
Aus der Klinik für Gynäkologie,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit des
anti-Mesothelin-Immunkonjugates Anetumab Ravtansine
an murinen Zervixkarzinommodellen

Exploration of the therapeutic effect of the anti-Mesothelin-
immunoconjugate Anetumab Ravtansine on murine models of
cancer of the cervix uteri

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lea Elisa Lazzerini

Datum der Promotion: 25.06.2023

Vorwort

Ein Teil der Ergebnisse dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen erschienen:

- Jöhrens K, Lazzerini L, Barinoff J, Sehouli J, Cichon G. Mesothelin as a target for cervical cancer therapy. Arch Gynecol Obstet. 2019 Jan;299(1):211-216. doi: 10.1007/s00404-018-4933-z. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30324544.
- Lazzerini L, Jöhrens K, Sehouli J, Cichon G. Favorable therapeutic response after anti-Mesothelin antibody-drug conjugate treatment requires high expression of Mesothelin in tumor cells. Arch Gynecol Obstet. 2020 Nov;302(5):1255-1262. doi: 10.1007/s00404-020-05734-9. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32815024; PMCID: PMC7524828

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
Abstract	14
Abstract (English)	16
1 Einleitung	17
1.1 Mesothelin	17
1.1.1 Aufbau und Funktion	17
1.1.2 Expression	18
1.1.3 Mesothelin als diagnostischer Marker	20
1.1.4 Mesothelin und onkologische Therapie	22
1.2 Zervixkarzinom	27
1.2.1 Epidemiologie	27
1.2.2 Therapie	28
1.2.3 Prognose	31
1.3 Fragestellung	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Zelllinien	33
2.2 Therapeutika	33
2.3 Zellkultur	33
2.4 Ermittlung der Zellzahl	34
2.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen	34
2.6 Immunhistochemie	34

2.7	MTT-Assay.....	35
2.8	In-vivo Testung.....	36
2.8.1	Tumorverabreichung.....	36
2.8.2	Versuchsaufbau	36
2.9	Statistik	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Mesothelin Färbung	38
3.2	MTT Assay.....	39
3.2.1	Zytotoxizität von BAY 94-9343 auf HeLa Zellen.....	39
3.2.2	Zytotoxizität von BAY 94-9343 auf Cx-03 Zellen.....	40
3.2.3	Zytotoxizität von BAY 94-9343 auf Caski Zellen	41
3.3	In vivo Testung von BAY 94-9343	42
3.3.1	HeLa Tumore (starke Mesothelinexpression)	42
3.3.2	Cx-03 Tumore (moderate Mesothelinexpression)	47
3.3.3	Caski Tumore (keine Mesothelinexpression)	50
4	Diskussion.....	52
4.1	Mesothelinexpression in Zervixkarzinomen	53
4.2	Wirksamkeit von Anetumab-Ravtansine	54
4.3	Ansätze zur Therapieoptimierung.....	55
4.3.1	Freies Mesothelin.....	55
4.3.2	Applikationsschema	56
4.3.3	Kombinationstherapie	57
4.3.4	Resistenzentwicklung.....	57
4.4	Toxizität.....	58
4.5	Fehlerquellen	60
4.6	Limitationen.....	60

4.7 Zusammenfassung.....	61
Quellenverzeichnis	62
Eidesstattliche Versicherung	70
Anteilerklärung.....	71
Lebenslauf.....	72
Publikationsliste.....	73
Danksagung	74
Bescheinigung Statistik	75

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Mesothelinexpression in einen Adenokarzinom *in situ* (a), in einen Adenokarzinom (b), in einen Plattenepithelkarzinom (c) der Zervix und in einen HeLa-Xenograft Tumor (d).39
- Abbildung 2: Inhibitionsrate von BAY 94-9343 auf HeLa Zellen. 10^3 HeLa Zellen wurden nach 24h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 für weitere 48h behandelt. Danach wurde die Zellviabilität mittels MTT-Tests gemessen und die Zellinhibition berechnet.....40
- Abbildung 3: Inhibitionsrate von BAY 94-9343 auf Cx-03 Zellen. 10^3 Cx-03 Zellen wurden nach 24h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 für weitere 48h behandelt. Danach wurde die Zellviabilität mittels MTT-Tests gemessen und die Zellinhibition berechnet.....41
- Abbildung 4: Inhibitionsrate von BAY 94-9343 auf Caski Zellen. 10^3 Caski Zellen wurden nach 24h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 für weitere 48h behandelt. Danach wurde die Zellviabilität mittels MTT-Tests gemessen und die Zellinhibition berechnet.....42
- Abbildung 5: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit PBS i.p. zwei Mal je Woche, 4 Wochen lang. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.43
- Abbildung 6: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 2 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, 4 Wochen lang. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.43
- Abbildung 7: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 5 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.44
- Abbildung 8: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.45

- Abbildung 9: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. einmal pro Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.46
- Abbildung 10: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. alle 3 Wochen, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.46
- Abbildung 11: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit PBS i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.47
- Abbildung 12: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 2 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.48
- Abbildung 13: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 5 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.48
- Abbildung 14: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.49
- Abbildung 15: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. einmal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.50
- Abbildung 16: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit PBS i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.51
- Abbildung 17: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 5mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.51
- Abbildung 18: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach

Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.52

Abbildung 19: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach einmaliger Gabe von 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. einmal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Stadien bei Zervixkarzinom.....	13
Tabelle 2: Relative 5-und 10-Jahres-Überlebensraten bei Zervixkarzinom in Abhängigkeit vom UICC-Stadium aus dem Krebsregister Bayern (n=14.606), 1998-2011. UICC-Stadien nach TNM-Klassifikation: UICC 0 = Tis N0 M0; UICC I = T1 N0 M0; UICC II = T2 N0 M0; UICC III = T3 N0 M0 oder T1-3 N1 M0; UICC IV = T4 N0 M0 oder T4 N1 M0 oder jedes T jedes N M1. Quelle: Krebsregister Bayern.....	15
Tabelle 3: Charakterisierung der benutzten Zervixkarzinom-Zelllinien.....	17
Tabelle 4: Behandlungsschema von Zervixkarzinomen mit Anetumab Ravtansine.....	21
Tabelle 5: Häufigkeit und Intensität der Mesothelin Färbung von Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome der Zervix.....	22

Abkürzungsverzeichnis

ADA	Anti-Drug-Antibody
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADC	Antibody-Drug-Conjugate
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	B-cell-lymphoma-Protein
CA125	Cancer-Antigen 125
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CO ₂	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
Cu	Kupfer
DCR	Dose Conversion Ratio
DLT	Dosis Limitierende Toxizität
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases

EZM	Extrazelluläre Matrix
Fab	Fragment antigen binding
FCS	Fetales Kalbsserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
GM-CSF	Granulocyte-macrophage Colony Stimulating Factor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HE4	Human Epididymis Protein 4
HPV	Humanen Papillomvirus
IC50	Inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-6	Interleukin 6
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
In	Indium
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
IR	Inhibitionsrate
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JÜR	Jahre Überlebensrate
kDA	kilodalton

KG	Körpergewicht
MAP	Mitogen-Activated Protein
MDR	Multi Drug Resistance
MHC	Major Histocompatibility Complex
MM	Malignes Mesotheliom
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPF	Megakaryocyte Potentiating Factor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSA	Microtubule Stabilising Agent
MSLN	Mesothelin
MTD	Mittlere Tagesdosis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MUC16	Mucin 16
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OD	Optische Dichte
ORR	Objective Response Rate
OS	Overall Survival
P53	Protein 53
PE38	Pseudomonas Exotoxin 38
PBS	Phosphate Buffered Saline

PFS	Progress Free Survival
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PUMA	p53-Upregulated Modulator of Apoptosis
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
SAGE	Serial analysis of gene expression
s.c.	Subkutan
Scid	Severe Combined Immunodeficiency
sIL-6R	Soluble Interleukin 6 Receptor
SMRP	Small Mesothelin Related Peptide
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
Stat3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
TACE	Tumor necrosis factor alpha Converting Enzyme
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNM	Tumor Nodes Metastasis
UICC	Union for International Cancer Control
VLP	Virus Like Particle
Zr	Zirconium

Abstrakt

Einleitung: Mesothelin (MSLN) ist ein membranständiges Glykoprotein, das unter physiologischen Bedingungen nur von mesothelialen Zellen exprimiert wird. In verschiedenen Tumorentitäten wurde eine Überexpression von Mesothelin beobachtet, was dieses Membranprotein zu einem Ziel für neue antikörperbasierte Immuntherapien macht. In dieser Studie wurde die Expression von Mesothelin in humanen Zervixkarzinomen sowie die therapeutische Wirksamkeit des anti-Mesothelin-Immunkonjugates Anetumab Ravtansine (BAY 94-9343) an murinen Zervixkarzinommodellen untersucht.

Methoden: Die Mesothelinexpression von 79 Zervixkarzinomproben wurde mittels immunhistochemische Färbung (IHC) bewertet. Es wurden drei Zervixkarzinomzelllinien mit starker (HeLa), moderater (Caski) und ohne (Cx-03) Mesothelinexpression ausgewählt. Die zytotoxische Wirkung von Anetumab Ravtansine wurde auf diese drei Zelllinien mittels MTT-Assay getestet. Danach wurde die Tumorantwort auf BAY 94-9343 in murinen Zervixkarzinommodellen untersucht. Hierfür wurden Scid Mäuse mit HeLa, Caski oder Cx-03 Tumoren mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 oder PBS als Kontrolle behandelt. Die Tumorantwort wurde mittels RECIST-Score bemessen.

Ergebnisse: 50/79 (63%) Zervixkarzinome zeigten eine positive Mesothelinexpression in der IHC-Färbung. Die Adenokarzinome hatten einen höheren Anteil an MSLN-positiven Tumoren, als die Plattenepithelkarzinome (77% gegen 57%). Die MTT-Untersuchung zeigte eine spezifische, dosisabhängige zytotoxische Wirkung von Anetumab Ravtansine auf Mesothelin-exprimierende Zervixkarzinomzellen. BAY 94-9343 zeigte keine Wirkung auf den Mesothelin-negativen Caski-Tumoren im Tiermodell. Bei moderater Mesothelinexpression (Cx-03-Tumoren) konnte 1/7 Tumore unter der Therapie mit 10 mg/kg BAY 94-9343 zweimal pro Woche oder mit wöchentlicher Gabe von 15 mg/kg BAY 94-9343 eradiziert werden. Bei hoher Mesothelinexpression (HeLa Tumore), wurden durch die Gabe von 10 mg/kg BAY 94-9343, zweimal pro Woche, 7/8 Tumoren komplett eradiziert. Sowohl die Gabe von 15 mg/kg einmal pro Woche als auch alle 3 Wochen, konnte eine Eradikation bei allen (7/7) Mäusen erreichen.

Zusammenfassung: In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nahezu 75% der Adenokarzinome der Zervix und etwa die Hälfte der Plattenepithelkarzinome prinzipiell für eine Therapie mit Anetumab Ravtansine geeignet sind. Die Wirksamkeit von

Anetumab Ravtansine ist abhängig von der Stärke der Mesothelinexpression, sodass eine sorgfältige Selektion durch IHC erfolgen sollte.

Abstract (English)

Purpose: The cell surface glycoprotein Mesothelin (MSLN) is physiologically expressed in mesothelial cells. It has been found that MSLN is overexpressed in several tumor entities. The aim of this study was to evaluate the MSLN expression in cervical cancer and the therapeutical effect of the novel anti-Mesothelin drug conjugate Anetumab Ravtansine (BAY 94-9343).

Methods: We analyzed the expression of MSLN in 79 cervical carcinomas through immunohistochemistry. We selected three cervical cancer cell lines with high (HeLa), moderate (Caski) and no (Cx-03) MSLN expression and measured the cytotoxicity of Anetumab Ravtansine via MTT-Assay. BAY 94-9343 was applied for dose-efficiency studies in Scid mice previously injected with the cervical cancer entities mentioned above. The RECIST-Score was used to evaluate the tumor response.

Results: In 77% of cervical adenocarcinomas, Mesothelin was expressed to high levels. Among squamous cell carcinomas of the cervix uteri expression levels were lower, but 57% still showed a MSLN expression. Anetumab Ravtansine showed a MSLN- and dose-dependent therapeutic effect in cervical cancer models in the MTT-Assay. There was no shown effect of BAY 94-9343 in the MSLN-negative Caski model in Scid mice. Applying BAY 94-9343 at a dose of 10 mg/kg twice weekly or 15 mg/kg weekly induced complete tumor regression in 1/7 mice in the Cx-03 model with moderate MSLN-expression. 7/8 HeLa-tumors with high MSLN expression have been eradicated applying BAY 94-9343 at a dose of 10 mg/kg twice weekly and 7/7 HeLa-tumors have been eradicated applying BAY 94-9343 at a dose of 15 mg/kg weekly or every three weeks.

Conclusions: With an overexpression of Mesothelin in almost three quarters of the cervical adenocarcinomas and over the half of the squamous cell carcinomas of the cervix uteri, Anetumab Ravtansine should be further investigated in the treatment of cervical cancer.

1 Einleitung

1.1 Mesothelin

Mesothelin (MSLN) ist ein membranständiges Glykoprotein, das unter physiologischen Bedingungen nur von mesothelialen Zellen des Peritoneums, der Pleura und des Perikards exprimiert wird. In verschiedenen Tumorentitäten des Menschen wie dem Pleuramesotheliom, Pankreaskarzinom, Ovarialkarzinom oder auch Zervixkarzinom wurde eine Überexpression von Mesothelin beobachtet, was dieses Membranprotein zu einem Ziel für neue antikörperbasierte Immuntherapien macht.

1.1.1 Aufbau und Funktion

Das MSLN Gen befindet sich auf dem Chromosom 16 und exprimiert mehrere Varianten des MSLN Proteins. Durch Spaltung eines 71-kDa Vorläuferproteins entstehen das 40-kDa Mesothelin und der 31-kDa megakaryocyte potentiating factor (MPF). Mesothelin wird durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Zellmembran gebunden¹. Die Variante 1 kann mittels Spaltung des GPI-Ankers durch Proteasen der Matrix-Metalloproteasen (MMP)-ADAM Familie in die extrazelluläre Matrix freigelassen werden. Es wird zur Zeit angenommen, dass die Variante 1 dem freien, löslichen small mesothelin related peptide (SMRP) entspricht². Durch abnormales splicing können die Varianten 2 oder 3 entstehen. Die Variante wurde 3 vor allem im Nukleus gefunden und entspricht wahrscheinlich der unprozessierten hnRNA. Die Variante 2 wurde nur selten gefunden³.

Die Funktion des Mesothelins ist bisher noch nicht geklärt. Knock-out Mäuse zeigten eine normale Entwicklung, ohne anatomische oder histologische Veränderungen⁴. Viele Tumorentitäten zeigen jedoch eine Überexpression des Glykoproteins (Mesotheliome, Plattenepithelkarzinome des Ösophagus und der Zervix, Ovarial-, Pankreas-, Lungen-, Magen-, Gallengang- und triple-negative Mammakarzinome)⁵. Es bestehen Hinweise dafür, dass das Mesothelin eine Rolle in der Zelladhäsion, -proliferation und -migration spielt. Es wurde beobachtet, dass zwischen Mesothelin und dem Protein CA125 eine heterotypische Bindung entstehen kann. CA125 wird von den meisten Ovarialkarzinomen exprimiert. Da es bei Ovarialkarzinomen in vielen Fällen zu peritonealer Metastasierung kommt, wird vermutet, dass eine Zelladhäsion durch die Bindung von CA125 an das physiologisch von den Peritonealzellen exprimierte MSLN entsteht⁶⁷. Die Bindung von

MSLN und CA125 aktiviert MAP-Kinasen in Pankreaskarzinomen, die wiederum MMP-7 induzieren⁸. MMP-7 kann auch durch einen CA125-unabhängigen Weg durch das MSLN aktiviert werden. Die Enzyme der Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) sind in der Tumorgenese für die Invasivität und Angiogenese verantwortlich. In Ovarialkarzinomen wurde durch Aktivierung der MAP-Kinase, des ERK- und JNK-Weges eine Induktion von MMP-7 nachgewiesen⁹. Eine Korrelation zwischen MSLN Expression, Angiogenese und Zellmigration wurde auch in Mesotheliomen und MSLN-positiven Mammakarzinomen beobachtet. Die Angiogenese und Zellmigration resultierten hier jedoch durch eine Induktion von MMP-9^{10; 11}.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MSLN die Zellproliferation in Tumormodellen fördert. In Pankreaskarzinomen wurde die Apoptose durch MSLN über einen p53-abhängigen Weg inhibiert. Der Transkriptionsfaktor p53 aktiviert die proapoptotischen Signalmoleküle Bax/Bak und hemmt die antiapoptotische Bcl-2 Familie mit Hilfe von PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis). Aber auch ein p53-unabhängiger Mechanismus wurde beschrieben¹². Außerdem zeigten Tumorzellen mit erhöhten MSLN Expression eine Resistenz gegen der TNF- α induzierten Apoptose und somit eine erhöhte Zellproliferation¹³.

1.1.2 Expression

1.1.2.1 Immunhistochemie

1.1.2.1.1 Normales Gewebe

Physiologisch exprimieren nur Zellen mesotheliale Ursprungs MSLN. In der immunhistochemischen Untersuchung (IHC) zeigt sich eine einschichtige Verteilung des MSLN⁵ in Mesothelialzellen des Peritoneums, der Pleura und des Perikards, sowie in Epithelzellen der Trachea, der Tonsillen, des Rete Testis, der Eileiter, der Ovarien, der Tunica Vaginalis^{14; 15} und der Kornea¹⁶.

1.1.2.1.2 Malignes Gewebe

Viele Untersuchungen zeigten eine verstärkte MSLN Expression in malignen Tumoren, oft mit einer diffusen membranösen oder zytoplasmatischen Gewichtung. Die Ergebnisse der IHC variieren jedoch zwischen den Studien. Dies hängt vor allem von den zur Fär-

bung angewendeten Antikörpern und dem zur Auswertung zugrunde gelegten Bewertungssystem ab. Insgesamt waren zwischen 55-88% der Ovarialkarzinome^{17; 18} und 100% der epithelialen Mesotheliome MSLN-positiv. Die meisten Pankreaskarzinome zeigen eine positive MSLN Färbung (83-100%), sowie viele Gallengangstumore (37-100%)¹⁸. Weitere MSLN-positive Tumore sind Plattenepithelkarzinome der Zervix (25% - 60%), der Lunge (18%), des Kopfes und Halses (67%)¹⁹. Ferner Adenokarzinome der Lunge (39-50%), Endometriumkarzinome (60-67%), kolorektale Karzinome (28-58%)¹⁹, gastroösophageale Karzinome (25-58%)^{19; 20}, triple-negative Mamma-Karzinome (67%)^{19; 21}, synoviale Sarkome (100%), Teratome (100%), kleine desmoplastische Rundzelltumore (58%)¹⁹ und Tumorzellen der akuten myeloischen Leukämie (81%)²². Es wurde keine MSLN Expression in der IHC in Schilddrüsenkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Urothelkarzinomen, Melanomen, Hepatomen, kleinzellige Lungenkarzinomen, Nebennierenrinden Karzinomen, Adenokarzinomen der Prostata und Karzinoiden gefunden^{15; 23}.

1.1.2.2 mRNA Analyse

Die Analyse der MSLN Expression durch DNS-Microarrays zeigt ähnliche Ergebnisse wie die IHC. Die höchste Expression wurde in Ovarialkarzinomen (66%), Zervixkarzinomen (25%), Pankreaskarzinomen (36%), Magenkarzinomen (24%), kolorektalen Karzinomen (21%), Adenokarzinomen des Ösophagus (13%) und triple-negativen Mammakarzinomen (28%) beschrieben. Niedrige Werte wurden auch in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus (3%), Schilddrüsenkarzinomen (5%), Nierenzellkarzinomen (9%), akute myeloische Leukämien (5%)¹⁹, Meningeomen, Prostatakarcinomen (2%) und hepatozelluläre Karzinomen (2%) gemessen. Es zeigten sich bei einigen Tumorentitäten große Unterschiede zwischen den Ergebnissen der IHC-Färbung und der mRNA Analyse. Zum Beispiel exprimierten deutlich weniger Synovialsarkome, Plattenepithelkarzinome vom Kopf/Hals und Pankreaskarzinome MSLN als in der IHC¹⁹. In der Studie von Frierson et al. wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt: Adenokarzinome der Lunge, gastroösophageale Adenokarzinome, Ovarialkarzinome und Pankreaskarzinome zeigten eine sehr starke MSLN Expression. In kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen und hepatozellulären Karzinomen konnte nur eine moderate Expression festgestellt werden²³.

