

4 Diskussion

4.1 Nacktmausmodell

4.1.1 Ektoper vs. orthotoper Ansatz

Die Mehrzahl der in vivo Untersuchungen von humanen Karzinomen wird in subkutanen Nacktmausmodellen durchgeführt. Diese Modelle sind von eingeschränktem klinischem Wert, da subkutan injizierte humane Tumorzellen nur selten in die parenchymatösen Organe metastasieren [21, 22, 155]. Die vorliegende Studie bestätigte diese Erfahrung für humane Pankreaskarzinom Xenografts: die subkutanen Tumoren in Donortieren metastasierten nie und ähnelten in ihrem Phänotyp eher verkapselten benignen Tumoren, als infiltrativ wachsenden Karzinomen, selbst wenn sie von wenig- oder undifferenzierten aggressiven Zelllinien abgeleitet waren [156]. Die orthotope Tumorinduktion wird daher als geeigneter betrachtet, die klinische Realität wiederzuspiegeln, da sie den gesamten Prozeß von Primärtumorwachstum, lokaler Tumordinfiltration und schließlich Fernmetastasierung rekapituliert [24, 26-29]. Diese Arbeit etablierte folglich ein orthotopes Nacktmausmodell mit vier unterschiedlich differenzierten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien [156].

4.1.2 Orthotope Induktionstechnik

Eine Reihe von orthotopen Ansätzen sind für das experimentelle Pankreaskarzinom bereits beschrieben worden. Kleine Tumorfragmente von subkutanen Tiertumoren oder Resektaten von Patienten wurden an das Pankreas genäht, oder das Pankreas wurde um die Transplantate geschlagen, um deren Bedeckung mit nativem Gewebe zu gewährleisten [33-36]. Wir implantierten zwei kleine Tumorfragmente in den Schwanz des Pankreas ohne Fixierung durch Nähte. Stattdessen erfolgte die Platzierung der Tumorimplantate in Parenchymtaschen, welche zuvor atraumatisch mit einer Mikroschere präpariert worden waren. Diese Technik ermöglichte die

komplette Umhüllung der Tumorimplantate durch Pankreasparenchym, ohne daß dadurch die anatomische Konfiguration des Organs alteriert worden wäre. Entscheidend war hierbei, daß zum einen keine Dislokation der Tumorfragmente von den Implantationsstellen auftrat und die Tumorangehensrate für alle vier benutzten Zelllinien 100 % betrug.

Eine Grundvoraussetzung zur Erzielung dieser optimalen orthotopen Tumorangehensrate war die sorgfältige Auswahl der Tumorimplantate aus den subkutanen Donortumoren. Das Wachstum der subkutanen Donortumoren sollte in diesem Zusammenhang auf einen maximalen größten Durchmesser von 1 cm und eine Dauer von 4 Wochen beschränkt bleiben. Größere und ältere Tumoren neigen dazu, vor allem im Tumorzentrum nekrotische Areale zu entwickeln [157]. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlicher, vitale Tumorimplantate aus der Peripherie von 3 bis 4 Wochen alten subkutanen Donortumoren zu gewinnen.

Die initial durchgeführte Implantation von Tumorfragmenten in den Pankreaskopf wurde aufgegeben, obwohl sich die Mehrzahl der humanen Karzinome in diesem Teil der Drüse entwickeln. Im Mausmodell zeigte sich allerdings, daß im Pankreaskopf induzierte Tumoren frühzeitig lokale Komplikationen wie Duodenalobstruktion und Choledochusverschluß auslösen, bevor sich eine metastatische Tumorkrankheit entwickeln konnte (Abb. 3, Seite 37). Da die Entwicklung eines Modells mit Metastasierung geplant war, wurden die Karzinome in der Folgezeit im Pankreasschwanz induziert, was die lokalen Komplikationen der Tumorkrankheit verzögerte, aber eine Ausbildung von Metastasen ermöglichte (Tabelle 4, Seite 43).

