

1 Hintergrund und Fragestellung

1.1 Epidemiologie und Problematik des exokrinen Pankreaskarzinoms

Das duktale Adenokarzinom des exokrinen Pankreas ist eines der aggressivsten Malignome und mittlerweile die vierthäufigste Krebstodesursache in der westlichen Welt [1-3]. Jährlich erkranken jeweils etwa 30.000 Menschen in der Europäischen Union und den USA [4-6]. Gleichzeitig zeigen die epidemiologischen Daten, daß die Sterbeziffern für das duktale Pankreaskarzinom etwa gleich hoch sind – mit anderen Worten, es gibt praktisch kein Langzeitüberleben bei dieser Erkrankung [7]. In der Tat liegen die berichteten 5-Jahres-Überlebensraten für das Gesamtkollektiv der Pankreaskarzinompatienten deutlich unter 5 % [3, 8], und dies hat sich in den vergangenen drei Jahrzehnten nicht signifikant geändert [9].

Bis heute bietet die radikale chirurgische Entfernung des Tumors die einzige Möglichkeit der Heilung [10, 11]. Da beim Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch in den meisten Fällen bereits ein lokal und/oder systemisch fortgeschrittenes Tumorstadium vorliegt, kommt die Option der potentiell kurativen Resektion nur für 10 bis 20 % aller Pankreaskarzinom-Patienten in Betracht [4, 11, 12]. Selbst bei den mit kurativer Intention resezierten Patienten sind die Langzeitergebnisse enttäuschend. Spezialisierte chirurgische Zentren berichten über 5-Jahres-Überlebensraten von maximal 30 % [7, 11, 13]; im Durchschnitt aller resezierten Patienten liegt diese Rate in der Größenordnung von 10 % [9, 11]. Weiterhin berichten einige Studien, daß die meisten 5-Jahres-Überlebenden zu einem späteren Zeitpunkt doch an der Tumorkrankheit versterben werden [7], was wiederum die o.g. epidemiologischen Daten unterstreicht.

Wirkungsvolle Alternativen zur chirurgischen Therapie gibt es nach wie vor nicht [8, 10, 14]. In der adjuvanten Situation konnte bislang der Nutzen einer postoperativen Radiochemotherapie nicht gesichert werden [6, 10, 15-17]. Der Stellenwert einer systemischen Chemotherapie ist derzeit noch nicht klar definiert. Die größte zu dieser Fragestellung veröffentlichte Studie (ESPAC-1) zeigte zwar einen statistisch signifikanten, klinisch aber eher marginalen Überlebensvorteil für eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU und Leucovorin; darüberhinaus ist diese Studie mit erheblichen methodischen Problemen behaftet [6, 10, 18]. Eine weitere Studie [19] deutet auf einen positiven Effekt von Gemcitabine in der adjuvanten Situation hin. In der palliativen Situation lässt sich durch Zytostatika ein objektives Tumorsprechen beim Pankreaskarzinom realistischerweise nicht erreichen. Gemcitabine stellt die einzige Substanz dar, für die ein statistisch signifikanter Effekt auf das Überleben berichtet wird, der in seiner Größenordnung und biologischen Relevanz aber als sehr moderat einzuschätzen ist [10, 19]. Immerhin kann Gemcitabine in etwa einem Viertel der Patienten zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen, die überwiegend aus einer Abnahme der Schmerzen bzw. des Analgetikabedarfs resultiert [8, 10].

1.2 Tiermodelle des duktales Pankreaskarzinoms

Aufgrund der Epidemiologie und dem klinischen Verlauf des Pankreaskarzinoms wird die Notwendigkeit deutlich, mit klinisch relevanten Tiermodellen zum einen die nur unzureichend verstandene Pathophysiologie dieses äußerst aggressiven Tumors weiter zu untersuchen. Zum anderen sind solche Modelle erforderlich, um präklinisch die Wirksamkeit von neuen therapeutischen Strategien zu evaluieren [20].