1.1.3 Mesothelin als diagnostischer Marker

1.1.3.1 Mesothelin als Tumormarker

Durch die limitierte Expression von MSLN im normalen und Überexpression in tumorösen Geweben ist MSLN ein potenzieller immunhistochemischer Parameter zur Diagnose oder Differenzierung von Tumoren. Zum Beispiel kann MSLN als Marker herangezogen werden um duktale Pankreaskarzinome von normalem, chronisch entzündlichem Pankreasgewebe, oder von anderen Pankreastumoren zu unterscheiden. Die Sensitivität von 75% und die Spezifität von 80% waren anderen Markern jedoch unterlegen ²⁴. Die starke Expression von MSLN kann auch in der Diagnose von nicht-muzinösen Ovarialkarzinomen, dem kleinzelligen desmoplastischen Rundzelltumor (andere Typen von Rundzelltumoren sind MSLN negativ) oder dem cholangiozellulären Karzinom (Differenzierung zum MSLN-negativen Hepatom) genutzt werden ¹⁵. Die Stärke der Mesothelinexpression wird auch zu Differenzierung von metastasierten Nierenzellkarzinomen und malignen Mesotheliomen (MM) herangezogen ²⁵. MSLN-positive Zellen wurden in high-grade Dysplasien von Barrett-Mukosa und in 46% der Adenokarzinome des Ösophagus beobachtet. Normales Gewebe und low-grade Dysplasien hingegen exprimierten kein MSLN ²⁶. Zurzeit läuft eine klinische Studie die das Mesothelin als klinischen Marker für das Ösophaguskarzinom untersucht (NCT01393483).

Die Expression von MSLN kann auch als prognostischer Marker benutzt werden. Eine starke Expression von MSLN korrelierte zum Beispiel bei cholangiozellulären Karzinomen ²⁷, Ovarialkarzinomen ²⁸ und Adenokarzinomen der Lunge ²⁹ mit einer schlechten Prognose. Die hohe Koexpression von MSLN und CA125 in Pankreastumoren ist ein negativer prognostischer Faktor für die Patienten und ist mit einer größeren Invasivität verbunden ³⁰. In der Prognose der Erkrankung spielt auch das Expressionsmuster eine Rolle. In kolorektalen Karzinomen konnte zwar keine Korrelation zwischen der MSLN Expression und der Prognose bewiesen werden, es wurde jedoch eine positive Korrelation zwischen der Expressionsstärke und dem Grad der lymphatischen Metastasierung festgestellt ³¹. Dasselbe Ergebnis wurde bei Magenkarzinomen beschrieben ³².

1.1.3.2 Serummesothelin als Tumormarker

1.1.3.2.1 Malignes Mesotheliom

Das maligne Mesotheliom (MM) ist ein seltener, oft schwer diagnostizierbarer Tumor mesotheliale Ursprungs. Die Entstehung des Tumors wird mit der Exposition mit Asbest in Verbindung gebracht. Da das MM zu fast 100% Mesothelin exprimiert, wurde das Protein als Tumormarker intensiv untersucht. Das lösliche Mesothelin (SMRP) wird von den Tumorzellen sezerniert und kann in Serum, Pleuraflüssigkeit, Aszites und Urin nachgewiesen werden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass SMRP in höheren Konzentrationen im Serum von Patienten mit MM als von Gesunden oder Patienten mit anderen Tumorarten, wie z.B. Lungenkarzinomen, identifiziert werden konnte³³. Das Serum-SMRP konnte in eine Metaanalyse eine Sensitivität von ca. 61% und eine Spezifität von 87% für die Diagnose von MM erreichen. Untersuchungen der SMRP-Werte in der Pleuraflüssigkeit hatten im Schnitt einen größeren diagnostischen Wert, mit einer Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 85%³⁴. Die Sensitivität von SMRP im Urin war mit 53% sehr gering und konnte sich zur MM Diagnostik nicht durchsetzen³⁵. Insgesamt wird das SMRP durch seine geringe Sensitivität als diagnostischer Marker limitiert. Die diagnostische Sicherheit kann durch die Kombination von SMRP mit weiteren Markern erhöht werden und wird derzeit erforscht. Zum Beispiel konnte die Sensitivität durch die Kombination mit dem Marker Thioredoxin-1 bis zu 100 % erhöht werden. Die kombinierte Spezifität sinkt jedoch auf bis zu 27,7%³⁶. Durch die Kombination von SMRP und CEA konnte, bei gleicher Spezifität, die Sensitivität erhöht werden^{37;38}. SMRP erscheint als guter Marker für die Differentialdiagnose des MM, jedoch nicht als Frühmarker der Tumorerkrankung³⁹. Um die Sensitivität für frühe Stadien der Erkrankung zu verbessern, können mehrere Marker herangezogen werden, wie microRNA-126 und Methyliertes Thrombomodulin Promoter (Met-TM)⁴⁰.

Des Weiteren zeigte sich bei Patienten mit MM eine positive Korrelation zwischen hohen SMRP-Werten und einer schlechteren Prognose⁴¹.

1.1.3.2.2 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom ist der gynäkologische Tumor mit der schlechtesten Prognose, da er meist erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium diagnostiziert wird. Derzeit wird CA125 als Tumormarker für die Diagnose und als Verlaufsparemeter bei Ovarialkarzinomen genutzt. Es wurde untersucht, inwieweit die Serumkonzentration von MSLN zum Screening und der Früherkennung von Ovarialkarzinomen Bedeutung erlangen kann. Hassan et al. zeigten, dass 14 der 21 untersuchten Ovarialkarzinome erhöhte SMRP

Werte im Serum vorwiesen. Außerdem setzten 2 von 5 in der IHC als MSLN-negativ (MSLN Expression < 30%) gewerteten Tumore lösliches MSLN frei ⁴². In weiteren Studien wurde eine hohe Konzentration von SMRP im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen gefunden ⁴³. Das SMRP wurde als ein guter diagnostischer Faktor beschrieben, um maligne von benigne Tumoren zu unterscheiden ⁴⁴. Insgesamt erreichte das SMRP eine Sensitivität von 62% und eine Spezifität von 94% ⁴⁵. Das Serum-SMRP scheint jedoch, im Gegensatz zu MSLN im Urin, kein guter Marker für Frühstadien bei Ovarialkarzinome zu sein ⁴⁶. Das im Urin gemessen lösliche MSLN zeigte eine bessere Sensitivität als Serum-MSLN bei der Diagnose von frühen Stadien von Ovarialkarzinomen ⁴⁷.

Es wurde eine positive Korrelation zwischen den SMRP-Werten und dem Tumorstadium, des Grading und der Tumorgröße beschrieben ^{28; 48}. Es wurden erhöhte SMRP-Werte bei älteren Frauen und erniedrigte Werte bei adipösen Patientinnen festgestellt. Der Einfluss dieser Faktoren ist bei onkologischen Erkrankungen aber nicht bedeutsam ⁴⁹.

1.1.4 Mesothelin und onkologische Therapie

Durch seine verstärkte Expression in Malignomen und dem Umstand, dass es als membranständiges Protein auch von extrazellulär erreichbar ist (z.B. durch spezifische Antikörper), wird Mesothelin zu einer vielversprechenden Zielstruktur für neue Therapieansätze, insbesondere für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (Antibody-Drug-Conjugates: ADC). ADC werden gebildet, indem ein kleinmolekulares Chemotherapeutikum mit einem spezifischen Antikörper verbunden wird. Zurzeit befinden sich mehrere neuartige therapeutische Ansätze in der frühen klinischen Erprobung.

1.1.4.1 Amatuximab (MORAb-009)

Amatuximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper (IgG1 / κ) mit hoher Affinität und Spezifität für Mesothelin. Durch Bindung und Opsonierung der Antikörper wird die zelluläre Immunantwort gegen den Antigen-Antikörper Komplex aktiviert. *In vitro* konnte MORAb-009 das Wachstum von MSLN exprimierenden Tumorzellen hemmen und die Bindung von CA125 an MSLN unterbinden ⁵⁰. Die Aufnahme und Verteilung von MORAb-009 wurde in mehreren bildgebenden Studien untersucht. Dafür wurde der Antikörper mit radioaktiven ¹¹¹In, ⁸⁹Zr-B3 oder ⁶⁴Cu konjugiert und seine spezifische Bindung und Anreicherung in Primärtumoren und Metastasen der Leber, der Niere und der Milz mittels SPECT-CT dargestellt. Die Gabe von höheren MORAb-009 Dosen zeigte eine

relativ stärkere Aufnahme des Antikörpers in Tumorzellen. Es wird vermutet, dass in höheren Konzentrationen zunächst das freie, lösliche Mesothelin abgefangen wird, und danach ein höherer Anteil des Antikörpers im Tumor gebunden werden kann⁵¹⁻⁵³. In MSLN-positiven murinen Tumormodellen zeigte die Kombination von Amatuximab mit Gemcitabin eine bessere Wirkung als die Monotherapie mit Gemcitabin⁵⁰. Darüber hinaus konnten Mizukami et al. in murinen Tumormodellen zeigen, dass eine Kombination mit Gemcitabin auch die Entwicklung von Metastasen reduziert⁵⁴. Eine Kombination von MORAb-009 mit Taxol zeigte bei allen Mäusen mit A431-k5 Tumoren eine Verkleinerung des Tumolvolumens, 4/7 Mäuse zeigten sogar eine komplette Tumorregression⁵⁰. Zwei klinische Studien der Phase 1 wurden in den U.S.A. und in Japan durchgeführt um die Sicherheit, die Dosis limitierende Toxizität (DLT) und maximal tolerierbare Dosis (MTD) des Antikörpers festzustellen. Die ersten klinischen Untersuchungen wurden an 13 Patienten mit Mesotheliomen, 7 Patienten mit Pankreaskarzinomen und 4 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen durchgeführt. MORAb-009 wurde über 4 Wochen 1x/Woche i.v. appliziert. Die MTD wurde auf 200 mg/m² festgelegt, mit Grad 4 Transaminasenerhöhung und Grad 3 Serumkrankheit als DLT. Insgesamt wurde die Therapie gut toleriert und 11/24 Patienten zeigten im CT einen stabilen Verlauf⁵⁵. In einer japanischen Studie wurden 7 Patienten mit MSLN-positiven kolorektalen Karzinomen, 6 Patienten mit Pankreaskarzinomen, 2 Patienten mit Mesotheliomen und 2 Patienten mit Kopf-Hals Karzinomen eingeschlossen. Sie erhielten das gleiche Applikationsprotokoll wie in der vorher genannten Studie. Die MTD wurde auf 200 mg/m² festgelegt, mit Fatigue und Fieber als DLT. 3/17 Patienten entwickelten eine stabile Erkrankung, 11/17 zeigten jedoch eine Tumorprogress⁵⁶. Bisher wurden die Ergebnisse einer Phase 2 Studie publiziert, die die Kombination von MORAb-009 mit Cisplatin und Pemetrexed bei 89 Patienten mit fortgeschrittenen, nicht-resezierbaren Pleuramesotheliom untersuchte. Bei 40% der Patienten wurde eine partielle Remission beobachtet, 51% hatten einen stabilen Verlauf. Die Kombinationstherapie hat 51% der Patienten ein 6 Monate progressionsfreies Überleben (PFS) ermöglicht, mit einem medianen Gesamtüberleben (Overall Survival, OS) von 14,8 Monaten. Das 6 Monate-PFS war jedoch nicht signifikant höher als die historischen Kontrollen. Im Vergleich zum OS von 13,3 Monaten der Phase III Studie zur Kombination von Cisplatin und Pemetrexed bei Pleuramesotheliomen, scheint der zusätzliche Einsatz von MORAb-009 einen zusätzlichen therapeutischen Effekt zu vermitteln⁵⁷. Weitere klinische Studien zu MORAb-009 werden derzeit durchgeführt.

1.1.4.2 SS1P

SS1P ist ein Immunotoxin, welches sich gegen MSLN exprimierende Zellen richtet. Es entsteht durch die Koppelung eines anti-MSLN Antikörpers mit einem 38-kDa Teil des Pseudomonas Exotoxin A (PE 38). Durch Bindung des Antikörpers an das MSLN wird SS1P internalisiert, intrazellulär freigesetzt und hemmt dort die Proteinsynthese. *In vitro* Versuche wiesen auf eine dosis-abhängige Wirkung von SS1P auf MSLN-positive Tumore hin⁵. Eine synergistische Wirkung von SS1P mit Paclitaxel, Gemcitabin und Cisplatin zeigte sich in Xenograftmodellen, aber nicht bei *in vitro* Untersuchungen. Die Kombination mit den Chemotherapeutika ermöglichte eine vollständige und andauernde Eradikation von A431/K5 Tumoren in Mäusen⁵⁸. Die Kombination von SS1P mit einer Radiotherapie zeigte eine verstärkte Antitumorwirkung in Xenograftmodellen⁵⁹. Derzeit laufen mehrere klinische Frühphasestudien. Die Dosis-Eskalationsstudien wurden an 20 Patienten mit Mesotheliomen, 12 Frauen mit Ovarialkarzinomen und 2 Patienten mit Pankreaskarzinomen durchgeführt. Davon reagierten 4 Patienten mit einer geringfügigen Tumorregression, 19 Patienten hatten eine stabile Erkrankung und in 10 Patienten zeigte sich eine Tumorprogression. Die MTD wurde auf 45 µg/kg festgelegt⁶⁰. Eine Kombination von SS1P mit Pemetrexed und Cisplatin bei Mesotheliomen bewirkte eine bessere Ansprechrate auf die Therapie als auf die Monotherapie mit SS1P⁶⁰. Die Studie zur Untersuchung der Kombination von SS1P mit Bevacizumab, Carboplatin und Paclitaxel bei Patienten mit Stadium IV Adenokarzinomen der Lunge wurde wegen zu weniger Patienten mit MSLN positiven Tumoren abgebrochen. Da schon nach der ersten Gabe die Bildung von Antikörpern gegen das Immunotoxin nachgewiesen werden konnte, wurde zusätzlich der Einfluss einer immunsuppressiven Therapie mit Pentostatin und Cyclophosphamid in Kombination mit SS1P bei 10 Patienten mit Mesotheliomen untersucht. 3/10 Patienten hatten eine deutliche Tumorregression, 2 davon über 15 Monate lang⁶¹. Durch den Einsatz von Bortezomib in Kombination mit dem Pentostatin-Cyclophosphamid Schema konnten die anti-SS1P Antikörper eliminiert und die Anzahl der Plasmazellen im Knochenmark reduziert werden⁶². Zhang et al. zeigten, dass die zytotoxische Wirkung von SS1P abhängig von der Freisetzung von SMRP ist, welches ein limitierender Faktor der Therapie bleibt⁶³.

1.1.4.3 RG7787 (LMB100)

Um die Antikörperbildung nach Verabreichung von Immunotoxinen zu verhindern, wurden immunogene B-Zellepitope und Proteasespaltstellen vom Exotoxin PE 38 entfernt. Das resultierende Exotoxin PE 24 hat die gleiche Aktivität wie PE 38, ist weniger immunogen und hat eine geringere nicht-spezifische Zytotoxizität *in vitro*. RG7787 (auch LMB100 genannt) besteht aus einem humanen anti-MSLN Fab-Fragment, das an PE24 gebunden ist. *In vitro* zeigte RG7787 eine starke zytotoxische Wirkung gegen MSLN-exprimierende Tumore. Die Kombination von RG7787 mit Paclitaxel im Pankreaskarzinom-Xenograftmodell in Mäusen führte zu einer nahezu kompletten Regression der Tumore. Paclitaxel verbesserte dabei nicht die intrazelluläre Aufnahme von RG7787⁶⁴. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Therapie von triple-negativen Mammakarzinomen, Magenkarzinomen und Mesotheliomen in Mäusen gezeigt^{65, 66}. Eine triple Therapie mit Cisplatin und Paclitaxel zeigte eine sehr gute Wirkung in der Therapie von Lungenkarzinomen im Xenograftmodell in Mäusen⁶⁷. Eine Verbesserung der Wirksamkeit von RG7787 konnte außerdem durch eine Reduzierung des freien, löslichen Mesothelins⁶⁸ und Gabe eines DDR1-Inhibitors⁶⁹ erreicht werden. Die klinische Phase 1 Studie zu RG7787 in Kombination mit Paclitaxel bei Patienten mit metastasierten oder fortgeschrittenen Pankreaskarzinom wurde wegen eines schlechten Nutzens/Risiko Verhältnisses frühzeitig beendet. Weitere Phase 1 Studien werden derzeit durchgeführt (NCT01445392, NCT00006981, NCT01362790).

1.1.4.4 DMOT4039A

DMOT4039A ist ein anti-MSLN Antikörper, gepaart mit dem Mitosehemmer Monomethyl Auristatin E. Das Immunotoxin hemmt die Proliferation von MSLN-positiven Tumoren *in vitro* und eine Einzeldosis reicht, um das Tumorstadium *in vivo* zu stoppen (Ovarialkarzinom, Mesotheliom, Pankreaskarzinom). In klinischen Phase Ib Studien wurde die Wirkung von DMOT4039A in 40 Patienten mit nicht-resezierbaren Pankreaskarzinomen und 31 Patientinnen mit platin-resistenten Ovarialkarzinomen untersucht. Das Medikament wurde entweder alle 3 Wochen oder wöchentlich verabreicht. Im ersten Schema wurde eine MTD von 2,4 mg/kg festgelegt mit Grad 3 Hyperglykämien und Grad 3 Hypophosphatämien als DLT. Bei einer wöchentlichen Gabe konnte eine MTD von 1,2 mg/kg gegeben werden. Insgesamt zeigten 6 Patienten der q3w-Gruppe eine partielle Tumorregression (2 Pankreaskarzinome und 4 Ovarialkarzinome)⁷⁰.

1.1.4.5 Anetumab-Ravtansine (BAY 94-9343)

Das Immunkonjugat Anetumab Ravtansine besteht aus einem humanen anti-MSLN Antikörper, der mit dem Maytansinoid DM4 durch einen Disulfidlinker verbunden ist. Das Immunkonjugat bindet an das MSLN-Antigen und wird internalisiert. In den Lysosomen wird der Disulfidlinker gespalten und DM4 freigesetzt. Das Maytansinoid hemmt die Polymerisation des Tubulins und somit die Zellteilung. Bei *in vitro* Versuchen wurde ein IC50 Wert in den nanomolaren Bereich für MSLN-positive Zellen gemessen ⁷¹. Zellen, die kein MSLN exprimieren, waren erst im mikromolaren Bereich von der zytotoxischen Wirkung betroffen. In der Konzentration von ca. 10 mg/kg konnte BAY 94-9343 alle Pankreaskarzinome und Mesotheliome und 4/6 Ovarialkarzinome in Mäusen komplett eradizieren. Die Therapie von Mesotheliomen im Mausmodell mit BAY 94-9343 ergab eine bessere Tumorreduktion als die Therapie mit Cisplatin oder mit Cisplatin und Pemetrexed. Des Weiteren konnte die zytotoxische Wirkung von 10 mg/kg BAY 94-9343 auf Zellen mit geringer Expression von MSLN (bis >20%) bewiesen werden ⁷¹. Das Wachstum von MSLN-negativen Zellen wurde auch geringfügig durch das Immunkonjugat gehemmt. Daher wird von einem Bystander Effekt des ADC ausgegangen ⁷¹. Quanz et al. untersuchte die Wirkung von Anetumab Ravtansine auf Ovarialkarzinome. *In vitro* und *in vivo* Experimente zeigten eine gute Potenz des ADC. In zwei Tumormodellen kam es zu einer Tumoreradikation unter einer Gabe von 15 mg/kg q2w. Unter der Dosierung von 2,5 mg/kg zeigten 3/7 Tumore eine Tumorreduktion. Die Kombination von Anetumab mit Doxorubicin, Carboplatin, Copanlisib oder Bevacizumab konnte die antitumorale Wirkung weiter verbessern ⁷². Aktuell laufen 12 klinische Studien zur Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit von BAY 94-9343.

In der Dosis-Eskalationsstudie Studie von Hassan et al. wurden 148 Patienten mit soliden Tumoren mit Anetumab Ravtansine behandelt (64 Mesotheliome, 64 Ovarialkarzinome, 9 Pankreaskarzinome, 5 Mammakarzinome, 2 NSCLC und 4 andere Karzinome). Die maximal tolerierte Dosis des ADC war 6,5 mg/kg q3w. Die Tumorantwort konnte in 138 Fällen evaluiert werden. 66 Patienten hatten einen stable disease, 11 zeigte eine partielle Remission und bei einem Patienten konnte eine komplette Remission erreicht werden. Die ORR (objective response rate) der Gruppe, die mit 6,5 mg/kg q3w behandelt wurde, lag bei 16% und die DCR (disease control rate) lag bei 65%. Die Gruppe, die 1,8 mg/kg qw erhielt, hatte eine ORR von 9% und eine DCR von 54%. Die Gruppe mit 2,2 mg/kg qw zeigte eine ORR von 6% und eine DCR von 64%. In den Subgruppen zeigten die

Mesotheliome die beste Tumorantwort mit einer ORR von 31% und einer DCR von 75% bei einer Gabe von 6,5 mg/kg q3w. Die Ovarialkarzinome hatten eine ORR von 5% und eine DCR von 57% in der gleichen Dosierung. In den Gruppen mit 1,8 mg/kg oder 2,2 mg/kg qw wurde eine schlechtere ORR erreicht (jeweils 6% und 0% bei den Mesotheliomen; 11% und 10% bei den Ovarialkarzinomen). Insgesamt zeigten die Tumore mit hoher Mesothelinexpression (>66%) die beste ORR (13,3% bei Mesotheliomen und 12,8% bei Ovarialkarzinomen). Es gab jedoch auch Tumore mit hoher MSLN Expression die nicht auf die Therapie ansprachen⁷³. In einer Phase II Studie (NCT02610140) wurde die Wirksamkeit und die Sicherheit von Anetumab Ravtansine im Vergleich zu Vinorelbine bei Patienten mit Mesothelin-exprimierenden, metastasierten Mesotheliomen untersucht. 166 Patienten haben 6,5 mg/kg des ADC q3w und 82 Patienten haben 30 mg/m² Vinorelbine qw erhalten. Der primäre Endpunkt der Studie war der PFS (progression free survival). Hier zeigte die Therapie mit Anetumab Ravtansine keinen Unterschied im Vergleich zu Vinorelbine (medianer PFS jeweils 4,3 und 4,5 Monate). Das Gesamtüberleben war in beiden Gruppen ähnlich (medianer OS von 9,5 Monaten bei Anetumab Ravtansine gegen 11,6 Monaten bei Vinorelbine). Die Studie konnte keine Überlegenheit von Anetumab Ravtansine im Vergleich zu Vinorelbine zeigen.

