

1 Einleitung

Jede Zelle eines mehrzelligen Lebewesens ist im Laufe der Evolution auf das adäquate Beantworten spezifischer externer Signale anderer Zellen programmiert worden. Die Kommunikation erfolgt unter anderem über das Zusammenspiel von zirkulierenden extrazellulären Signalmolekülen und ihren korrespondierenden Rezeptoren, die für die Informationsweiterleitung in die Zelle verantwortlich sind. Am Ende jedes intrazellulären Signalpfades stehen Zielproteine, welche verändert werden und so das Verhalten der betreffenden Zelle regulieren.

Eine große Anzahl extrazellulärer Signalproteine, zu denen auch die Wachstumsfaktoren gehören, interagiert hierbei mit membranständigen Rezeptoren aus der Familie der Rezeptor-tyrosinkinasen. Zu den wichtigen humanen Wachstumsfaktoren gehören unter anderem der epidermale Wachstumsfaktor (engl. *epidermal growth factor*) EGF, dessen Name sich aus der ursprünglichen Beobachtung ableitet, dass er das Wachstum epidermaler Gewebe fördert, sowie die insulinartigen Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factors*, Synonym: *Somatomedine*), IGF-1 und IGF-2, welche als Vermittler der Somatotropin-Wirkung fungieren und somit u.a. von Bedeutung für das menschliche Längenwachstum sind.

EGF und IGFs wirken als starke Mitogene und übermitteln über ihre jeweiligen Rezeptoren, EGFR bzw. IGF-1R, Signale, welche die zellulären Prozesse der Proliferation, Differenzierung, des Metabolismus, der Endozytose und der Apoptose modulieren (Oliviera *et al.*, 2006; Stewart und Rotwein, 1996).

Sowohl das EGF/EGFR- als auch das IGF/IGF-1R-System sind häufig das Ziel onkogener Mutationen, die zu dysregulierter Aktivität dieser Systeme führen und auf diese Weise zu Tumorentstehung- und -wachstum beitragen. Beide Systeme stellen somit grundsätzlich interessante Ansatzpunkte für neuartige Anti-Tumorthérapien dar.

1.1 Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

1.1.1 Charakteristika des EGFR

Der EGFR ist Teil einer Unterfamilie von vier eng verwandten transmembranen Rezeptoren: EGFR (HER1/erbB-1), HER-2 (erbB-2/neu), HER-3 (erbB-3) und HER-4 (erbB-4) (Yarden und Sliwkowski, 2001). Der EGFR ist ein 170 kDa großes Protein, das drei funktionelle Domänen aufweist: eine extrazelluläre ligandenbindende Domäne (N-Terminus), eine hydrophobe transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität (C-Terminus). Bislang sind sieben Liganden bekannt, die an den EGFR binden. Der bedeutsamste von ihnen ist EGF. Außerdem fungieren TGF- α , Amphiregulin, Betacellulin, HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*), Epiregulin und Neuregulin G2 β als Liganden (Toyoda *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1994; Wells, 1999).

Bindet ein Ligand an den EGF-Rezeptor, so kommt es in einem ersten Schritt zur Dimerisierung von Rezeptormonomeren. Hierbei können entweder zwei EGFR (Homodimer) oder ein EGF-Rezeptor mit einem anderen Rezeptor aus der HER-Familie (Heterodimer) dimerisieren (Yarden und Sliwkowski, 2001). Die Rezeptordimerisierung führt zur sukzessiven Aktivierung der enzymatischen Aktivität der EGFR-Tyrosinkinase (TK). Sie wird durch die Autophosphorylierung zweier Tyrosinreste des Rezeptordimers eingeleitet. An die phosphorylierte Stelle binden zytoplasmatische Botenproteine und leiten so eine Reihe von komplexen Signalkaskaden ein, zu denen z.B. der Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase-Weg (MAPK, vgl. Kap. 1.3.1), der STAT-Signalweg (*Signal Transducers and Activators of Transcription*, vgl. Kap. 1.3.2), aber auch die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT (Proteinkinase B) gehören. Endpunkte dieser Signalkaskaden sind Änderungen im Expressionsmuster von Genen, die an der Regulierung des Zellwachstums, der Apoptose, des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung beteiligt sind.

Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle bei Metastasierungs- und Angiogenese-Prozessen (Abb. 1-1).

Nach erfolgter Aktivierung werden die Rezeptor-Liganden-Komplexe internalisiert und anschließend entweder recycelt oder abgebaut (Yarden und Slivkowski, 2001).