4.1.3 Tumorzell-Injektion vs. Tumorfragment-Implantation

Die direkte Injektion von Tumorzellen in das Pankreas wurde als Alternative zur Implantation von Tumorfragmenten beschrieben, um orthotope Tumoren zu generieren [30-32]. Allerdings ist in diesen Modellen die Tumorangehensrate nicht immer vollständig; weiterhin suggeriert das fast simultane Auftreten von metastatischer Tumorausbreitung die Möglichkeit eines

Zellverlustes in die Abdominalhöhle während der Injektionsprozedur, mit anschließender artifizieller Pseudo-Metastasierung, selbst wenn die Injektionsstelle mit Fibrinkleber versiegelt wurde [100]. Um diese Frage definitiv zu klären, evaluierte die Studie die Implantationstechnik versus die direkte Tumorzellinjektion.

Im Gegensatz zur Implantation von intakten Tumorfragmenten resultierte die Injektion von Karzinomzellen nicht immer in der Entwicklung eines orthotopen Tumorwachstums. Am auffälligsten war dies bei besser differenzierten Capan-1 Zellen, wo sich trotz einer technisch erfolgreichen Injektion nur in einem Drittel der Tiere ein Primärtumorwachstum ausbildete. Ungeachtet dessen entwickelten aber 6 von 8 Tieren *ohne* Primärtumor zumindest kleine metastatische Läsionen in der Bauchhöhle, was wiederum auf einen signifikanten Zellverlust während der Injektionsprozedur schließen läßt (Tabelle 4, Seite 43).

Die Entwicklung von Tumorknötchen in der Nahtreihe der vormaligen Medianlaparotomie erwies sich als weiterer indikativer Parameter für intraabdominellen Zellverlust bei der Injektion von Tumorzellen, da die heilende Wunde eine bevorzugtes Implantationsbett für Tumorzellen darstellt [158-162]. Nacktmäuse mit durch Injektion induzierten Tumoren entwickelten in der Nahtreihe signifikant häufiger Metastasen, als Tiere, bei denen Tumorfragmente implantiert wurden; weiterhin traten diese Metastasen nach Injektion in der Regel früher auf und wuchsen dementsprechend zu größeren Volumina heran (Tabelle 5, Seite 47). Schließlich trat in den Tieren der Injektionsgruppe neben Nahtreihenmetastasen auch die intraabdominelle Aussaat früher und simultan mit dem orthotopen Primärtumorwachstum auf. Dies resultierte wiederum in kürzeren Überlebenszeiten für injizierte Tiere im Vergleich zu implantierten Mäusen.

Die vorliegende Arbeit analysierte somit zum ersten Mal die genannten Tumorinduktionstechniken in der Nacktmaus im direkten Vergleich: die Vermeidung einer artefiziellen Metastasierung durch Tumorzellverlust während der Induktionsprozedur gelingt nach den vorliegenden Daten besser mit der Implantationstechnik, als nach direkter orthotoper Tumorzellinduktion.

4.1.4 Disseminierungsscore

Orthotope Modelle sollten bessere Werkzeuge für die Untersuchung der Pathophysiologie von humanen Karzinomen und für die präklinische Evaluierung von neuen Therapien darstellen [27, 29]. Dies erfordert die qualitative und quantitative Erfassung nicht nur des Primärtumorwachstums, sondern auch von lokaler und systemischer Tumorausbreitung. Wir entwickelten hierfür einen Disseminierungsscore, der sowohl lokale Tumordinfiltration, als auch Fernmetastasierung erfasst. Eine sorgfältige und systematische makroskopische Evaluierung bei der Autopsie ist die Voraussetzung dafür, verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten; idealerweise wird sie durch eine histopathologische Analyse ergänzt. Unter Beachtung dieser Richtlinien war es möglich, signifikante Unterschiede zwischen den vier untersuchten Zelllinien zu quantifizieren, die deren unterschiedliche Aggressivität in vivo reflektieren. So erreichten beispielsweise schlecht differenzierte AsPC-1 Tumoren signifikant höhere Werte, als moderat differenzierte HPAF-2 Karzinome (Abb. 5, Seite 39). Dieses erstmalig beschriebene Scoring-System bietet ein wertvolles Werkzeug, um die Effekte von neuen Therapiestrategien für das Pankreaskarzinom besser und detaillierter zu erfassen.