Die erste klinische Untersuchung von Anetumab Ravtansine zeigte dosislimitierende Nebenwirkungen bei der Gabe von 7,5 mg/kg (q3w) des Immunkonjugates (Grad 3 periphere Neuropathie und Grad 4 Keratitis). Bei einer Dosierung von 6,5 mg/kg (q3w) entwickelte 1/6 Patienten eine ASAT-Erhöhung (Grad 3). Bei der Dosierung von 5,5 mg/kg (q3w) entwickelte 1/6 Patienten eine Hypertonie und Hyponatriämie (Grad 3). 17/38 Patienten, die mit 6,5 mg/kg (q3w) behandelt wurden, mussten die Therapie aufgrund von Nebenwirkungen abbrechen. Bei 18/38 Patienten musste die Dosis reduziert werden⁷³. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Müdigkeit, Übelkeit, Durchfall, Appetitlosigkeit, Erbrechen und periphere sensorische Neuropathien. Die häufigsten Grad 3 Nebenwirkungen waren Übelkeit, Fatigue und Keratopathien. Alle Nebenwirkungen waren nach zwei bis vier Wochen nach Absetzen der ADC-Therapie regredient oder behoben.

1.2 Zervixkarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Weltweit wurden laut der WHO im Jahr 2012 528000 neue Fälle von Zervixkarzinomen gezählt und 266000 resultierende Todesfälle registriert. Davon wurden etwa 4700 Fälle

in Deutschland diagnostiziert, mit einer Mortalität von 1617 Patientinnen im gleichen Jahr. Es ist das vierthäufigste Karzinom der Frau weltweit, allerdings mit regionalen Unterschieden. Die höchste Anzahl von Inzidenzen wird in Entwicklungs- und Schwellenländern gezählt, die keine ausreichenden Präventionsmaßnahmen nutzen. Das mittlere Alter bei Diagnose eines invasiven Zervixkarzinoms liegt bei etwa 53 Jahre. Der Erkrankungsgipfel für schwergradige Krebsvorstufen eines Cervixkarzinoms (CIN III, carcinoma in situ) liegt bei etwa 33 Jahren. In Deutschland werden ca. 50% der invasiven Karzinome im Frühstadium diagnostiziert ⁷⁴. Ca. 80% der Zervixkarzinome sind Plattenepithelkarzinome. Der Anteil der Adenokarzinome hat in den letzten Jahren zugenommen und liegt zurzeit bei ca. 20%. Dieser Anstieg kann durch ein besseres Screening erklärt werden. Einen Einfluss der HPV-Impfung wird zurzeit noch untersucht. Weitere seltene Karzinome der Zervix sind neuroendokrine, klarzellige, serös-papilläre und adenosquamöse Karzinome, sowie Zervixsarkome und Zervixlymphome ⁷⁵.

1.2.2 Therapie

Die Behandlung von Zervixkarzinomen hängt vom Tumorstadium (s. Tabelle 2), den Risikofaktoren (Infiltration der Lymph- oder Blutgefäße, Infiltration der Nervenscheiden, Tumortyp, Differenzierungsgrad) und der persönlichen Situation der Patientin (bestehender Kinderwunsch, bestehende Schwangerschaft, abgeschlossene Familienplanung) ab. Das Tumorstadium wird durch die FIGO-Klassifikation festgelegt.

Tabelle 1: TNM- und FIGO-Stadien bei Zervixkarzinom ⁷⁵

TNM	FIGO	Tumorausbreitung
T1	I	Tumor ist auf der Zervix begrenzt
T1a	IA	Tumor mikroskopisch sichtbar, dringt maximal 5 mm ins Gewebe ein. <ul style="list-style-type: none"> • T1a1/ IA1: Tumor dringt max. 3 mm ins Gewebe ein und ist max. 5 mm breit • T1a2/ IA2: Tumor dringt zw. 3-5 mm ins Gewebe ein und ist max. 5 mm breit
T1b	IB	Invasives Karzinom mit tiefster Invasion ≥ 5 mm (größere Maße als St. T1a1/ IA) <ul style="list-style-type: none"> • T1b1/ IB1: Tiefe der Invasion der Stroma ≥ 5mm, Größe < 2cm • T1b2/ IB2: Tiefe der Invasion ≥ 2cm, Größe < 4cm • IB3: Invasives Karzinom, > 4cm groß
T2	II	Tumor wächst über die Gebärmutter hinaus, erreicht aber nicht die Beckenwand und nicht das untere Drittel der Vagina
T2a	IIA	Tumor breitet sich auf die oberen zwei Drittel der Vagina aus, die Parametrien sind nicht befallen <ul style="list-style-type: none"> • T2a1/ IIA1: < 4 cm groß • T2a2/ IIA2: > 4 cm groß
T2b	IIB	Tumor befällt die Parametrien, erreicht aber nicht die Beckenwand
T3	III	Tumor erreicht die Beckenwand und/oder das untere Drittel der Vagina und/oder es kommt zur Nierenstauung/ Nierenausfall und/oder Befall der pelvinen / paraaortalen Lymphknoten
T3a	IIIA	Tumor erreicht das untere Drittel der Vagina, aber nicht die Beckenwand
T3b	IIIB	Tumor erreicht die Beckenwand und/oder es kommt zur Nierenstauung / Nierenausfall
	IIIC	Befall der pelvinen und/oder der paraaortalen Lymphknoten <ul style="list-style-type: none"> • IIIC1: Befall der pelvinen Lymphknoten • IIIC2: Befall der paraaortalen Lymphknoten
T4	IV	Tumor befällt die Harnblase oder das Rektum oder reicht über das Becken hinaus
	IVA	Tumor befällt die Harnblase oder das Rektum und/ oder Überschreitung des kleinen Beckens
M1	IVB	Fernmetastasen
N1		Regionäre Lymphknoten-Metastasen

Die aktuellen Leitlinien sehen Behandlungen wie folgend vor: im frühen Stadium IA1 sollte eine primäre Operation (Konisation, Trachelektomie oder Hysterektomie) durchgeführt werden.

Im Stadium IA2 und IA1 mit ≥ 2 Risikofaktoren (Lymphangiosis, R1, G3, neuroendokrines Karzinom, Tumor > 4 cm oder intraoperativer Befund pN1 bzw. histologisch positive Lymphknotenmetastase) eine Hysterektomie samt Eileiter. Bei befallenen Lymphknoten werden diese entfernt und die Patientin erhält eine adjuvante Radiochemotherapie im histologisch nachgewiesenen Ausbreitungsfeld.

Ab Stadium IA2 mit mehreren Risikofaktoren sollte immer eine radikale Hysterektomie mit Resektion der Parametrien durchgeführt und die befallenen Lymphknoten entfernt werden. Eine adjuvante Radiochemotherapie wird bei positivem Lymphknotenbefall durchgeführt. Bei mehreren feingeweblichen Risikofaktoren und bei nicht vollständig resezierbarem Tumor kann eine primäre Radiochemotherapie angestrebt werden.

Im Stadium IB1 und IIA1 wird eine radikale Hysterektomie mit Resektion der Parametrien empfohlen. Bei makroskopisch befallenen Lymphknoten sollten diese entfernt werden. Bei bestehendem Kinderwunsch mit Tumoren < 2 cm ohne Risikofaktoren kann eine radikale Trachelektomie mit prophylaktischer Permanentcerclage erwogen werden. Im Falle von positivem Lymphknotenbefall oder mehreren Risikofaktoren soll eine adjuvante Radiochemotherapie durchgeführt werden.

Im Stadium IB2, IIA2 und IIB wird eine radikale Hysterektomie kombiniert mit pelviner und paraaortaler Lymphodonektomie empfohlen, bei Scheidenbefall eine (partielle) radikale Kolpektomie. Bei befallenen Lymphknoten oder mehreren Risikofaktoren sollte die Patientin eine adjuvante Radiochemotherapie erhalten.

Ab dem Stadium IIB wird die primäre Radiochemotherapie kombiniert mit einer pelvinen und paraaortalen Lymphonodektomie bevorzugt. Bei den neuroendokrinen Zervixkarzinom wird im Stadium IIB und IVB eine primäre Radiochemotherapie mittels Cisplatin und Etoposid empfohlen.

Im Stadium III und IVA sollte eine Cisplatin-haltige Radiochemotherapie erfolgen. Bei makroskopisch befallenen Lymphknoten im Stadium III wird ebenfalls eine Lymphodo-

nektomie empfohlen. Bei metastasiertem Zervixkarzinom kann eine Chemotherapie mittels Cisplatin und Topotecan erfolgen. Die Kombination von Cisplatin und Paclitaxel und von Cisplatin, Paclitaxel und Bevacizumab wird noch untersucht. Im Stadium IVB wird eine palliative Chemotherapie mit Bevacizumab, Cisplatin und Paclitaxel oder Bevacizumab, Paclitaxel und Topotecan empfohlen. Eine Bestrahlung oder eine Operation können zur Linderung von Symptomen beitragen ⁷⁵.

1.2.3 Prognose

Jährlich sterben ca. 1500 Frauen an einem Zervixkarzinom in Deutschland. Insgesamt hat das Zervixkarzinom eine relative 5 Jahre-Überlebensrate (5-JÜR) von ca. 69% ⁷⁶, wobei ältere Patientinnen eine deutlich schlechtere Prognose haben ⁷⁷.

Tabelle 2: Relative 5- und 10-Jahres-Überlebensraten bei Zervixkarzinom in Abhängigkeit vom UICC-Stadium aus dem Krebsregister Bayern (n=14.606), 1998-2011. UICC-Stadien nach TNM-Klassifikation: UICC 0 = Tis N0 M0; UICC I = T1 N0 M0; UICC II = T2 N0 M0; UICC III = T3 N0 M0 oder T1-3 N1 M0; UICC IV = T4 N0 M0 oder T4 N1 M0 oder jedes T jedes N M1 ⁷⁵

UICC-Stadium	0	I	II	III	IV
Relative 5-Jahres-Überlebensrate	100%	95%	75%	58%	21%
Relative 10-Jahres-Überlebensrate	100%	93%	71%	51%	16%

Die Mortalität hängt stark von dem Tumorstadium ab (s. Tabelle 2). Die Inzidenz von höheren Stadien (> FIGO IIB) hat sich durch die frühzeitige Erkennung von präinvasiven Vorstufen in den letzten 10 Jahren deutlich verringert. Die 5-JÜR bei einem UICC 1 Stadium beträgt 95%. Ab dem FIGO Stadium IA2 ist keine fertilitätserhaltende Therapie mehr möglich, was ein tiefgreifendes Problem für viele Patientinnen ist. Bei einem UICC 4 Stadium besteht eine 5-JÜR von 21%. 12% der Karzinome sind bei Erstdiagnose primär metastasiert, in einem Drittel der Fälle bestehen regionäre Lymphknotenmetastasen ⁷⁵.

Die Histologie hat einen Einfluss bezüglich der Mortalität. Die neuroendokrinen Tumore haben eine deutlich schlechtere Prognose als die Plattenepithel- und Adenokarzinome mit einer 5-JÜR von ca. 30% ⁷⁸. Ein negativer Einfluss der Histologie auf die Prognose ist bei Adenokarzinomen noch umstritten. Adenokarzinome zeigen eine schlechtere Radiosensitivität als Plattenepithelkarzinome ⁷⁹.

Die Therapie des Zervixkarzinoms bleibt weiterhin eine Herausforderung durch die fertilitätseinschränkenden Methoden und der schlechten Prognose des Zervixkarzinoms in

den fortgeschrittenen Stadien. Es wird ersichtlich, dass neue Therapiemöglichkeiten zur Therapie des Zervixkarzinoms dringend nötig sind.

1.3 Fragestellung

Die Aufgabe der vorliegenden Doktorarbeit war es zum einen die Datenlage zur Häufigkeit und Stärke der Expression von Mesothelin in Zervixkarzinomen zu verbessern und das therapeutische Potential eines neuartigen anti-Mesothelin Antikörperimmunkonjugates (BAY 94-9343) in humanen Zervixkarzinomxenografftumoren an Mäusen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen der Arbeit wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Referenznummer G 0262/10 genehmigt. Die Asservierung und Kultivierung von humanem vitalem Tumorgewebe (Operationspräparate) wurden von dem Ethikkomitee der Charité unter der Referenznummer ek.217/20 genehmigt.

2.1 Zelllinien

Zwei humane Zervixkarzinomzelllinien (HeLa- und Caski-Zellen) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) erworben. Die Cx-03 Zelllinie (humanes Karzinosarkom der Zervix) wurde in der AG Cichon etabliert ⁸⁰.

Tabelle 3: Charakterisierung der benutzten Zervixkarzinom-Zelllinien.

Zellentität	Histologie
HeLa	Plattenepithel Karzinom
Caski	Plattenepithel Karzinom
Cx-03	Karzinosarkom der Zervix mit rhabdomyoblastären Differenzierung.

2.2 Therapeutika

Das Immunkonjugat BAY 94-9343 wurde von der Bayer AG (Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.3 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in DMEM-Medium (4,5 g/L D-Glucose + L-Glutamin, von Gibco, Life Technologies) plus 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kalbserum (FCS) und Antibiotikaschutz mit 10% Penicillin/Streptomycin-Lösung. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% trypsiniert und passagiert. Zu diesem Ziel wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA benetzt und 10 min im Brutschrank bei 37°C + 5% CO₂ inkubiert um die Adhärenz der Zellen zu lösen. Das Trypsin wurde mittels DMEM neutralisiert, die Zellen in Suspension gebracht und in ein Falcon Röhrchen übertragen. Die Zellen wurden dann für 10 min bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und der Pellet mit DMEM wieder resuspendiert. Die Zelllösung wurde danach auf

Zellkulturflaschen verteilt.

2.4 Ermittlung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden 20 µl der trypsinisierten und gewaschenen Zellsuspension mit dem gleichem Volumen 0,5% Trypanblau versetzt und die Zellzahl sowie der Anteil an vitalen Zellen in einer Neubauerkammer ausgezählt. Für die Versuche sowie für die Zellkulturen wurden nur Zellen mit einer Viabilität von über 90% genutzt.

2.5 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die frisch trypsinisierten und gewaschenen Zellen in 80% DMEM/FCS und 20% DMSO aufgenommen und auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Das DMSO verhindert während des Einfrierens die Bildung von intrazellulären Eiskristallen. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und langsam abgekühlt ($1^\circ\text{C}/\text{min}$). Die Proben lagerten zunächst bis zu 2 Wochen bei -80°C im Tiefkühlschrank und wurden im Anschluss in flüssigen Stickstoff kryokonserviert.

Zur Reaktivierung wurden die eingefrorenen Zellen zunächst bei 37°C zügig aufgetaut und in warmes DMEM aufgenommen. Anschließend wurden sie zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem DMEM resuspendiert. Nach Ermittlung der Anzahl wurden die Zellen entweder auf Kulturflaschen verteilt oder direkt für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

2.6 Immunhistochemie

Um das Expressionsniveau von Mesothelin in primären Zervixkarzinomgewebe zu bestimmen wurden 79 Zervixkarzinomproben (Paraffinblöcke) aus dem Archiv der Pathologie der Charité herangezogen. Das Probenkollektiv setzte sich aus 53 Plattenepithelkarzinomen und 26 Adenokarzinomen zusammen. Die Karzinomfälle waren zwischen 2006 und 2015 an der Charité diagnostiziert worden und stammten von zuvor unbehandelten Patienten (keine neoadjuvante Chemotherapie, keine Radiatio). Die MSLN Expression wurde mittels IHC-Färbung in Paraffin-gebetteten Proben untersucht. Hierfür wurde das Leica Bond™ polymer fully refine detection System benutzt. Der Mesothelin-Antikörper 5B2 wurde von Thermo Scientific (clone 5B2, 1: 100, Thermo Scientific MS-1320) erworben.

Alle gefärbten Tumorproben wurden von einem zertifizierten Pathologen untersucht und die Mesothelin-Färbung quantifiziert. Die Auswertung der Färbung erfolgte nach dem System von Hirsch et al. J Clin Oncol 21:3798-3807, 2003, wie folgt: drei repräsentative Felder von jeder Tumorprobe wurden ausgesucht und der Mittelwert des h-scores errechnet. Der h-score entspricht dem Produkt des relativen Anteils Mesothelin-positiver Tumorzellen (%) und der Färbeintensität (1+,2+,3+): $1 \times (\% \text{ Zellen } 1+) + 2 \times (\% \text{ Zellen } 2+) + 3 \times (\% \text{ Zellen } 3+)$. Der höchste erreichbare Wert ist 300. Abhängig vom h-score wurde die Mesothelinexpression in vier Gruppen aufgeteilt: keine (score 0), niedrig (score 1-9), moderat (score 10-49) und hoch (50-300). Als Positivkontrolle wurde Pleuramesotheliumgewebe eingesetzt. Die getesteten Zelllinien HeLa, Caski und Cx-03 wurden nach dem gleichen Prinzip durch Immunhistochemie gefärbt und bewertet.

2.7 MTT-Assay

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Tests (Promokine) untersucht. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid) ist ein wasserlöslicher und membrangängiger Farbstoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen metabolisiert wird. Dies führt zur Bildung von dunkelblauen Formazan-Kristallen im Zytoplasma von unbeschädigten Zellen. Nach Lyse der Zellen und Lösung der Kristalle, kann der Farbstoff durch Spektrophotometrische Messung mit einem ELISA-Reader (Anthos 2010, Biochrom) quantifiziert werden. Die Bildung der dunkelblauen Formazan-Kristalle ist direkt proportional zu der Anzahl an proliferierenden Zellen. Die Absorptionswerte (OD) spiegeln also die Anzahl lebender Zellen wider. Die Anzahl an auszusäenden Zellen wurde experimentell ermittelt, sodass die Konfluenz am Tag 4 ca. 70% betrug. Es wurden 2 µl MTT-Färbung pro Well hinzugefügt, durch leichtes schwenken vermischt und für 2h inkubiert. Danach wurden die blauen Formazan-Kristalle mit 200 µl DMSO und leichtes Schütteln gelöst. Die Absorption wurde bei 560 nm und 620 nm gemessen. Als Nullwert wurde die Absorption der MTT-Lösung ohne Zellen festgelegt. Die Inhibitionsrate wurde mittels der Formel $IR (\%) = 100 * (1 - (OD_{570-620nm} \text{ X} - OD_{570-620nm} \text{ Blank}) / (OD_{570-620nm} \text{ Kontrolle} - OD_{570-620nm} \text{ -Blank}))$ errechnet.

Die Wirkung von Anetumab wurde auf HeLa, Caski und Cx-03 Zellen mittels MTT-Assay getestet. In eine 96 Well Platte wurden 10^3 Zellen in 50 µl DMEM/ Well gelöst und für 24h in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt. Die äußeren Wells wurden nur mit PBS gefüllt. Am Tag 2 wurden 50 µl DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen

von Bay 94-9343 den Zellen hinzugefügt. Es wurden Konzentrationen zwischen 0,05 µg/ml und 10 µg/ml getestet, sowie eine unbehandelte Kontrolle. Jede Konzentration wurde dreifach getestet. Die Zellen wurden für 48h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Am Tag 4 wurde der MTT-Test durchgeführt.

2.8 In-vivo Testung

2.8.1 Tumorverabreichung

Für die Tierexperimente wurden mind. 12 Wochen alte Scid beige Mäuse (von Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) gekauft und unter pathogenfreien Konditionen gehalten. Die HeLa, Caski und Cx-03 Zellen wurden subkutan (s.c.) am rechten Oberschenkel der Scid Mäuse injiziert. Die Zellen wurden zuvor trypsinisiert und mittels der Neubauer Kammer gezählt. Es wurden zwischen 1. 10⁵ und 1. 10⁷ Zellen in 200 µl PBS in Spritzen aufgenommen und den Mäusen s.c. verabreicht.

2.8.2 Versuchsaufbau

Die Mäuse wurden in Gruppen zu 5-8 Tieren eingeteilt und jeweils zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen behandelt. Es erfolgte eine intraperitoneale (i.p.) Gabe des Immunkonjugates in 200 µl Puffersubstanz. Die Kontrollgruppe erhielt 200 µl PBS i.p. nach dem gleichen Behandlungsschema. Die Tumorgroße wurde zweimal pro Woche überprüft und der größte Durchmesser mittels eines Messschiebers ermittelt. Ab einen Diameter von 4,0 mm wurden die Tumore behandelt. Die Tumore konnten maximal bis zu 20 mm Diameter auswachsen, danach wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Das Tumorwachstum wurde wie folgt berechnet:

Wachstum (%) = (Durchmesser letzter Tag – Durchmesser Beginn der Behandlung) * 100/Durchmesser Beginn.