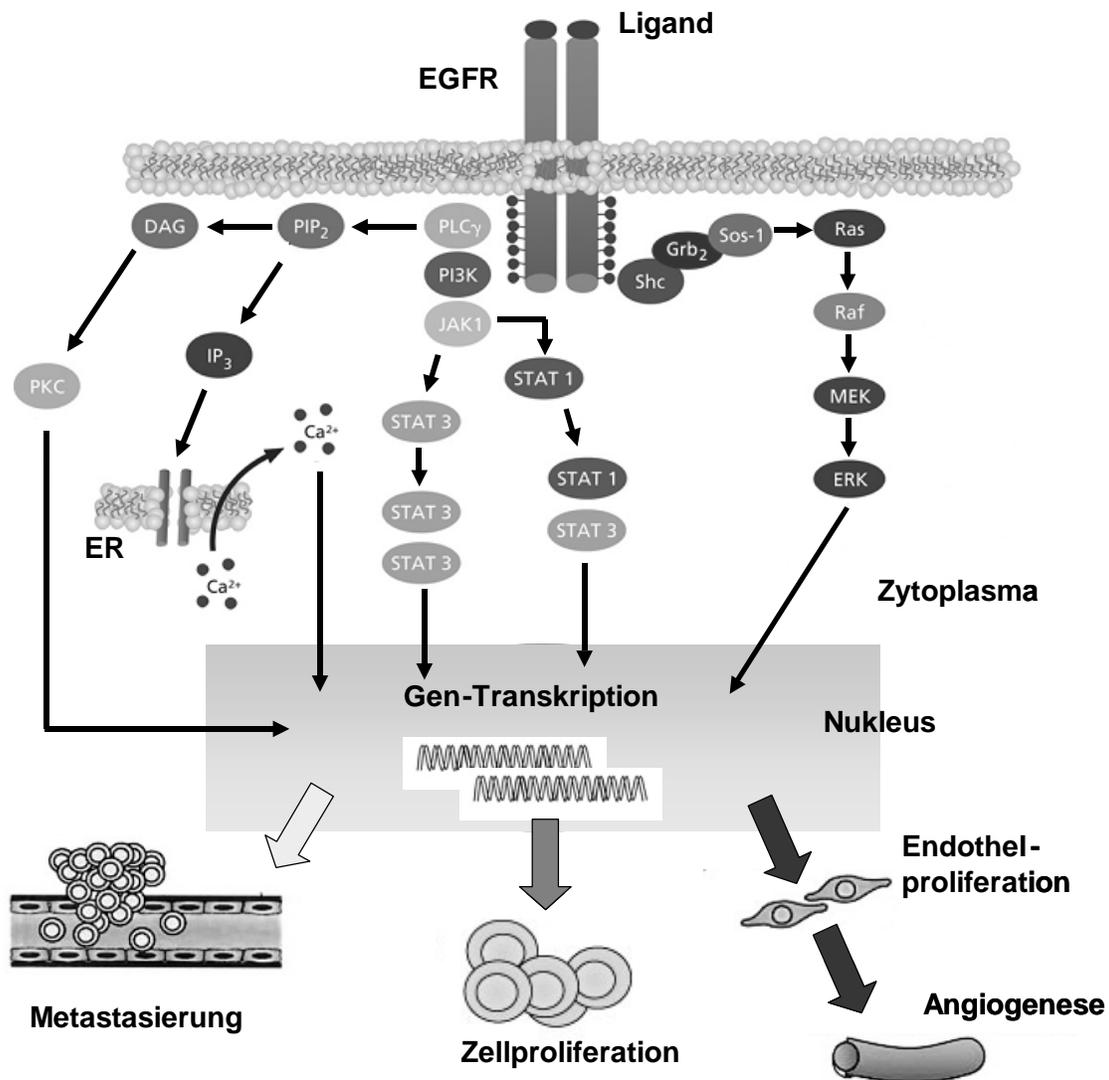


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der EGFR-Signalwege. Bindung eines Liganden an den EGF-Rezeptor bewirkt eine Rezeptordimerisierung und anschließende Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase des Rezeptors. Die dadurch aktivierten Signalkaskaden resultieren in Veränderungen der Transkription. Steigerungen der Zellproliferation und Angiogenese sowie Tumormetastasierungen sind die Folge (modifiziert nach Harari, 2004).

1.2 Der insulinartige Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF-1R)

1.2.1 Charakteristika des IGF-1R

Beim ausgereiften IGF-1R handelt es sich um einen tetrameren Tyrosinkinase-Rezeptor, der aus 2 ligandenbindenden α -Untereinheiten sowie 2 transmembranen β -Untereinheiten aufgebaut ist. IGF-1R weist eine 70%-ige Strukturhomologie zum Insulinrezeptor auf (O'Connor, 2003). Nach der Ligandenbindung an die α -Untereinheiten des IGF-1R kommt es zu einer Konformationsänderung und Kreuzphosphorylierung der transmembranen β -Untereinheiten, die eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase des IGF-1R sowie die Autophosphorylierung weiterer Tyrosinreste innerhalb der katalytischen Domäne der β -Untereinheiten bewirken. Über die aktivierte katalytische Domäne der β -Untereinheiten erfolgt die anschließende Phosphorylierung des als IRS bezeichneten Insulinrezeptorsubstrats (Kellerer *et al.*, 1999), das als Bindungsstelle zum Andocken zytoplasmatischer Botenproteine fungiert, die für die Induktion der unmittelbar nachgeschalteten Signalkaskaden wie der MAPK und PI3K/AKT (**Abb. 1-2**; vgl. Kap. 1.3.1) aber auch des STAT-Signalwegs (vgl. Kap 1.3.2) notwendig sind (Grimberg, 2003; Fukunaga und Kawano, 2003).

Der IGF-1R bindet mit größter Affinität IGF-1, aber auch IGF-2 (ca. 10-fach geringere Affinität) und Insulin (100- bis 1000-fach geringere Affinität). Die Wirkung der IGFs wird durch IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) moduliert, von denen derzeit 6 verschiedene bekannt sind (Baxter, 2000; Mohan und Baylink, 2002). Diese werden, wie IGF selbst, primär in der Leber synthetisiert, aber ebenso lokal in den meisten Geweben, wo sie auto- und parakrin wirken. Sie sorgen für eine Bindung und damit ubiquitäre Verteilung über das Serum.

Ursprünglich nahm man an, dass der IGF-1R lediglich eine redundante Form des verwandten Insulinrezeptors darstellt. Die Funktion des IGF-1R wurde daher zunächst in der

Kompensation fehlender oder nicht funktionsfähiger Insulinrezeptoren vermutet. Heute weiss man, dass der IGF-1R vom Insulinrezeptor unabhängige, einzigartige und charakteristische Eigenschaften aufweist, die ihn zu einem der bedeutsamsten Rezeptoren für Mitogenese, Transformation und Apoptoseprotektion machen (Baserga *et al.*, 2003).

