

6 Zusammenfassung

Lebermetastasen verschlechtern die Prognose von Patienten, die an kolorektalen Karzinom erkranken erheblich. Da chirurgische oder chemotherapeutische Behandlungsversuche oft nicht indiziert oder deren Ergebnisse unbefriedigend sind, besteht dringender Bedarf für die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Vorfeld klinischer Studien das geeignetste Prodrug für eine liposomal vermittelte lokoregionäre HSV-*tk*-Suizidgentherapie von kolorektalen Lebermetastasen zu ermitteln. Pegylierte Liposomen dienten in dieser Arbeit als gefahrlose Genfähren. Sie wurden im Tierversuch zusammen mit einem Embolisat lokoregionär appliziert und transfizierten so die Lebermetastasen mit dem Thymidinkinasegen. Die nachfolgende Behandlung mit einem nicht toxischen Prodrug, welches von den transfizierten Zellen durch die eingebrachte Thymidinkinase in einen toxischen Metaboliten konvertiert wurde, trieb die Tumorzelle dann in den Suizid. Für diese Prodrug-Behandlung wurden die Nukleosidanaloga Valaciclovir (VCV, ein Valinsäurester des Aciclovir und damit oral verfügbar), Aciclovir (ACV, i.p. und in zwei Dosierungen appliziert) und Ganciclovir (GCV, i.p. appliziert) getestet. Einem oral verfügbaren Präparat wäre für die spätere klinische Anwendung gegenüber einer Tropfinfusion der Vorzug zu geben, da die Prodrugbehandlung 1-2 Wochen andauert.

Die *in-vitro*-Versuche unter Verwendung der Tumorzelllinien CC531 und F98 zeigten deutlich eine gesteigerte Zytotoxizität HSV-*tk*-transfizierter Zellen zugunsten des Prodrug GCV gegenüber dem ACV.

Bei den *in-vivo*-Versuchen am Lebermetastasenmodell der Ratte bestanden bei den oral VCV-behandelten Tieren und den in geringer Dosis ACV-behandelten Tieren keine signifikanten Wachstumshemmungen des CC531 Lebertumors am Ende der Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigte sich aber im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums bei den mit je 100 mg / kg ACV ($p = 0,0048$) respektive GCV ($p = 0,0011$) behandelten Hochdosisgruppen. Zwischen diesen beiden Hochdosisgruppen bestanden bezüglich des Tumorwachstums keine signifikanten Unterschiede. Daher wäre ein klinischer Einsatz hinsichtlich der therapeutischen Effizienz dieser hochdosiert und i.v. verabreichten Prodrugs nahezu gleichwertig zu beurteilen. Tendenziell scheint eine bessere Wirksamkeit des GCV vorzuliegen. In dieser Gruppe wurden bei zwei der zehn Tiere sogar Regressionen des sehr aggressiv wachsenden CC531-Kolonkarzinomtumors erzielt.

Das Auftreten von Lungenmetastasen war ebenfalls nur in diesen beiden Behandlungsgruppen deutlich verringert (30 % der Tiere unter ACV-Hochdosisbehandlung, respektive 10 % der

Tiere unter GCV-Hochdosisbehandlung, dagegen entwickelten etwa 60 % der Tiere in allen anderen Versuchsgruppen Lungenmetastasen).

Die gesteigerte Effektivität in den Hochdosisgruppen ist in erster Linie zurückzuführen auf das Erreichen deutlich höherer Plasmawerte, besonders für das GCV. Dagegen zeigte die mit dem oral verfügbaren Valinsäureester, VCV-behandelte Gruppe neben der nicht ausreichenden Tumorantwort wesentlich geringere Plasmawerte für das entstehende ACV. Die im Anschluss ausgeführte Auswertung von PCR-Messungen einer dafür eigens mitgeführten Kontrollgruppe gab Aufschluss über Anreicherung und zeitlichen Verlauf der Genexpression in Organen. So wurde ein starker Expressionsabfall des therapeutischen Gen zwischen Tag 5 und Tag 9 nach Applikation nachgewiesen. Die verabreichte Thymidinkinase wurde bei diesem Tierversuch besonders in der Milz und auch der gesunden Leber nachgewiesen. Die Entwicklung eines geeigneten Therapiemonitoring nicht nur mit konventionellen Parametern (die Verwendung des Prodrug GCV erschien leicht myelosuppressiv), sondern auch im Sinne der Expressionsüberwachung ist daher anstrebenswert.