Die Reaktion auf die Therapie wurde nach dem RECIST Score bewertet. Eine partielle Regression wurde als eine Reduktion der Tumorgroße ≥30 % definiert. Eine Tumoreradikation, wenn der Tumor nicht mehr palpabel war. Eine Reduktion des Tumolvolumens um <30% oder eine Vergrößerung bis zu <20% wurde als stabile Erkrankung bezeichnet. Die *in vivo* Testung von Anetumab Ravtansine an HeLa, Caski und Cx-03 Tumoren wird in der folgenden Tabelle beschrieben.

Tabelle 4: Behandlungsschema von Zervixkarzinomen mit Anetumab Raptansine.

Tumorentität	Konzentration von Anetumab Raptansine	Behandlungsintervall
HeLa	2 mg/kg KG	2x/Woche
	5 mg/kg KG	2x/Woche
	10 mg/kg KG	2x/Woche
	15 mg/kg KG	1x/Woche
		1x alle 3 Wochen
Caski	5 mg/kg KG	2x/Woche
	10 mg/kg KG	2x/Woche
	15 mg/kg KG	1x/Woche
Cx-03	2 mg/kg KG	2x/Woche
	5 mg/kg KG	2x/Woche
	10 mg/kg KG	2x/Woche
	15 mg/kg KG	1x/Woche

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung erfolgten mit Excel. Für die *in vitro* Experimente wurde die Pearson Korrelation eingesetzt. Zum Vergleich der RECIST-Scores wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die RECIST-Scores wurden einem Wert zugewiesen (komplette Remission:1, partielle Remission:2, stabile Erkrankung:3 und Progression:4). Hiermit wurde mithilfe Rechners von socscistatistics.com der Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von 0,05 errechnet ⁸¹.

3 Ergebnisse

3.1 Mesothelin Färbung

50/79 (63%) der untersuchten Zervixkarzinome zeigten eine positive Mesothelinexpression. Die Adenokarzinome hatten einen höheren Anteil an MSLN-positiven Tumoren, als die Plattenepithelkarzinome (77% gegen 57%). Außerdem fiel bei 73% der Adenokarzinomen eine starke Mesothelinexpression (h-score 50-300) auf, gegenüber 26,4% bei Plattenepithelkarzinomen. Das Expressionsmuster von Mesothelin war inhomogen (s. Abbildung 1). Die hohe Prävalenz der Mesothelin-positiven Karzinome macht Zervixkarzinome zu einem guten Ziel für eine Therapie mit Anatumab Raptansine. Der Einfluss der Stärke der Mesothelinexpression auf eine Therapieantwort wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

Tabelle 5: Häufigkeit und Intensität der Mesothelin Färbung von Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome der Zervix.

Mesothelin expression	Keine (h-score:0)	Niedrig (h-score:1-9)	Moderat (h-score:10-49)	Hoch (h-score:50-300)
Adenokarzinome (n=26)	6/26 (23%)	0/26 (0%)	1/26 (3,9%)	19/26 (73,9%)
Plattenepithelkarzinome (n=53)	23/53 (43,4%)	2/53 (3,8%)	14/53 (26,4%)	14/53 (26,4%)

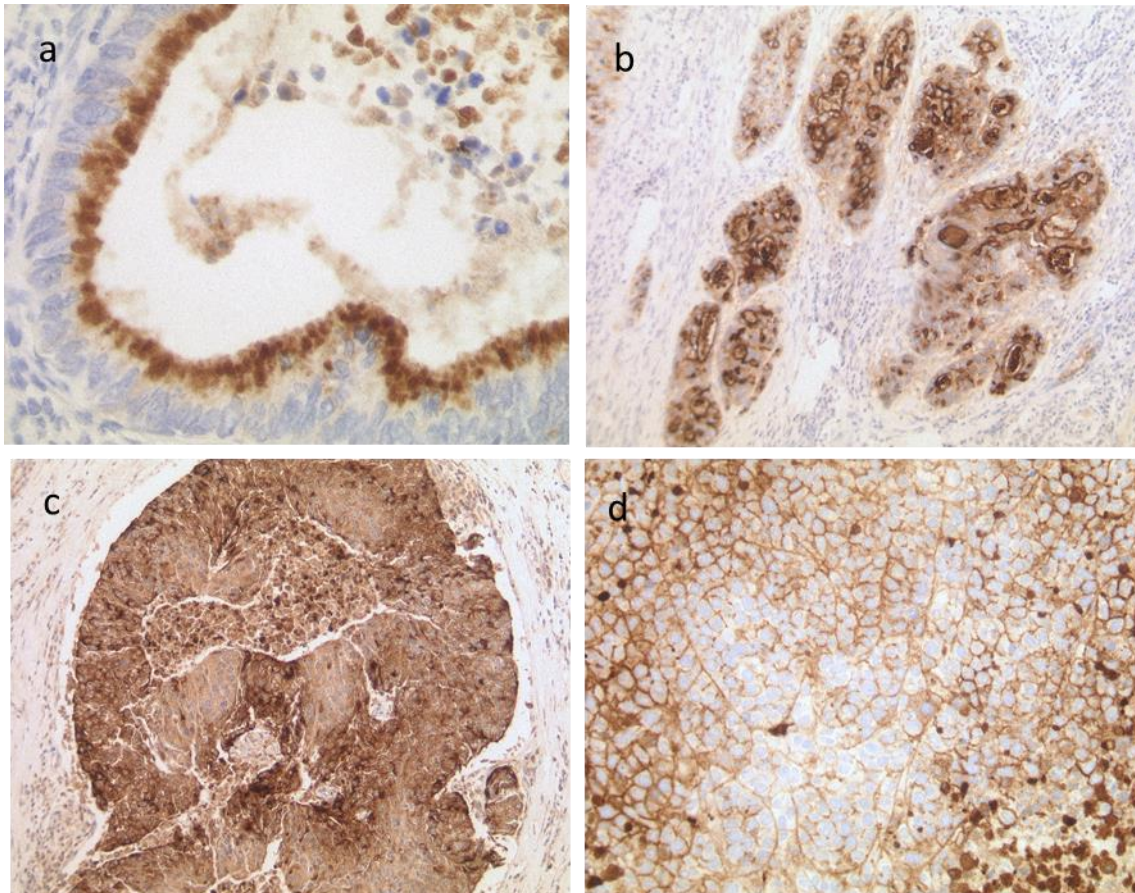


Abbildung 1: Mesothelinexpression in einem Adenokarzinom *in situ* (a), in einem Adenokarzinom (b), in einem Plattenepithelkarzinom (c) der Zervix und in einem HeLa-Xenograft Tumor (d).

Die in unseren Experimenten benutzte HeLa Zelllinie zeigte eine starke (h-Score: 230) und Cx-03 eine moderate Expression (h-Score: 40). Caski hingegen war Mesothelin-negativ (h-Score:0).

3.2 MTT Assay

3.2.1 Zytotoxizität von BAY 94-9343 auf HeLa Zellen

Die zytotoxische Wirkung von BAY 94-9343 wurde auf HeLa Zellen mit starker Mesothelinexpression untersucht. Ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine Inhibitionsrate von $> 60\%$. Die Korrelationsanalyse nach Pearson zeigte eine starke Korrelation zwischen der Tumoringhibition und der Konzentration des ADC ($r=0,763$).

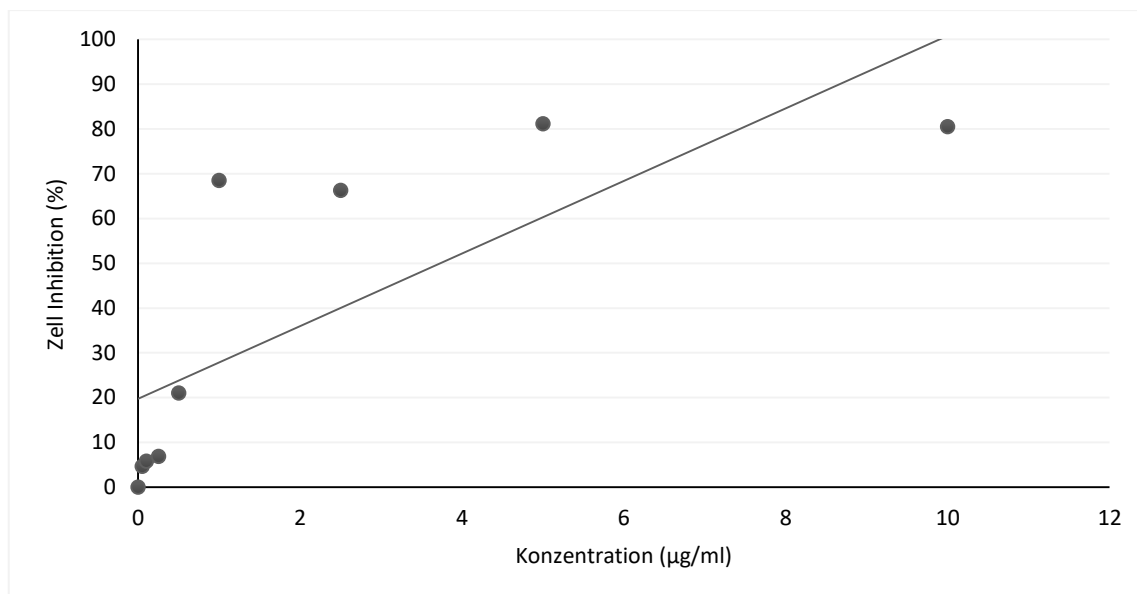


Abbildung 2: Inhibitionsrate von BAY 94-9343 auf HeLa Zellen. 10^3 HeLa Zellen wurden nach 24h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 für weitere 48h behandelt. Danach wurde die Zellviabilität mittels MTT-Tests gemessen und die Zellinhibition berechnet.

3.2.2 Zytotoxizität von BAY 94-9343 auf Cx-03 Zellen

Bei Cx-03 Zellen mit moderater Mesothelinexpression konnte in den untersuchten Konzentrationen keine Zellinhibition > 50% erreicht werden. Eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung wurde jedoch beobachtet ($r=0,769$), im Vergleich zu den HeLa Zellen war diese jedoch deutlich abgeschwächt.

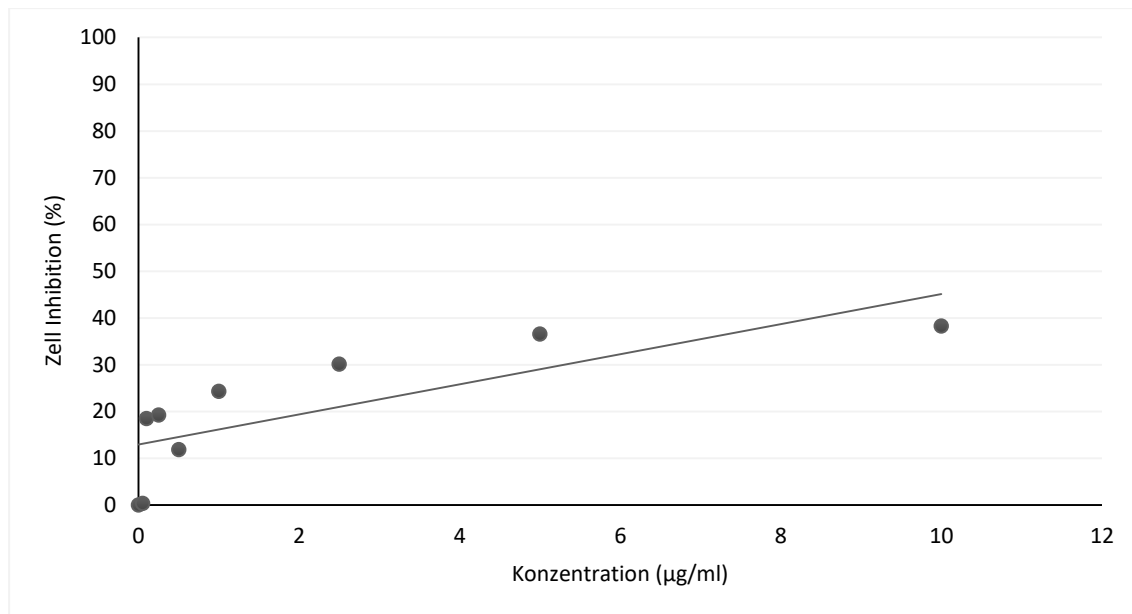


Abbildung 3: Inhibitionsrate von BAY 94-9343 auf Cx-03 Zellen. 10^3 Cx-03 Zellen wurden nach 24h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 für weitere 48h behandelt. Danach wurde die Zellviabilität mittels MTT-Tests gemessen und die Zellinhibition berechnet.

3.2.3 Zytotoxizität von BAY 94-9343 auf Caski Zellen

Bei der Anwendung von BAY 94-9343 auf Mesothelin-negativen Caski Zellen konnte nur eine geringe Inhibition der Tumorproliferation mit einer Inhibitionsrate <30% festgestellt werden. Im Vergleich zu der Therapie der HeLa- und Cx-03-Zellen ist die Zellinhibition bei Caski-Zellen am niedrigsten (jeweils 80%, 38% und 27% bei einer Konzentration von 10 µg/ml des ADC). Auch bei den Mesothelin-negativen Zellen wurde ein hoher Korrelationskoeffizient ($r=0,905$) nachgewiesen.

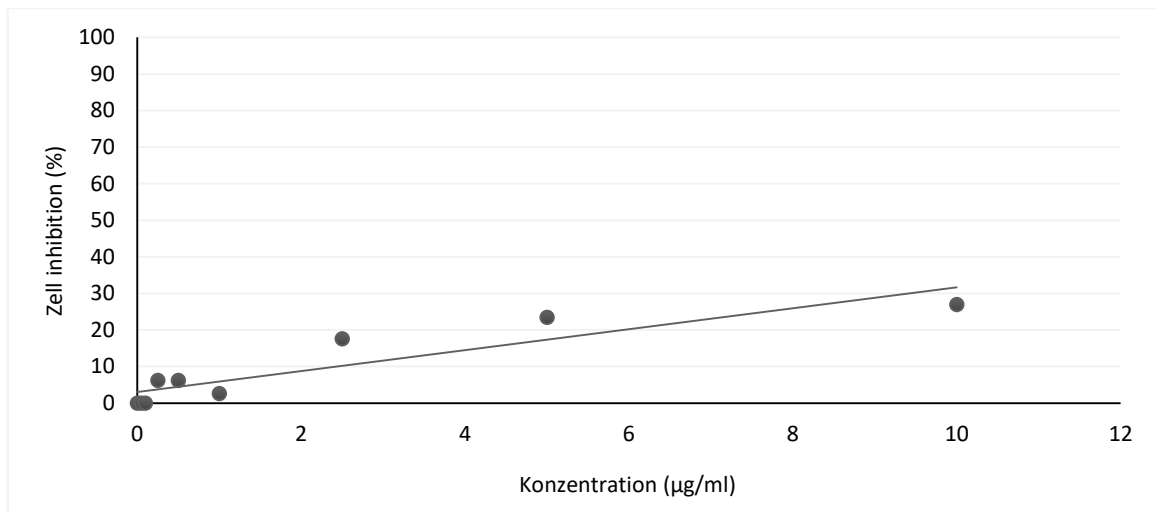


Abbildung 4: Inhibitionsrate von BAY 94-9343 auf Caski Zellen. 10^3 Caski Zellen wurden nach 24h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY 94-9343 für weitere 48h behandelt. Danach wurde die Zellviabilität mittels MTT-Tests gemessen und die Zellinhibition berechnet.

Zusammenfassend konnte in diesem Experiment eine Dosis-abhängige zytotoxische Wirkung des Immunkonjugates auf den untersuchten Zervixkarzinomzellen gezeigt werden. Die Inhibitionsrate zeigte sich außerdem abhängig von der Stärke der Mesothelinexpression, sodass von einer spezifischen Wirkung von BAY 94-9343 ausgegangen werden muss.

3.3 In vivo Testung von BAY 94-9343

3.3.1 HeLa Tumore (starke Mesothelinexpression)

Die zytotoxische Wirkung von Anetumab Ravtansine auf HeLa-Tumore wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in Scid Mäusen untersucht. Das Tumorstadium wurde anhand einer Kontrollgruppe mit PBS Injektionen verglichen. Die Tumore, die mit 2 mg/kg BAY 94-9343, zweimal je Woche, behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied zu der Kontrollgruppe (Tumorstadium in 100% der Fälle, $p=0,93624$).

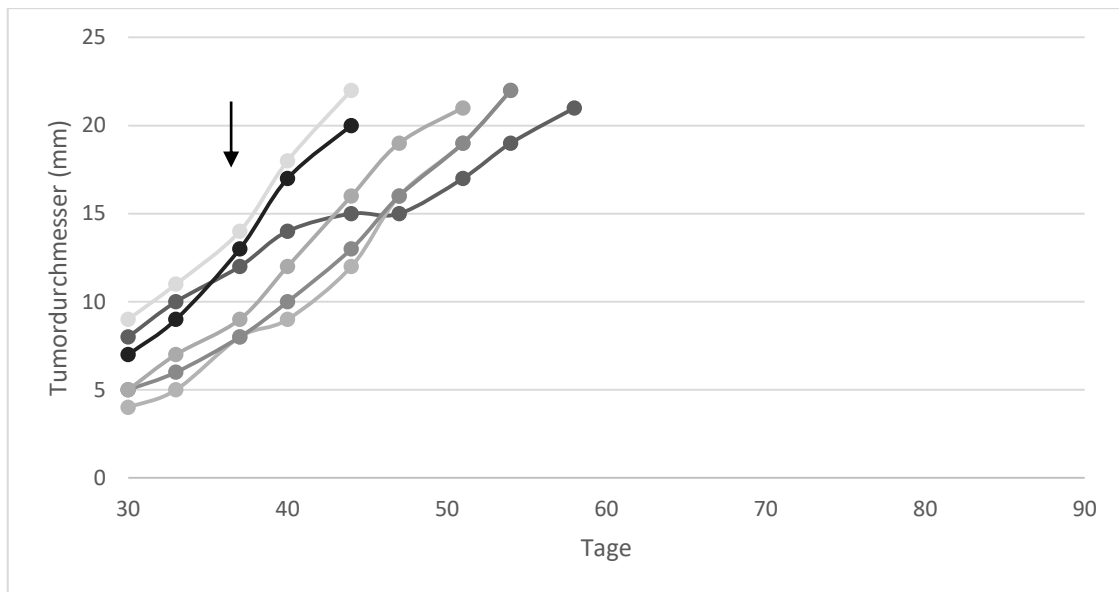


Abbildung 5: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit PBS i.p. zwei Mal je Woche, 4 Wochen lang. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

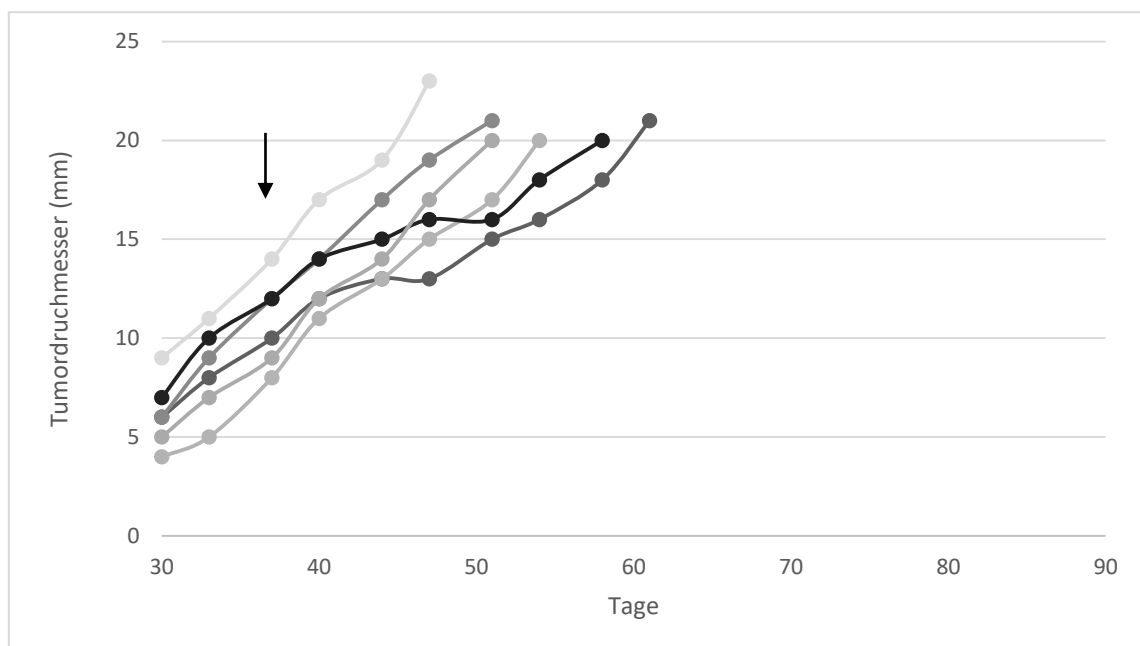


Abbildung 6: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 2 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, 4 Wochen lang. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

Das Tumorwachstum war unter der Therapie mit 5 mg/kg BAY 94-9343, zweimal je Woche, heterogen. In 6/8 Fällen gab es einen Tumorprogress. In 2/8 Fällen konnte aber eine Tumoreradikation erreicht werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Tumorantwort ($p=0,4777$).