1.2.1 Nacktmausmodelle

Die subkutane Injektion von humanen Tumorzellen in immundefiziente Tiere wie Nacktmäuse wird schon lange und im großen Stil dazu benutzt, experimentelle Modelle von humanen Karzinomen zu generieren [21, 22]. Die

klinische Erkrankung wird durch diese Modelle jedoch nur unzureichend abgebildet, da beispielsweise eine Fernmetastasierung nur in Ausnahmefällen auftritt, wenn der Primärtumor subkutan ektop induziert wird [23-25]. Eine orthotope Tumorinduktion, bei der ein Primärtumor im Ursprungsorgan induziert wird, bildet den Prozeß des initial lokalen Tumorwachstums und der späteren Fernmetastasierung wesentlich realistischer ab [24, 26-29].

Bislang sind eine Reihe von Techniken beschrieben worden, um orthotope Pankreaskarzinome in Nacktmäusen zu induzieren [30-36]. Alle diese Techniken sind jedoch mit potentiellen Nachteilen verbunden. Eine direkte Injektion von Tumorzellen in das Pankreas [30-32] birgt das hohe Risiko einer Zellverschleppung in die Abdominalhöhle mit Ausbildung einer artifiziellen intraabdominellen Metastasierung. Die orthotope Transplantation von kleinen Tumorfragmenten, die entweder aus subkutanen Tiertumoren [33, 34] oder direkt von resezierten humanen Karzinomen [35, 36] stammen, wurde bereits beschrieben. Die bisher verwendeten Techniken, diese Tumorfragmente im Pankreas zu verankern, waren allerdings unbefriedigend: das Benutzen von Haltenähten ist traumatisch, darüberhinaus löst die Naht bereits eine entzündliche Reaktion hervor [34-36]. Das ebenfalls beschriebene komplette Umhüllen des Xenografts mit dem Pankreasorgan verändert die normalen anatomischen Lagebeziehungen [33].

1.2.2 Fragestellung Nacktmausmodell

Das **erste Ziel** der Nacktmausmodell-Studie war

- *die Entwicklung einer weniger traumatischen Technik für die orthotope Implantation von kleinen Tumor-Xenografts in das Pankreas.*
- *Darüberhinaus sollte die Implantationstechnik im Vergleich zur direkten Injektion von Tumorzellen evaluiert werden.*
- *Das präklinische Austesten von neuen Therapiestrategien in Tiermodellen erfordert neben einer verlässlichen Tumorinduktion auch die genaue Erfassung der Behandlungseffekte auf lokales und systemisches Tumorwachstum. Dementsprechend sollte ein Scoring-System entwickelt werden, um das Ausmaß der lokalen*

Tumorinfiltration sowie die systemische Tumoraussaat zu quantifizieren.

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas umfaßt eine Vielzahl von histomorphologischen Subgruppen mit unterschiedlichen biologischen Phänotypen [37, 38]. Daher war ein **zweites Ziel** der Studie,

- *das Nacktmausmodell für eine breite Palette von gut differenzierten bis hin zu undifferenzierten Karzinomen zu charakterisieren, um die unterschiedlichen Aspekte der klinischen Erkrankung realistisch abzubilden.*

1.2.3 Rattenmodelle

Immunkompromittierte Tiere wie Nacktmäuse ermöglichen zwar das in vivo Wachstum von humanen Pankreaskarzinomzellen oder Tumorfragmenten, sie können aber naturgemäß die Interaktion von Tumor und einem voll kompetenten Immunsystem nicht komplett abbilden [39, 40]. Daher sind auch Modelle in immunkompetenten Ratten beschrieben worden [41-44]. Problematisch war hierbei, daß im Gegensatz zum vorwiegend duktalem Phänotyp des humanen Pankreaskarzinoms [45], die spontan entstandenen oder chemisch induzierten Pankreaskarzinome in Ratten einen typischerweise gut differenzierten, azinären Phänotyp entwickelten, langsam wuchsen und nur selten metastasierten [43, 46]. Neben diesen klinischen Unterschieden fehlten den Ratten-Tumoren auch die charakteristischen molekularen Veränderungen von humanen Karzinomen [47-49].

