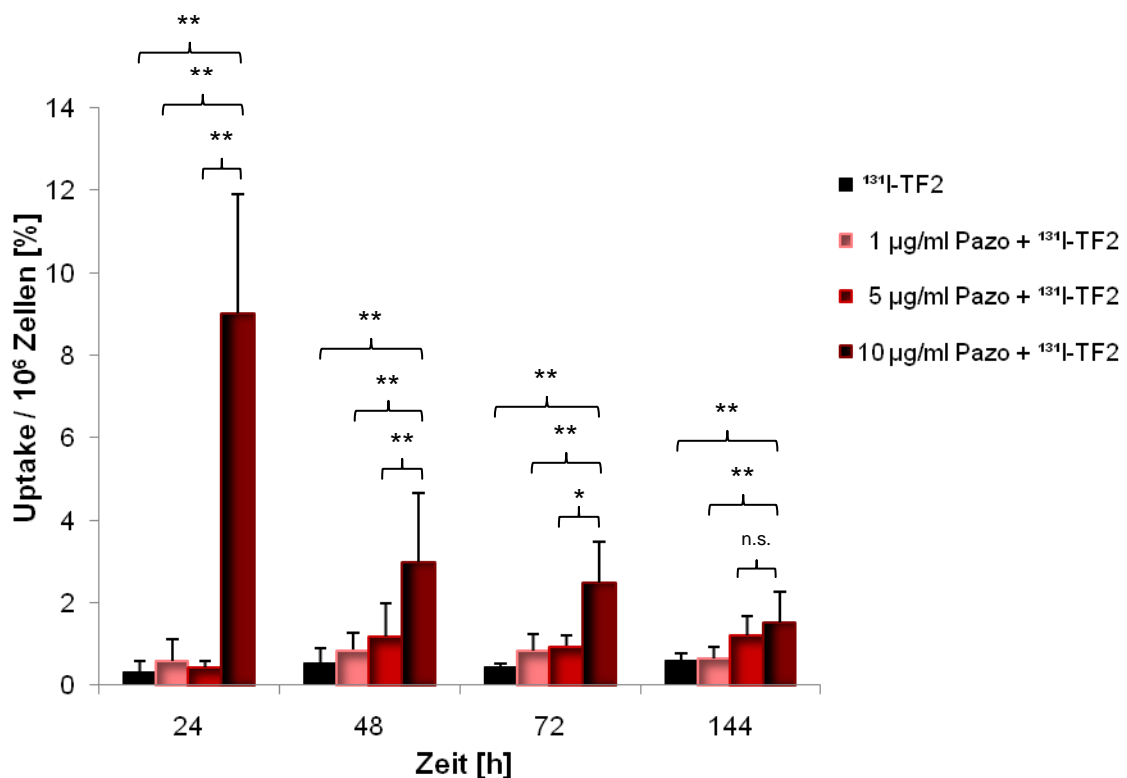
**Abb. 12: Vergleich des standardisierten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake der drei Zelllinien (n = 9).** Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. \*\*p < 0,01. n.s. nicht signifikant.

Der standardisierte Antikörper-Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2 war bis auf die Werte für die Zelllinien T84 über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant. Die höchsten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werte wurden für die T84-Zellen ermittelt. Dabei konnte ein maximaler Uptake des radioiodierten Antikörpers bei annähernd 2 % nach 24 Stunden bestimmt werden. Die Werte des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake der T84-Zellen lagen signifikant (p < 0,01) über den Uptake-Werten der Zelllinien SW480 und HT29. Die Ergebnisse der SW480 und HT29-Zellen unterschieden sich untereinander nur geringfügig. Ein signifikanter Unter-

schied trat einzig für die  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werte nach 72 Stunden auf. Für SW480 und HT29 wurde der höchste Uptake nach 144 Stunden mit annähernd 0,5 % bestimmt.

### 3.5.2 Veränderung des $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake unter Zugabe von Pazopanib

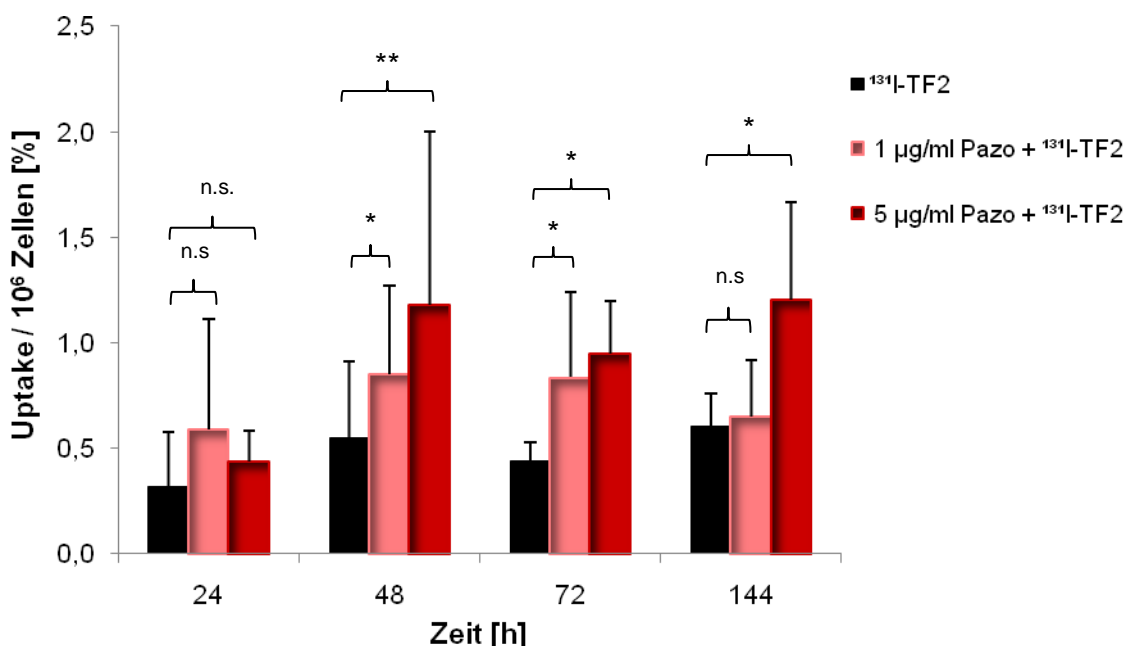
Neben der Untersuchung des unbeeinflussten  $^{131}\text{I}$ -Antikörper-Uptake wurden im Rahmen von Parallelexperimenten die einzelnen Zelllinien zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib behandelt. Der Verlauf der  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptakewerte für die mit Pazopanib inkubierten Zellen wird in den nachfolgenden Abbildungen für jede Zelllinie dargestellt.



**Abb. 13:**  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake/ $10^6$  Zellen bei Inkubation mit unterschiedlichen Pazopanib-Konzentrationen bei der Zelllinie SW480 ( $n = 9$ ). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n.s. nicht signifikant.

Für die Zelllinie SW480 konnten im Untersuchungszeitraum sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig Veränderungen des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake nach Inkubation mit Pazopanib festgestellt werden. Für die untersuchte Höchstkonzentration von 10 µg/ml Pazopanib, welche 100 % der klinischen Dosis des Tyrosinkinase-Inhibitors entspricht, konnte bereits mit circa 9 % der höchste  $^{131}\text{I}$ -Antikörper-Uptake nach 24 Stunden bestimmt wer-

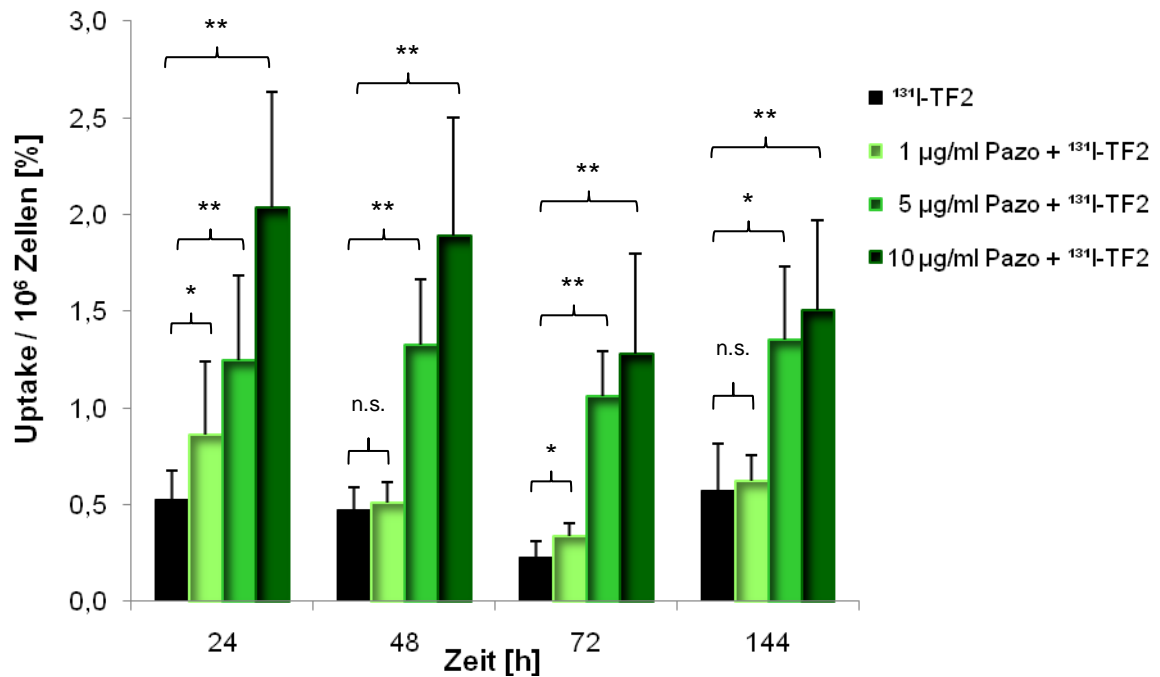
den. Dies entspricht annähernd einer 18-fachen Erhöhung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake. Sehr deutlich ist die Verringerung des Uptake-Wertes für die höchste Pazopanib-Konzentration im Zeitverlauf. Im Untersuchungszeitraum sank die Aufnahme von  $^{131}\text{I}$ -TF2 durch die Zellen unter Beeinflussung von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pazopanib auf unter 2 %, wobei auch nach 144 Stunden eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Ergebnissen ohne zusätzliche Pazopanibgabe vorlag ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 14:** Ausschnittsvergrößerung der Abb. 12 mit Darstellung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake/ $10^6$  Zellen für 1 und 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pazopanib +  $^{131}\text{I}$ -TF2 ( $n = 9$ ). Wiedergegeben sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n.s. nicht signifikant.