4.1.5 In vivo Phänotyp der untersuchten Zelllinien

Durch die Untersuchung von vier unterschiedlichen humanen Zelllinien war es möglich, eine breite Palette von charakteristischen klinischen und histopathologischen Merkmalen des Pankreaskarzinoms experimentell abzubilden.

MIAPaCa-2 produzierte als undifferenzierte Zelllinie extensives lokales Tumorwachstum und Infiltration von benachbarten anatomischen Strukturen, inklusive eines Befalls von retroperitonealen Lymphknoten. Retroperitoneales Tumorwachstum fand sich auch in der Nachbarschaft von Nerven; eine perineurale Invasion, wie sie sich beim Menschen häufig findet [163, 164], wurde allerdings nicht beobachtet. Metastasen traten vorwiegend in der Abdominalhöhle auf, gelegentlich aber auch in Lunge und mediastinalen Lymphknoten. Alle Tiere entwickelten eine klinisch apparente Tumorkrankheit,

meist mit großen Tumormassen und extensiver Aszitesproduktion (Tabelle 4, Seite 43). Das beschriebene ausgedehnte Wachstum von MIAPaCa-2 Tumoren in Nacktmäusen deckt sich mit den bislang berichteten Erfahrungen mit diesen undifferenzierten humanen Pankreaskarzinom-Zellen [20, 165, 166].

AsPC-1 Zellen, schlecht differenziert, wuchsen zu kleineren Primärtumoren aus, zeigten aber den aggressivsten Phänotyp bezüglich der Tumor-Disseminierung (Abb. 9, Seite 46). Extensive Metastasierung verursachte den Tod des Großteils der Versuchstiere während der Beobachtungsperiode (Abb. 6, Seite 42).

Die von den mittelgradig differenzierten HPAF-2 Zellen hergeleiteten Tumoren waren durch große, partiell zystische Raumforderungen charakterisiert (Abb. 8, Seite 45). Die Mortalität in dieser Gruppe war durch die lokale Tumorlast bedingt, die Metastasierung war vergleichsweise geringer als bei den weniger differenzierten Tumoren ausgeprägt (Tabelle 4, Seite 43).

Die besser differenzierten Capan-1 Zellen generierten infiltratives, aber limitiertes Tumorwachstum in Pankreas und benachbartem Gewebe. Der klinische Verlauf war für diese Tiere relativ mild; tumorbedingte Mortalität trat während der Beobachtungsphase nicht auf (Abb. 6, Seite 42). Das wenig aggressive Wachstum von Capan-1 Tumoren in der Nacktmaus schränkt den Wert dieser Zelllinie für den Einsatz in Therapiestudien ein.

4.2 Rattenmodell

4.2.1 Immunkompetente Tiermodelle

Der Wert der in der Literatur beschriebenen [30-36] und selbst evaluierten [156] Pankreaskarzinom-Modelle in immundefizienten Mäusen ist unbestritten. Diese Modelle können allerdings nicht die Auseinandersetzung eines immunkompetenten Organismus mit dem Tumor vollständig reflektieren; beispielsweise fehlt häufig die für die klinische Erkrankung so charakteristische inflammatorische und desmoplastische Reaktion in der

Tumorumgebung [37, 38]. Aus diesem Grund sind Modelle in voll immunkompetenten Tieren von Interesse.