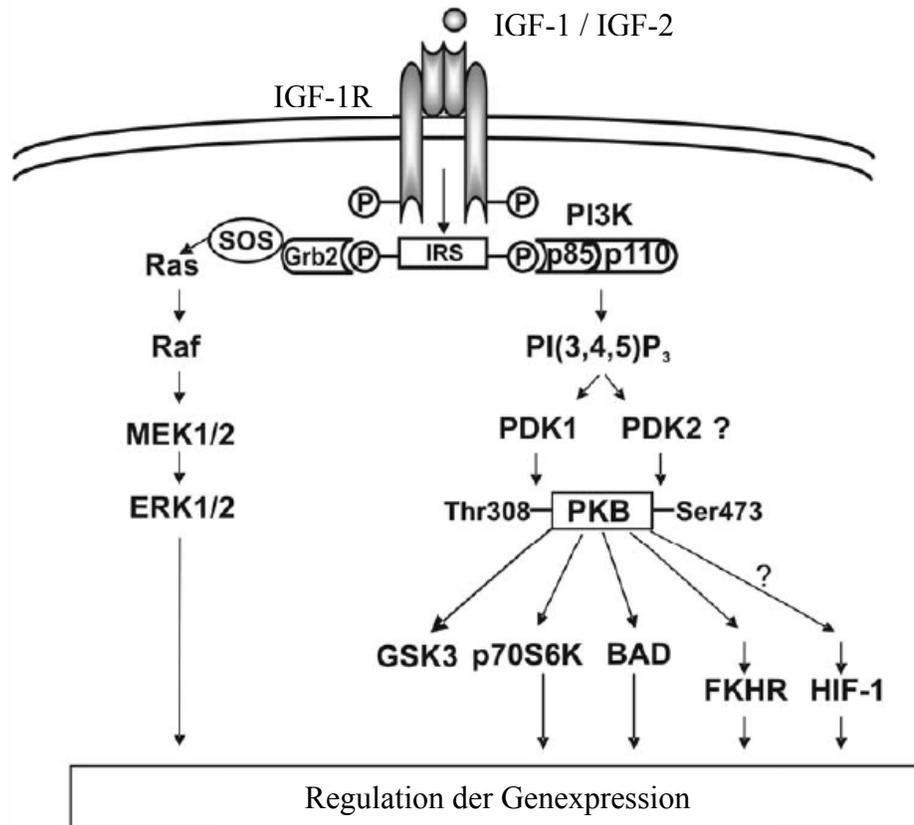


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der IGF-1R-Signalwege (ohne STATs). Ligandenbindung führt zur Autophosphorylierung der intrazellulären katalytischen Domänen des IGF-1R, in Folge dessen es zur Aktivierung von IRS kommt. Durch Bindung von Adapterproteinen an IRS werden nachgeschaltete mitogene und zellprotektive Signalkaskaden (hier: Ras/Raf-MAPK und PI3K/AKT dargestellt) aktiviert. (nach Kellerer *et al.*, 1999).

1.3. EGFR- und IGF-1R-induzierte Signaltransduktion

1.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen gehören zu den wichtigsten durch extrazelluläre Signale aktivierten Signalkaskaden (Chan-Hui und Weaver, 1998). Eine Subgruppe der MAPK bilden die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), bei denen es sich um zytoplasmatische Proteinkinasen handelt, deren Name sich aus ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen wirkende Liganden ableitet. Neben Zytokinen oder Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Johnson und Lapadat, 2002) wird die extrazellulär regulierte Kinase1/2 (ERK1/2 Synonym: p44/p42MAPK) vor allem durch Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF- α (Yarden und Silkowski, 2001) bzw. IGF-1/IGF-2 (Grimberg, 2003) aktiviert. Die Aktivierung von ERK1/2 führt zu Zellzyklusprogression und Hemmung von Apoptose (Cross *et al.*, 2000; Rubinfeld und Seger, 2005; Wilkinson und Millar, 2000).

1.3.2 Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)

Bei den Proteinen der STAT-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die eine zentrale Rolle in der Wachstumsfaktor-induzierten Signaltransduktion spielen (Zong *et al.*, 2000). Mittlerweile sind sieben verschiedene STAT-Proteine mit unterschiedlicher Funktion bekannt. Die aus 750-850 Aminosäuren bestehenden STAT-Proteine liegen in ihrer inaktiven Form als Monomere im Zytoplasma einer Zelle vor. Ihre normalerweise transiente Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung spezifischer und hochkonservierter Tyrosinphosphorylierungsstellen. Im Verlauf der STAT-Aktivierung kommt es einer Dimerisierung von STAT-Monomeren, wobei aus gleichen und/oder verschiedenen STAT-Monomeren Homo- bzw. Heterodimere gebildet werden. Nach der Translokation der Dimere in den

Zellkern binden diese an die Kern-DNA und können so die Transkription verschiedener Gene für Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose regulieren (Bromberg und Darnell Jr, 2000).

Erhöhte STAT-Aktivität, hauptsächlich durch konstitutive Aktivierung der Proteine hervorgerufen, spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Tumoren.

In diesem Zusammenhang wird vor allem für STAT3 sowie STAT5-Proteine eine Inhibition des zellulären Selbstmordprogramms, der Apoptose, sowie eine Förderung der Zellproliferation beschrieben (Bowman *et al.*, 2000). Die Funktion von STAT1 bei der Tumorentstehung und -progression wird hingegen kontrovers diskutiert: Zum einen gibt es Anhaltspunkte, dass STAT1 als Tumorsuppressor fungieren kann (Bromberg *et al.*, 1996), zum anderen wurde jedoch auch beschrieben, dass konstitutiv aktiviertes STAT1 neben STAT3 und STAT5 in einer Reihe von Tumorzelllinien vorliegt (Bowman *et al.*, 2000).

1.4 Bedeutung von EGFR und IGF-1R bei Tumorentstehung und -wachstum

1.4.1 Bedeutung des EGFR

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor stellt ein vielversprechendes Zielprotein für neuartige Krebstherapien dar. Viele Tumoren weisen eine abnormale, verstärkte Expression und/oder konstitutive Aktivierung des EGFR auf (**Tab. 1-1**).

Tumortyp	Anteil der Tumoren mit EGFR-Überexpression (%)
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	40-80
Prostatakarzinom	40-80
Mammakarzinom	14-91
Kolorektales Karzinom	25-77
Pankreaskarzinom	30-89
Ovariakarzinom	35-70
Kopf-Hals-Tumoren	80-100

Tabelle 1-1: Tumoren mit EGFR-Überexpression (Harari, 2004).

EGFR-Überexpression kann als Folge einer Genamplifikation entstehen und so Störungen im Zellzyklusverhalten und/oder der Zelldifferenzierung hervorrufen, die zur Tumorentstehung beitragen. Zum anderen kann eine EGFR-Überexpression, die zudem häufig mit einer ebenfalls erhöhten Co-Expression funktioneller EGFR-Liganden assoziiert ist, in bestehenden Tumoren zu erhöhtem Tumorwachstum, Metastasierung, Angiogenese und Gefäßinvasion sowie Apoptoseinhibition führen. Die EGFR-Aktivität in einem Tumor kann aber auch durch Heterodimerisierung des EGFR mit anderen Mitgliedern der HER-Familie, z.B. HER2, unphysiologisch erhöht werden (Salomon *et al.*, 1995; Wells, 1999; Woodburn, 1999).