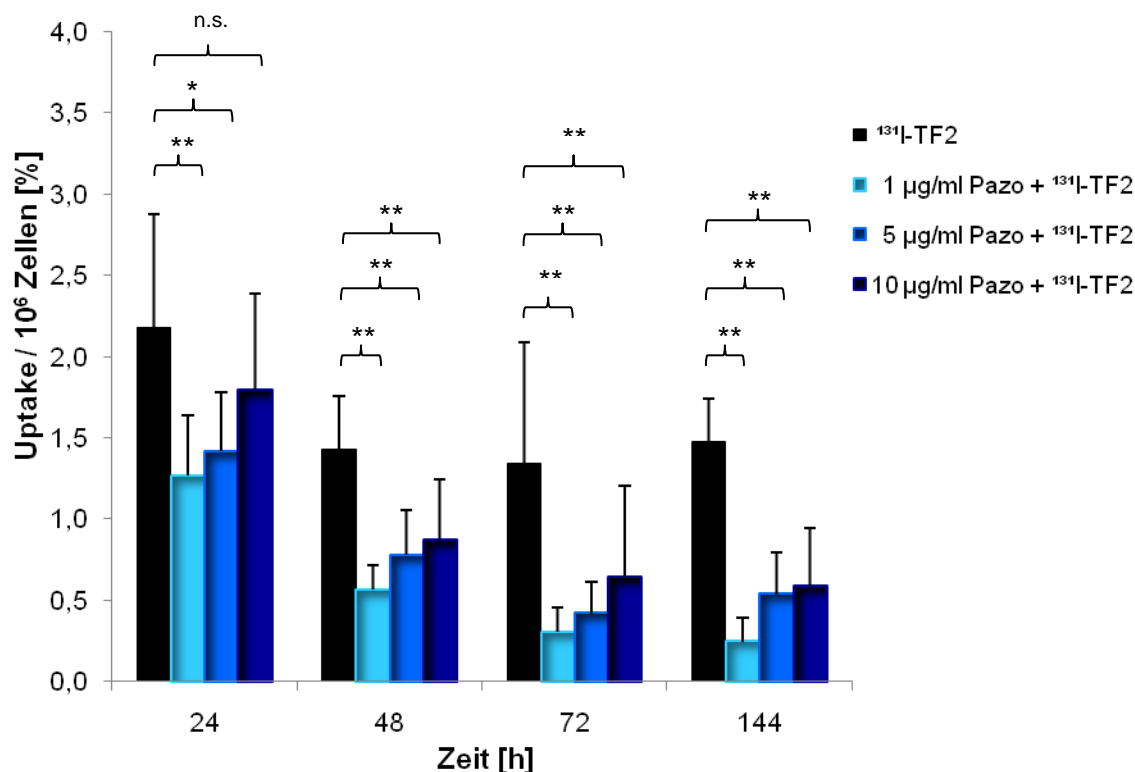
Die Ergebnisse zur Inkubation der SW480-Zellen mit 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pazopanib sowie der Referenzprobe (ausschließliche Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2) werden in der Abb. 14 zur besseren Übersicht vergrößert dargestellt. Es konnte festgestellt werden, dass für die Konzentrationen 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors ebenfalls eine Erhöhung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake im Vergleich zur Referenzprobe stattfand. Dabei konnte für 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Pazopanib ab 48 Stunden zeitabhängig eine signifikante Erhöhung des Uptake nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ). Für die Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors wurden nach 48 und 72 Stunden signifikante Unterschiede beim Uptake des radioiodierten Antikörpers ermittelt werden.





**Abb. 15:**  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake/ $10^6$  Zellen bei Inkubation mit unterschiedlichen Pazopanib-Konzentrationen bei der Zelllinie HT29 (n = 9). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; n.s. nicht signifikant.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Zelllinie SW480 konnte auch bei der Zelllinie HT29 eine relativ klare Konzentrationsabhängigkeit des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake über den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen werden. Vor allem für 5 und 10 µg/ml Pazopanib konnte eine signifikante Erhöhung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake ermittelt werden (p < 0,01). Der höchste  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake für die Pazopanib-Konzentration von 10 µg/ml lag bei annähernd 2 %. Weiterhin sind die Werte für den Uptake nach Inkubation mit 10 µg/ml des Tyrosinkinase-Inhibitors bei den HT29-Zellen über den Untersuchungszeitraum, im Unterschied zu den Ergebnissen bei der Zelllinie SW480, relativ konstant. Die Ergebnisse für die Zellproben, die mit der Konzentration von 5 µg/ml des Tyrosinkinase-Inhibitors inkubiert wurden, näherten sich nach 144 Stunden den  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werten von 10 µg/ml an. Demgegenüber ergaben sich für die Uptake-Werte von 1 µg/ml Pazopanib im Vergleich zur Referenzprobe (ausschließliche Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2) bis auf die Ergebnisse nach 24 und 72 Stunden keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 16:**  $^{131}\text{I-TF2}$ -Uptake/ $10^6$  Zellen bei Inkubation mit unterschiedlichen Pazopanib-Konzentrationen bei der Zelllinie T48 (n = 9). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte sowie die Standardabweichungen. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; n.s. nicht signifikant.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit der Zelllinie T84 sind in Abb. 16 dargestellt. Der Vergleich mit den Abb. 13 und 15 der SW480 und HT29 verdeutlicht das unterschiedliche Verhalten der T84-Zellen bei Inkubation mit Pazopanib. Während bei den anderen beiden Zelllinien der  $^{131}\text{I-TF2}$ -Uptake durch den zugegebenen Tyrosinkinase-Inhibitor erhöht wurde, zeigen die Ergebnisse der T84 eine Verringerung der Uptake-Werte. Die Herabsetzung des Uptake des radioiodierten Antikörpers ist im Untersuchungszeitraum von 24 bis 144 Stunden im Vergleich zur Referenz signifikant (p < 0,01). Eine Ausnahme hierbei bildet der Uptake-Wert für 10  $\mu\text{g/ml}$  Pazopanib zum Messzeitpunkt nach 24 Stunden. Über den Untersuchungszeitraum sinken die Uptake-Werte für die Ansätze mit Pazopanib. Jedoch ließ sich eine Erhöhung des Uptake von  $^{131}\text{I-TF2}$  in Abhängigkeit von der Pazopanib-Konzentration nachweisen.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib auf den durch CEA-vermittelten Uptake des Antikörpers TF2 *in vitro* untersucht, um einen möglichen Beitrag zur Steigerung der Effektivität von Radioimmuntherapie und Radio-Immuno-PET zu leisten. Weiterhin wurde als eine potentielle therapeutische Option die antiproliferative Potenz des Antikörpers sowie von Pazopanib auf CRC-Zelllinien überprüft. In diesem Kapitel werden sowohl die Methodik als auch die Ergebnisse kritisch diskutiert und die Bedeutung für die klinische Routine dargelegt.

### 4.1 Methodik

Zur Erfassung eines veränderten Bindungsverhaltens des Antikörpers TF2 an CEA auf der Zelloberfläche der CRC-Zelllinien wurde in den Versuchen auf die Uptake-Messung von  $^{131}\text{I}$ -TF2 zurückgegriffen, da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die Anreicherung von TF2 weitgehend mit der Anreicherung des Pretargeting-Systems (TF2-IMP-288) übereinstimmt (Meller et al., 2011). Der Uptake ist in der Nuklearmedizin ein wichtiger Parameter zur Quantifizierung der Aufnahme/Anreicherung eines radioaktiven Stoffes in Zellen oder Gewebekompartimenten.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Berechnungsmethode für die jeweiligen  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werte basierte auf den ermittelten Zellzahlen der CRC-Zelllinien. Dabei wurde der Uptake des radioiodierten Antikörpers zu festgelegten Messzeitpunkten (24, 48, 72, 144 Stunden) bestimmt. Mit Hilfe der ermittelten Zellzahlen wurde der Uptake auf  $10^6$  Zellen normiert, wodurch ein Vergleich der Ergebnisse ermöglicht wird. Eine andere Methode wäre die Bestimmung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake bezogen auf den Proteingehalt der untersuchten Zellen (Riemann et al., 2001). Problematisch erscheint indes, dass dieser Parameter nicht mit der Zellzahl gleichgesetzt werden kann, da der zelluläre Proteingehalt zwischen unterschiedlich behandelten Zellen signifikant abweichen kann. Zwar ist diese Methode sehr zeitsparend, jedoch stand für die Untersuchungen in dieser Arbeit die Messung der Aktivität des an CEA gebundenen Antikörpers im Vordergrund. Daneben war auch die Bestimmung der Zellzahl für die Untersuchung antiproliferativer Effekte von TF2 und Pazopanib von Interesse.

Die hier angewandte Methode zur Uptake-Ermittlung von  $^{131}\text{I}$ -TF2 muss jedoch auch kritisch betrachtet werden. Vor allem bei niedrigen Zellzahlen können keine sicheren statistischen Berechnungen durchgeführt werden. Bei kleinen Zellzahlen und den entsprechend niedrigen Impulsraten unter 300 besteht für die Messungen im Bohrloch-

Detektor ein Fehler von  $\pm 10\%$ . Bei den meisten Messungen lagen die Impulsraten jedoch über 1000.

Eine weitere Problematik bei niedrigen Zellzahlen ist die nach dem Waschvorgang zwischen den Zellen verbleibende Restaktivität von  $^{131}\text{I}$ -haltigem Medium im Verhältnis zur absoluten Aktivität.

Bei der Durchsicht der Ergebnisse fielen die abweichenden  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake-Werte nach 24 Stunden unter Inkubation mit  $10\ \mu\text{g/ml}$  Pazopanib bei der Zelllinie SW480 auf (s. Abb. 13). Der 24-Stundenwert mit  $9\ \%/10^6$  Zellen lag im Vergleich zu den anderen Messzeitpunkten weitaus höher ( $3\text{-}2\ \%/10^6$  Zellen). Nach Analyse der Datenreihen ist dieser Uptake-Wert des radioiodierten Antikörpers auf die geringen Zellzahlen zu diesem Untersuchungszeitpunkt zurückzuführen ( $< 40.000$  Zellen/ml). Die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) ist erst für die Zellzählung von mehr als  $10^6\text{-}10^7$  Zellen/ml gesichert. Bei den 24-Stundenwerten konnte diese Voraussetzung nicht immer erfüllt werden. Weiterhin muss die Subjektivität der manuellen Zellzählung im Hämozytometer und somit eine mögliche Abweichung von der tatsächlichen Zellzahl beachtet werden.

Für den Einsatz des radioiodierten Antikörpers TF2 in der nuklearmedizinischen Anwendung ist der  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake als Surrogatmarker für die Anreicherung des Pretargeting-Systems von großer Bedeutung. Es kann allerdings mit dieser Methode keine Aussage getroffen werden, welche Mechanismen auf molekularer Ebene stattfinden. Beispielsweise wäre eine Internalisierung von  $^{131}\text{I}$ -TF2 in die Zellen und eine weitere Verstoffwechslung des Radioimmunkonjugats denkbar. Dies wäre auch für die Bestimmung der zellulär gebundenen Aktivität problematisch, da intrazelluläre Deiodasen die Freisetzung von Iodid verursachen könnten. Gegen diesen Sachverhalt sprechen jedoch die Vorversuche mit dem Pretargeting-System (Meller et al., 2011).

Weitere mechanistische Untersuchungen könnten mit Hilfe von RT-PCR, Western Blot, ELISA oder anderen molekularbiologischen Methoden durchgeführt werden. So könnten gezielte Aussagen getroffen werden, ob sich Pazopanib auf die mRNA-Expression von CEA auswirkt oder ob eine vermehrte Translokation von CEA zugrunde liegt.

Für die Reproduzierbarkeit der ermittelten Uptake-Werte von  $^{131}\text{I}$ -TF2 war die Durchführung regelmäßiger Qualitätskontrollen essentiell. Diese Kontrollen gaben den Nachweis, dass der den Zellen zugesetzte radioaktiv markierte Antikörper bei allen Untersuchungen eine hohe radiochemische Reinheit aufwies (s. Abb. 6).