1.2.4 Fragestellung Rattenmodell

Die Etablierung einer duktal-differenzierten Pankreaskarzinom-Zelllinie in Lewis-Ratten [50] machte es nun möglich, ein orthotopes, immunkompetentes Modell für das duktales Adenokarzinom des Pankreas zu entwickeln. Die hierfür durchgeführte Studie hatte das **Ziel**,

- *verschiedene Tumorinduktionstechniken zu evaluieren (Implantation vs. Injektion), und sowohl das klinische Wachstumsmuster, als auch*

die histopathologischen Phänotypen der resultierenden Rattentumore zu charakterisieren.

- *Wie im Mausmodell sollte darüberhinaus ein Score entwickelt werden, um durch die Quantifizierung von lokaler Tumorinfiltration und Fernmetastasierung ein valides Instrument zur Erfassung von Therapieeffekten in präklinischen Studien zu erhalten.*

1.3 Angiogenesehemmung als neue Therapiestrategie

Der Begriff Angiogenese bezeichnet die Bildung von Blutgefäßen nach der Geburt und steht im Gegensatz zur Vaskulogenese, dem Prozeß der Ausbildung des Blutgefäßsystems während der Embryonalentwicklung [51-53]. Beide Vorgänge sind essentiell für die Entwicklung und den Erhalt eines funktionellen Blutgefäßsystems im gesunden Organismus.

1.3.1 Das Prinzip der Tumorangiogenese

Judah Folkman formulierte 1971 erstmals seine Hypothese zur pathologischen Gefäßbildung in Tumoren, der Tumorangiogenese [51, 52, 54, 55]. Hiernach werden solide Tumoren zunächst in einem avaskulären Stadium passiv durch Diffusion ernährt und können dabei einen maximalen Größendurchmesser von 1 – 2 Millimetern erreichen. Für ein Überschreiten dieser Wachstumsbarriere müssen die Tumornester eine suffiziente Tumorangiogenese induzieren. Ausgehend von reifen Blutgefäßen in der Nachbarschaft kommt es unter Vermittlung von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor; auch als VEGF-A bezeichnet [56-60]) zum Aussprossen neuer Gefäße, die zunächst gerichtet zum Tumor hin wachsen und diesen nachfolgend infiltrieren. Mit dem dadurch hergestellten Anschluß an das normale Gefäßbett des Organismus ist gleichzeitig eine zentrale Voraussetzung für die hämatogene Metastasierung des Primarius gegeben.

Aus diesen Überlegungen ergibt sich theoretisch, daß die wirksame Inhibierung der Tumorangio-genese eine solide Tumormasse wieder in den Bereich eines sich ausschließlich per diffusionem ernährenden Knotens schrumpfen läßt [52, 61, 62]. Dies stellt keinen kurativen Ansatz im üblichen Sinne dar, da über diese indirekte, die Gefäßversorgung betreffende Intervention, nicht alle Tumorzellen komplett beseitigt werden. Auf diese Weise könnte aber eine Kontrolle des onkologischen Prozesses auf niedrigem Niveau, eine Chronifizierung der Tumorerkrankung erreicht werden [63].