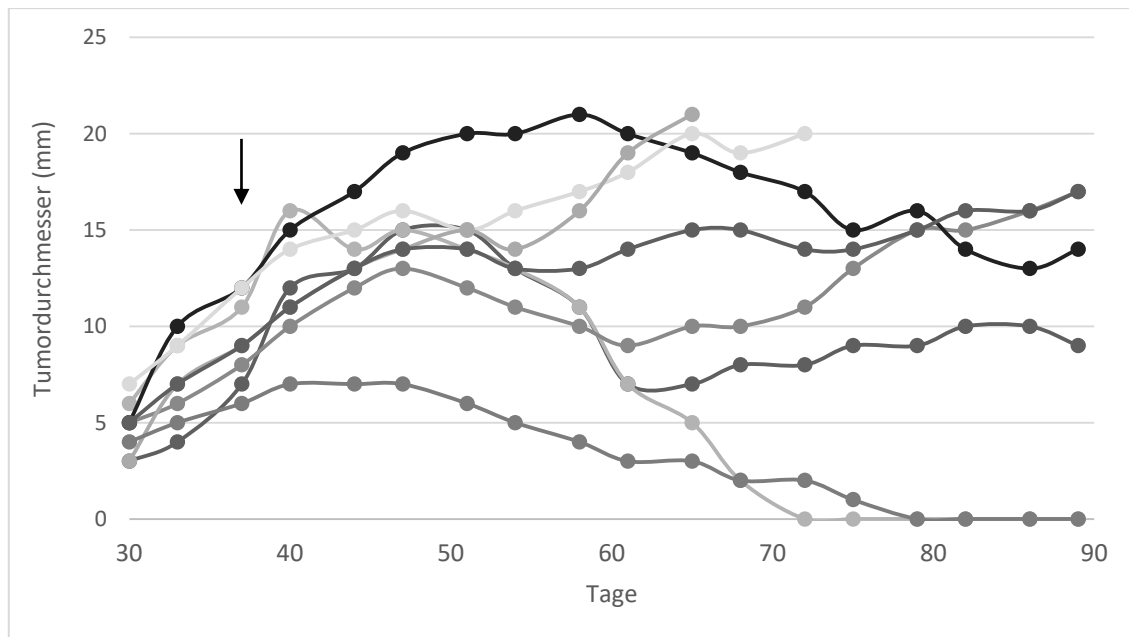


Abbildung 7: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 5 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

Sehr gute Ergebnisse zeigten sich bei der Behandlung der Tumore mit 10 mg/kg BAY 94-9343, zweimal je Woche. 7/8 Tumore wurden durch die Behandlung erfolgreich eradiziert. Bei einer Maus kam es jedoch zu einem ungebremsten Tumorwachstum. Hier zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0.00804$).

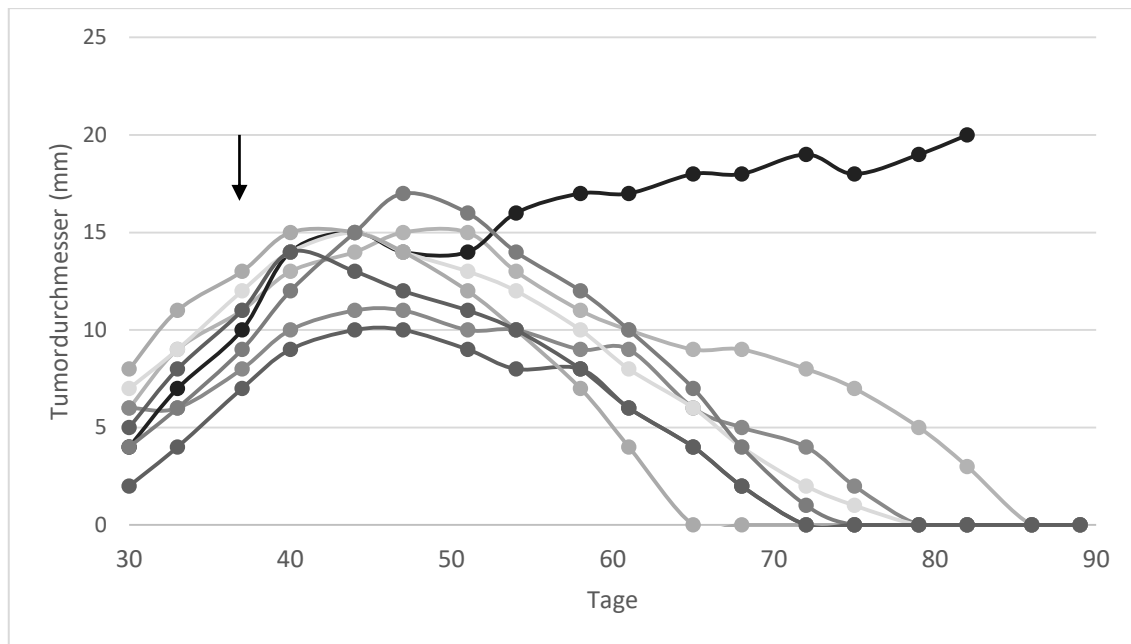


Abbildung 8: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

Um den Einfluss des Therapieschemas zu untersuchen, wurden zwei Gruppen mit einer höheren Dosis und in längeren Abständen therapiert (15 mg/kg BAY 94-9343, einmal je Woche bzw. alle drei Wochen). In beiden Gruppen konnte in allen Fällen eine Tumoreradikation erreicht werden. Bei allen Mäusen zeigte sich eine Tumorantwort schon nach der ersten Gabe des Immunkonjugates. In beiden Gruppen sahen wir einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0.00512$).

Anetumab Ravtansine hat also eine dosisabhängige Wirkung auf das Wachstum von HeLa-Tumoren. Eine Verlängerung des Dosierintervalls kann durch Dosisanpassung erreicht werden, ohne die Wirksamkeit der Therapie zu beeinflussen. Eine Tumorantwort konnte bei der Dosis von 15 mg/kg sogar schon nach der ersten Gabe beobachtet werden im Vergleich zu der dritten Gabe bei einer Dosis von 10 mg/kg. Die Gabe von höheren Dosen könnte deshalb bevorzugt werden soweit die Nebenwirkungsrate tolerabel ist.

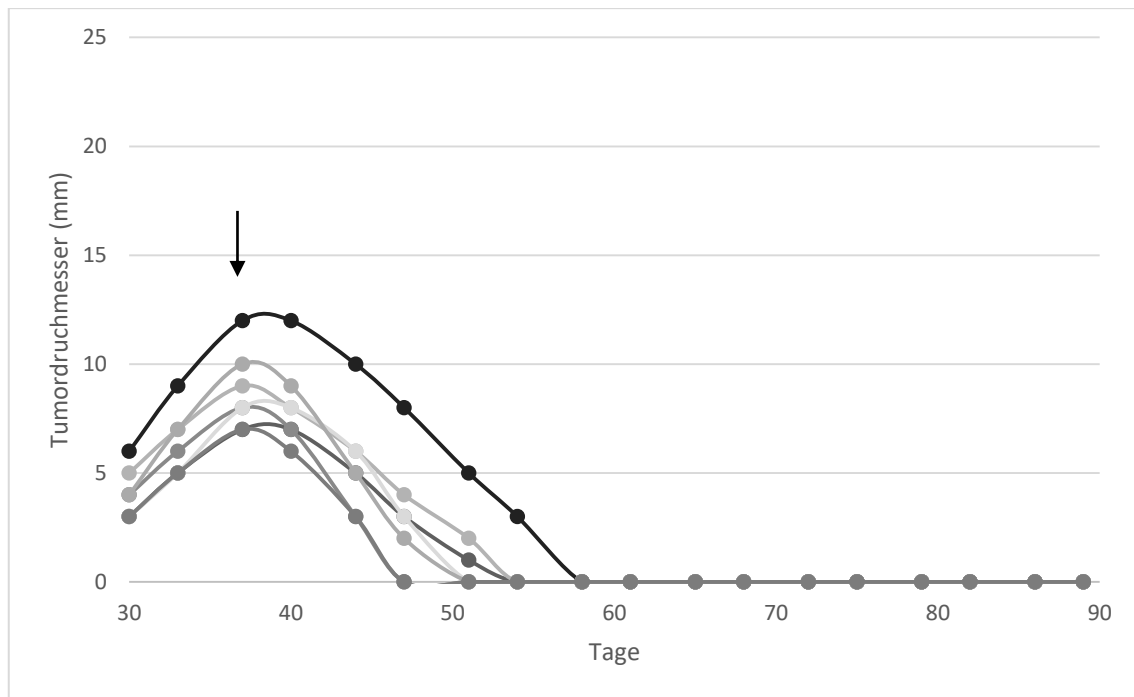


Abbildung 9: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. einmal pro Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

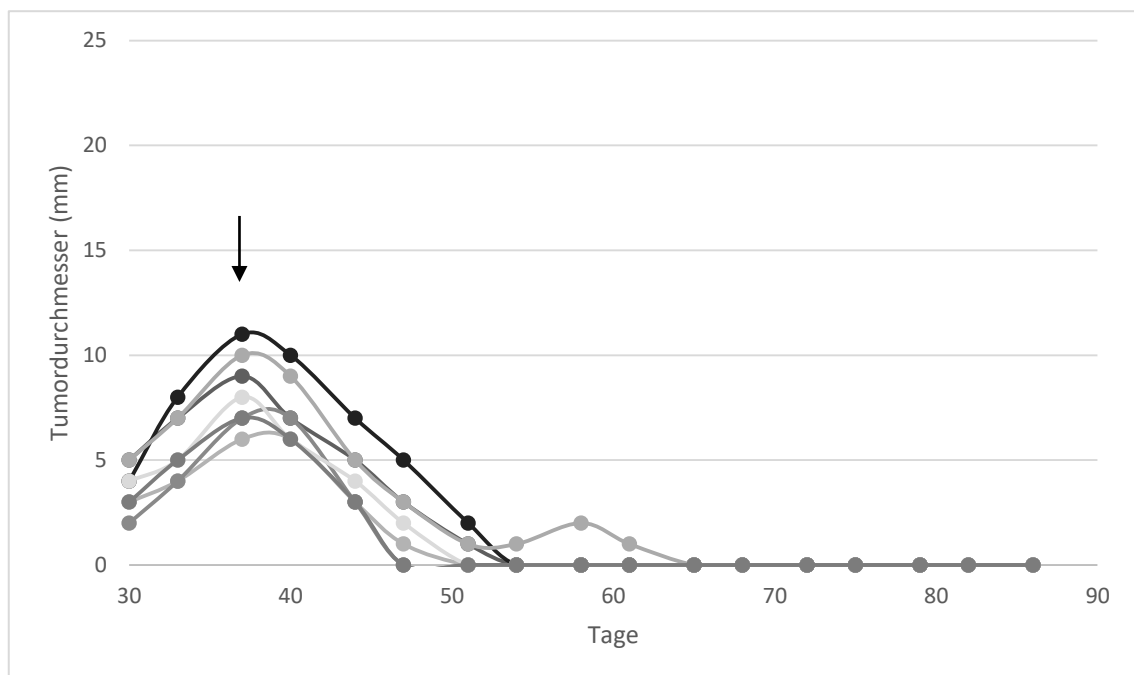


Abbildung 10: Tumorwachstum von HeLa Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. alle 3 Wochen, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

3.3.2 Cx-03 Tumore (moderate Mesothelinexpression)

Die Gabe von PBS oder 2 mg/kg bzw. 5 mg/kg BAY 94-9343, jeweils zweimal je Woche, erlaubte ein ungehemmtes Wachstum der Cx-03 Tumore. Es zeigte sich kein Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0.93624$).

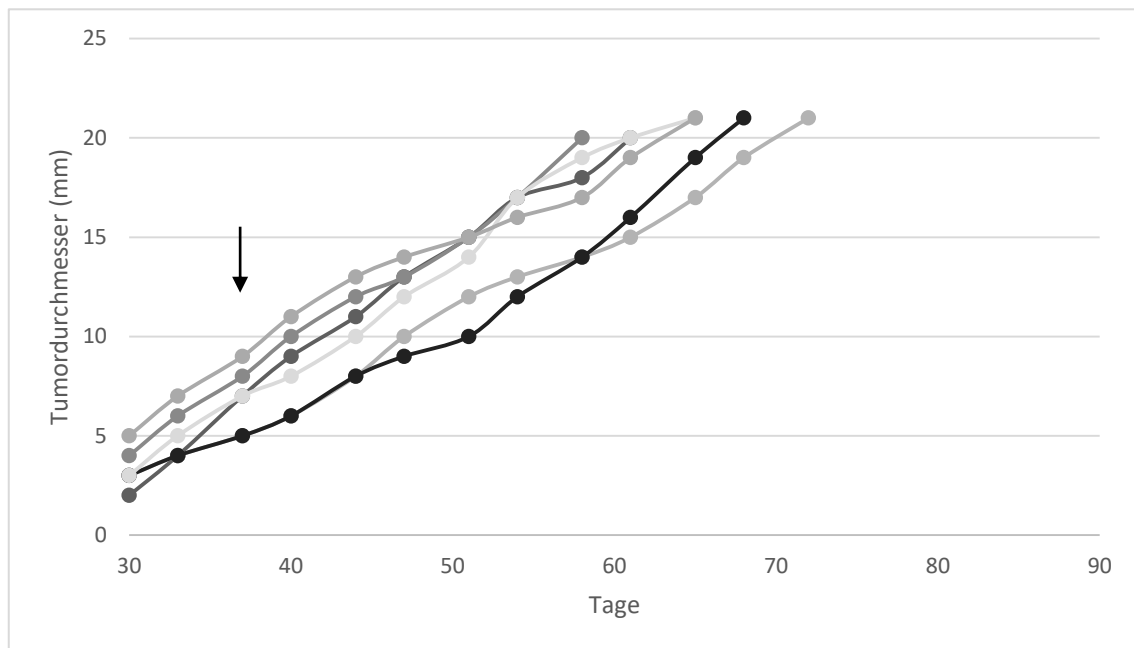


Abbildung 11: Tumorwachstum von Cx-03 Tumore in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit PBS i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

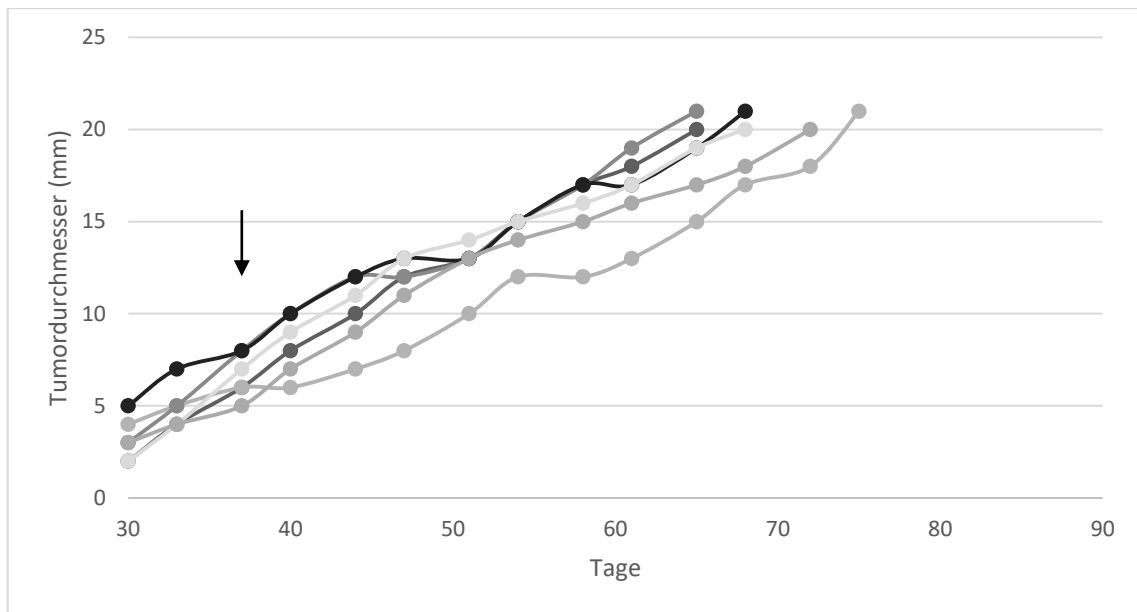


Abbildung 12: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 2 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

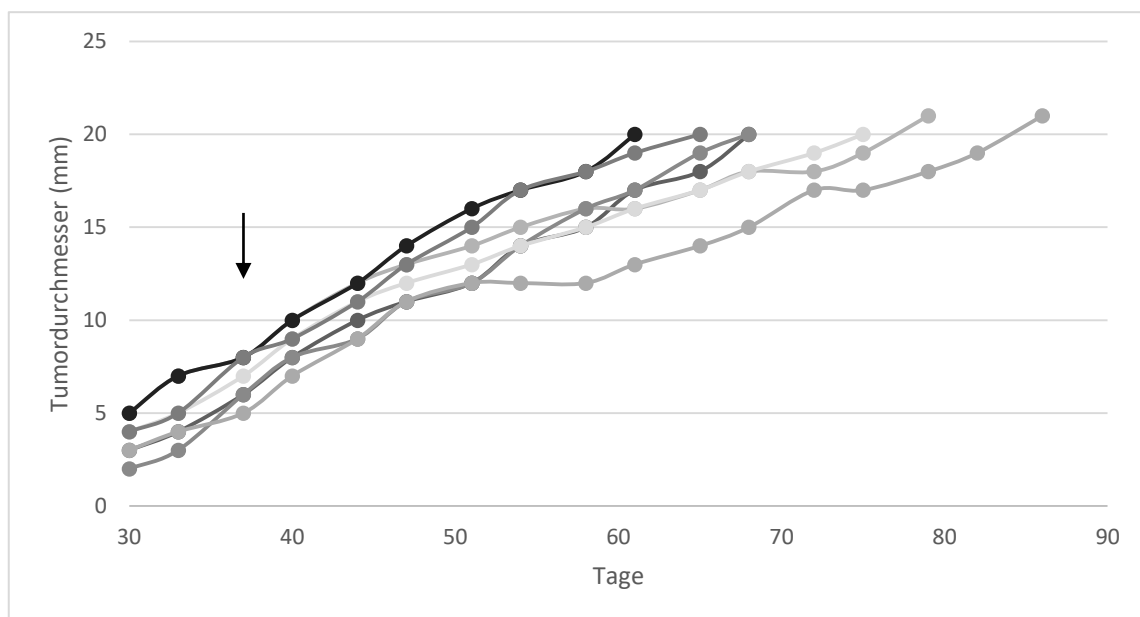


Abbildung 13: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 5 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

1/7 Tumoren konnte durch die Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343, zweimal je Woche, eradiziert werden. In einem weiteren Fall wurde eine partielle Remission erreicht. In den anderen 5 Fällen kam es zu einem Tumorprogress. Insgesamt ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p=0,42952$).

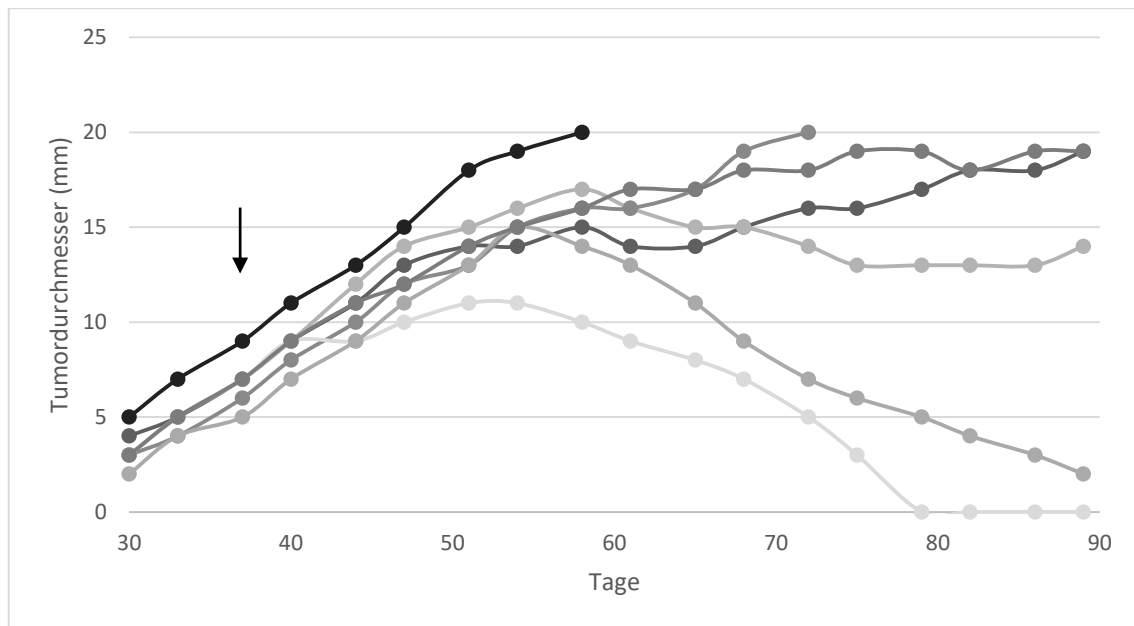


Abbildung 14: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

Unter der Therapie mit 15 mg/kg BAY 94-9343, einmal je Woche, wurden in 1/7 Fällen eine Tumoreradikation und in 2/7 Fällen eine partielle Remission erreicht. In den restlichen Fällen wurde ein Tumorprogress beobachtet. Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe ($p=0,22628$). Insgesamt zeigt sich die therapeutische Wirksamkeit von Anetumab Ravtansine, wie vermutet, schwächer als in der Gruppe mit starker Mesothelinexpression. Trotzdem kann auch hier eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung beobachtet werden mit teilweisen sehr guten Ergebnissen.