Darüberhinaus sind auch verschiedene Mutationen im EGF-Rezeptorgen bekannt, die zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors führen. Eine häufig in Tumoren auftretende Mutante ist EGFRvIII, bei der es sich um eine Mutante mit trunkierter extrazellulärer Rezeptordomäne handelt. Zusätzlich zu ihrer dysregulierten Aktivität sind die meisten Mutanten nicht mehr internalisierbar und verbleiben somit nach ihrer Aktivierung an der Zelloberfläche. Dadurch steigt die Anzahl der EGF-Rezeptoren auf der Oberfläche, wodurch das Tumorzellwachstum zusätzlich gefördert wird.

Insgesamt konnte bereits für eine Vielzahl von Tumoren eine enge Korrelation zwischen EGFR-(Über-)Expression und dem Erkrankungsstadium, verkürztem Überleben, der Entwicklung von Tumormetastasen sowie der Tumor(ent)differenzierung gezeigt werden (Baselga, 2002; Di Lorenzo *et al.*, 2002; Peghini *et al.*, 2002). Ferner konnte der EGFR bei verschiedenen Tumorarten für ein vermindertes Therapieansprechen sowie die Ausbildung von Resistenzen gegenüber zytotoxischen Therapeutika verantwortlich gemacht werden (Meyers *et al.*, 1988; Wosikowski *et al.*, 1997).

Die Hemmung des EGFR und seiner spezifischen TK-Aktivität wird daher als sehr vielversprechender Ansatz für innovative Therapiestrategien in der Krebsbehandlung

angesehen (Arteaga, 2002). Hierzu werden Rezeptorantagonisten, Antikörper und vor allem spezifische Inhibitoren der EGFR-TK eingesetzt (Sewell *et al.*, 2002; Ciardiello *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2001; Sirotnak *et al.*, 2000; Overholser *et al.*, 2000; vgl: Kap.1.5).

1.4.2 Bedeutung des IGF-1R

Erhöhte IGF-Spiegel sind in einer Vielzahl von Tumoren mit einer aggressiven Tumorbiologie assoziiert, u.a. in Prostata-, Brust-, Kolon- und Lungenkarzinomen (Pollak *et al.*, 2004). Die IGF-induzierten, stark mitogenen und antiapoptotischen Effekte werden über den IGF-1R vermittelt. IGF-1R-Überexpression erhöht signifikant die Wahrscheinlichkeit für die Tumorentstehung und verstärkt die Tendenz von bereits bestehenden Tumoren zu metastasieren (Yu und Rohan, 2000). Änderungen, welche das Gleichgewicht zwischen der IGF/IGF-1R-Aktivität gegen die Funktion der IGF-Bindungsproteine (IGFBPs) verschieben, sind ebenfalls an der Entstehung und dem Fortschreiten von Neoplasien in verschiedenen Zelltypen beteiligt (Grimberg und Cohen, 2000).

Die Expression des IGF/IGF-1R-Systems ist neben den genannten Tumoren auch beim hepatozellulären Karzinom (Scharf und Braulke, 2003; Yao *et al.*, 2003) sowie bei neuroendokrinen Tumoren von Bedeutung (von Wichert *et al.*, 2000; Yu und Rohan, 2000; Zhang und Yee, 2000). So wird die Expression von IGF-1R gepaart mit autokriner IGF-Sekretion bei neuroendokrinen Tumorzellen u.a. für deren autonomes Wachstumsverhalten verantwortlich gemacht (von Wichert *et al.*, 2000). Untersuchungen zur Hepatokarzinogenese haben gezeigt, dass die Überexpression von IGF-1R und seinem Liganden IGF-2 von kritischer Bedeutung für die Entstehung von Hepatomen und hepatozellulären Karzinomen ist (Zahradka *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1996; Aihara *et al.*, 1998).

Der IGF-1R spielt aber nicht nur bei der Tumorentstehung und Metastasierung eine kritische Rolle, sondern er ist auch hinsichtlich der Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps von herausragender Bedeutung (LeRoith *et al.*, 1999). So konnte durch Behandlung mit antisense-Oligonukleotiden, antisense-mRNA exprimierenden Plasmiden oder auch dominant-negativen IGF-1R-Varianten eine Revision des transformierten Phänotyps bei verschiedenen Tumorzellarten erreicht werden (Trojan *et al.*, 1992; Trojan *et al.*, 1993; Prager *et al.*, 1994). Darüberhinaus ist auch die eindeutige Korrelation zwischen Expressionsstärke des IGF-1R und der Apoptosefähigkeit von Tumorzellen belegt, wobei die Apoptoserate in dem Maße zunimmt, in dem die IGF-1R-Expression supprimiert wird (Resnicoff *et al.*, 1995). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass der IGF-1R in der Lage ist, die Tyrosinkinase des EGFR zu transaktivieren (Gilmore *et al.*, 2002). Somit entfalten sich die mitogenen IGF-Effekte zumindest teilweise unter Zuhilfenahme des EGFR-Signalwegs, der offenbar einen entscheidenden Mechanismus für das IGF-vermittelte Wachstum von Tumorzellen darstellt (Ahmad *et al.*, 2004). Durch die beschriebene Konvergenz der EGFR- und IGF-1R-Signalwege könnte daher auch die Hemmung der EGFR-TK zur Inhibition von IGF-stimuliertem Tumorwachstum beitragen, wodurch sich die Anwendung von EGFR-TK-Inhibitoren besonders auf jene Tumore erweitern würde, in denen IGF-Signalen eine große Bedeutung zukommt.

Aus der aufgezeigten Bedeutung des IGF-1R und seiner Liganden für Tumorentstehung und -wachstum könnten demzufolge künftige krebstherapeutische Ansätze vielversprechend sein, bei denen die IGF-1R-Expression auf der Zellmembran verhindert wird, die Interaktion von IGFs mit IGF-1R blockiert wird oder IGF-1R-induzierte Signalkaskaden spezifisch inhibiert werden (Pietrzkowski *et al.*, 1993; Neuenschwander *et al.*, 1995; LeRoith *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 1999).