Das bei unseren *In-vitro*-Studien zur Radioiodierung von TF2 eingesetzte  $^{131}\text{I}$  ist eines der am häufigsten verwendeten Nuklide in der Radioimmuntherapie. Der Vorteil von  $^{131}\text{I}$  liegt neben dem kostengünstigen Anschaffungspreis vor allem in der einfachen und zuverlässigen Markierung mit Hilfe der IODOGEN®-Methode. Daneben erfordert die radioaktive Markierung keine zusätzliche chemische Modifikation des Antikörpers TF2, welche zu einer Beeinflussung der Bindung des Antikörpers an das Zielantigen führen könnte (s. 2.4.2). Somit ist die Radioiodierung von Antikörpern, wie auch Rades et al. zeigen konnten, eine für den klinischen Einsatz geeignete Methode (Rades et al., 2009).  $^{131}\text{I}$  erlaubt durch die gleichzeitige Emission von  $\beta^-$ - und  $\gamma$ -Strahlung ebenfalls die Untersuchung des zytotoxischen Potentials des radioiodierten Antikörpers (Pouget et al., 2011).

## 4.2 Zellkulturen

Um den Einfluss des Tyrosinkinase-Inhibitors auf den Radioiod-Uptake des Antikörpers TF2 zu untersuchen, wurden verschiedene CRC-Zelllinien ausgewählt. Die Selektion der Zelllinien SW480, HT29 und T84 erfolgte unter dem Aspekt einer unterschiedlichen CEA-Produktion, wobei T84 mit 600 ng CEA/ml/10<sup>6</sup> in zehn Tagen im Medium die höchste CEA-Menge exprimiert (ATCC®). Die aus der Literatur bekannten Werte für die CEA-Expression im Medium liegen bei den anderen Zellkulturen deutlich niedriger: SW480: 0,7 ng CEA/ml/10<sup>6</sup>/10 d und HT29: 25 ng CEA/ml/10<sup>6</sup>/10 d im Medium (ATCC®; Fantini et al., 1989). Die angegebenen Werte beziehen sich im Gegensatz zu unseren Messungen auf das nicht zellulär gebundene CEA im Zellmedium, woraus sich die Unterschiede zu unseren Ergebnissen erklären lassen.

Eine wichtige Voraussetzung für den späteren klinischen Einsatz des Antikörpers TF2 ist die spezifische Bindung des Antikörpers an das CEA. Der erfolgte Nachweis der Spezifität des Antikörpers gestattet es, die ermittelten Uptake-Werte mit der Oberflächenexpression von CEA zu korrelieren. Im Rahmen kompetitiver Studien wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit die spezifische Bindung des Antikörpers für alle drei ausgewählten Zelllinien analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Vorinkubation der Zellen mit der fünfzigfachen Menge an kaltem TF2 erwartungsgemäß die Uptake-Werte für alle Zellen auf annähernd 25 Prozent gesenkt werden konnten (s. Abb. 7). Die Spezifität der Antikörperbindung von TF2 wurde somit für den gesamten Untersuchungszeitraum nachgewiesen.

Wie aus den Literaturangaben bereits hervorgeht, konnten wie erwartet bei der Zelllinie T84 nach Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -TF2 die höchsten Uptake-Werte ermittelt werden (Meller et

al., 2011). Die Ergebnisse für den  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake bei SW480 und HT29 unterschieden sich dagegen kaum (s. Abb. 12). Die geringe Differenz der Uptake-Werte zwischen den beiden Zelllinien kann auf die niedrige CEA-Expression der SW480 und HT29 im Vergleich zu den T84-Zellen zurückgeführt werden.

Bereits in früheren *In-vitro*-Studien von Meller et al. mit den Zelllinien SW480, HT29 und T84 konnte durch die Bestimmung des Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2 auf eine quantitative Analyse der CEA-Expression auf der Zelloberfläche dieser Tumorzelllinien zurückgeschlossen werden (Meller et al., 2011). Dabei wurden für die T84-Zellen die höchsten Uptake-Werte bestimmt. Im Vergleich zu den gemessenen Uptake-Werten des iodierten Antikörpers in der vorliegenden Arbeit ( $1,5\ \%/10^6$  Zellen nach 48 und 72 Stunden) zeigte die Zelllinie T84 bei den Untersuchungen von Meller et al. einen höheren  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake von  $10\ \%/10^6$  Zellen nach 48 und 72 Stunden. Die eingesetzte Aktivität von 100 kBq/ml war in beiden Versuchen identisch. Die Differenz der Ergebnisse könnte u. a. durch die unterschiedlichen Zellpassagen erklärt werden. Bei höheren Zellpassagen entdifferenzieren die einzelnen Zelllinien und können veränderte Expressionsmuster auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Für die SW480 und HT29 konnten die niedrigen Uptake-Werte des iodierten TF2 von Meller et al. 2011 bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen dokumentieren weiterhin, dass der Antikörper TF2 bei den *In-vitro*-Untersuchungen keinen Einfluss auf die Zellproliferation aufwies (s. Abb. 7). So wurde die Zellproliferation von SW480, HT29 und T84 weder bei Inkubation mit dem markierten Antikörper noch bei großen Mengen von TF2 gehemmt (siehe auch Meller et al., 2011). Es sollte jedoch beachtet werden, dass für den Effekt des radioiodierten Antikörpers auf die Zellproliferation nur eine Aussage innerhalb der in den *In-vitro*-Versuchen eingesetzten Aktivität (100 kBq/ml) getroffen werden kann. Die im Rahmen therapeutischer Untersuchungen eingesetzten Aktivitäten liegen deutlich höher. Daneben muss angemerkt werden, dass *in vivo* u. a. durch den Crossfire-Effekt viel höhere Strahlendosen im Tumorgewebe erreicht und benachbarte Tumorzellen geschädigt werden könnten. Demzufolge ist bei Zugabe einer höheren Aktivität eine Hemmung der Zellproliferation durch  $^{131}\text{I}$ -TF2 durchaus wahrscheinlich.

### 4.3 Zytotoxische Potenz von Pazopanib

In der vorliegenden Arbeit konnte für Pazopanib sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ein antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden. Dabei wurde das Zellwachstum nach 144 Stunden teilweise auf unter 50 % gehemmt (s. Abb. 9 bis 11).

Pazopanib gehört zu den Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren und wird vor allem durch seine Hemmung der Neovaskulogenese unter anderem bereits beim metastasierten Nierenzellkarzinom eingesetzt (Pick und Nystrom, 2012). Neben seiner antiangiogenen Wirkungsweise wird jedoch die antiproliferative Potenz von Pazopanib auf Tumorzellen in der Literatur stark kontrovers diskutiert. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten Craveiro et al. 2014 bei verschiedenen Medulloblastom-Zelllinien unter Einfluss von Pazopanib eine konzentrationsabhängig verstärkte Proliferationshemmung sowie eine proapoptotische Tendenz feststellen. Daneben konnte die Forschungsgruppe in weiterführenden *In-vivo*-Experimenten mit menschlichen Medulloblastom-Xenotransplanten in Mäusemodellen für Pazopanib und Sorafenib eine antineoplastische Wirkung nachweisen (Craveiro et al., 2014). Ebenfalls bestätigte Paesler et al. mit Hilfe von Apoptose-Assays bei einer Zelllinie der chronisch lymphatischen Leukämie eine dosisabhängige Steigerung der Apoptose nach Inkubation mit Pazopanib (Paesler et al., 2010). Demgegenüber stehen die Untersuchungen von Canter et al., die für Pazopanib im Vergleich zu Sunitinib keine proapoptotischen Eigenschaften für verschiedene Zelllinien des Nierenzellkarzinoms (RCC-Zelllinien) nachwiesen. Pazopanib wirkte bei den durchgeführten *In-vitro*-Untersuchungen zwar zytostatisch, ein zytotoxischer Effekt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Canter et al., 2011). Shablak et al. beschrieben für RCC-Zelllinien andererseits eine signifikant gesteigerte Apoptoserate unter Einfluss von Pazopanib (Shablak et al., 2014).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse liegt in den für die einzelnen Studien eingesetzten Methoden zur Erfassung der Zellproliferation. Während in der vorliegenden Arbeit die Zellzahlen mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt wurden, erfolgte die Bestimmung in anderen Studien u. a. mit Hilfe von Zellproliferations-Assays (Craveiro et al., 2014). Weiterhin kamen zur Klärung der antiproliferativen/proapoptotischen Wirkung von Pazopanib in den Experimenten anderer Forschungsgruppen verschiedene Apoptose-Assays, durchflusszytometrische Zellanalysen oder der CellTiter-Blue-Zellviabilitäts-Assay zum Einsatz (Paesler et al., 2010; Canter et al., 2011). Daneben unterscheiden sich die Untersuchungszeiträume der einzelnen Studien. Während in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Pazopanib über einen Zeitraum von 114 Stunden beobachtet wurde, waren die Untersuchungszeiträume in den anderen Studien mit maximal 72 Stunden wesentlich kürzer. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen von Pazopanib lagen, bis auf die Untersuchungen von Paesler et al., im ähnlichen Bereich (zwischen 5 und 10 µg/ml Pazopanib).

Ein Anhaltspunkt für die Hemmung der Zellproliferation durch einen Inhibitor des VEGF-Rezeptors ist der Nachweis einer dysregulierten und gesteigerten Signalaktivität

von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) bei malignen Erkrankungen. Ursachen für diese pathologisch konstitutive Aktivierung der RTKs sind u. a. Genamplifikationen sowie eine durch autokrine bzw. parakrine Signalschleifen bedingte gesteigerte Expression der RTKs in Tumorzellen. Durch die Daueraktivierung der RTKs sind die Tumorzellen für Wachstumsfaktoren empfänglicher (Zwick et al., 2002). Masood et al. konnte nachweisen, dass VEGF u. a. für Tumorzelllinien von Ovar, Pankreas, Melanom und Kaposi-Sarkom als autokriner Wachstumsfaktor fungiert. Nach Inkubation der Zellen mit VEGF-Antisense-Oligonukleotiden und VEGFR-Antikörpern war eine verminderte Zellviabilität nachweisbar (Masood et al., 2001). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Kim et al. für CRC-Zelllinien (u. a. auch für die in dieser Arbeit einbezogene Zelllinie HT29), wonach ein über VEGF/VEGFR-2 vermittelter autokriner Wachstumspfad auftritt. Durch Einsatz eines Anti-VEGFR-2-Antikörper konnte das Zellwachstum signifikant gesenkt werden (Kim et al., 2005). Eine Bestätigung der in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse geben Samuel et al. 2011 bei Untersuchungen mit homozygotem Verlust des VEGF-Allels in CRC-Zelllinien. Ohne die Expression von VEGF kam es zu einer signifikanten Verminderung des Zellwachstums sowie einer gesteigerten Apoptoserate, die unter Zugabe des Zytostatikums 5-Fluorouracil zusätzlich gesteigert werden konnte (Samuel et al., 2011). Unsere Untersuchungsergebnisse und die Auswertung der Literatur gestatten deshalb die Hypothese, dass eine Hemmung des VEGF/VEGFR-Signalweges durch den hier verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitor Pazopanib einen Einfluss auf die Tumorzellproliferation hat.

#### **4.4 Unterschiede der antiproliferativen Potenz von Pazopanib bei den eingesetzten Zelllinien**

Obwohl Pazopanib in allen drei Zelllinien einen antiproliferativen Effekt auf das Zellwachstum vermittelt, ist das Ausmaß der Zellproliferationshemmung nach Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor für die einzelnen Zelllinien unterschiedlich. Während bei den SW480 eine eindeutige Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit im Untersuchungszeitraum festgestellt werden konnte, induzierte Pazopanib bei der Zelllinie HT29 nach 144 Stunden eine Hemmung der Proliferation unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors. Für die T84 wurde nach 144 Stunden erst ab einer Konzentration von 5 µg/ml ein signifikanter antiproliferativer Effekt ermittelt. Diese zellspezifischen Unterschiede der antiproliferativen Wirkung von Pazopanib könnten durch das unterschiedliche Expressionsmuster der VEGF-Rezeptoren bei den einzelnen Zelllinien erklärt werden. Die in der Literatur diskutierten Ergebnisse über die



VEGFR-Expressionsmuster der jeweiligen Zellkulturen sind jedoch nicht eindeutig und teilweise widersprüchlich.