Das gut beschriebene Pankreaskarzinom-Modell im syrischen Goldhamster [167-172] zeigt viele klinische, morphologische und molekulare Aspekte der humanen Erkrankung [173-177]. Der Mangel an immunologischen und molekularen Forschungstools für Hamster hat seinen praktischen Nutzen jedoch stark eingeschränkt. Der Einsatz der Spezies Ratte war bislang dadurch limitiert, daß sowohl spontan auftretende, als auch chemisch induzierte Pankreaskarzinome der Ratte durch einen azinären und gut differenzierten, langsam wachsenden sowie selten metastasierenden Phänotyp gekennzeichnet waren [43, 44, 46]. Darüberhinaus fehlten viele der molekularen Charakteristika von humanen Tumoren [47-49, 178]. Pettengill und Mitarbeiter beschrieben 1993 erstmalig eine duktale, transplantierbare Ratten-Pankreaskarzinom-Zelllinie, welche sich in einer Azaserin-behandelten Lewis-Ratte entwickelt hatte [50]. Diese DSL-6A/C1 Zellen bildeten nach subkutaner Injektion in Lewis-Ratten duktale Strukturen, umgeben von dichtem fibrösen Gewebe. Immunhistochemisch bestätigte sich ein Verlust von azinären Zellmarkern, während duktale Zellmarker wie Zytokeratine während Kultur und Regrafting auftraten. Da sich der duktale Phänotyp sowohl in vitro, als auch in vivo als stabil erwies, eröffneten diese Zellen die Möglichkeit zur Entwicklung eines neuen, immunkompetenten und orthotopen Modells des duktales Pankreasadenokarzinoms [179].

4.2.2 Tumorinduktion durch Injektion

Wie im Mausmodell wurden auch bei dieser Studie verschiedene Tumorinduktionstechniken evaluiert. Nach subkutaner Injektion bildeten sich aus DSL-6A Zellen nur isolierte Tumorknoten, die nicht metastasierten und in den Versuchstieren keine systemische klinische Tumorkrankheit auslösten.

Die orthotope Induktion von Pankreaskarzinomen in Ratten durch Injektion von DSL-6A Zellen war bereits von Mäkinen et al. beschrieben worden [100]. Die Autoren berichteten, daß die direkte Injektion von Zellen in das Pankreas in einer inkompletten Angehensrate resultierte; wenn Tumoren angingen, so

bildeten sich nur kleine Volumina aus. Allerdings trat nahezu simultan eine oberflächliche Tumoraussaat auf dem Peritoneum und intraabdominellen Organen auf, was eher auf Zellverschleppung während der Injektionsprozedur, als auf wirkliche Metastasierung ausgehend vom Primarius hinweist.

Die Erfahrungen der vorliegenden Studie waren ähnlich: trotz einer sorgfältigen Injektionsprozedur mit Benutzung von Matrigel [107, 108, 180, 181], einer Tumorwachstum-fördernden Mixtur extrazellulärer Matrixkomponenten zur Suspension der Tumorzellen in einem kleinen Lumen (50 µl), war die Angehensrate in der Injektionsgruppe nur 50 %. Darüberhinaus waren die induzierten Tumore relativ klein und auf das Pankreas beschränkt (Abb. 10/11, Seite 50). Die metastatische Aussaat war auf intraperitoneale Loci limitiert und trat simultan mit dem Primärtumorwachstum auf. Dies wurde durch die vergleichbare Größe von Primärtumoren und „metastatischen“ Tumorknoten in der Nahtreihe der Operationswunde dokumentiert, welche ein ideales Implantationsbett für versprengte Tumorzellen darstellt (vergl. Abb. 10, Seite 50 mit Abb. 15A, Seite 53). Außerhalb der Peritonealhöhle fand sich kein malignes Gewebe (Tabelle 6, Seite 51). 11 von 12 Ratten zeigten klinisch keine Tumorkrankheit während der 16-wöchigen Beobachtungsphase; das eine Tier, welches in der letzten Woche euthanasiert werden musste, hatte eine disseminierte peritoneale Karzinomatose entwickelt, am wahrscheinlichsten durch einen signifikanten Zellverlust bei der initialen Tumorzell-Injektion ausgelöst.