1.5 Therapeutische Beeinflussung von EGFR und IGF-1R

1.5.1 Therapeutische Beeinflussung des EGFR

Das Konzept Wachstumsfaktorrezeptor-basierter Anti-Tumorthérapien ist in den vergangenen Jahren besonders anhand des EGFR entwickelt und untersucht worden. Zunehmend wird aber auch die besondere Bedeutung des IGF-1R für innovative und zielgerichtete Therapieansätze in der Onkologie erkannt. Im Gegensatz zum IGF-1R, bei dem die Wirksamkeit zur Verfügung stehender Substanzen und Arzneistoffe noch im experimentellen Bereich liegt bzw. in frühen klinischen Testungen überprüft wird, haben für EGFR-basierte Anti-Tumorthérapien bereits zwei Klassen von Arzneistoffen Eingang in die Therapie gefunden, und zwar die als Tyrosinkinaseinhibitoren bezeichneten Blocker der intrazellulären Tyrosinkinasedomäne des EGFR (vgl. Kap. 1.5.1.1) sowie monoklonale Antikörper (vgl. Kap. 1.5.1.2), die gegen die extrazelluläre Liganden-bindende Domäne des EGFR gerichtet sind (Ciardiello und Tortora, 2001; Grunwald und Hidalgo, 2003). In der weiteren Entwicklung befinden sich außerdem Methoden zur Inhibition durch Antisense-Oligonukleotide sowie Antikörper-basierte Immunokonjugate (u.a. Immunotoxine, Immunoradionukleotide, Immunoliposomen) (Ciardiello und Tortora, 2001; Grunwald und Hidalgo, 2003).

1.5.1.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Bei den Tyrosinkinaseinhibitoren handelt es sich um oral bioverfügbare Chinazolinderivate, welche hochspezifisch mit der intrazellulären Tyrosinkinase des EGFR interagieren und dadurch die Signaltransduktion nach Ligandenbindung unterbrechen. TKIs verhindern die Autophosphorylierung des Tyrosinrestes durch kompetitive Bindung an die intrazelluläre Mg^{2+} -ATP-Bindungsstelle des EGFR. Obwohl in den letzten 20 Jahren hunderte von EGFR-

TKIs entwickelt und getestet wurden, haben bisher mit Gefitinib (IressaTM) und Erlotinib (TarcevaTM) nur zwei TKIs Eingang in die Klinik gefunden (Ciardiello, 2000). Zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien belegen die Wirksamkeit der beiden TKIs bei verschiedenen Tumorentitäten (Harari, 2004). Gefitinib wurde 2003 von der FDA (*Food and Drug Administration*) für die Behandlung des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms in der Drittlinietherapie zugelassen, Erlotinib im Herbst 2004 zur Zweit- und Drittlinietherapie bei lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem nichtkleinzelligem Lungenkrebs. Beide Substanzen können bei guter Verträglichkeit oral verabreicht werden. Hauptnebenwirkungen beider Arzneistoffe sind akneartige Hautveränderungen sowie eine teilweise dosislimitierende Diarrhoe (Albanell *et al.*, 2001). Die Hautveränderungen sind für gewöhnlich schwach ausgeprägt und stabilisieren sich bzw. verschwinden im weiteren Therapieverlauf (Busam *et al.*, 2001). Die Bioverfügbarkeit beider TKIs liegt bei ungefähr 60%.

1.5.1.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper binden an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors und verhindern dadurch kompetitiv die Bindung der natürlichen Liganden. Zum einen wird somit die Aktivierung des Rezeptors und seiner nachgeschalteten mitogenen Signalkaskaden verhindert, zum anderen wird eine Internalisierung des EGFR-Antikörper-Komplexes sowie teilweise auch die Suppression der EGFR-Expression ausgelöst (Prewett *et al.*, 1996). Als zusätzliche Wirkmechanismen werden eine Stimulation von immunologischen Reaktionen gegen die EGFR-exprimierenden Tumorzellen diskutiert (Carter, 2001) sowie die Suppression des für die Angiogenese bedeutsamen Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*).

Cetuximab (ErbixTM), ein chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper gegen den EGFR, hat als bisher einziger Vertreter dieser Gruppe Einzug in die Therapie gehalten. Cetuximab bindet an den EGFR mit einer 5 bis 10-fach höheren Affinität als die endogenen Liganden. Cetuximab wurde kürzlich sowohl in den USA als auch in Europa für die Behandlung von EGFR-positiven kolorektalen Karzinomen in der Zweit- bzw. Drittlinientherapie zugelassen. Cetuximab als proteinischer Arzneistoff muss den Patienten i.v. verabreicht werden. Dank seiner langen Halbwertszeit von 114 h reicht allerdings eine Infusion pro Woche aus (Baselga, 2001). Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen entsprechen denen der TKIs, zusätzlich birgt die Infusion mit Cetuximab auch das Risiko allergischer Reaktionen gegen den Antikörper.

1.5.2 Therapeutische Beeinflussung des IGF-1R

Bislang gibt es keine zugelassenen und in der klinischen Anwendung befindlichen Arzneistoffe zur IGF-1R-basierten Tumorthherapie. Die Gründe, weshalb die forcierte Entwicklung spezifischer Anti-IGF-1R-Substanzen (TK-Inhibitoren, Antikörper) nicht so weit fortgeschritten ist wie beim EGFR, hängen unter anderem mit der Befürchtung zusammen, dass gegen den IGF-1R gerichtete Inhibitoren aufgrund der großen Homologie des IGF-1R mit dem verwandten Insulinrezeptor zumindest teilweise auch eine Wirkung auf das Insulinsystem ausüben können und damit zu unerwünschten Insulinresistenzen und diabetologischen Nebenwirkungen führen (Garber, 2005). Mittlerweile sind jedoch insbesondere im Bereich der monoklonalen Antikörper (**Tab. 1-2**) und TK-Inhibitoren (**Tab. 1-3**) sehr spezifische und vielversprechende Substanzen synthetisiert worden und befinden sich derzeit in (prä-)klinischen Testungen.