Fan et al. konnte mit Hilfe von RT-PCR, Western Blot und ELISA für die SW480 die Expression von VEGFR-1 nachweisen, wobei die Ergebnisse für VEGFR-2 und 3 negativ waren (Fan et al., 2005). Dagegen detektierte die Forschergruppe um Morelli et al. neben VEGFR-1 zusätzlich durch RT-PCR und Western Blot das Vorhandensein von VEGFR-3 auf der Zelloberfläche der SW480 (Morelli et al., 2009). Demgegenüber wurde 2010 von Nakatani et al. bei RT-PCR-Analysen auf den Zellen VEGF-Rezeptor-Typen 1 und 2, jedoch nicht Typ 3 nachgewiesen (Nakatani et al., 2010). Diese Ergebnisse lassen bezüglich der genauen Expression von VEGF-Rezeptoren bei der Zelllinie SW480 leider keine allgemeingültige Aussage zu.

Ähnlich wie für SW480 können auch für die Zelllinie HT29 keine eindeutigen Angaben hinsichtlich der Expression der VEGF-Rezeptor-Typen getroffen werden. Während Fan et al. auf der Zelloberfläche der HT29 nur den VEGFR-1 nachwies, konnte die Forschungsgruppe um Kim et al. mit Hilfe der gleichen diagnostischen Methoden (RT-PCR) bei der CRC-Zelllinie VEGFR-2 dokumentieren (Fan et al., 2005; Kim et al., 2005). Übereinstimmend mit den Versuchen in der vorliegenden Arbeit wurde angenommen, dass die antiproliferative Wirkung von Pazopanib, unabhängig von der Konzentration, durch die Inhibierung der Tyrosinkinase des VEGFR-2 erfolgte.

Im Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Zelllinien ist die aktuelle Literaturlage zur Expression der VEGF-Rezeptoren bei der Zelllinie T84 eher gering. Einzig die Analysen von Estevez-Garcia über genetische Polymorphismen von VEGFR und PDGFR  $\alpha$  und  $\beta$  lassen auf die Expression des VEGF-Rezeptors Typ 2 auf der Zelloberfläche der T84 schließen (Estevez-Garcia et al., 2012).

Neben den VEGF-Rezeptoren 1-3 hemmt Pazopanib als hochselektiver und potenter Inhibitor auch die Rezeptor-Tyrosinkinasen PDGFR  $\alpha/\beta$  und c-Kit, welche ebenfalls für die Pathogenese und Metastasierung von Tumorerkrankungen von Bedeutung sind (Schutz et al., 2011). Es kann somit vermutet werden, dass die unterschiedlichen zellspezifischen Effekte von Pazopanib aufgrund der Expression anderer RTKs auf der Zelloberfläche der eingesetzten Zelllinien vermittelt werden. Dies bestätigen beispielsweise für die Zelllinie SW480 die Untersuchungen von Kaulfuß et al. Die Forschungsgruppe konnte mit Hilfe der RT-PCR eine hohe Expression des PDGF-Rezeptors  $\beta$  bei den SW480-Zellen nachweisen. Bei Blockade des Rezeptors durch den für PDGFR- $\beta$

spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor Ki11502 konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation beobachtet werden (Kaulfuss et al., 2013).

Zur genauen Verifizierung des Expressionsmusters der verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen auf den drei untersuchten Zelllinien sollte mit Hilfe von molekularbiologischen Untersuchungen eine Identifikation und Quantifizierung der jeweiligen RTKs erfolgen.

Da Pazopanib als Multitarget-Tyrosinkinase-Inhibitor die Aktivität von verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen hemmt, kann vermutet werden, dass Pazopanib durch seine kumulative Aktivität über verschiedene Zellrezeptoren einen messbaren Einfluss auf die Zellproliferation hat. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Hemmung mehrerer Rezeptor-Tyrosinkinasen effektiver erscheint als die alleinige Blockade eines Rezeptors (Kaulfuss et al., 2009; Falchook et al., 2013).

Neben der Quantität der exprimierten Rezeptor-Tyrosinkinasen spielt möglicherweise auch der Typ des VEGF-Rezeptors eine Rolle. Die höchste Potenz von Pazopanib konnte in zellfreien *In-vitro*-Assays für VEGFR-1 bestimmt werden, gefolgt von den VEGF-Rezeptoren 2 und 3 sowie der PDGF-Rezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (Kumar et al., 2007). Es bedürfte hiermit weiterer Untersuchungen beispielsweise mit Hilfe Rezeptor-phosphorylierungs-Assays, um zu ermitteln durch welche Rezeptor-Tyrosinkinasen Pazopanib die Zellproliferation beeinflusst. Dies ist auch für spätere Anwendungen am Patienten wünschenswert, da durch die Charakterisierung des Rezeptor-Status in Tumorproben ein Therapieansprechen durch Pazopanib abgeleitet werden könnte. Da die Entwicklung in der Onkologie immer weiter in Richtung personalisierter Therapie voranschreitet, könnte dies eine sinnvolle Ergänzung für individuelle Behandlungsansätze sein.

Eine weitere Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse zur Zellproliferation unter Inkubation mit Pazopanib bei den einzelnen Zelllinien liegt in den intrazellulären Signalkaskaden (z. B. Erk-1/2 oder SAPK/JNK). Diese den Rezeptor-Tyrosinkinasen nachgeschalteten Signalkaskaden sind oft in unterschiedlichem Ausmaß bei den verschiedenen Zellkulturen und Tumoren in wichtige zellspezifische Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration integriert. Daneben könnten auch Mutationen dieser Signaltransduktionswege bei den einzelnen Tumorzelllinien vorliegen und ein unterschiedliches Ansprechen auf Pazopanib bedingen.

Die ermittelten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der antiproliferativen Wirkung sind vielversprechend. Jedoch muss aufgezeigt werden, dass die hier durchge-

führten Experimente im Rahmen eines Zellmodells erfolgten. Die vornehmlich hemmende Wirkung von Pazopanib auf die Blutgefäße eines Tumors konnte *in vitro* nicht dargestellt werden. Daher sollte in einem nächsten Schritt im Mausmodell die Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors *in vivo* getestet werden. Es konnte bereits von Kumar et al. geprüft werden, dass Pazopanib durch seine zusätzliche antiangiogene Wirkung im Rahmen der Neovaskulogenese auch *in vivo* erfolgversprechende Ergebnisse bei verschiedenen Tumoren (u. a. für HT29-Xenotransplantate) aufweist (Podar et al., 2006; Kumar et al., 2007).

## 4.5 Anwendung von Pazopanib in der CEA-vermittelten Radioimmuntherapie

In der Vergangenheit zeigten zahlreiche Studien einen möglichen Zusammenhang zwischen VEGF und einem weiteren Mitglied der CEACAM-Familie: CEACAM1 auf (Kuespert et al., 2006; Beauchemin und Arabzadeh, 2013). Ergun et al. wiesen u. a. für CEACAM1 eine wichtige Funktion für VEGF-vermittelte angiogenetische Schritte wie Zellproliferation, Chemotaxis und die Neubildung von Kapillaren nach (Ergun et al., 2000). Ebenfalls konnte für einige der CEACAMs (CEACAM1, 3 und 6) eine Assoziation mit Tyrosinkinase-Aktivitäten in menschlichen Neutrophilen bestätigt werden, was wiederum eine funktionale Bedeutung in den Zellen haben könnte (Keith et al., 1995). Dementsprechend scheint auch ein möglicher Crosstalk zwischen VEGF und CEA/CEACAM5, einem anderen Vertreter der CEACAMs, denkbar. Bisher waren zu diesem Sachverhalt keine Daten verfügbar.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten wir erstmalig Ergebnisse für ein verändertes Bindungsverhalten eines gegen CEA-gerichteten Antikörper unter Zusatz des VEGFR-Inhibitors Pazopanib nachweisen. Bei zwei von drei untersuchten Zelllinien fanden wir einen gesteigerten Uptake des iodierten Antikörpers TF2 durch die Inkubation mit Pazopanib. Dieser Effekt war abhängig von der eingesetzten Konzentration des Tyrosinkinase-Inhibitors (s. Abb. 13-16).

Eine mögliche Erklärung für den gesteigerten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake ist eine verstärkte CEA-Expression unter Pazopanib-Therapie. Neben der Gabe von antitumoralen Substanzen kann beispielsweise auch eine Radiatio den Uptake in Tumorzellen erhöhen. So beschrieben Rades et al. eine Steigerung des  $^{131}\text{I}$ -Uptake des gegen EGFR-gerichteten Antikörpers Cetuximab in Tumorzellen bei gleichzeitiger externer Radiatio (Rades et al., 2009). Eine andere Forschergruppe wies nach, dass bei Schilddrüsenzellen nach externer Bestrahlung der Radioiod-Uptake signifikant erhöht werden konnte. Als eine

mögliche Begründung wurde die Aktivierung verschiedener zellulärer Transportmechanismen aufgeführt (Meller et al., 2006). Ebenfalls konnte diese Arbeitsgruppe bereits in Versuchen mit CRC-Zelllinien einen gesteigerten Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2 nach externer Radiatio feststellen (Meller et al., 2011). Weiterhin sind in der Literatur verschiedene Studien beschrieben, in denen eine Erhöhung der CEA mRNA-Expression nach Exposition der Zellen mit Zytostatika (z. B. 5-Fluorouracil, Docetaxel), Zytokinen und Proteinkinase-Inhibitoren, wie Staurosporin, nachweisbar war (Ohtsukasa et al., 2003; Aquino et al., 2004).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass durch exogene Einflüsse wie beispielsweise Radiatio, Chemotherapeutika oder sonstige zytotoxisch und genotoxisch wirkende Substanzen die Zelle in eine Art „Stresszustand“ versetzt wird und mit einer gesteigerten Expression oder Translokation bestimmter Rezeptoren und Transporter reagiert.

Bei Tumoren könnte die vermehrte Expression von Antigenen auf der Zellmembran u. a. in der Radioimmundiagnostik und -therapie ausgenutzt werden. Häufig vermindert eine geringe sowie heterogene Expression der Antigene im Tumorgewebe die Effektivität der Verfahren. Durch Strategien zur Steigerung der CEA-Expression – wie die Gabe des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pazopanib – könnte die Sensitivität und Effektivität von diagnostischen und therapeutischen Ansätzen verbessert werden. Dazu inhaltlich passend beschrieben Pouget et al. in einer Veröffentlichung, dass der radioaktive Uptake in Tumorgeweben unter anderem neben der Immunaktivität und Spezifität des Antiköpers vor allem auch von der Anzahl der Oberflächenantigene auf der Tumorzelle abhängt (Pouget et al., 2011).

Da sich der Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2 nach Inkubation mit Pazopanib bei den drei hier untersuchten Zelllinien unterscheidet, kann man weiterhin annehmen, dass dies mit verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden innerhalb der Zellen zusammenhängt. Es ist bekannt, dass durch die Aktivierung des VEGF/VEGFR-Signalweges eine Reihe nachgeschalteter intrazellulärer Signalwege beeinflusst werden, wie beispielsweise PI3Kinase/Akt, Ras/Erk1/2 und PKC $\gamma$ , um somit u. a. auch die Genexpression im Nukleus zu regulieren (Hamberg et al., 2010). Durch die Hemmung der Rezeptor-Tyrosinkinase mit Pazopanib könnte ein anderer Signalweg, der bei normaler Funktion des VEGF-Rezeptors unterdrückt wird, für eine gesteigerte Expression bestimmter Gene (z. B. für CEACAM5/CEA) verantwortlich sein. Es lässt sich daher nur vermuten, dass die Zelllinie T84 nicht über einen Signalweg verfügt, welcher bei den SW480 und HT29 durch den von Pazopanib induzierten „Stress“ eine höhere Expression von CEA

an der Zelloberfläche bedingt. Es bleibt daher Gegenstand weiterführender Forschung, genauere Analysen zu möglichen Mechanismen innerhalb der Zelllinien durchzuführen.