Als zentrale Voraussetzung für eine klinisch anwendbare antiangiogene Tumorthapie müssen hinreichend große Unterschiede zwischen neu formierten, unreifen Tumorgefäßen einerseits und den reifen, physiologischen Blutgefäßen des adulten Organismus andererseits bestehen. Die Erkenntnisse der Endothelzellbiologie bestätigen die Existenz solcher Unterschiede [64-66]: so ist der größte Teil der Tumorblutgefäße im Gegensatz zu reifen Gefäßen nicht von perivaskulären Zellen umgeben, was zu einem unphysiologisch aufgebauten Gefäßbett führt. Darüberhinaus besteht die Gefäßwand in Tumoren häufig aus einem Mosaik von Tumor- und Endothelzellen. Weiterhin sind Tumorgefäße in hohem Maße chaotisch organisiert, dilatiert, verlaufen stark gewunden, haben wechselnde Durchmesser und unphysiologische Verzweigungen, enden oft blind und zeichnen sich durch eine erhöhte Permeabilität aus. Dies führt zu einem entsprechend unorganisierten Blutfluß, der oft die Richtung wechselt und zeitweilig sogar ganz zum Stillstand kommt. Die Charakteristika einer pathologischen Angiogenese finden sich bei nahezu allen gastrointestinalen Tumoren [67-69]. Zusätzlich ist von Bedeutung, daß ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Angiogenese im Primärtumor und der Prognose vieler Tumorerkrankungen ermittelt wurde: je höher der Grad der Vaskularisierung, desto kürzer das Überleben [70-72]. Außerdem korrelieren häufig auch die Plasmaspiegel angiogener Faktoren mit der Prognose der Tumorerkrankung [73-76].

Im Gegensatz zu den eigentlichen Tumorzellen sind die Endothelzellen von Tumorblutgefäßen selbst nicht maligne transformiert. Daher sind die

klassischen Mechanismen der Resistenzentwicklung, die Tumorzellen in aller Regel bei längerer konventioneller Behandlung ausbilden, bei antiangiogenen Therapieansätzen nicht zu erwarten [52, 53]. Diese Tatsache ist von zentraler Bedeutung für die generelle Wertigkeit antiangiogener Therapien.

Als ein physiologischerweise entwicklungsbiologischer Prozeß, stellt die Angiogenese im Erwachsenen einen weitgehend herunterregulierten Vorgang dar [52, 53, 77]. Da dies prinzipiell bis auf die wenigen Ausnahmen der Wundheilung [78, 79], der Geweberegeneration und des repetitiven Wiederaufbaus des Endometriums im weiblichen Menstruationszyklus [80, 81] gilt, sollten antiangiogene Therapien theoretisch auch bei längerer Anwendungsdauer nicht zu wesentlichen Nebenwirkungen führen [82, 83].

1.3.2 Fragestellungen zur antiangiogenen Therapie

Das vielschichtige Netzwerk der Tumorangio-genese bietet diverse Angriffspunkte für eine antiangiogene Tumorthherapie [62, 84]. Antiangiogene Substanzen können bei einer Reihe von soliden Tumoren das Tumorstadium und die metastatische Disseminierung reduzieren [85-88]; VEGF-Antagonisten befinden sich bereits im klinischen Einsatz [89-93]. Ein Grund für die Evaluierung von antiangiogenen Ansätzen beim Pankreaskarzinom ist die Tatsache, daß die angiogene Aktivität in Pankreaskarzinom-Gewebe im Vergleich zum normalen Pankreasgewebe signifikant verstärkt ist [94]. Kuehn et al. konnten zeigen, daß die mikrovaskuläre Gefäßdichte sowie die Expression von proangiogenen Faktoren wie VEGF im Pankreaskarzinom signifikant höher war, als im normalen exokrinen Parenchym [95]. Weiterhin korrelierte VEGF im Primärtumor mit lokaler Tumorstadium und dem Überleben von Pankreaskarzinom-Patienten [96-99]. Ein **Hauptziel** der vorliegenden Arbeit war es daher,

- *die therapeutische Potenz von verschiedenen antiangiogenen Therapiestrategien für das dukta-le Adenokarzinom des exokrinen Pankreas präklinisch experimentell zu evaluieren.*