Antagonistische und/oder neutralisierende Antikörper	Firma	Entwicklungsphase
CP-751,871	Pfizer	Phase 1
EM164	ImmunoGen /Sanofi-Aventis	präklinisch
IMC-A14	ImClone	präklinisch
h7C10	Pierre Fabre und Merck	präklinisch
19D12	Schering-Plough	präklinisch

Tabelle 1-2: Entwicklung therapeutischer IGF-1R-Antikörper (nach Hofmann und Garcia-Echeverria, 2005).

IGF-1R-Tyrosinkinase-inhibitoren	Firma	Entwicklungsphase
INSM18	Insmed	Phase 1
PPP	Karolinska Cancer Institute und Biovitrum	präklinisch
NVP-ADW742	Novartis Pharma	präklinisch
NVP-AEW541	Novartis Pharma	präklinisch
BMS-536924	Bristol-Myers Squibb	präklinisch
BMS-554417	Bristol-Myers Squibb	präklinisch

Tabelle 1-3: Entwicklung therapeutischer IGF-1R-Tyrosinkinaseinhibitoren (nach Hofmann und Garcia-Echeverria, 2005).

Die bisherigen *in vivo*-Studien zur Inhibition von IGF-1R ergaben bei allenfalls geringer Toxizität sowie einem Ausbleiben der befürchteten Insulinresistenz eine sehr gute Verträglichkeit und Wirksamkeit (Hofmann und Garcia-Echeverria, 2005; Scotlandi *et al.*, 2005; Burtrum *et al.*, 2003).

In der Entwicklung befinden sich außerdem Methoden zur Inhibierung des IGF-1R durch Antisense-Oligonukleotide sowie bi-spezifische Antikörper (Di-Diabody), die simultan die Bindung von IGF-1 als auch die von EGF an ihre jeweiligen Rezeptoren blockieren (Lu *et al.*, 2005).

1.5.2.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Für die hier vorgestellten Untersuchungen stand neben dem für Laboruntersuchungen seit langem bekannten, selektiven IGF-1R-TK-Inhibitor AG1024 (Parizas *et al.*, 1997) der hochspezifische IGF-1R-TK-Inhibitor NVP-AEW541 zur Verfügung.

NVP-AEW541 ist ein IGF-1R-TK-Inhibitor mit einem niedrigen Molekulargewicht (MW: 439,57) und gehört zur Gruppe der sog. *small molecule inhibitors*. NVP-AEW541 ist ein oral verfügbarer Arzneistoff aus der Klasse der Pyrrolo[2,3-d]Pyrimidinderivate (Scotlandi *et al.*, 2005). Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass NVP-AEW541 spezifisch und hochselektiv die Tyrosinkinase des IGF-1R inhibiert, während es weitgehend unwirksam gegenüber dem eng verwandten Insulinrezeptor sowie anderen Tyrosin- oder Serin/Threoninkinasen ist (Garcia-Echeverria *et al.*, 2004).

Die ausgeprägte antineoplastische Potenz und Selektivität sowie die gute Verträglichkeit von NVP-AEW541 konnte *in vivo* bereits für nichtgastrointestinale Tumoren wie z.B. Fibrosarkom, Brustkrebs und musculoskeletalen Tumoren belegt werden (Garcia-Echeverria *et al.*, 2004, Scotlandi *et al.*, 2005). Untersuchungen zur antineoplastischen Potenz von NVP-AEW541 wurden jedoch bislang an hepatozellulären, kolorektalen sowie neuroendokrinen gastrointestinalen Tumoren noch nicht durchgeführt.

1.6 Gastrointestinale Tumoren

1.6.1 Hepatozelluläre Karzinome

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt mit circa 80% das häufigste Leberkarzinom dar. Das HCC ist die fünfthäufigste Tumorentität weltweit und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache (Parkin, 2001). Jährlich erkranken mehr als 620000 Menschen an primärem Leberkrebs, fast genauso viele (600000) sterben daran. Die Inzidenz des HCC zeigt deutliche

geographische Unterschiede. Während das HCC in Entwicklungsländern, in Ost- und Südostasien, im Pazifischen Becken und in Subsahara-Afrika am stärksten verbreitet ist, liegen in Europa und Nordamerika die Erkrankungsraten bei unter 5 Fällen pro 100000 Einwohnern. In manchen Regionen Chinas erkranken hingegen bis zu 100 von 100000 Einwohnern am hepatozellulären Karzinom (Ferlay *et al.*, 2004). Damit werden allein in China mehr als die Hälfte der weltweiten HCC-Erkrankungen diagnostiziert. Beunruhigenderweise hat die Inzidenz des HCC jedoch auch in Europa und in den USA in den letzten Jahren stark zugenommen.

Risikofaktoren für die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms sind insbesondere virale Hepatitiden. Die chronische Hepatitis B mit HBs-Antigenpersistenz ist mit einem über 200-fach erhöhten Risiko ein hepatozelluläres Karzinom zu entwickeln assoziiert. Untersuchungen zur chronischen Hepatitis C-Infektion weisen auf ein noch höheres HCC-Risiko hin. Weitere Risikofaktoren sind die Hämochromatose, chronische Lebererkrankungen durch Alkoholabusus, Aflatoxinexposition, Adipositas und Diabetes mellitus. Mit Ausnahme des durch Aflatoxin induzierten HCC entwickelt sich ein HCC jedoch nur in Ausnahmefällen in einer gesunden Leber. In westlichen Ländern gilt die Leberzirrhose als die wichtigste Grunderkrankung für die Entwicklung eines HCC (Sherman, 2005).

Die molekulare Pathogenese des HCC ist bisher nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, dass HBV/HCV-Infektionen oder alkoholtoxische Leberschädigungen als chronische Lebererkrankungen zu einer erhöhten Mitoserate und damit zu einem erhöhten Auftreten von genetischen Veränderungen führen. Diese chromosomalen Alterationen oder Mutationen können wiederum die Aktivierung zellulärer Proto-Onkogene oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge haben und so zur malignen Transformation von Hepatozyten beitragen.