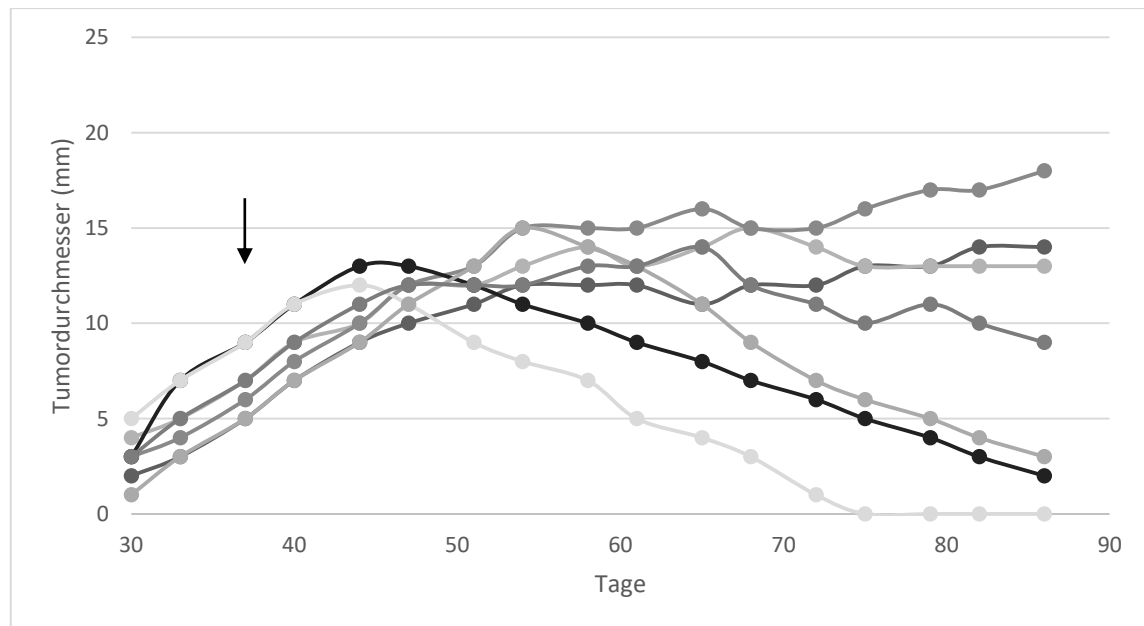


Abbildung 15: Tumorwachstum von Cx-03 Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. einmal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

3.3.3 Caski Tumore (keine Mesothelinexpression)

Die Mesothelin-negativen Caski-Tumore wurden mittels PBS als Kontrolle oder mit 5 mg/kg bzw. 10 mg/kg BAY 94-9343, zweimal je Woche, behandelt. In den drei Gruppen kam es zu einem Tumorprogress in allen Mäusen ($p=0,93624$). Auch unter der Behandlung mit 15 mg/kg BAY 94-9343, einmal je Woche, wurde ein Tumorprogress bei allen Mäusen ($p=0,93624$) beobachtet. Die Ergebnisse beweisen die spezifische Wirkung des anti-Mesothelin Immunkonjugates.

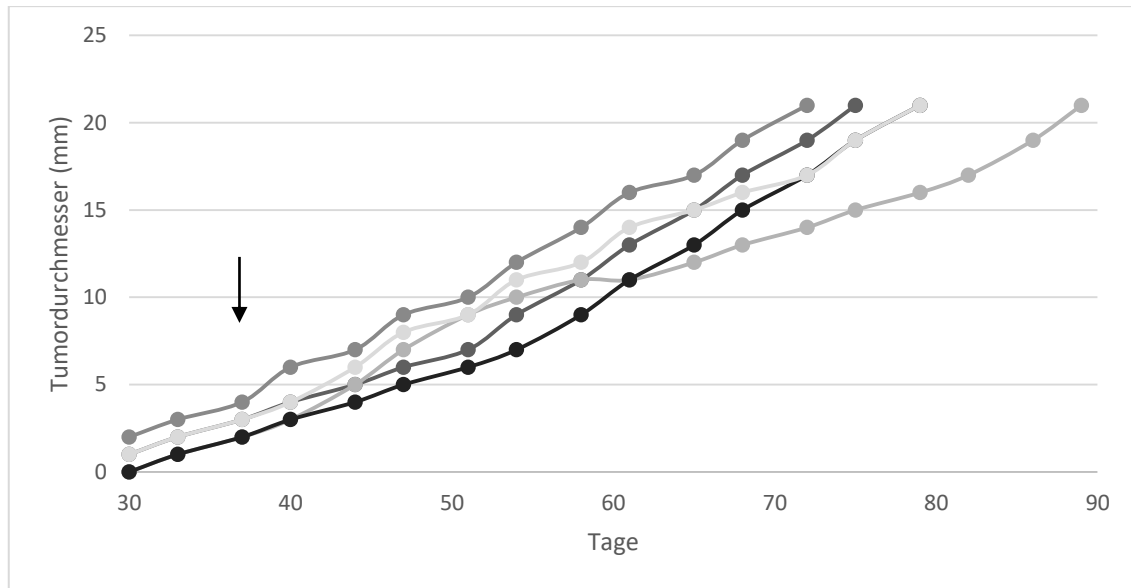


Abbildung 16: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit PBS i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

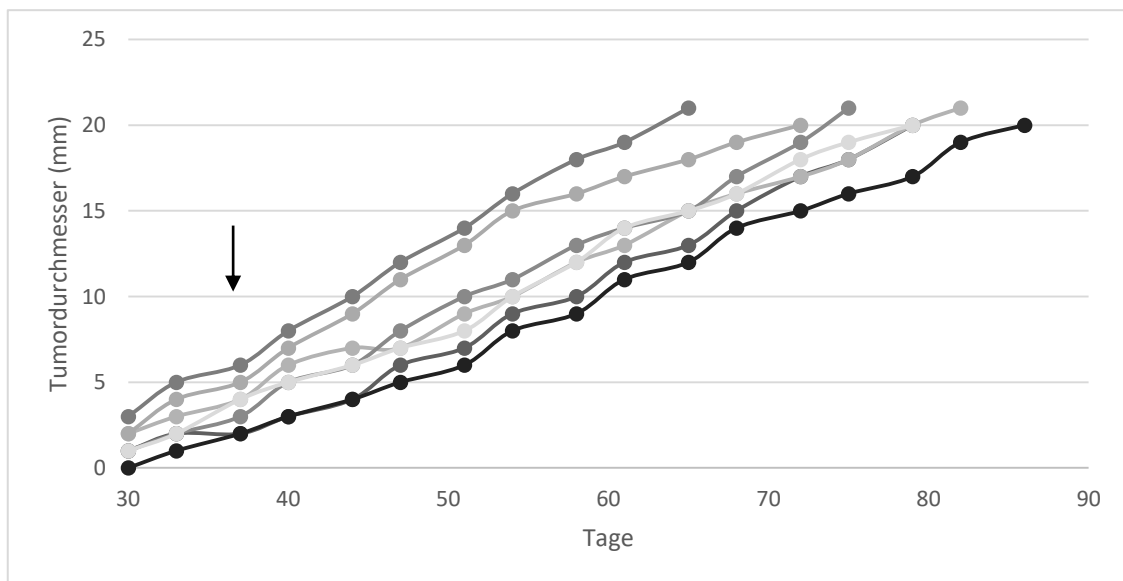


Abbildung 17: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 5mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

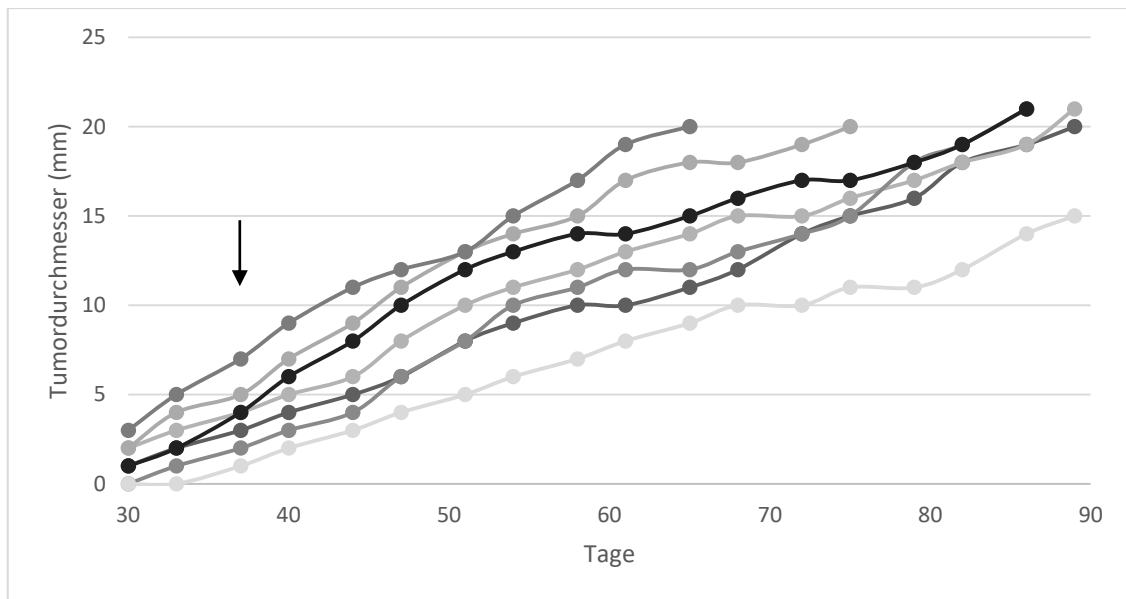


Abbildung 18: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach Behandlung mit 10 mg/kg BAY 94-9343 i.p. zwei Mal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

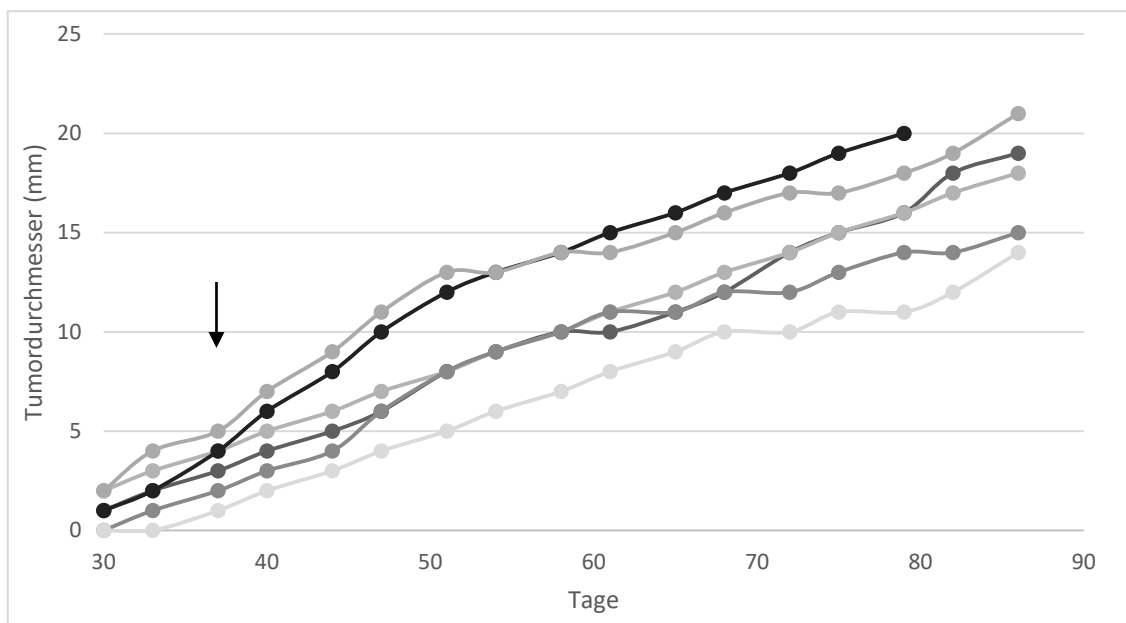


Abbildung 19: Tumorwachstum von Caski Tumoren in Scid beige Mäusen nach einmaliger Gabe von 15 mg/kg BAY 94-9343 i.p. einmal je Woche, bis Tag 90. Der größte Tumordurchmesser wurde abgebildet. ↓ markiert den Anfang der Therapie.

4 Diskussion

Mesothelin wurde erstmals 1992 von Chang und Pastan bei der Suche nach neuen Tumorantigenen zur Immuntherapie von Ovarialkarzinomen entdeckt. Hierbei wurde Mesothelin als Zielprotein eines Antikörpers (Klon K1) identifiziert, der nach Immunisierung

von Mäusen mit der Ovariakarzinom Zelllinie OVCAR 3 isoliert worden war. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass der K1-Antikörper eine erhöhte Affinität zu Geweben mesothelialen Ursprungs wie dem Peritoneum, dem Perikard und der Pleura hat. Von besonderer Bedeutung war der Umstand, dass eine erhöhte Mesothelinexpression in zahlreichen Tumorentitäten dargestellt werden konnte, was zu der Frage führte, inwieweit dieses Protein zum Ziel immunologischer Tumorthérapien gemacht werden könnte. Im Bereich gynäkologischer Tumoren wurden erhöhte Mesothelinexpressionen auch bei Zervixkarzinomen diagnostiziert⁸². Bisher wurde Mesothelin als diagnostischer Marker und als experimentelles Tumortarget zur Behandlung von Ovariakarzinom eingesetzt. Die Literatur zur Expression und therapeutischen Relevanz für die Behandlung von Zervixkarzinomen ist dagegen begrenzt. Ziel dieser Doktorarbeit ist es die Häufigkeit und die Expressionsstärke von Mesothelin in Zervixkarzinomen zu verifizieren und ein neues und experimentelles, gegen Mesothelin gerichtetes, Immunkonjugat (Anetumab Raptansine) in tierexperimentellen Zervixkarzinommodellen auf seine therapeutische Wirksamkeit hin zu untersuchen.

4.1 Mesothelinexpression in Zervixkarzinomen

Zur Bestimmung der Mesothelinexpression in Zervixkarzinomen wurden insgesamt 79 Tumorproben (53 Plattenepithelkarzinome, 26 Adenokarzinome) immunhistochemisch untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Subentitäten. Während nahezu die Hälfte der Plattenepithelkarzinome gar kein Mesothelin exprimiert und nur etwa 25% der Tumore eine hohe Expression zeigen, sind die Verhältnisse beim Adenokarzinom genau umgekehrt. Nahe 75% der Adenokarzinome zeigen eine hohe Expression (score 50-300) und nur in 25% der Adenokarzinomproben wurde keine erhöhte Mesothelinexpression gesehen. Literaturdaten zu Expression von Mesothelin in Zervixkarzinomen liegen nur begrenzt vor und erscheinen variabel. In guter Übereinstimmung mit eigenen Daten berichten Inaguma et al. über eine erhöhte Expression in 28,6% der Plattenepithelkarzinome der Zervix (82) und Ordóñez et al. in 25% (15) wobei Chang et al. in 86% (81) der Zervixkarzinomfälle eine erhöhte Mesothelinexpression findet. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen resultiert möglicherweise aus den unterschiedlichen Größen der untersuchten Gruppen (jeweilig n=21, n=4 und n=7). Des Weiteren machen die fehlende Differenzierung von Platten- und Adenokarzinome, die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und die Wahl unterschiedliche Antikörper zur Mesothelin-Färbung eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse schwierig (82).

Im Vergleich zu den oben genannten Untersuchungen zeichnet sich unsere Studie durch eine höhere Zahl an untersuchten Tumorproben aus und liefert eine breitere Basis für die Annahme, dass Adenokarzinome in Bezug auf die Mesothelinexpression eine Sonderstellung einnehmen und zu einem bevorzugten Ziel für Mesothelin gerichtete Immuntherapien werden könnten. Adenokarzinome neigen häufiger zu aggressiverem Wachstum und einer schlechteren Prognose, sodass die Identifikation weiterer Therapieoptionen wünschenswert wäre.

4.2 Wirksamkeit von Anetumab-Ravtansine

Die therapeutische Wirksamkeit von BAY 94-9343 zur Behandlung von Zervixkarzinomen wurde in unsere Studie zunächst *in vitro* bewiesen. Die zytotoxische Wirkung korrelierte mit der Stärke der Mesothelinexpression. Auch bei den Mesothelin-negativen Caski-Zellen konnte eine geringe zytotoxische Wirkung beobachtet werden. In der Publikation von Golfier et al. wurde auch das Wachstum von Mesothelin-negative Tumoren durch die Therapie mit Anetumab Ravtansine gehemmt, wobei eine deutliche höhere Konzentration des Immunkonjugates nötig war ⁷¹. Unsere Ergebnisse decken sich also mit denen von Golfier et al. und zeigen sowohl eine konzentrationsabhängige, spezifische, als auch eine unspezifische zytotoxische Wirkung des ADC.

In einem weiteren Schritt wurde die zytotoxische Wirksamkeit von BAY 94-9343 auf Mesothelin-exprimierende Zervixkarzinomen *in vivo* durch unsere Studie nachgewiesen. Die Wirksamkeit der Therapie war sowohl abhängig von der Mesothelinexpression, als auch von der verabreichten Dosis des Immunkonjugates. Die Experimente von Golfier et al. zeigten die gleichen Ergebnisse wie unsere, mit ähnlicher Wirksamkeit des Immunkonjugates auf unterschiedliche Mesothelin-exprimierende Tumore ⁷¹. Interessanterweise zeigte die Studie von Golfier et al. auch, dass der Therapieerfolg von der Tumorentität abhängt. Bei gleicher Konzentration zeigte sich eine bessere Wirksamkeit der Therapie bei OVCAR-3 Tumoren im Vergleich zu HT-29/meso Tumoren, obwohl OVCAR-3 im Vergleich zu HT-29/meso eine geringere Mesothelinexpression in der immunhistochemischen Färbung aufweist ⁷¹. Beide Zelllinien sind Adenokarzinome. Die Pathologie erscheint also nicht als ausschlaggebender Faktor um die Tumorantwort vorhersehen zu können. Ein genaueres Verständnis der beeinflussenden Faktoren ist essentiell um das Patientenkollektiv zu identifizieren welches am besten von einer Therapie mit Anetumab

Ravtansine profitiert. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass eine starke Mesothelinexpression ein Faktor zur Therapieentscheidung sein sollte.

4.3 Ansätze zur Therapieoptimierung

4.3.1 Freies Mesothelin

Ein negativer Einfluss auf die Therapie könnte das freie Mesothelin im Serum haben, welches das Immunkonjugat binden und so die freie Konzentration von BAY 94-9343 reduzieren kann. Zhang et al. zeigten, dass die zytotoxische Wirkung von SS1P durch erhöhte Werte des freien MSLN herabgesetzt wird und MSLN durch das TNF- α Converting Enzyme (TACE) in die extrazelluläre Matrix (EZM) freigesetzt werden kann (63). Die Reduktion des freien Mesothelin zur Optimierung der therapeutischen Wirksamkeit von anti-Mesothelin Immunkonjugaten wurde durch Awuah et al. untersucht. Die mutierte Zelllinie A431/G9 produzierte 80% weniger freies MSLN als A431/H9, indem die TACE-Protease Bindestelle des MSLN gehemmt wurde. Beide Zelllinien wurden mit SS1P und RG7787 behandelt. Die TACE-Mutant Zelllinie nahm zwei bis dreimal mehr Immunotoxin auf und hatte eine höhere Ansprechrate auf die Immunotoxin-Therapie, als A341/H9 (68). Es wird davon ausgegangen, dass die Menge an freiem MSLN im Serum abhängig von der TumorgroÙe und der glomerulären Filtrationsrate ist (85). Die Tumoraufnahme von 64-Cu-markiertem MORAb-009 wurde durch PET-Bildgebung durch Lee et al. untersucht. Dabei beobachteten sie eine positive Korrelation zwischen TumorgroÙe und freiem MSLN, sowie eine negative Korrelation zwischen TumorgroÙe und freiem MSLN sowie MORAb-009 Aufnahme des Tumors (51). Das freie MSLN im extrazellulären Raum hingegen könnte in manchen Fällen die Tumorpenetration von Immunotoxinen verbessern. Im mathematischen Modell von Pak et al. wurde gezeigt, dass das freie MSLN der EZM die Wirkung von SS1P erhöhen kann. Dieses Phänomen wird durch die Aufhebung der binding-site-barrier durch das freie MSLN erklärt. Das an MSLN gebundene Immunotoxin wird dadurch uniform im Tumorgewebe verteilt und kann als Immunotoxin-Reservoir fungieren. Die positive Wirkung von freiem MSLN hängt von der Anzahl an Bindungsstellen per Zelle, der Endozytoserate, der Konzentration an Liganden und der benötigten Anzahl an Liganden ab, um einen Effekt an der Zelle auszulösen (86). Da bewiesen ist, dass die Freisetzung von löslichen MSLN unabhängig von der Expression von MSLN ist (87) und es bisher keine Studie über das freie MSLN bei Zervixkarzinomen publiziert wurde, ist die

Auswirkung des freien MSLN auf die zytotoxische Potenz von BAY 94-9343 schwer einzuschätzen. Auch in anderen Mesothelin-exprimierende Karzinomen wurde die Regulierung der Mesothelinfreisetzung noch nicht geklärt. Es sind weitere Studien nötig um die Frage zu untersuchen und möglicherweise eine therapeutische Möglichkeit zu entwickeln, um die Therapie mit Anetumab Ravtansine zu optimieren.