Eine potentiell antiangiogene Substanz ist **Suramin**. Dieses Naphthyl-Harnstoff-Derivat wurde ursprünglich zur Therapie der Trypanosomiasis und Onchocerciasis entwickelt und seit den 1920er Jahren eingesetzt [100]. Später wurden dann anti-neoplastische Effekte von Suramin gefunden [101]. Der exakte Mechanismus der antiangiogenen Aktivität von Suramin ist nicht bekannt, wobei unspezifische Interaktionen von Suramin mit einer Reihe von Wachstums- und proangiogenen Faktoren wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF) sowie VEGF beschrieben worden sind [102-106]. Darüberhinaus interagiert Suramin auch mit zellulären Enzymen wie DNA-Polymerase, Topoisomerase II und Protein-Kinase C. Suramin vermag experimentelles Tumorstadium zu inhibieren [89, 104, 107-109] und wurde bereits in klinischen Studien, beispielsweise in der Therapie des Prostatakarzinoms eingesetzt [110, 111]. Der anti-angiogene Effekt von Suramin konnte experimentell nachgewiesen werden [102, 112, 113]. Zur Untersuchung der unbekannteren Rolle von Suramin in der Therapie des Pankreaskarzinoms wurde in dieser Studie

- *die Zellproliferation sowie die VEGF-Sekretion von humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien unter Suramineinfluss untersucht.*
- *Weiterhin erfolgte die präklinische Evaluierung der therapeutischen und antiangiogenen Potenz von Suramin im orthotopen Nacktmausmodell des duktales humanen Pankreaskarzinoms.*

Inhibitoren der Angiogenese können grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden: Faktor-spezifische Substanzen wurden entwickelt, um proangiogene Regulatoren der Neovaskularisierung wie VEGF zu neutralisieren. Faktor-unspezifische Inhibitoren der Neoangiogenese zielen direkt auf die Endothelzell-Proliferation. **TNP-470** (O-[Chloroacetylcarbonyl]fumagillol) ist ein Derivat von Fumagillin, das von *Aspergillus fumigatus* produziert wird und als einer der ersten Angiogeneseinhibitoren beschrieben wurde [114]. TNP-470 inhibiert die Neoangiogenese sowohl in vitro, als auch in vivo Faktor-unspezifisch [115]. Die Substanz inhibiert Wachstum und Metastasierung

einer Reihe von humanen Karzinomen in präklinischen Studien [116-118]; in dieser Studie wurde

- *der Effekt von TNP-470 auf die Proliferation von humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie die therapeutische Potenz der Substanz im orthotopen Nacktmausmodell untersucht.*

Wie bereits erwähnt stellt VEGF einen der wichtigsten Wachstumsfaktoren für Gefäßendothelien dar. VEGF ist ein hochkonservatives, heparinbindendes Glykoprotein, welches von den meisten Zellarten und insbesondere von Tumorzellen, normalerweise jedoch nicht von Endothelzellen sezerniert wird [56, 59]. Die Transkription von VEGF wird hauptsächlich durch Hypoxie angeregt [56, 59], welche insbesondere in rasch wachsenden Tumoren anzutreffen ist und besonders ausgeprägt in Pankreaskarzinomen nachgewiesen werden konnte [53, 119, 120]. Allerdings wird die VEGF-Transkription bereits unter Normoxie durch zahlreiche Onkogene wie H-ras [121] und einige transmembranäre Tyrosinkinase wie Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und erbB2 hochreguliert [56, 59, 122]. Eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 korreliert ebenfalls mit der VEGF-Expression [56, 59, 123, 124]. Entsprechend der zentralen Rolle, die VEGF in der Tumorangio-genese einnimmt sowie der Tatsache, daß in humanen Pankreaskarzinomen VEGF häufig überexprimiert wird [94, 95, 97, 125] und Pankreaskarzinomzellen in vitro hohe, biologisch signifikante VEGF-Konzentrationen produzieren [126], lag es nahe, verschiedene anti-VEGF Strategien für die Therapie des Pankreaskarzinoms zu evaluieren.