Die Ergebnisse der Arbeit belegen eindeutig, dass eine hohe Plasmakonzentration der Prodrugs Voraussetzung für eine effiziente Behandlung des Tumors ist. In unseren präklinischen Versuchen erwies sich die liposomal vermittelte HSV-*tk* Suizidgenstrategie mit allen verwendeten Prodrugs als gut verträgliche, nebenwirkungsarme Behandlung.

Investigation of efficiency of the prodrugs valaciclovir, aciclovir and ganciclovir after application of DCES-HSV-*tk* suicide gene therapy system for the treatment of CC531 liver metastases model in rats

7 Summary

Liver metastases worsen considerably the prognoses of the patients, who suffer from colorectal cancer. Because of the unsatisfactory efficacy of surgical and chemotherapeutic treatment, there is urgent need for the development of new methods of treatment. The aim of the present work was to elucidate the most suitable prodrug for the HSV-*tk*-liposome-mediated suicide gene therapy of colorectal liver metastases in preliminary stages of clinical studies. Pegylated liposomes were used as low risk gene vectors in this work. In the animal experiment they were applied together with an embolisate locoregionally, to achieve efficient transfection of tumor cells with the thymidine kinase gene. The following treatment with a non-toxic prodrug, which is converted into a toxic metabolite by thymidine kinase in the transfected tumor cells, drives the tumor cell to suicide. The nucleoside analoga Valaciclovir (VCV, an ester of Aciclovir and thus orally available), Aciclovir (ACV, i.p. and in two different doses) and Ganciclovir (GCV, i.p.) were tested as prodrugs. For future clinical application, an orally available drug would be of advantage since the prodrug application lasts 1-2 weeks. The *in-vitro* experiments showed an increased cytotoxicity of transfected tumor cell lines CC531 (rat colon carcinoma) and F98 (rat glioblastoma) in favor of the prodrug GCV compared to ACV. The *in-vivo* experiments, using a rat model of liver metastases, demonstrated no significant suppression of CC531 liver tumor growth with orally given VCV and intraperitoneally given ACV in low dosage compared with the control group at the end of the treatment. In contrast, significant suppression of tumor growth occurred in animals treated with the high dosage of 100 mg / kg ACV and GCV ($p=0,0048$, $p=0,0011$ respectively versus control). There were no statistical difference in tumor growth inhibition between both drugs. Thus for a clinical use ACV and GCV at high dosage may be expected to elicit equal therapeutic efficiency. However, there was an apparent tendency favoring. In the GCV-treated group, regressions of the fast-growing CC531 rat colon carcinoma liver metastases were found in two of ten animals.

The presence of pulmonary metastases was reduced clearly likewise only in both high doses treatment groups (30 % of the ACV-treated animals and 10 % of the GCV-treated animals developed pulmonary metastases, compared to about 60 % in all other experimental groups). The increased efficacy in these both groups may be explained most likely by reaching clearly higher plasma levels for GCV followed by equally dosed ACV compared with the other

experimental groups. ACV from his orally administered valine acid ester VCV showed the lowest plasma levels which is in line with the insufficient tumor answer.

In a separately designed control group PCR-measurements informed about enhancement and temporal course of the transgene expression in different organs. A strong decrease in gene expression was observed between day 5 and day 9 after application. The development of a suitable *in-vivo* monitoring not only including main parameters (the use of the prodrug GCV appeared myelosuppressive), but also to control suicide gene expression is strongly indicated. The results of the work show that a high plasmaconcentration of the prodrugs determine an efficient treatment of the tumor.

In summary, the liposome mediated HSV-*tk* suicide gene therapy combined with all tested prodrugs represents a well tolerated treatment with less side effects.