4.3.2 Applikationsschema

Ein weiterer Ansatz um die Wirksamkeit des Immunkonjugates zu verbessern, ist die Konzentration von BAY 94-9343 im Serum zu erhöhen. Die Chancen, dass eine spezifische Antigen-Antikörper Bindung stattfindet, werden durch das Abfangen von freien MSLN und durch den Überstand an Substrat erhöht. Dies kann durch die Injektion von höheren Dosen des Immunkonjugates oder durch ein geeignetes Injektionsschema erfolgen. In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass eine Tumorregression erst nach der 2.-4. Injektion von 10 mg/kg BAY 94-9343, zweimal je Woche, sichtbar war. Bei einer Halbwertszeit von ca. 80h in der Maus und einem Applikationsschema von zweimal wöchentlich, kann von einer Akkumulation im Serum ausgegangen werden. Um die Hypothese zu prüfen, ob ein höherer Peak-Spiegel des Immunkonjugates im Serum nötig ist, um eine therapeutische Wirkung auf den Tumor zu haben, wurden HeLa, Cx-03 und Caski-Tumore mit jeweils 15 mg/kg des ADC einmal wöchentlich therapiert. Hier zeigt insbesondere am Beispiel der Hela-Tumore, dass eine Erhöhung der Einzeldosis bei Verlängerung des Applikationsintervalls einen deutlichen besseren therapeutischen Effekt vermittelt, als die Gabe der gleichen Gesamtdosis in niedrigeren Dosen aber kürzeren Intervallen. Es ist jedoch zu befürchten, dass unter einer hohen Dosis des Immunkonjugates deutlich mehr Nebenwirkungen entstehen. Hierfür ist sowohl die unspezifische Wirkung auf Mesothelin-negative Zellen als auch die spezifische Wirkung auf physiologisch Mesothelin-positiven Zellen verantwortlich. In der Phase I Studie zu Anetumab Ravtansine wurde ersichtlich, dass sich wenig Unterschiede in dem Nebenwirkungsprofil zwischen der Therapie mit 6,5 mg/kg q3w und der Therapie mit 2,2 mg/kg qw zeigten (73). Ein Therapieschema mit höherer ADC-Dosis mit längeren Applikationsintervallen sollte also bevorzugt werden, da eine bessere Wirksamkeit sowie eine bessere Compliance zu erwarten ist.

4.3.3 Kombinationstherapie

Durch eine Kombination des Immunkonjugates mit Zytostatika könnte eine bessere Wirksamkeit erreicht werden. Außerdem ist es hierdurch in manchen Fällen möglich eine Dosisreduktion des Immunkonjugates zu erreichen, bei gleichbleibender zytotoxischer Wirkung am Tumor. Quanz et al. untersuchte die Kombination von BAY 94-9343 mit pegyliertem liposomalen Doxorubicin, Carboplatin, Copanlisib oder Bevacizumab als Therapie von MSLN-positiven Ovarialkarzinomen *in vitro* und *in vivo* in Mäusen. Alle Chemotherapeutika zeigten eine additive bis synergistische Wirkung in Kombination mit dem ADC (72). Die Kombinationstherapie von Anetumab Ravtansine mit anderen Chemotherapeutika wird aktuell in mehreren klinischen Studien untersucht und könnte die Toleranz der Therapie verbessern.

4.3.4 Resistenzentwicklung

Eine sekundäre Resistenzentwicklung gegenüber Immunkonjugate oder Zytostatika ist ein weitläufiges Problem in der Onkologie. Auch in unseren Experimenten sahen wir dass viele Tumore während der Behandlung mit BAY 94-9343 nach beginnender Verkleinerung wieder auswuschen, unabhängig von der Tumorentität. Es gibt bisher viele bekannte spezifische Resistenzmechanismen. Zum einen kann die Expression des Zielantigens reduziert werden, zum anderen kann die Serum- und die intrazelluläre Konzentration des Immunkonjugates reduziert werden.

4.3.4.1 Mesothelinexpression

Eine Resistenzentwicklung gegen BAY 94-9343 ist durch eine vermehrte Freisetzung von löslichen MSLN oder durch eine reduzierte Expression von membranständigen MSLN möglich. Mesotheliomzellen zum Beispiel haben die Eigenschaft ihre MSLN Expression *in vitro* zu verlieren (4). Hollevoet et al. zeigte, dass RG7787-resistente KLM1-Zellen eine um das Fünffache reduzierte MSLN Expression aufweisen. Dies erfolgt durch Methylierung des MSLN Promoters (88). Golfier et al. untersuchten die MSLN Expression durch IHC in Probeexzisionen von primären Zervixkarzinomen und deren Rezidivkarzinomen. In 28% der Fälle wurde in den Rezidivtumoren eine erhöhte MSLN-Expression beobachtet, in 14% eine Regression (71). Die Regulation der Mesothelinexpression ist noch nicht geklärt und muss noch weiter erforscht werden, um den Einfluss auf die spezifische Tumorthherapie weiter zu ergründen.

4.3.4.2 ADC-spezifische Resistenz

Eine Zytostatika-Resistenz ist ein limitierender Faktor für die Therapie mit Anetumab Ravtansine. Bisher sind diese Regulationsmechanismen noch nicht völlig verstanden. Die Bindung des ADC, die Spaltung des disulfid-Linkers, die Akkumulation von DM4 und seine Bindung an die Mikrotubuli können beeinflusst werden.

Es kann außerdem zu einer Reduktion der lysosomalen Funktion der Krebszellen kommen. So wird die Menge an aktives DM4 durch Verhinderung der Spaltung des disulfid-Links gemindert. Ein weit verbreiteter Resistenzmechanismus ist die Überaktivierung des Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR-1). MDR-1 ist ein ATP-abhängiger Transporter, der zytotoxische Proteine aus der Zelle aktiv ausschleust. Es wurde mehrfach gezeigt, dass Maytansinoide durch MDR-1 ihre Wirksamkeit einbüßen⁸³. Eine systemische Unterdrückung durch MDR-1 Inhibitoren wurde schon viel untersucht und ist aufgrund der ausgeprägten Nebenwirkung nicht umsetzbar. Die Bindung zwischen DM4 und die Mikrotubuli kann durch Mutation des β -Tubulins verhindert werden. Die genauen Mechanismen sind in diesem Fall noch nicht bekannt.

4.3.4.3 Antikörperproduktion

Eine Antikörperproduktion gegen das Immunkonjugat ist ein bekanntes Problem bei der Behandlung mit Immunotoxinen und Immunkonjugate. In der klinischen Studie zu Anetumab Ravtansine hatten 10/32 Patienten Anti-Drug-Antikörper (ADA) vor Beginn der Behandlung. 8/22 Patienten entwickelten ADA unter der Therapie mit dem ADC. Es wurde jedoch kein Unterschied der Tumorantwort oder der Nebenwirkungen zwischen Patienten mit oder ohne ADA beobachtet (73). Die Antikörperproduktion scheint in diesem Fall keine Einschränkung in der Tumorthherapie darzustellen.

4.4 Toxizität

Eine sichtbare Nebenwirkung der Therapie an den Mäusen war der Verlust der Behaarung in der Region des Tumors, eingehend mit trockener Haut. Insgesamt wurde die Immuntherapie gut vertragen, auch bei der Verabreichung höherer Dosen. Eine Maus der Cx-03-Gruppe ist während des Experimentes gestorben, 2 Mäuse sind nach 6 Wochen ohne Tumor gestorben. Eine Maus der Hela-Gruppe musste aufgrund von starkem Gewichtsverlust und Verschlechterung des Allgemeinzustands getötet werden. Da das ADC nicht das murine Mesothelin bindet, sind die Nebenwirkungen durch die unspezifische

Toxizität zu erklären. Ein gutes Verständnis der unspezifischen Wirkung des Immunkonjugates ist wichtig um die unerwünschten Nebenwirkungen reduzieren zu können und so eine bessere Toleranz der Therapie zu erreichen.

Die zytotoxische Wirkung auf Mesothelin-negative Stromazellen wird von Golfier et al. durch den bystander Effekt erklärt. Mesothelin-exprimierende Zellen nehmen das Immunkonjugat auf und spalten seinen disulfid-Link, sodass das aktivierte DM4 freigesetzt wird. Das DM4 kann in den extrazellulären Raum diffundieren und durch unspezifische Mechanismen in die Mesothelin-negative Zelle aufgenommen werden, in der das Maytansinoid seine zytotoxische Wirkung entfalten kann. Golfier et al. konnte den bystander Effekt in Zellverbänden mit nur 20 % Mesothelin-positiven Zellen nachweisen. Der Effekt ist bei Karzinomen mit heterogener Mesothelinexpression ein Faktor, der die Tumoreradikation positiv beeinflusst. Die toxische Wirkung auf gesunden Zellen ist auf die direkte Umgebung des Karzinoms begrenzt und kann somit vernachlässigt werden.

Das ADC könnte auch durch eine unspezifische Rezeptorbindung des Antikörpers in die Zellen aufgenommen werden. Hierfür sprechen die Ergebnisse von Golfier et al. bei der Untersuchung der intrazellulären Akkumulation von Anetumab Ravtansine in Mesothelin-positiven und -negativen HT29-Tumoren. Hierfür wurde der Antikörper mit einer fluoreszierenden Färbung gekoppelt und Tumor-tragenden Mäusen intravenös injiziert. Nach 168 Stunden zeigten die bildgebenden Verfahren eine 1,4-Fache Aufnahme des ADC in den MSLN-positiven Tumoren im Vergleich zu den MSLN-negativen Tumoren. Es fällt auf, dass sich die Antikörper auch in den MSLN-negativen Tumoren anreichern. In der in vivo Untersuchung mit Isotyp-Kontrollen wurde bei höherer Dosierung auch eine zytotoxische Wirkung auf Mesothelin-exprimierenden Tumoren beobachtet ⁷¹.

Es gibt also mehrere Mechanismen durch die das Immunkonjugat auch Mesothelin-negative Zellen zerstören und somit unerwünschte Nebenwirkungen auslösen kann. Da die unspezifischen Aufnahmemechanismen nicht unterbunden werden können, muss die Schadensreduktion durch eine Anpassung der Therapieschemata erreicht werden (durch genaue Untersuchung der Dosis und des Dosierungsintervall).

In den klinischen Studien wurden in mehreren Fällen therapielimitierende Keratopathien durch die zytotoxische Wirkung von BAY 93-9343 auf die Mesothelin-positiven Kornealzellen ausgelöst. Ein lokaler Schutz der Kornea wäre durch Abfangen des ADC eine

Möglichkeit diese schwerwiegende Nebenwirkung zu bekämpfen. Hier wäre zum Beispiel denkbar das freie Mesothelin als topische Therapie zu nutzen um das ADC zu binden.

4.5 Fehlerquellen

Ein systematischer Fehler ist in der IHC-Färbung möglich, da nur eine einzige Person die Färbung der Zellen bewertet hat. Um diesen Fehler zu minimieren wäre die Wiederholung der Bewertung durch unabhängige Pathologen wünschenswert gewesen. Ein statistischer Fehler ist während des MTT-Essays möglich. Die Experimente wurden zwar dreifach getestet, jedoch im Rahmen eines Durchganges, auf einer 96-Well-Platte. Um diesen Fehler zu minimieren wäre eine mehrfache Wiederholung der Experimente nötig gewesen. Als Fehlerquelle kann bei den in vivo-Experimenten die Messung der Tumorgöße genannt werden, da diese von drei verschiedenen Personen durchgeführt wurden. Die Messung mittels Messschieber kann bei sehr kleinen Tumoren ungenau und abhängig von der messenden Person sein. Außerdem wurde nur der größte Durchmesser bewertet und verglichen. Da die Form der Tumore unregelmäßig war, kann dadurch das Wachstum über- oder unterschätzt worden sein. Ein Vergleich der Tumorvolumina wäre aussagekräftiger gewesen, wobei in diesem Falle die Messung der Tumortiefe, bei teilweise auch intramuskulärem Wachstum, nur ungenau möglich ist.

4.6 Limitationen

Die geringe Fallzahl und der kurze Beobachtungszeitraum sind Faktoren, die die statistische Relevanz der vorliegenden Studie beeinflussen und verfälschen könnten. In unserer Studie wurden sowohl Plattenepithelkarzinome sowie ein Karzinosarkom der Zervix untersucht. Es ist möglich, dass die Histologie der Karzinome einen Einfluss auf die Tumorantwort auf BAY-94-9343 hat und somit nicht erkannt wurde. Eine einheitliche Histologie mit unterschiedlichen Mesothelinexpression hätte eine genauere Aussage ermöglicht. Des Weiteren wurden keine Adenokarzinome untersucht, welche mit ihrer hohen Prävalenz Mesothelin-positiven Karzinomen eine interessante Untersuchungsgruppe darbie-ten. Die Cx-03 Zelllinie stach in den in vitro Experimenten mit einer starken Schleimproduktion hervor. Möglicherweise wurde dadurch die Penetration des Immunkonjugates behindert und so die zytotoxische Wirkung reduziert. Der Einfluss dieser Tumoreigenschaft ist aktuell nicht zu eruieren.

4.7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass nahezu 75% der Adenokarzinome der Zervix uteri und etwa die Hälfte der Plattenepithelkarzinome prinzipiell für eine Therapie mit Anetumab Ravtansine geeignet sind. Eine Voraussetzung zur Identifikation von Patienten, die vor einer Mesothelin gerichteten ADC-Therapie profitieren könnten, wären eine regelmäßige immunhistologische Erfassung der Mesothelinexpression in Zervixkarzinomen. Darüber hinaus konnten wir in unserer Studie auch bestätigen, dass die Gabe von höheren Einzeldosen bei größeren Applikationsintervallen einen besseren therapeutischen Effekt vermittelt, als die häufigere Gabe von niedrigeren Dosen. Die Erhöhung der Einzeldosis ist zwangsläufig mit einer Erhöhung des Risikos schwerer Nebenwirkungen verbunden, so dass hier eine verbesserte Kontrolle und Unterdrückung von Nebenwirkungen mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden muss. Auch eine Kombination mit Chemotherapeutika sollte in Betracht gezogen werden, um die Penetration von BAY 94-9343 im Tumor zu erhöhen und eine bessere Toleranz der Therapie zu erreichen. Die Nutzung von Mesothelin als Zielprotein könnte helfen insbesondere im Bereich der gynäkologischen Onkologie neue Therapieoptionen zu erschließen.

Quellenverzeichnis

1. Hassan R, Ho M. 2008. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer*. 44(1):46-53.
2. Hellstrom I, Raycraft J, Kanan S, Sardesai NY, Verch T, Yang Y, Hellstrom KE. 2006. Mesothelin variant 1 is released from tumor cells as a diagnostic marker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(5):1014-1020.
3. Muminova ZE, Strong TV, Shaw DR. 2004. Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 4:19.
4. Zhang J, Qiu S, Zhang Y, Merino M, Fetsch P, Avital I, Filie A, Pastan I, Hassan R. 2012. Loss of mesothelin expression by mesothelioma cells grown in vitro determines sensitivity to anti-mesothelin immunotoxin ss1p. *Anticancer Res*. 32(12):5151-5158.
5. Pastan I, Hassan R. 2014. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer Res*. 74(11):2907-2912.
6. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, Miyajima A. 2004. Binding of ovarian cancer antigen ca125/muc16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*. 279(10):9190-9198.
7. Hassan R, Schweizer C, Lu KF, Schuler B, Remaley AT, Weil SC, Pastan I. 2010. Inhibition of mesothelin-ca-125 interaction in patients with mesothelioma by the anti-mesothelin monoclonal antibody morab-009: Implications for cancer therapy. *Lung Cancer*. 68(3):455-459.
8. Chen SH, Hung WC, Wang P, Paul C, Konstantopoulos K. 2013. Mesothelin binding to ca125/muc16 promotes pancreatic cancer cell motility and invasion via mmp-7 activation. *Sci Rep*. 3:1870.
9. Chang MC, Chen CA, Chen PJ, Chiang YC, Chen YL, Mao TL, Lin HW, Lin Chiang WH, Cheng WF. 2012. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing mmp-7 through mapk/erk and jnk pathways. *Biochem J*. 442(2):293-302.
10. Servais EL, Colovos C, Rodriguez L, Bograd AJ, Nitadori J, Sima C, Rusch VW, Sadelain M, Adusumilli PS. 2012. Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and mmp-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. *Clin Cancer Res*. 18(9):2478-2489.
11. Wang Y, Wang L, Li D, Wang HB, Chen QF. 2012. Mesothelin promotes invasion and metastasis in breast cancer cells. *J Int Med Res*. 40(6):2109-2116.
12. Zheng C, Jia W, Tang Y, Zhao H, Jiang Y, Sun S. 2012. Mesothelin regulates growth and apoptosis in pancreatic cancer cells through p53-dependent and -independent signal pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 31:84.

13. Bharadwaj U, Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. 2011. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to tnf- α -induced apoptosis through akt/pi3k/nf-kb activation and il-6/mcl-1 overexpression. *Mol Cancer*. 10:106.
14. Chang K, Pastan I, Willingham MC. 1992. Isolation and characterization of a monoclonal antibody, k1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int J Cancer*. 50(3):373-381.
15. Ordóñez NG. 2003. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol*. 27(11):1418-1428.
16. Jirsova K, Neuwirth A, Kalasova S, Vesela V, Merjava S. 2010. Mesothelial proteins are expressed in the human cornea. *Exp Eye Res*. 91(5):623-629.
17. Yen MJ, Hsu CY, Mao TL, Wu TC, Roden R, Wang TL, Shih IM. 2006. Diffuse mesothelin expression correlates with prolonged patient survival in ovarian serous carcinoma. *Clin Cancer Res*. 12(3 Pt 1):827-831.
18. Hassan R, Bera T, Pastan I. 2004. Mesothelin: A new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 10(12 Pt 1):3937-3942.
19. Lamberts LE, de Groot DJ, Bense RD, de Vries EG, Fehrmann RS. 2015. Functional genomic mrna profiling of a large cancer data base demonstrates mesothelin overexpression in a broad range of tumor types. *Oncotarget*. 6(29):28164-28172.
20. Illei PB, Alewine C, Zahurak M, Cowan ML, Montgomery E, Hassan R, Xiang L, Pastan I, Kelly RJ. 2016. Mesothelin expression in advanced gastroesophageal cancer represents a novel target for immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 24(4):246-252.
21. Tchou J, Wang LC, Selven B, Zhang H, Conejo-Garcia J, Borghaei H, Kalos M, Vondeheide RH, Albelda SM, June CH, Zhang PJ. 2012. Mesothelin, a novel immunotherapy target for triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 133(2):799-804.
22. Steinbach D, Onda M, Voigt A, Dawczynski K, Wittig S, Hassan R, Gruhn B, Pastan I. 2007. Mesothelin, a possible target for immunotherapy, is expressed in primary aml cells. *Eur J Haematol*. 79(4):281-286.
23. Frierson HF, Moskaluk CA, Powell SM, Zhang H, Cerilli LA, Stoler MH, Cathro H, Hampton GM. 2003. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Hum Pathol*. 34(6):605-609.
24. Ibrahim DA, Abouhashem NS. 2016. Diagnostic value of imp3 and mesothelin in differentiating pancreatic ductal adenocarcinoma from chronic pancreatitis. *Pathol Res Pract*. 212(4):288-293.
25. Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, Allen TC, Attanoos RL, Beasley MB, Butnor KJ, Chirieac LR, Churg AM, Dacic S, Galateau-Sallé F, Gibbs A, Gown AM, Krausz T,

- Litzky LA, Marchevsky A, Nicholson AG, Roggli VL, Sharma AK, Travis WD, Walts AE, Wick MR. 2018. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma 2017 update of the consensus statement from the international mesothelioma interest group. *Arch Pathol Lab Med.* 142(1):89-108.
26. Rizk NP, Servais EL, Tang LH, Sima CS, Gerdes H, Fleisher M, Rusch VW, Adusumilli PS. 2012. Tissue and serum mesothelin are potential markers of neoplastic progression in barrett's associated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 21(3):482-486.
 27. Nomura R, Fujii H, Abe M, Sugo H, Ishizaki Y, Kawasaki S, Hino O. 2013. Mesothelin expression is a prognostic factor in cholangiocellular carcinoma. *Int Surg.* 98(2):164-169.
 28. Aktas B, Kasimir-Bauer S, Wimberger P, Kimmig R, Heubner M. 2013. Utility of mesothelin, l1cam and afamin as biomarkers in primary ovarian cancer. *Anticancer Res.* 33(1):329-336.
 29. Kachala SS, Bograd AJ, Villena-Vargas J, Suzuki K, Servais EL, Kadota K, Chou J, Sima CS, Vertes E, Rusch VW, Travis WD, Sadelain M, Adusumilli PS. 2014. Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 20(4):1020-1028.
 30. Shimizu A, Hirono S, Tani M, Kawai M, Okada K, Miyazawa M, Kitahata Y, Nakamura Y, Noda T, Yokoyama S, Yamaue H. 2012. Coexpression of muc16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 103(4):739-746.
 31. Kawamata F, Homma S, Kamachi H, Einama T, Kato Y, Tsuda M, Tanaka S, Maeda M, Kajino K, Hino O, Takahashi N, Kamiyama T, Nishihara H, Taketomi A, Todo S. 2014. C-erc/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. *J Gastroenterol.* 49(1):81-92.
 32. Ito T, Kajino K, Abe M, Sato K, Maekawa H, Sakurada M, Orita H, Wada R, Kajiyama Y, Hino O. 2014. Erc/mesothelin is expressed in human gastric cancer tissues and cell lines. *Oncol Rep.* 31(1):27-33.
 33. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. 2003. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet.* 362(9396):1612-1616.
 34. Cui A, Jin XG, Zhai K, Tong ZH, Shi HZ. 2014. Diagnostic values of soluble mesothelin-related peptides for malignant pleural mesothelioma: Updated meta-analysis. *BMJ Open.* 4(2):e004145.
 35. Creaney J, Musk AW, Robinson BW. 2010. Sensitivity of urinary mesothelin in patients with malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 5(9):1461-1466.
 36. Demir M, Kaya H, Taylan M, Ekinci A, Yilmaz S, Teke F, Sezgi C, Tanrikulu AC,