Prinzipiell kann VEGF über zwei Mechanismen die Tumorproliferation fördern: zum einen stimuliert von Tumorzellen gebildeter VEGF parakrin die Migration und Proliferation von Endothelzellen und damit die Tumor-Neoangiogenese. Zum anderen übt VEGF möglicherweise einen direkten, autokrinen Proliferationsreiz auf die Tumorzellen selbst aus. **Ziel** war es daher auch,

- *Mechanismen der VEGF-Wirkung beim Pankreaskarzinom aufzuklären und*

- *die therapeutische Potenz verschiedener gegen VEGF gerichteter Therapieansätze systematisch zu evaluieren.*
- *Eine Option hierbei war der Einsatz eines neutralisierenden **anti-VEGF Antikörpers (A4.6.1)**, dessen Effekte in vitro und in vivo untersucht wurden.*
- *Ein zweiter Ansatz greift bereits einen Schritt früher an: durch ein **VEGF-Antisense Oligonukleotid (AS-3)** wurde die Produktion von VEGF-Protein unterdrückt.*

Eine weitere potentielle Therapiestrategie ergibt sich aus dem Umstand, daß VEGF die Endothelzellproliferation und –migration über die Bindung an zwei verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen [19, 56, 59] an der Zelloberfläche steuert: den VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1, auch als flt-1 bezeichnet) und VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2, auch als KDR/flk-1 bekannt). Die VEGF-Rezeptoren werden hierbei in hoher Dichte nur von proliferierenden Tumorgefäßen exprimiert, wohingegen die reifen Blutgefäße des Organismus nur eine geringe Rezeptordichte aufweisen [127, 128]. Dies wiederum eröffnet die einzigartige Möglichkeit, über die VEGF-Rezeptoren auf selektiv proliferierende Tumorendothelien abzielen. Man hat daher Konstrukte entwickelt, welche sowohl VEGF, als auch Fragmente von Bakterientoxinen enthalten: der VEGF-Anteil soll über die Rezeptoren an die Zielzelle selektiv binden, das Toxinfragment dann selektiv die Proteinsynthese der Zielzelle inhibieren [129-131].

In dieser Studie kam ein Fusionsprotein aus dem Diphtherie-Toxin (DT) und VEGF165, der prädominanten VEGF-Isoform, zum Einsatz [129]. Das DT-Protein besteht aus zwei Untereinheiten: DTA und DTB [132]. Während das DTB-Fragment für die Bindung an die Zelloberfläche sowie die Translokation ins Zytosol verantwortlich zeichnet, bewirkt das DTA-Fragment eine Inhibition der Proteinsynthese von Säugerzellen [133, 134]. Das **DT-VEGF Fusionsprotein** enthält nur ein alleine nicht-bindungsfähiges DT-Fragment und ist daher für humane VEGF-Rezeptor-negative-Zellen unschädlich. Die Bindung an VEGF dirigiert es indes an VEGF-Rezeptor-positive Ziel(Endothel)-Zellen. Die vorliegende Studie untersuchte

- *die Wirkung von DT-VEGF auf Pankreaskarzinom- und Endothelzellen in vitro, sowie therapeutisches Potential und Verträglichkeit im Nacktmausmodell des Pankreaskarzinoms.*

Neben der Wirkung von proangiogenen Mediatoren ist der proteolytische Prozess der Basalmembran-Invasion und Degradation der extrazellulären Matrix nicht nur für den Prozeß der Angiogenese von Bedeutung, sondern auch für das lokale und metastasierende Wachstum des Tumors selbst [135]. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine Familie von mindestens 18 degradierenden Enzymen, sind primär für das Aufbrechen der extrazellulären Matrix und der Basalmembran während der Tumorprogression verantwortlich [135-137]. Eine Reihe von präklinischen Studien konnte eine therapeutische Potenz von synthetischen MMP-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom zeigen, allerdings war eine Tumoreradikation selbst bei prophylaktischer Substanzgabe nicht möglich [138-140]. Die komplexe und multifaktorielle Regulation der Progression des Pankreaskarzinoms impliziert, daß Kombinationstherapien möglicherweise effektiver als monotherapeutische Ansätze sind. In der vorliegenden Arbeit wurde daher

- *das therapeutische Potential einer **Kombinationstherapie** aus VEGF-Blockade und MMP-Inhibition im Tiermodell evaluiert.*