Das HCC ist klinisch äußerst bösartig und besitzt unbehandelt eine sehr schlechte Prognose. Die durchschnittliche Überlebenszeit symptomatischer Patienten beträgt meist nur wenige Monate. Während kurative HCC-Resektionen, lokale ablativ Verfahren oder Lebertransplantationen nur bei einem geringen Teil der Patienten möglich sind, sind die derzeitigen palliativen Therapieformen bei den meist fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen äußerst unbefriedigend und führen bislang nicht zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der betroffenen Patienten (El Serag *et al.*, 2001).

1.6.2 Neuroendokrine gastroenteropankreatische Tumoren

Gastro**e**ntero**p**ankreatische **n**euro**e**ndokrine **T**umoren (GEPNETs) stellen eine relativ seltene und zudem stark heterogene Tumorentität dar. Fast die Hälfte aller fernmetastasierter GEPNETs setzt große Mengen biogener Amine und/oder Neuropeptide frei, die ursächlich für die bei diesen Tumoren charakteristischen Hypersekretionssyndrome sind. Die oft bizarren klinischen Symptome können im allgemeinen durch Somatostatinanaloga oder Interferon- α gut kontrolliert werden (Faiss *et al.*, 1996; Öberg, 2001). Bisher gibt es aber nur unzureichende medikamentöse Möglichkeiten, das Wachstum und die weitere Disseminierung von GEPNETs zu verhindern. Das Wachstumsverhalten von GEPNETs zeigt eine erstaunlich große Spannweite, die von sehr langsam über mäßig schnell bis zu sehr schnell wachsenden, aggressiven Tumoren reicht (Öberg, 1994). Bei Patienten mit anaplastischen und schnell wachsenden Tumoren ist eine zytoreduktive Chemotherapie indiziert und geht mit einem Überlebensvorteil einher. Bei Patienten mit langsam progredienten Dünndarmtumoren ist jedoch kein Überlebensvorteil durch eine Chemotherapie gesichert. Wegen der besonderen Biologie neuroendokriner Tumorerkrankungen sind innovative Behandlungsstrategien wünschenswert, die sowohl wirksam als auch gut

verträglich sind und das Wachstum von GEPNETs unabhängig von deren unterschiedlicher Proliferationskinetik und Disseminierung effektiv hemmen.

1.6.3 Kolorektale Karzinome

Dickdarmkrebs ist in der westlichen Welt die häufigste Krebserkrankung bei Nichtrauchern (Neuhaus, 1998). Allein in Deutschland werden ca. 55.000 Neuerkrankungen und 30.000 Todesfälle pro Jahr registriert (Schmoll, 1997). Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit kolorektalen Karzinom ist stadienabhängig sehr unterschiedlich. Während die Überlebensrate von Patienten in frühen Erkrankungsstadien nach der operativen Entfernung des Tumors 83–93 % beträgt, sinkt die Überlebensrate von Patienten mit lokalen Lymphknotenmetastasen auf unter 45 %. Bei rezidivierenden oder metastasierenden kolorektalen Karzinomen fällt die 5-Jahres-Überlebensrate auf dramatische 8 % (O'Connell *et al.*, 2004).

Die Karzinogenese sporadischer kolorektaler Karzinome ist ein Prozess, der sich aus mehreren morphologischen und molekularen Schritten zusammensetzt. Diese führen vom normalen Epithel zur Schleimhauthyperplasie und über die Entstehung von benignen adenomatösen Polypen verschiedener Dysplasiestadien zu nicht invasiven und später invasiven Karzinomen. Dabei gibt es eine typische Abfolge von genetischen Alterationen, die in der sogenannten „Adenom-Karzinom-Sequenz“ der kolorektalen Tumorgenese definiert wurde (Kinzler and Vogelstein, 1996; Hanski *et al.*, 2000).

Die Therapie kolorektaler Karzinome erfolgt stadiengerecht. Während in den frühen Stadien ein kurativer Ansatz durch chirurgische Tumoresektion einschließlich der lymphatischen Abflusswege verfolgt und ggf. postoperativ durch adjuvante Chemotherapie unterstützt wird, setzt man beim palliativen Therapieansatz im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium vor allem

chemotherapeutische Maßnahmen ein. Für Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom im fortgeschrittenen Stadium gibt es mit den heute verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten keine Aussicht auf eine Heilung. Die chemotherapeutische Behandlung hat in diesem Fall zum Ziel, die Dauer der verbleibenden Lebenszeit bei größtmöglicher Lebensqualität zu verlängern. Die hierzu einzusetzenden Therapeutika sollten daher im besonderen Maße neben hoher Wirksamkeit möglichst geringe Nebenwirkungen aufweisen.

1.6.4 Ösophaguskarzinome

Beim Ösophaguskarzinom existieren zwei histologische Typen: Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom. In Deutschland sind etwa 80 % der Ösophaguskarzinome plattenepithelialen Ursprungs, während sich etwa 20 % auf der Grundlage von zylindrischem Barrett-Epithel als Adenokarzinome entwickeln. Das Adenokarzinom ist eine der am schnellsten zunehmenden Tumorentitäten in der westlichen Welt (Blot and McLaughlin, 1999). Im Gegensatz dazu ist die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms weitgehend konstant geblieben.

Die meisten Ösophaguskarzinome werden aufgrund fehlender Frühsymptomatik erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (Bareiss *et al.*, 2002). Da sich die Prognose vor allem nach dem Tumorstadium bei Beginn der Therapie richtet (Adachi *et al.*, 1996; Li and Yao, 1997), ist die 5-Jahres-Überlebensrate aller diagnostizierten Fälle mit insgesamt < 10 % ungünstig.

Neuere tumorbiologische Untersuchungen zeigen, dass die maligne Transformation beim Adenokarzinom des Ösophagus, ähnlich wie beim Kolonkarzinom, mehrstufig erfolgt. Patienten mit chronischer Refluxösophagitis entwickeln häufig einen sogenannten Barrett-Ösophagus, bei dem sich das normale Plattenepithel des distalen Ösophagus in eine intestinale Metaplasie mit spezialisiertem Zylinderepithel umgewandelt hat. Aus der

Metaplasie kann sich über die weiteren Schritte der gering- und hochgradigen Dysplasie ein Adenokarzinom der distalen Speiseröhre entwickeln (Shaheen und Ransohoff, 2002). Die Mechanismen, die zur malignen Transformation und Tumorprogression des Plattenepithelkarzinoms führen, sind bisher nur unvollständig bekannt. Die chronische Irritation der Ösophagusschleimhaut durch chronischen Alkoholabusus, insbesondere in Kombination mit Nikotinabusus, stellt mit 90% den Hauptrisikofaktor für das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre dar (Brown *et al.*, 2001).