Eine andere Hypothese betrifft die gesteigerte CEA/CEACAM5-Expression zur Kompensation der von Pazopanib induzierten Inhibition von CEACAM1, um die interzelluläre Interaktion aufrecht zu erhalten. Für CEACAM1 belegen zahlreiche Studien eine Interaktion zu VEGF/VEGFR, wobei u. a. eine Wechselwirkung zwischen CEACAM1 und VEGFR-3 nachgewiesen werden konnte (Kilic et al., 2007). Eine Hemmung des VEGF-Rezeptors durch Pazopanib könnte folglich zu einer CEACAM1-Inhibition führen. Die Familie der CEACAMs ist vor allem für Zell-Zell-Kontakte essentiell. So wurde u. a. für CEACAM5 eine heterophile Interaktion mit CEACAM1 beschrieben (Zheng et al., 2011). Man könnte demnach vermuten, dass durch die von Pazopanib induzierte Hemmung von CEACAM1 die Tumorzellen mit einer gesteigerten CEACAM5-Expression reagieren, um die wichtige interzelluläre Kommunikation aufrecht zu erhalten. Bei der Zelllinie T84 scheint dieser Effekt aufgrund der hohen Expression von CEACAM5 keine Rolle zu spielen, da im Gegensatz zu den SW480 und HT29 keine Erhöhung des  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake unter Pazopanib-Gabe nachgewiesen wurde. Die anti-proliferative Wirkung des Tyrosinkinase-Inhibitors auf die Zellen könnte ebenfalls für diese Hypothese sprechen. Da die interzellulären Kontakte für die Zellen eine überlebenswichtige Funktion haben, würde eine Hemmung von CEACAM1 durch Pazopanib ein proapoptotisches Signal durch verminderte Zell-Zell-Kontakte bedeuten. Es erscheint daher wünschenswert, weitergehende Studien zu dieser möglichen Interaktion durchzuführen und z. B. die CEACAM1-Expression unter Pazopanib näher zu untersuchen.

## 4.6 Multimodale Therapie und Diagnostik

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pazopanib *in vitro* neben der Hemmung der Proliferation von CRC-Zelllinien auch eine positive Wirkung auf den Uptake des gegen CEA-gerichteten radioaktiv markierten Antikörpers TF2 bei Tumorzellen hat. Dieser Umstand könnte im Rahmen von Radioimmundiagnostik und -therapie durch die gesteigerte Expression von Zielantigenen genutzt werden.

Durch die Entwicklung immer komplexerer Therapiestrategien mit neuen Medikamenten und molekular zielgerichteten Therapeutika ist der Bedarf an sensitiver und spezifischer Bildgebung gewachsen. Konventionelle Bildgebungsmethoden wie CT, MRT, Sonografie oder auch PET/CT mit unspezifischen Tracern wie FDG sind dem nicht mehr gewachsen. Als neues zielgerichtetes nuklearmedizinisches Bildgebungsverfahren

ren kann die Immuno-PET durch Detektierung von Tumor-Biomarkern geeignete Patienten auswählen (Screening) und eine Vorhersage eines Therapieansprechens geben. Im Rahmen der Immuno-PET wird auch das innovative Pretargeting-Verfahren in klinischen Studien für den Einsatz in der Radioimmundiagnostik geprüft (vgl. Kapitel 1.6). Untersuchungen von Schoffelen et al. zeigten, dass die Immuno-PET mit Hilfe des Pretargeting-Verfahrens TF2 + IMP-288 und kurzlebiger Radionuklide ( $^{68}\text{Ga}$  und  $^{18}\text{F}$ ) Tumor-Xenotransplantate in Mäusen spezifischer detektierte als die  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (Schoffelen et al., 2010a). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Forschungsgruppe um McBride et al. bei Vergleich von Pretargeting-Immuno-PET und  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET (McBride et al., 2006).

Die aus unseren Versuchen erbrachten Erkenntnisse zeigen ein aussichtsreiches Potential für eine verbesserte Detektion von Tumorzellen durch das Pretargeting-System TF2 + IMP-288. Meller et al. wiesen für die Zelllinien SW480, HT29 und T84 nach 4 und 72 Stunden einen höheren Uptake des Pretargeting-Systems an den Zellen nach als im Vergleich zum Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2. Somit ist zu untersuchen, welche Wirkung Pazopanib auf den Uptake des Pretargeting-Systems TF2 + IMP-288 hat und ob die Ergebnisse durch Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor verbessert werden. Bei der Radioimmuno-PET mit z. B.  $^{68}\text{Ga}$ -IMP-288 könnte eine Kombination mit Pazopanib zu einer höheren Bildqualität führen und sollte in zukünftigen Versuchen *in vivo* im Mausmodell näher überprüft werden.

Durch eine vorherige Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor kann weiterhin die Expression des Zielantigens CEA für die Immuno-PET und somit der radioaktive Uptake im Tumor erhöht werden, welches eine Verbesserung des Hintergrundverhältnisses („background ratio“) zur Folge hätte. Die Steigerung der Sensitivität der Bildgebungsverfahren ist beispielsweise für Mikrometastasen von großer Bedeutung. Diese sind häufig nur schwer zu detektieren, bestimmen aber maßgeblich das Therapievergehen und die Prognose des Patienten. Diesbezüglich sollten weitergehende Studien durchgeführt werden, um den Einfluss von Pazopanib im Rahmen der Radioimmundiagnostik zu verifizieren.

Neben der Radioimmundiagnostik könnte Pazopanib auch in der Radioimmuntherapie zum Einsatz kommen. Durch eine gesteigerte Expression von Zielantigenen steht eine höhere Anzahl an Bindungsstellen für Radiopharmaka zur Verfügung, wodurch mehr Strahlung im Tumorgewebe abgegeben und höhere Herddosen erreicht werden können. Wie bereits unter Punkt 1.5 beschrieben, zeichnen sich gerade große Tumormassen durch inhomogene Antigenexpression und erhöhte Strahlenresistenz aus. Sie sind

somit schwer mit Hilfe der konventionellen Radioimmuntherapie zu behandeln. Eine Lösung bietet das bereits in der Radioimmundiagnostik entwickelte Pretargeting-Verfahren, um höhere Aktivitäten im Tumorgewebe zu erreichen. Eine therapeutische Option wäre die Kopplung therapeutischer betastrahlender Radionuklide, wie  $^{90}\text{Y}$  oder  $^{177}\text{Lu}$ , an das Hapten IMP-288, welches mit dem gegen CEA-gerichteten Antikörper TF2 ein aussichtsreiches Pretargeting-Verfahren darstellt. Ein mögliches Therapiekonzept mit Vorbehandlung des Patienten mit Pazopanib und anschließender Radioimmuntherapie sollte in weiteren Studien genauer betrachtet werden.

Außerdem sollte in weiterführenden Untersuchungen eine Kombination von Pazopanib und anderen gegen CEA/CEACAM5 gerichteten Antikörper in ihrer Wirkung auf die Zellviabilität getestet werden. In der Literatur sind bereits Anti-CEA-Antikörper in Bezug auf ihre inhibierende Wirkung auf Tumorzellen bekannt (Sharkey et al., 1995; Zheng et al., 2011). Somit wäre ein Synergieeffekt der zytotoxischen Wirkung bei Kombinationstherapie mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor möglich.

Eine weitere Option zur Verbesserung der Effektivität der Radioimmuntherapie (RIT) ist die Kombination mit Stoffen, welche die Mikroumgebung des Tumors beeinflussen, wie beispielsweise antiangiogenetischen Substanzen. Dies erscheint sinnvoll, da die Blutgefäße innerhalb der Tumore durch das schnelle Wachstum sehr heterogen und chaotisch aufgebaut sind, wodurch eine inadäquate Verteilung der Radiopharmaka resultiert. Kraeber-Bodere et al. konnten nachweisen, dass nach Vorbehandlung mit Bevacizumab die Effizienz einer gegen CEA-vermittelten Radioimmuntherapie bei medullärem Schilddrüsenkarzinom gesteigert wurde (Kraeber-Bodere et al., 2010). Andererseits konnte die Forschergruppe um Heskamp et al. dokumentieren, dass nach einer quantitativen SPECT/CT der Uptake von Cetuximab und anderen mit  $^{111}\text{In}$  markierten Antikörpern nach Bevacizumab-Therapie reduziert wurde (Heskamp et al., 2013). Weitere Studien über eine Kombination von RIT und anderen Angiogeneseinhibitoren erbrachten ebenfalls kontroverse Resultate, woraus ersichtlich wird, dass komplexe Wechselwirkungen bei einer Kombinationstherapie eine Rolle spielen. Beispielsweise zerstören antiangiogenetische Substanzen die Tumorblutgefäße, wodurch die Radiopharmaka nicht mehr in das Tumorgewebe gelangen können. Demgegenüber normalisieren die antiangiogenetischen Medikamente die chaotische und teilweise insuffiziente Blutgefäßversorgung des Tumors, was wiederum zu einer erhöhten Abgabe der radioaktiven Substanzen in den Tumor führt (Jain et al., 2013). Somit sollte eine vorsichtige Dosierung und Planung bei Gabe von antiangiogenetischen Substanzen im Rahmen der Radioimmuntherapie erfolgen. Die Ergebnisse von Rajkumar zeigen, dass die Biodistribution von radioaktiv markierten Anti-CEA-Antikörpern in Mäusemodellen mit kolo-

rektalem Adenokarzinom durch Zugabe des PDGFR-Inhibitor Imatinib gesteigert werden konnte. Dieser Effekt ist jedoch abhängig von der jeweiligen Gefäßarchitektur der Tumormodelle (Rajkumar et al., 2012). So sollte Pazopanib neben der Erhöhung des Uptake von Radiopharmaka auch als ein Vertreter neuerer zielgerichteter antiangiogener Substanzen in weiteren *In-vivo*-Modellen auf seine Auswirkung auf die Biodistribution von Radiopharmaka getestet werden.

Die Anwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren im Rahmen klinischer Studien erscheint allerdings auch problematisch, da eine erhöhte CEA-Expression nach Pazopanib-Gabe zu einer Fehlinterpretation des therapeutischen Ansprechens führen könnte. Die Kontrolle des Tumormarkers CEA ist dann nicht mehr aussagekräftig und initiiert eventuell falsche Schlussfolgerungen.