- Meteroglu F, Senyigit A. 2016. Evaluation of new biomarkers in the prediction of malignant mesothelioma in subjects with environmental asbestos exposure. *Lung*. 194(3):409-417.
37. Fukuoka K, Kuribayashi K, Yamada S, Tamura K, Tabata C, Nakano T. 2013. Combined serum mesothelin and carcinoembryonic antigen measurement in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mol Clin Oncol*. 1(6):942-948.
 38. Muley T, Dienemann H, Herth FJ, Thomas M, Meister M, Schneider J. 2013. Combination of mesothelin and cea significantly improves the differentiation between malignant pleural mesothelioma, benign asbestos disease, and lung cancer. *J Thorac Oncol*. 8(7):947-951.
 39. Filiberti R, Marroni P, Spigno F, Merlo DF, Mortara V, Caruso P, Cioè A, Michelazzi L, Bruzzone A, Bobbio B, Simonassi C, Del Corso L, Galli R, Racchi O, Dini G, Linares R, Mencoboni M. 2014. Is soluble mesothelin-related protein an upfront predictive marker of pleural mesothelioma? A prospective study on italian workers exposed to asbestos. *Oncology*. 86(1):33-43.
 40. Santarelli L, Staffolani S, Strafella E, Nocchi L, Manzella N, Grossi P, Bracci M, Pignotti E, Alleva R, Borghi B, Pompili C, Sabbatini A, Rubini C, Zuccatosta L, Bichisecchi E, Valentino M, Horwood K, Comar M, Bovenzi M, Dong LF, Neuzil J, Amati M, Tomasetti M. 2015. Combined circulating epigenetic markers to improve mesothelin performance in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Lung Cancer*. 90(3):457-464.
 41. Linch M, Gennatas S, Kazikin S, Iqbal J, Gunapala R, Priest K, Severn J, Norton A, Ayite B, Bhosle J, O'Brien M, Popat S. 2014. A serum mesothelin level is a prognostic indicator for patients with malignant mesothelioma in routine clinical practice. *BMC Cancer*. 14:674.
 42. Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. 2006. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 12(2):447-453.
 43. Scholler N, Fu N, Yang Y, Ye Z, Goodman GE, Hellström KE, Hellström I. 1999. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20):11531-11536.
 44. Ibrahim M, Bahaa A, Ibrahim A, El Hakem AA, Abo-El Noor A, El Tohamy U. 2014. Evaluation of serum mesothelin in malignant and benign ovarian masses. *Arch Gynecol Obstet*. 290(1):107-113.
 45. Madeira K, Dondossola ER, Farias BF, Simon CS, Alexandre MC, Silva BR, Rosa MI. 2016. Mesothelin as a biomarker for ovarian carcinoma: A meta-analysis. *An Acad Bras Cienc*. 88(2):923-932.
 46. Blyuss O, Gentry-Maharaj A, Fourkala EO, Ryan A, Zaikin A, Menon U, Jacobs I,

- Timms JF. 2015. Serial patterns of ovarian cancer biomarkers in a prediagnosis longitudinal dataset. *Biomed Res Int.* 2015:681416.
47. Badgwell D, Lu Z, Cole L, Fritsche H, Atkinson EN, Somers E, Allard J, Moore RG, Lu KH, Bast RC. 2007. Urinary mesothelin provides greater sensitivity for early stage ovarian cancer than serum mesothelin, urinary hcg free beta subunit and urinary hcg beta core fragment. *Gynecol Oncol.* 106(3):490-497.
 48. O'Shannessy DJ, Somers EB, Palmer LM, Thiel RP, Oberoi P, Heath R, Marcucci L. 2013. Serum folate receptor alpha, mesothelin and megakaryocyte potentiating factor in ovarian cancer: Association to disease stage and grade and comparison to ca125 and he4. *J Ovarian Res.* 6(1):29.
 49. Lowe KA, Shah C, Wallace E, Anderson G, Paley P, McIntosh M, Andersen MR, Scholler N, Bergan L, Thorpe J, Urban N, Drescher CW. 2008. Effects of personal characteristics on serum ca125, mesothelin, and he4 levels in healthy postmenopausal women at high-risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(9):2480-2487.
 50. Hassan R, Ebel W, Routhier EL, Patel R, Kline JB, Zhang J, Chao Q, Jacob S, Turchin H, Gibbs L, Phillips MD, Mudali S, Iacobuzio-Donahue C, Jaffee EM, Moreno M, Pastan I, Sass PM, Nicolaidis NC, Grasso L. 2007. Preclinical evaluation of morab-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin. *Cancer Immun.* 7:20.
 51. Lee JH, Kim H, Yao Z, Lee SJ, Szajek LP, Grasso L, Pastan I, Paik CH. 2015. Tumor and organ uptake of (64)cu-labeled morab-009 (amatuximab), an anti-mesothelin antibody, by pet imaging and biodistribution studies. *Nucl Med Biol.* 42(11):880-886.
 52. Lindenberg L, Thomas A, Adler S, Mena E, Kurdziel K, Maltzman J, Wallin B, Hoffman K, Pastan I, Paik CH, Choyke P, Hassan R. 2015. Safety and biodistribution of 111in-amatuximab in patients with mesothelin expressing cancers using single photon emission computed tomography-computed tomography (spect-ct) imaging. *Oncotarget.* 6(6):4496-4504.
 53. Lee JH, Kim H, Yao Z, Szajek LP, Grasso L, Kim I, Paik CH. 2018. Tumor-shed antigen affects antibody tumor targeting: Comparison of two. *Contrast Media Mol Imaging.* 2018:2461257.
 54. Mizukami T, Kamachi H, Fujii Y, Matsuzawa F, Einama T, Kawamata F, Kobayashi N, Hatanaka Y, Taketomi A. 2018. The anti-mesothelin monoclonal antibody amatuximab enhances the anti-tumor effect of gemcitabine against mesothelin-high expressing pancreatic cancer cells in a peritoneal metastasis mouse model. *Oncotarget.* 9(73):33844-33852.
 55. Hassan R, Cohen SJ, Phillips M, Pastan I, Sharon E, Kelly RJ, Schweizer C, Weil S, Laheru D. 2010. Phase i clinical trial of the chimeric anti-mesothelin monoclonal antibody morab-009 in patients with mesothelin-expressing cancers. *Clin Cancer Res.* 16(24):6132-6138.

-
56. Fujisaka Y, Kurata T, Tanaka K, Kudo T, Okamoto K, Tsurutani J, Kaneda H, Okamoto I, Namiki M, Kitamura C, Nakagawa K. 2015. Phase i study of amatuximab, a novel monoclonal antibody to mesothelin, in japanese patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. 33(2):380-388.
 57. Hassan R, Kindler HL, Jahan T, Bazhenova L, Reck M, Thomas A, Pastan I, Parno J, O'Shannessy DJ, Fatato P, Maltzman JD, Wallin BA. 2014. Phase ii clinical trial of amatuximab, a chimeric antimesothelin antibody with pemetrexed and cisplatin in advanced unresectable pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 20(23):5927-5936.
 58. Hassan R, Broaddus VC, Wilson S, Liewehr DJ, Zhang J. 2007. Anti-mesothelin immunotoxin ss1p in combination with gemcitabine results in increased activity against mesothelin-expressing tumor xenografts. *Clin Cancer Res*. 13(23):7166-7171.
 59. Hassan R, Williams-Gould J, Steinberg SM, Liewehr DJ, Yokokawa J, Tsang KY, Surawski RJ, Scott T, Camphausen K. 2006. Tumor-directed radiation and the immunotoxin ss1p in the treatment of mesothelin-expressing tumor xenografts. *Clin Cancer Res*. 12(16):4983-4988.
 60. Hassan R, Sharon E, Thomas A, Zhang J, Ling A, Miettinen M, Kreitman RJ, Steinberg SM, Hollevoet K, Pastan I. 2014. Phase 1 study of the antimesothelin immunotoxin ss1p in combination with pemetrexed and cisplatin for front-line therapy of pleural mesothelioma and correlation of tumor response with serum mesothelin, megakaryocyte potentiating factor, and cancer antigen 125. *Cancer*. 120(21):3311-3319.
 61. Hassan R, Miller AC, Sharon E, Thomas A, Reynolds JC, Ling A, Kreitman RJ, Miettinen MM, Steinberg SM, Fowler DH, Pastan I. 2013. Major cancer regressions in mesothelioma after treatment with an anti-mesothelin immunotoxin and immune suppression. *Sci Transl Med*. 5(208):208ra147.
 62. Manning ML, Mason-Osann E, Onda M, Pastan I. 2015. Bortezomib reduces pre-existing antibodies to recombinant immunotoxins in mice. *J Immunol*. 194(4):1695-1701.
 63. Zhang Y, Chertov O, Zhang J, Hassan R, Pastan I. 2011. Cytotoxic activity of immunotoxin ss1p is modulated by tace-dependent mesothelin shedding. *Cancer Res*. 71(17):5915-5922.
 64. Hollevoet K, Mason-Osann E, Liu XF, Imhof-Jung S, Niederfellner G, Pastan I. 2014. In vitro and in vivo activity of the low-immunogenic antimesothelin immunotoxin rg7787 in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*. 13(8):2040-2049.
 65. Alewine C, Xiang L, Yamori T, Niederfellner G, Bosslet K, Pastan I. 2014. Efficacy of rg7787, a next-generation mesothelin-targeted immunotoxin, against triple-negative breast and gastric cancers. *Mol Cancer Ther*. 13(11):2653-2661.
 66. Zhang J, Khanna S, Jiang Q, Alewine C, Miettinen M, Pastan I, Hassan R. 2017.

- Efficacy of anti-mesothelin immunotoxin rg7787 plus nab-paclitaxel against mesothelioma patient-derived xenografts and mesothelin as a biomarker of tumor response. *Clin Cancer Res.* 23(6):1564-1574.
67. Bauss F, Lechmann M, Krippendorff BF, Staack R, Herting F, Festag M, Imhof-Jung S, Hesse F, Pompiati M, Kollmorgen G, da Silva Mateus Seidl R, Bossenmaier B, Lau W, Schantz C, Stracke JO, Brinkmann U, Onda M, Pastan I, Bosslet K, Niederfellner G. 2016. Characterization of a re-engineered, mesothelin-targeted pseudomonas exotoxin fusion protein for lung cancer therapy. *Mol Oncol.* 10(8):1317-1329.
 68. Awuah P, Bera TK, Folivi M, Chertov O, Pastan I. 2016. Reduced shedding of surface mesothelin improves efficacy of mesothelin-targeting recombinant immunotoxins. *Mol Cancer Ther.*
 69. Ali-Rahmani F, FitzGerald DJ, Martin S, Patel P, Prunotto M, Ormanoglu P, Thomas C, Pastan I. 2015. Anticancer effects of mesothelin-targeted immunotoxin therapy are regulated by tyrosine kinase ddr1. *Cancer Res.*
 70. Weekes CD, Lamberts LE, Borad MJ, Voortman J, McWilliams RR, Diamond JR, de Vries EG, Verheul HM, Lieu CH, Kim GP, Wang Y, Scales SJ, Samineni D, Brunstein F, Choi Y, Maslyar DJ, Colon-Otero G. 2016. Phase i study of dmot4039a, an antibody-drug conjugate targeting mesothelin, in patients with unresectable pancreatic or platinum-resistant ovarian cancer. *Mol Cancer Ther.* 15(3):439-447.
 71. Golfier S, Kopitz C, Kahnert A, Heisler I, Schatz CA, Stelte-Ludwig B, Mayer-Bartschmid A, Unterschemmann K, Bruder S, Linden L, Harrenga A, Hauff P, Scholle FD, Müller-Tiemann B, Kreft B, Ziegelbauer K. 2014. Anetumab ravtansine: A novel mesothelin-targeting antibody-drug conjugate cures tumors with heterogeneous target expression favored by bystander effect. *Mol Cancer Ther.* 13(6):1537-1548.
 72. Quanz M, Hagemann UB, Zitzmann-Kolbe S, Stelte-Ludwig B, Golfier S, Elbi C, Mumberg D, Ziegelbauer K, Schatz CA. 2018. Anetumab ravtansine inhibits tumor growth and shows additive effect in combination with targeted agents and chemotherapy in mesothelin-expressing human ovarian cancer models. *Oncotarget.* 9(75):34103-34121.
 73. Hassan R, Blumenschein GR Jr, Moore KN, Santin AD, Kindler HL, Nemunaitis JJ, Seward SM, Thomas A, Kim SK, Rajagopalan P, Walter AO, Laurent D, Childs BH, Sarapa N, Elbi C, Bendell JC. 2020. First-in-human, multicenter, phase i dose-escalation and expansion study of anti-mesothelin antibody-drug conjugate anetumab ravtansine in advanced or metastatic solid tumors. *J Clin Oncol.* 38(16):1824-1835.
 74. Krebs in deutschland 2011/2012. 2015. 10. Ausgabe ed. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).

-
75. Leitlinienprogramm onkologie (deutsche krebsgesellschaft, deutsche krebshilfe, awmf): S3-leitlinie diagnostik, therapie und nachsorge der patientin mit zervixkarzinom, langversion, 2.0, 2021, awmf-registernummer: 032/033ol, <https://www.Leitlinienprogramm-onkologie.De/leitlinien/zervixkarzinom/>.
 76. Krebs in deutschland für 2013/2014. 2017. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
 77. Quinn BA, Deng X, Colton A, Bandyopadhyay D, Carter JS, Fields EC. 2018. Increasing age predicts poor cervical cancer prognosis with subsequent effect on treatment and overall survival. Brachytherapy.
 78. Emmett M, Gildea C, Nordin A, Hirschowitz L, Poole J. 2018. Cervical cancer - does the morphological subtype affect survival rates? J Obstet Gynaecol. 38(4):548-555.
 79. Zhou J, Zhang WW, Wu SG, He ZY, Sun JY, Yang GF, Li FY. 2017. The prognostic value of histologic subtype in node-positive early-stage cervical cancer after hysterectomy and adjuvant radiotherapy. Int J Surg. 44:1-6.
 80. Bücken R, Schaefer C, Gruber AD, Hoppe J, Lazzerini L, Barinoff J, Sehouli J, Cichon G. 2018. Establishment of a mucin secreting cell line cx-03 from an uterine carcino sarcoma. Pharm Res. 36(1):7.
 81. Mann-whitney u test calculator. Social Science Statistics; [accessed 27.07.2021]. Mann-Whitney U Test Calculator (socscistatistics.com).
 82. Chang K, Pastan I, Willingham MC. 1992. Frequent expression of the tumor antigen cak1 in squamous-cell carcinomas. Int J Cancer. 51(4):548-554.
 83. Kovtun YV, Audette CA, Mayo MF, Jones GE, Doherty H, Maloney EK, Erickson HK, Sun X, Wilhelm S, Ab O, Lai KC, Widdison WC, Kellogg B, Johnson H, Pinkas J, Lutz RJ, Singh R, Goldmacher VS, Chari RV. 2010. Antibody-maytansinoid conjugates designed to bypass multidrug resistance. Cancer Res. 70(6):2528-2537.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lea Elisa Lazzerini, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit des anti-Mesothelin-Immunkonjugates Anetumab Ravtansine an murinen Zervixkarzinommodellen“; „Exploration of the therapeutic effect of the anti-Mesothelin-immunoconjugate Anetumab Ravtansine on murine models of cancer of the cervix uteri“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte. Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 17.04.2023

Unterschrift



Anteilerklärung

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

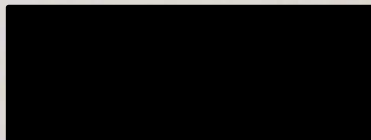
Lea Elisa Lazzerini hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen (dessen Ergebnisse Teil der Dissertation sind):

Publikation 2 (als Co-Autorin): Jöhrens K, Lazzerini L, Barinoff J, Sehouli J, Cichon G. Mesothelin as a target for cervical cancer therapy. Arch Gynecol Obstet. 2019 Jan;299(1):211-216. doi: 10.1007/s00404-018-4933-z. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30324544.

Ich habe die Zellkultur (HeLa Zellen) durchgeführt und an der tierexperimentellen Arbeit (Tumorzellen injizieren, Injektion von BAY 93-9343, Tumorgroße messen, Beendigung der Mäuseleben) teilgenommen. Ich habe die Graphiken der Publikation erstellt. Aus meiner tierexperimentellen Arbeit sind die Ergebnisse in der Abb. 2 entstanden. Ich habe die Publikation Korrektur gelesen.

Publikation 3 (als Erstautorin): Lazzerini L, Jöhrens K, Sehouli J, Cichon G. Favorable therapeutic response after anti-Mesothelin antibody-drug conjugate treatment requires high expression of Mesothelin in tumor cells. Arch Gynecol Obstet. 2020 Nov;302(5):1255-1262. doi: 10.1007/s00404-020-05734-9. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32815024; PMCID: PMC7524828.

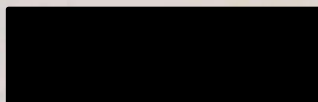
Ich habe die Zellkultur (Caski, HeLa, Cx-03 Zellen) durchgeführt, an der tierexperimentellen Arbeit (Tumorzellen injizieren, Injektion von BAY 94-9343 / PBS, Tumorgroße messen, Beendigung der Mäuseleben) teilgenommen, die Ergebnisse ausgewertet sowie die Graphiken und den Text erstellt.



26.9.22
CHARITÉ CAMPUS BENJAMIN FRANKLIN
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Frauenklinik mit Hochschulambulanz
Tel. 030 8445 2457
Hindenburgdamm 30 | 12203 Berlin

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

PD Dr. G. Cichon



Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Jöhrens K, Lazzerini L, Barinoff J, Sehouli J, Cichon G. Mesothelin as a target for cervical cancer therapy. *Arch Gynecol Obstet.* 2019 Jan;299(1):211-216. doi: 10.1007/s00404-018-4933-z. Epub 2018 Oct 15. PMID: 30324544.
2. Bücken R, Schaefer C, Gruber AD, Hoppe J, Lazzerini L, Barinoff J, Sehouli J, Cichon G. Establishment of a Mucin Secreting Cell Line Cx-03 from an Uterine Carcino Sarcoma. *Pharm Res.* 2018 Nov 8;36(1):7. doi: 10.1007/s11095-018-2533-z. PMID: 30411161.
3. Lazzerini L, Jöhrens K, Sehouli J, Cichon G. Favorable therapeutic response after anti-Mesothelin antibody-drug conjugate treatment requires high expression of Mesothelin in tumor cells. *Arch Gynecol Obstet.* 2020 Nov;302(5):1255-1262. doi: 10.1007/s00404-020-05734-9. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32815024; PMCID: PMC7524828.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Dr. Günter Cichon für die stets freundliche und hilfreiche Betreuung während der gesamten Bearbeitungszeit. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Cichon bedanken, die mich in der laborchemischen und tierexperimentellen Arbeit unterwiesen haben. Ohne die Hilfsbereitschaft dieses Teams wäre meine Studie nicht möglich gewesen. Vielen Dank auch an Frau Dr. Schulze-Tanzil für die Mitbetreuung der Dissertation.

Meiner Mutter, Großmutter und Schwester danke ich für ihren Rat und dafür, niemals aufgegeben zu haben, mir die deutsche Grammatik beizubringen. Des Weiteren danke ich meinen Freund Michael für seine Geduld, mir immer wieder mit Word auszu helfen, wenn das Programm nicht das machte, was ich wollte. Ein großer Dank gilt all meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren stets motiviert und mir geholfen haben auch über lange Zeiträume hinweg am Ball zu bleiben.

Milles merci à ma famille et à mes amies de m'avoir toujours soutenue et d'avoir cru en moi tout ce temps. Merci pour tout votre amour et bienveillance.

Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Lazzerini, Lea
Emailadresse: lea.lazzerini@charite.de
Matrikelnummer: 214898
PromotionsbetreuerIn: PD Dr. Günter Cichon
Promotionsinstitution / Klinik: Klinik für Gynäkologie, CBF

Postanschrift:
 Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
 Besucheranschrift:
 Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
 geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau *Lea Lazzerini* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 28.07.2021

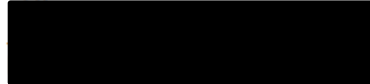
Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Für vergleiche von mehr als zwei Gruppen Kruskal Wallis Test verwenden.
- Boxplots können zur Veranschaulichung verwendet werden.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum:

Name des Beraters/ der Beraterin:



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

CHARITÉ
 UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
 Institut für Biometrie und
 Klinische Epidemiologie
 Campus Charité Mitte
 Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
 Sitz: Reinhardtstr. 58