1.7 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Die therapeutischen Möglichkeiten zur medikamentösen Behandlung fortgeschrittener gastrointestinaler Tumoren sind nach wie vor unbefriedigend. Daher sind neue Therapieansätze dringend erforderlich. In den letzten Jahren wurde die herausragende Bedeutung von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren als Ansatzpunkt für künftige, zielgerichtete Anti-Tumortherapien erkannt. Insbesondere der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR sowie in zunehmendem Maße auch der insulinartige Wachstumsfaktor-1-Rezeptor IGF-1R haben sich hierbei als vielversprechende Zielstrukturen herauskristallisiert. So führt die Unterbrechung der EGFR- bzw. IGF-1R-Signaltransduktion durch niedermolekulare Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren und monoklonale Antikörper bei verschiedenen Tumoren zu antiproliferativen Effekten.

Zur Blockade des EGFR und seiner mitogenen und zytoprotektiven Signalwege sind seit kurzem der EGFR-Antikörper Cetuximab sowie zwei Inhibitoren der intrazellulären EGFR-Tyrosinkinase (Gefitinib, Erlotinib) zur supportiven medikamentösen Therapie einzelner Tumorentitäten zugelassen. Demgegenüber gibt es für IGF-1R-basierte Therapien noch keine zugelassenen Arzneistoffe. Aber auch hier sind bereits monoklonale Antikörper und

spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren wie NVP-AEW541 in der Entwicklung bzw. in klinischen Testungen.

Ziel dieser Arbeit war es, die neuartigen EGFR- und IGF-1R-TK-Inhibitoren (Gefitinib, Erlotinib bzw. NVP-AEW541) sowie den monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab auf ihre Eignung für innovative Therapiemöglichkeiten bei bisher in diesem Zusammenhang noch nicht untersuchten gastrointestinalen Tumoren zu evaluieren.

Dazu wurden die zur Inhibition des EGFR zur Verfügung stehenden Substanzen Cetuximab, Gefitinib und Erlotinib auf ihre Potenz zur Wachstumshemmung, Zellzyklusmodulation und Apoptoseinduktion bei hepatozellulären, neuroendokrinen und ösophagealen Karzinomzellen untersucht. Mit dem zur Inhibition des IGF-1R-Signalweg zur Verfügung stehenden Tyrosinkinaseinhibitor NVP-AEW541 wurden entsprechende *in vitro*-Studien an hepatozellulären, kolorektalen sowie neuroendokrinen gastrointestinalen Tumorzellmodellen durchgeführt. Die Mechanismen, denen die antineoplastischen Wirkungen der untersuchten Arzneistoffe zugrunde liegen, wurden mit Hilfe zellbiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden charakterisiert.

Um die an Zelllinienmodellen erzielten Ergebnisse direkt an individuellen humanen Tumoren zu evaluieren, wurden zudem Untersuchungen an Primärzellkulturen aus Operationsresektaten oder Biopsaten verschiedener humaner gastrointestinaler Tumoren durchgeführt, die im Vergleich zu Zelllinien ein patientennäheres Untersuchungsmodell darstellen.

Wachstumsfaktorrezeptor-exprimierende Tumorzellen, speziell solche mit autokriner Sekretion von Wachstumsfaktoren, entwickeln oftmals Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Ein Ansatz, die Wachstumsfaktorrezeptor-vermittelte Chemotherapieresistenz zu überwinden, besteht in der Hemmung dieses Signalwegs während der Chemotherapie (Woodburn, 1999). Aufgrund vorbeschriebener additiver oder gar synergistischer

Wirkungsverstärkung verschiedener Chemotherapeutika mit Wachstumsfaktorrezeptor-TK-Inhibitoren (Ciardiello *et al.*, 2002; Mita *et al.*, 2002; Ratjan *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Koizumi *et al.*, 2004) war es daher ein zusätzliches Anliegen, derartige Kombinationen auch bei den hier untersuchten gastrointestinalen Tumormodellen zu charakterisieren. Außerdem wurde darauf hingewiesen, dass die Konvergenz von EGFR- und IGF-1R Signalwegen einen interessanten Ansatzpunkt für additive/synergistische Wachstumsinhibitionen darstellen kann. Auch dieser Aspekt wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht. Insgesamt wurden folgende kombinationstherapeutische Ansätze in den verschiedenen *in vitro*-Modellen evaluiert:

- die Modulation der antiproliferativen Effekte konventioneller Chemotherapeutika durch simultane EGFR- bzw. IGF-1R-Inhibition,
- die simultane Blockade von EGFR und IGF-1R,
- sowie die duale Blockade des EGFR durch EGFR-Antikörper und EGFR-TKI.

Insgesamt wurden 9 Originalarbeiten zu den beschriebenen Fragestellungen veröffentlicht bzw. befinden sich bereits im Druck. Die Arbeiten sind im anschließenden Ergebnisteil nach Tumorentitäten unterteilt aufgeführt. Den Anfang bilden die Ergebnisse zur EGFR- bzw. IGF-1R-Inhibition beim hepatozellulären Karzinom (Kap. 2.1), das mit 5 Publikationen am umfanglichsten untersucht wurde. Im zweiten Teil schließen sich Arbeiten zur Wachstumsinhibition neuroendokriner gastrointestinaler Tumore durch EGFR-Blockade bzw. IGF-1R-Inhibition an (2 Publikationen) (Kap. 2.3). Im dritten Teil werden ergänzende Ergebnisse zur IGF-1R Inhibition beim kolorektalen Karzinom sowie zur EGFR-Inhibition beim Ösophaguskarzinom dargestellt (Kap. 2.5). Am Ende eines jeden Ergebnisteils werden die wichtigsten Untersuchungsergebnisse kurz zusammengefasst, bevor sie im abschließenden Diskussionsteil einer Bewertung unterzogen werden.