Als Fazit lässt sich schlussfolgern, dass durch die aufgezeigte Zytotoxizität von Pazopanib auf CRC-Zelllinien eine Beeinflussung der Antikörperbindung von TF2 an CEA/CEACAM5 nachweisbar ist. Zur Bestätigung der Hypothese wären weiterführende molekularbiologischen Untersuchungen (z. B: RT-PCR, Western Blot) zur genauen Spezifizierung der Wechselwirkung zwischen CEA und dem VEGF/VEGFR-System notwendig. Daneben stellen multimodale Therapieansätze wie beispielsweise die Kombinationen von Radioimmuntherapie und Tyrosinkinase-Inhibitoren eine sinnvolle Erweiterung der bisherigen Therapiemöglichkeiten dar.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das kolorektale Karzinom (CRC) gehört zu den häufigsten Malignomerkrankungen in Deutschland. Vor allem bei vorliegender Metastasierung ist eine Therapie bisher kaum erfolgreich. Hier spielen zunehmend multimodale und individualisierte Behandlungsansätze eine wesentliche Rolle. Als Zielstrukturen für neue antitumorale Diagnostik- und Therapiemethoden werden das Carcinoembryonale Antigen (CEA) und der Wachstumsfaktor VEGF diskutiert, da beide Moleküle für das kolorektale Karzinom im Rahmen der Pathogenese dieser Tumorerkrankung eine große Bedeutung haben. So wurde die CEA/CEACAM5-vermittelte Radioimmuntherapie als nuklearmedizinischer Ansatz aussichtsreich in klinischen Studien getestet und könnte nach R0-Resektion von Lebermetastasen eine sinnvolle Therapieoption darstellen. Daneben werden bereits seit einigen Jahren vielfältige VEGF/VEGFR-inhibierende Wirkstoffe, wie z. B. Multi-Tyrosinkinase-Inhibitoren, in der Onkologie mit Erfolg angewandt. Ihre Wirkung in der Therapie kolorektaler Karzinome konnte bislang nicht eindeutig belegt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob für eine CEA-vermittelte Radioimmundiagnostik und -therapie die Kombination mit Tyrosinkinase-Inhibitoren sinnvoll sein könnte.

Hierfür wurde zunächst der bispezifische, gegen CEA-gerichtete Antikörper TF2 radioaktiv mit  $^{131}\text{I}$  markiert und die Spezifität des Antikörpers überprüft. In Hinblick auf die Realisierung eines multimodalen Therapiekonzeptes wurde anschließend in den *In-vitro*-Studien der Einfluss verschiedener Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors Pazopanib auf die Bindung von  $^{131}\text{I}$ -TF2 bei drei unterschiedlich CEA-produzierenden CRC-Zelllinien analysiert. Parallel wurde die Zellproliferation nach Inkubation mit TF2 und verschiedenen Pazopanib-Konzentrationen näher untersucht.

$^{131}\text{I}$ -TF2 ließ sich in hoher Ausbeute und radiochemischer Reinheit herstellen. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit Hilfe von kompetitiven Studien in allen drei Zelllinien bewiesen. Bei der Bestimmung des Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2 konnte die unterschiedliche CEA-Expression der Zellen nachgewiesen werden. Die zusätzliche Behandlung mit Pazopanib führte konzentrationsabhängig zu einem signifikant gesteigerten  $^{131}\text{I}$ -TF2-Uptake in zwei der drei Zelllinien. TF2 hatte sowohl markiert als auch in hohen Mengen keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Die *In-vitro*-Untersuchungen verdeutlichen bei Pazopanib eine konzentrationsabhängige antiproliferative Potenz für alle Zelllinien.

Die erhaltenen Ergebnisse gestatten die Schlussfolgerung, dass mit Hilfe von Tyrosinkinase-Inhibitoren der Uptake von  $^{131}\text{I}$ -TF2 bei kolorektalen Tumorzellen erhöht werden

kann. Dieser Effekt scheint vielversprechend für die Steigerung der Effizienz und Sensitivität u. a. der Radioimmuntherapie und der Radio-Immuno-PET. Dies sollte jedoch in einem nächsten Schritt in *In-vivo*-Studien bestätigt werden. Ebenso sollte die Hypothese der erhöhten CEACAM5-Expression zur Kompensation der CEACAM1-Inhibition für die Aufrechterhaltung der interzellulären Interaktion näher untersucht werden.

Durch den nachgewiesenen antiproliferativen Effekt von Pazopanib auf CRC-Zelllinien könnte der Tyrosinkinase-Inhibitor das multimodale Therapieregime für das kolorektale Adenokarzinom ergänzen. In anschließenden Studien sollten Zellkulturen anderer Tumore mit bekannt erhöhter CEA-Expression analysiert werden, um eine Übertragbarkeit der hier erlangten Ergebnisse auf andere Tumorentitäten zu verifizieren.

## 6 Literaturverzeichnis

**Agrawal M, Garg RJ, Cortes J, Quintás-Cardama A (2010)** Tyrosine kinase inhibitors: the first decade. *Curr Hematol Malig Rep* 5(2):70–80.

**Ahluwalia A, Jones MK, Szabo S, Tarnawski AS (2013)** Aberrant, ectopic expression of VEGF and VEGF receptors 1 and 2 in malignant colonic epithelial cells. Implications for these cells growth via an autocrine mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 437(4):515–520.

**Aquino A, Formica V, Prete SP, Correale PP, Massara MC, Turriziani M, Vecchis L de, Bonmassar E (2004)** Drug-induced increase of carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Pharmacol Res* 49(5):383–396.

**Beauchemin N, Arabzadeh A (2013)** Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 32(3-4):643–671.

**Behr TM, Salib AL, Liersch T, Behe M, Angerstein C, Blumenthal RD, Fayyazi A, Sharkey RM, Ringe B, Becker H, Wormann B, Hiddemann W, Goldenberg DM, Becker W (1999)** Radioimmunotherapy of small volume disease of colorectal cancer metastatic to the liver: preclinical evaluation in comparison to standard chemotherapy and initial results of a phase I clinical study. *Clin Cancer Res* 5(10 Suppl):3232s-3242s.

**Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP (1989)** Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57(2):327–334.

**Bennouna J, Deslandres M, Senellart H, Labareyre C de, Ruiz-Soto R, Wixon C, Botbyl J, Suttle AB, Delord J (2015)** A phase I open-label study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of pazopanib in combination with irinotecan and cetuximab for relapsed or refractory metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* 33(1):138–147.

**Birk DM, Barbato J, Mureebe L, Chaer RA (2008)** Current insights on the biology and clinical aspects of VEGF regulation. *Vasc Endovascular Surg* 42(6):517–530.

**Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM (2005a)** Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res* 65(19):8809–8817.

**Blumenthal RD, Osorio L, Hayes MK, Horak ID, Hansen HJ, Goldenberg DM (2005b)** Carcinoembryonic antigen antibody inhibits lung metastasis and augments chemotherapy in a human colonic carcinoma xenograft. *Cancer Immunol Immunother* 54(4):315–327.

**Bockisch A:** Nuklearmedizin. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2008, S. 417-429.

**Bramswig KH, Poettler M, Unseld M, Wrba F, Uhrin P, Zimmermann W, Zielinski CC, Prager GW (2013)** Soluble carcinoembryonic antigen activates endothelial cells and tumor angiogenesis. *Cancer Res* 73(22):6584–6596.

**Cai W, Olafsen T, Zhang X, Cao Q, Gambhir SS, Williams LE, Wu AM, Chen X (2007)** PET imaging of colorectal cancer in xenograft-bearing mice by use of an <sup>18</sup>F-labeled T84.66 anti-carcinoembryonic antigen diabody. *J Nucl Med* 48(2):304–310.

**Canter D, Kutikov A, Golovine K, Makhov P, Simhan J, Uzzo RG, Kolenko VM (2011)** Are all multi-targeted tyrosine kinase inhibitors created equal? An in vitro study of sunitinib and pazopanib in renal cell carcinoma cell lines. *Can J Urol* 18(4):5819–5825.

**Canter RJ, Ames E, Mac S, Grossenbacher SK, Chen M, Li C, Borys D, Smith RC, Tellez J, Sayers TJ, Monjabez AM, Murphy WJ (2014)** Anti-proliferative but not anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors enrich for cancer stem cells in soft tissue sarcoma. *BMC Cancer* 14:756.

**Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J, Ballmer-Hofer K (2006)** A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 63(17):2067–2077.

**Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, Giuliani F, Caruso M, Gebbia N, Carteni G, Agostara B, Pezzella G, Manzione L, Borsellino N, Misino A, Romito S, Durini E, Cordio S, Di Seri M, Lopez M, Maiello E, Montemurro S, Cramarossa A, Lorusso V, Di Bisceglie M, Chiarenza M, Valerio MR, Guida T, Leonardi V, Pisconti S, Rosati G, Carrozza F, Nettis G, Valdesi M, Filippelli G, Fortunato S, Mancarella S, Brunetti C (2005)** Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 23(22):4866–4875.

**Conaghan P, Ashraf S, Tytherleigh M, Wilding J, Tchilian E, Bicknell D, Mortensen NJ, Bodmer W (2008)** Targeted killing of colorectal cancer cell lines by a humanised IgG1 monoclonal antibody that binds to membrane-bound carcinoembryonic antigen. *Br J Cancer* 98(7):1217–1225.

**Craveiro RB, Ehrhardt M, Holst MI, Pietsch T, Dilloo D (2014)** In comparative analysis of multi-kinase inhibitors for targeted medulloblastoma therapy pazopanib exhibits promising in vitro and in vivo efficacy. *Oncotarget* 5(16):7149–7161.

**Divitiis C de, Nasti G, Montano M, Fisichella R, Iaffaioli RV, Berretta M (2014)** Prognostic and predictive response factors in colorectal cancer patients: between hope and reality. *World J Gastroenterol* 20(41):15049–15059.

**Dowlati A (2010)** Hunting and trapping the vascular endothelial growth factor. *J Clin Oncol* 28(2):185–187.

**Duffy MJ (2001)** Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 47(4):624–630.

**Ergun S, Kilik N, Ziegeler G, Hansen A, Nollau P, Gotze J, Wurmbach JH, Horst A, Weil J, Fernando M, Wagener C (2000)** CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol Cell* 5(2):311–320.

**Estevez-Garcia P, Castano A, Martin AC, Lopez-Rios F, Iglesias J, Munoz-Galvan S, Lopez-Calderero I, Molina-Pinelo S, Pastor MD, Carnero A, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R (2012)** PDGFRalpha/beta and VEGFR2 polymorphisms in colorectal cancer: incidence and implications in clinical outcome. *BMC Cancer* 12:514.

**Falchook GS, Naing A, Hong DS, Zinner R, Fu S, Piha-Paul SA, Tsimberidou AM, Morgan-Linnell SK, Jiang Y, Bastida C, Wheler JJ, Kurzrock R (2013)** Dual EGFR inhibition in combination with anti-VEGF treatment: a phase I clinical trial in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 4(1):118–127.

**Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM (2005)** Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene* 24(16):2647–2653.

**Fantini J, Rognoni JB, Culouscou JM, Pommier G, Marvaldi J, Tirard A (1989)** Induction of polarized apical expression and vectorial release of carcinoembryonic antigen (CEA) during the process of differentiation of HT29-D4 cells. *J Cell Physiol* 141(1):126–134.

**Ferrara N, Davis-Smyth T (1997)** The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1):4–25.

**Ferrara N (2002)** VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer* 2(10):795–803.

**Ferrara N, Gerber H, LeCouter J (2003)** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9(6):669–676.

**Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML (1995)** Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376(6535):66–70.

**Ford CH, Tsaltas GC, Osborne PA, Addetia K (1996)** Novel flow cytometric analysis of the progress and route of internalization of a monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody. *Cytometry* 23(3):228–240.

**Fraker PJ, Speck, J C Jr (1978)** Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80(4):849–857.

**Frapas E, Maurel C, Remaud-Le Saec P, Mauxion T, Faivre-Chauvet A, Davodeau F, Goldenberg DM, Bardies M, Barbet J (2011)** Pretargeted radioimmunotherapy of colorectal cancer metastases: models and pharmacokinetics predict influence of the physical and radiochemical properties of the radionuclide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38(12):2153–2164.

**Frapas E, Rousseau C, Bodet-Milin C, Barbet J, Chatal J, Kraeber-Bodéré F (2013)** Improvement of radioimmunotherapy using pretargeting. *Front Oncol* 3:159.

**Gasparini M, Ripamonti M, Seregini E, Regalia E, Buraggi GL (1988)** Tumor imaging of colo-rectal carcinoma with an anti-CEA monoclonal antibody. *Int J Cancer Suppl* 2:81–84.

**Gerber H, Baldwin ME, Shojaei F (2008)** Vascular Endothelial Growth Factor Antibodies for Anti-Angiogenic Therapy. In: Marmé D, Fusenig N (eds) Tumor Angiogenesis. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 377–393.

**Gerber H, Ferrara N (2003)** The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med (Berl)* 81(1):20–31.

**GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG (2013)** Fachinformation Votrient® 200mg/400mg Filmtabletten.

**Gold P, Freedman SO (1965)** Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 122(3):467–481.

**Goldenberg DM, Rossi EA, Sharkey RM, McBride WJ, Chang C (2008)** Multifunctional antibodies by the Dock-and-Lock method for improved cancer imaging and therapy by pretargeting. *J Nucl Med* 49(1):158–163.

**Goldsmith SJ (2010)** Radioimmunotherapy of lymphoma: Bexxar and Zevalin. *Semin Nucl Med* 40(2):122–135.

**Govindan SV, Cardillo TM, Moon S, Hansen HJ, Goldenberg DM (2009)** CEA-CAM5-targeted therapy of human colonic and pancreatic cancer xenografts with potent labetuzumab-SN-38 immunoconjugates. *Clin Cancer Res* 15(19):6052–6061.

**Hamberg P, Verweij J, Sleijfer S (2010)** (Pre-)clinical pharmacology and activity of pazopanib, a novel multikinase angiogenesis inhibitor. *Oncologist* 15(6):539–547.

**Hammarström S (1999)** The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol* 9(2):67–81.

**Hanahan D, Folkman J (1996)** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86(3):353–364.

**Hardman N, Murray B, Zwickl M, Kolbinger F, Pluschke G (1992)** Application of genetically-engineered anti-CEA antibodies for potential immunotherapy of colorectal cancer. *Int J Biol Markers* 7(3):203–209.

**Herold G:** Innere Medizin. , Auflage 2015. Herold, Köln, 2015, S. 490-496.

**Heskamp S, Boerman OC, Molkenboer-Kuennen, Janneke D M, Oyen, Wim J G, van der Graaf, Winette T A, van Laarhoven, Hanneke W M (2013)** Bevacizumab reduces tumor targeting of anti-epidermal growth factor and anti-insulin-like growth factor 1 receptor antibodies. *Int J Cancer* 133(2):307–314.

**Hostetter RB, Campbell DE, Chi KF, Kerckhoff S, Cleary KR, Ullrich S, Thomas P, Jessup JM (1990)** Carcinoembryonic antigen enhances metastatic potential of human colorectal carcinoma. *Arch Surg* 125(3):300–304.

**Huang J, Frischer JS, Serur A, Kadenhe A, Yokoi A, McCrudden KW, New T, O'Toole K, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Yamashiro DJ, Kandel JJ (2003)** Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(13):7785–7790.

**Hurwitz HI, Dowlati A, Saini S, Savage S, Suttle AB, Gibson DM, Hodge JP, Merkle EM, Pandite L (2009)** Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 15(12):4220–4227.

**Imakiire T, Kuroki M, Shibaguchi H, Abe H, Yamauchi Y, Ueno A, Hirose Y, Yamada H, Yamashita Y, Shirakusa T, Ishida I, Kuroki M (2004)** Generation, immunologic characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen. *Int J Cancer* 108(4):564–570.

**Jain M, Gupta S, Kaur S, Ponnusamy MP, Batra SK (2013)** Emerging trends for radioimmunotherapy in solid tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 28(9):639–650.

**Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011)** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61(2):69–90.

**Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudla B (2011a)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology. *Endokrynol Pol* 62(5):444–455.

**Kajdaniuk D, Marek B, Foltyn W, Kos-Kudla B (2011b)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 2: in endocrinology and oncology. *Endokrynol Pol* 62(5):456–464.

**Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K (2002)** Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol* 4(1):E2-5.



**Kaulfuss S, Burfeind P, Gaedcke J, Scharf J (2009)** Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 8(4):821–833.

**Kaulfuss S, Seemann H, Kampe R, Meyer J, Dressel R, Konig B, Scharf J, Burfeind P (2013)** Blockade of the PDGFR family together with SRC leads to diminished proliferation of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 4(7):1037–1049.

**Kawashima H (2014)** Radioimmunotherapy: a specific treatment protocol for cancer by cytotoxic radioisotopes conjugated to antibodies. *Scientific World J* 2014:492061.

**Kilic N, Oliveira-Ferrer L, Neshat-Vahid S, Irmak S, Obst-Pernberg K, Wurmbach J, Loges S, Kilic E, Weil J, Lauke H, Tilki D, Singer BB, Ergun S (2007)** Lymphatic reprogramming of microvascular endothelial cells by CEA-related cell adhesion molecule-1 via interaction with VEGFR-3 and Prox1. *Blood* 110(13):4223–4233.

**Kim SJ, Seo JH, Lee YJ, Yoon JH, Choi CW, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS (2005)** Autocrine vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor-2 growth pathway represents a cyclooxygenase-2-independent target for the cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in colon cancer cells. *Oncology* 68(2-3):204–211.

**Kraeber-Bodere F, Bodet-Milin C, Niaudet C, Sai-Maurel C, Moreau A, Faivre-Chauvet A, Thomare P, Deleris G, Estieu-Gionnet K, Bikfalvi A, Barbet J, Paris F (2010)** Comparative toxicity and efficacy of combined radioimmunotherapy and antiangiogenic therapy in carcinoembryonic antigen-expressing medullary thyroid cancer xenograft. *J Nucl Med* 51(4):624–631.

**Kuespert K, Pils S, Hauck CR (2006)** CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* 18(5):565–571.

**Kumar R, Knick VB, Rudolph SK, Johnson JH, Crosby RM, Crouthamel M, Hopper TM, Miller CG, Harrington LE, Onori JA, Mullin RJ, Gilmer TM, Truesdale AT, Epperly AH, Bolor A, Stafford JA, Luttrell DK, Cheung M (2007)** Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlation from mouse to human with pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor with potent antitumor and antiangiogenic activity. *Mol Cancer Ther* 6(7):2012–2021.

**Lennartsson J, Ronnstrand L (2006)** The stem cell factor receptor/c-Kit as a drug target in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 6(1):65–75.

**Li L, Bading J, Yazaki PJ, Ahuja AH, Crow D, Colcher D, Williams LE, Wong, Jeffrey Y C, Raubitschek A, Shively JE (2008a)** A versatile bifunctional chelate for radio-labeling humanized anti-CEA antibody with In-111 and Cu-64 at either thiol or amino groups: PET imaging of CEA-positive tumors with whole antibodies. *Bioconjug Chem* 19(1):89–96.

**Li X, Tjwa M, van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart J, Springer ML, Degenfeld G von, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L (2008b)** Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(9):1614–1620.

**Liersch T, Meller J, Bittrich M, Kulle B, Becker H, Goldenberg DM (2007)** Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with (131)I-labetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. *Ann Surg Oncol* 14(9):2577–2590.

**Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS (2001)** Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood* 98(6):1904–1913.

**McBride WJ, Zanzonico P, Sharkey RM, Noren C, Karacay H, Rossi EA, Losman MJ, Brard P, Chang C, Larson SM, Goldenberg DM (2006)** Bispecific antibody pretargeting PET (immunoPET) with an 124I-labeled hapten-peptide. *J Nucl Med* 47(10):1678–1688.

**Meller B, Deisting W, Wenzel BE, Pethe A, Nadrowitz R, Meller J, Richter E, Baehre M (2006)** Increased radioiodine uptake of thyroid cell cultures after external irradiation. *Strahlenther Onkol* 182(1):30–36.

**Meller B, Rave-Fränck M, Breunig C, Schirmer M, Baehre M, Nadrowitz R, Liersch T, Meller J (2011)** Novel Carcinoembryonic-Antigen-(CEA)-Specific Pretargeting System to Assess Tumor Cell Viability after Irradiation of Colorectal Cancer Cells. *Strahlenther Onkol* 187(2):120–126.

**Meredith RF, Buchsbaum DJ, Alvarez RD, LoBuglio AF (2007)** Brief overview of preclinical and clinical studies in the development of intraperitoneal radioimmunotherapy for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 13(18 Pt 2):5643s-5645s.

**Morelli MP, Brown AM, Pitts TM, Tentler JJ, Ciardiello F, Ryan A, Jürgensmeier JM, Eckhardt SG (2009)** Targeting vascular endothelial growth factor receptor-1 and -3 with cediranib (AZD2171): effects on migration and invasion of gastrointestinal cancer cell lines. *Mol Cancer Ther* 8(9):2546–2558.

**Nakatani H, Akimori T, Takezaki Y, Hanazaki K (2010)** Vascular endothelial growth factors and their receptors in the novel human cell line, HN-Eso-1, established from esophageal spindle cell carcinoma. *J Med Invest* 57(3-4):232–236.

**Namensreaktionen.de** - Elektrophile aromatische Substitution. Internetadresse: <http://www.namensreaktionen.de/elektrophile-aromatische-substitution.html>. (Abrufdatum: 02.03.2015).

**Naumov GN, Akslen LA, Folkman J (2006)** Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. *Cell Cycle* 5(16):1779–1787.

**Neumaier M, Paululat S, Chan A, Matthaes P, Wagener C (1993)** Biliary glycoprotein, a potential human cell adhesion molecule, is down-regulated in colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(22):10744–10748.

**Ng, Eugene W M, Adamis AP (2006)** Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1082:151–171.

**Ohtsukasa S, Okabe S, Yamashita H, Iwai T, Sugihara K (2003)** Increased expression of CEA and MHC class I in colorectal cancer cell lines exposed to chemotherapy drugs. *J Cancer Res Clin Oncol* 129(12):719–726.

**Ordonez C, Screatton RA, Ilantzis C, Stanners CP (2000)** Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. *Cancer Res* 60(13):3419–3424.

**Ordonez C, Zhai AB, Camacho-Leal P, Demarte L, Fan, Mannie M Y, Stanners CP (2007)** GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin alpha5beta1-fibronectin interaction. *J Cell Physiol* 210(3):757–765.

**Ostman A (2004)** PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 15(4):275–286.

**Paesler J, Gehrke I, Gandhirajan RK, Filipovich A, Hertweck M, Erdfelder F, Uhrmacher S, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer K (2010)** The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vatalanib and pazopanib potently induce apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 16(13):3390–3398.

**Pavlidis ET, Pavlidis TE (2013)** Role of bevacizumab in colorectal cancer growth and its adverse effects: a review. *World J Gastroenterol* 19(31):5051–5060.

**Pick AM, Nystrom KK (2012)** Pazopanib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Clin Ther* 34(3):511–520.

**Podar K, Tonon G, Sattler M, Tai Y, Legouill S, Yasui H, Ishitsuka K, Kumar S, Kumar R, Pandite LN, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC (2006)** The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc. Natl Acad Sci USA* 103(51):19478–19483.

**Pouget J, Navarro-Teulon I, Bardiès M, Chouin N, Cartron G, Pèlegri A, Azria D (2011)** Clinical radioimmunotherapy--the role of radiobiology. *Nat Rev Clin Oncol* 8(12):720–734.

**Pronto-Laborinho AC, Pinto S, Carvalho M de (2014)** Roles of vascular endothelial growth factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int* 2014:947513.

**Rades D, Wolff C, Nadrowitz R, Breunig C, Schild SE, Baehre M, Meller B (2009)** Radioactive EGFR antibody cetuximab in multimodal cancer treatment: stability and synergistic effects with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75(4):1226–1231.

**Rajkumar VS, Boxer G, Robson M, Muddle J, Papastavrou Y, Pedley RB (2012)** A comparative study of PDGFR inhibition with imatinib on radiolabeled antibody targeting and clearance in two pathologically distinct models of colon adenocarcinoma. *Tumour Biol* 33(6):2019–2029.

**Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS (1995)** Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 14(4):263–277.

**Riemann B, Kopka K, Stogbauer F, Halfter H, Ketteler S, Phan TQ, Franzius C, Weckesser M, Ringelstein EB, Schober O (2001)** Kinetic parameters of 3-(123)iodo-L-alpha-methyl tyrosine ((123)IIMT) transport in human GOS3 glioma cells. *Nucl Med Biol* 28(3):293–297.

**Rossi EA, Goldenberg DM, Cardillo TM, McBride WJ, Sharkey RM, Chang C (2006)** Stably tethered multifunctional structures of defined composition made by the dock and lock method for use in cancer targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(18):6841–6846.

**Samuel S, Fan F, Dang LH, Xia L, Gaur P, Ellis LM (2011)** Intracrine vascular endothelial growth factor signaling in survival and chemoresistance of human colorectal cancer cells. *Oncogene* 30(10):1205–1212.

**Schoffelen R, Sharkey RM, Goldenberg DM, Franssen G, McBride WJ, Rossi EA, Chang C, Laverman P, Disselhorst JA, Eek A, van der Graaf, Winette T A, Oyen, Wim J G, Boerman OC (2010a)** Pretargeted immuno-positron emission tomography imaging of carcinoembryonic antigen-expressing tumors with a bispecific antibody and a <sup>68</sup>Ga- and <sup>18</sup>F-labeled hapten peptide in mice with human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 9(4):1019–1027.

**Schoffelen R, van der Graaf, Winette T A, Franssen G, Sharkey RM, Goldenberg DM, McBride WJ, Rossi EA, Eek A, Oyen, Wim J G, Boerman OC (2010b)** Pretargeted <sup>177</sup>Lu radioimmunotherapy of carcinoembryonic antigen-expressing human colonic tumors in mice. *J Nucl Med* 51(11):1780–1787.

**Schoffelen R, Boerman OC, Goldenberg DM, Sharkey RM, van Herpen, C M L, Franssen GM, McBride WJ, Chang C, Rossi EA, van der Graaf, W T A, Oyen, W J G (2013)** Development of an imaging-guided CEA-pretargeted radionuclide treatment of advanced colorectal cancer: first clinical results. *Br J Cancer* 109(4):934–942.

**Schutz, Fabio A B, Choueiri TK, Sternberg CN (2011)** Pazopanib: Clinical development of a potent anti-angiogenic drug. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 77(3):163–171.

**Senba T, Kuroki M, Arakawa F, Yamamoto T, Kuwahara M, Haruno M, Ikeda S, Matsuoka Y (1998)** Tumor growth suppression by a mouse/human chimeric anti-CEA antibody and lymphokine-activated killer cells in vitro and in SCID mouse xenograft model. *Anticancer Res* 18(1A):17–24.

**Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983)** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219(4587):983–985.

**Shablak A, Gilham DE, Hawkins RE, Elkord E (2014)** In vitro effect of IL-2 in combination with pazopanib or sunitinib on lymphocytes function and apoptosis of RCC cells. *Expert Opin Pharmacother* 15(11):1489–1499.

**Sharkey RM, Juweid M, Shevitz J, Behr T, Dunn R, Swayne LC, Wong GY, Blumenthal RD, Griffiths GL, Siegel JA (1995)** Evaluation of a complementarity-determining region-grafted (humanized) anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody in preclinical and clinical studies. *Cancer Res* 55(23 Suppl):5935s-5945s.

**Sharkey RM, Rossi EA, McBride WJ, Chang C, Goldenberg DM (2010)** Recombinant bispecific monoclonal antibodies prepared by the dock-and-lock strategy for pretargeted radioimmunotherapy. *Semin Nucl Med* 40(3):190–203.

**Shibuya M (2001)** Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26(1):25–35.

**Shibuya M (2013)** Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem* 153(1):13–19.

**Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992)** Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359(6398):843–845.

**Skubitz KM, Campbell KD, Ahmed K, Skubitz AP (1995)** CD66 family members are associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol* 155(11):5382–5390.

**Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998)** Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92(6):735–745.

**Stein R, Goldenberg DM (2004)** A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 3(12):1559–1564.

**Stein R, Govindan SV, Hayes M, Griffiths GL, Hansen HJ, Horak ID, Goldenberg DM (2005)** Advantage of a residualizing iodine radiolabel in the therapy of a colon cancer xenograft targeted with an anticarcinoembryonic antigen monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 11(7):2727–2734.

**Sunwoo HH, Suresh MR: Cancer markers. In: Wild D (ed):** The immunoassay handbook: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques. 4. Aufl. Elsevier, Oxford, 2013, pp. 833-856.

**Takahashi H, Shibuya M (2005)** The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 109(3):227–241.

**Takahashi S (2011)** Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull* 34(12):1785–1788.

**Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM (1995)** Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55(18):3964–3968.

**Thompson JA, Grunert F, Zimmermann W (1991)** Carcinoembryonic antigen gene family: molecular biology and clinical perspectives. *J Clin Lab Anal* 5(5):344–366.

**Thomson DM, Krupey J, Freedman SO, Gold P (1969)** The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci USA* 64(1):161–167.

**Troiani T, Lockerbie O, Morrow M, Ciardiello F, Eckhardt SG (2006)** Sequence-dependent inhibition of human colon cancer cell growth and of prosurvival pathways by oxaliplatin in combination with ZD6474 (Zactima), an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. *Mol Cancer Ther* 5(7):1883–1894.

**Tsaltas G, Ford CH, Gallant M (1992)** Demonstration of monoclonal anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody internalization by electron microscopy, western blotting and radioimmunoassay. *Anticancer Res* 12(6B):2133–2142.

**van der Graaf, Winette TA, Blay J, Chawla SP, Kim D, Bui-Nguyen B, Casali PG, Schöffski P, Aglietta M, Staddon AP, Beppu Y, Le Cesne A, Gelderblom H, Judson IR, Araki N, Ouali M, Marreaud S, Hodge R, Dewji MR, Coens C, Demetri GD, Fletcher CD, Dei Tos, Angelo Paolo, Hohenberger P (2012)** Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* 379(9829):1879–1886.

**Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH (1994)** Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269(43):26988–26995.

**Zentrum für Krebsregisterdaten/Robert-Koch-Institut (2013):** Krebs in Deutschland 2009/2010.

**Zheng C, Feng J, Di Lu, Wang P, Xing S, Coll J, Yang D, Yan X (2011)** A novel anti-CEACAM5 monoclonal antibody, CC4, suppresses colorectal tumor growth and enhances NK cells-mediated tumor immunity. *PLoS ONE* 6(6):e21146.

**Zwick E, Bange J, Ullrich A (2002)** Receptor tyrosine kinases as targets for anti-cancer drugs. *Trends Mol Med* 8(1):17–23.



## 7 Thesen

- 1) Das Oberflächenantigen CEA/CEACAM5, der Wachstumsfaktor VEGF sowie der zugehörige VEGF-Rezeptor stellen beim kolorektalen Karzinom Angriffspunkte für zielgerichtete, individualisierte Therapien dar.
- 2) Wechselwirkungen zwischen diesen Zielstrukturen können weiterhin für multimodale Behandlungsmethoden eine sinnvolle Ergänzung darstellen.
- 3) Zur Untersuchung der Interaktion zwischen CEA und dem VEGF/VEGFR-Signalweg erfolgte die radiochemische Iodierung des gegen CEA-gerichteten Antikörpers TF2.
- 4) Für die *In-vitro*-Studien wurden die kolorektalen Adenokarzinomzelllinien SW480, HT29 und T84 mit unterschiedlicher CEA-Expression eingesetzt und mit verschiedenen Konzentrationen des VEGFR-Inhibitors Pazopanib inkubiert.
- 5) Die ermittelten <sup>131</sup>I-TF2-Uptake-Werte für die unterschiedlichen Zelllinien waren spezifisch und korrelierten mit den Literaturangaben zur jeweiligen CEA-Produktion.
- 6) Unter den gewählten Bedingungen (Konzentration, Aktivität) lag keine Beeinflussung der Zellproliferation der CRC-Zelllinien durch den Antikörper TF2 vor.
- 7) Die durchgeführten *In-vitro*-Studien konnten nachweisen, dass Pazopanib sowohl in Abhängigkeit von der Zeit als auch von der Konzentration die Zellproliferation hemmt, sowie bei zwei der drei Zelllinien die Aufnahme des radioiodierten Antikörpers positiv beeinflusst.
- 8) Die Verwendung von Pazopanib zur Hemmung der Proliferation von Tumorzellen ist ein vielversprechender Ansatz zur Ergänzung der Therapie des kolorektalen Karzinoms.
- 9) Pazopanib führt zu einer Zunahme der Expression des möglichen Zielantigens CEA/CEACAM5 und sollte somit zu einer Steigerung der Effektivität von CEA-vermittelten Radioimmuntherapien und Radioimmuno-PET mit Pretargeting-Systemen beitragen können.

## 8 Tabellarischer Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Kathrin Hüttl  
Geburtsdatum: 19.08.1989  
Geburtsort: Freiberg

### Schulbildung:

1996 – 2000 Grundschole Oberschöna  
2000 – 2006 Ulrich-Rülein-Gymnasium Freiberg  
2006 – 2008 Geschwister-Scholl-Gymnasium Freiberg  
07/2008 Abschluss der Schulbildung: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung:

WS 2008 – WS 2014 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
09/ 2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
SS 2015 Promotionsstudium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### Praktisches Jahr:

08/2013 – 12/2013 BG Kliniken Bergmannstrost Halle – Chirurgie  
12/2013 – 03/2014 Klinikum Chemnitz – Innere Medizin  
04/2014 – 07/2014 Kreiskrankenhaus Freiberg – Anästhesiologie und Intensivmedizin

### Promotion:

2011 – 2012 Experimentelle Untersuchungen zur Dissertation  
04/2015 Fertigstellung der Dissertation

Datum.....

Unterschrift.....

## 9 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Datum.....

Unterschrift.....

## 10 Erklärung über frühere Promotionsgesuche

Ich erkläre hiermit, dass die Arbeit bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Den Antrag auf Eröffnung des Promotionsverfahrens stelle ich erstmalig an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Datum.....

Unterschrift.....

## 11 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich Frau Prof. Dr. Birgit Meller für die Überlassung der anspruchsvollen Themenstellung und die intensive Betreuung meiner Arbeit danken. Für Ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die vielen wertvollen Anregungen und Hinweise möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Bähre als Leiter der Klinik für Nuklearmedizin danke ich für seine Unterstützung und Förderung sowie die Möglichkeit, die Promotion in seiner Klinik durchführen zu können.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Ing. Christian Breunig für die Einführung in die verschiedenen Labortechniken, die fortwährende Unterstützung bei den Zellversuchen und die konstruktiven Ideen bei der Erstellung der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Klinik für Nuklearmedizin für ihre bereitwillige Unterstützung und Rücksichtnahme bedanken.

Meiner Laborpartnerin Frau Livia Flämig danke ich für die gute Zusammenarbeit, die gegenseitige Motivation sowie die gemeinsamen unterhaltsamen Stunden im Labor.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die immerwährende Unterstützung und Ermutigung in jeder Phase der Doktorarbeit. Ohne sie wäre so vieles nicht möglich gewesen.