4.2.3 Tumorinduktion durch Implantation

Um die offensichtlichen Nachteile der Injektionstechnik zu vermeiden, wurden analog dem Nacktmausmodell kleine Fragmente von subkutanen Donortumoren orthotop in den Pankreasschwanz von Empfängerratten implantiert. Diese Fragmente sind klein genug (1 mm), um bis zur Ausbildung einer Neovaskularisierung per diffusionem zu überleben [52, 53]. Die angewendete mikrochirurgische Technik erlaubt die atraumatische Präparation eines Implantationsbettes im Pankreas, in welchem das

Tumorfragment komplett von Parenchym umgeben ist. Nähte oder Gewebekleber waren wie schon im Mausmodell nicht erforderlich, um die Implantate zu fixieren; eine Dislokation von implantierten Fragmenten in die Abdominalhöhle trat nicht auf.

Nach Implantation von 3 Fragmenten (IPL-3) resultierte eine Angehensrate von 75 %. Allerdings überlebten alle Tiere die 16-wöchige Beobachtungsphase ohne klinische Tumorkrankheit (Abb. 12, Seite 51). Die ausgebildeten Primärtumoren waren klein, Metastasierung ein seltenes Ereignis (Abb. 10/11, Seite 50; Tabelle 6, Seite 51). Im Gegensatz zur Injektionsgruppe trat jedoch die frühe Ausbildung von Tumorknoten in der Nahtreihe als Indikator einer Zellverschleppung während der Tumorinduktion in der IPL-3 Gruppe nicht auf.

Tumorangehensrate, lokales Tumorstadium, Metastasierung und klinische Ausprägung der Tumorkrankheit änderten sich drastisch nach Implantation von fünf Donortumorfragmenten in das Pankreas (IPL-5). Alle Ratten entwickelten nun orthotope Tumore, Metastasen und eine klinisch sichtbare Tumorkrankheit (Abb. 10/11, Seite 50; Tabelle 6, Seite 51). Die Hälfte der Tiere starb, oder mußte im letzten Drittel der Beobachtungsperiode euthanasiert werden (Abb. 12, Seite 51). Das Durchschnittsvolumen der Primärtumore war mehr als zehnmals so groß, als in der Injektions- und IPL-3 Gruppe (Abb. 10, Seite 50). Die lokale Infiltration in die Nachbarschaft war nun aggressiv und schloß wie in der humanen Erkrankung das Retroperitoneum mit ein. Extensive metastatische Aussaat trat nicht nur in der Peritonealhöhle, sondern auch in Lunge und den oberen mediastinalen Lymphknoten auf (Abb. 14, Seite 52). Diese klinisch offensichtlichen Unterschiede in der Tumordisseminierung zwischen der IPL-5 und den beiden anderen Gruppen wurde durch signifikant unterschiedliche Disseminierungsscores reflektiert (Abb. 11, Seite 50), was wiederum die Durchführbarkeit und Verlässlichkeit des Scoring-Systems demonstrierte.

Die ausgeprägten Unterschiede in der resultierenden Tumorentwicklung zwischen den IPL-3 und IPL-5 Gruppen scheinen anzuzeigen, daß initial eine

bestimmte Schwelle von lokaler Tumorlast bei der Induktion überschritten werden muß, um in diesem immunkompetenten Rattenmodell ein klinisch signifikantes lokales und systemisches Tumorwachstum zu ermöglichen. Histologisch zeigten die induzierten Pankreaskarzinome einen gut bis mittelgradig differenzierten Phänotyp mit dichtem fibrotischem Gewebe um die Tumorzellen (Abb. 14B, Seite 52), und entsprachen somit der Mehrzahl der humanen Karzinome.

4.3 Therapiestudie mit Suramin

Das initial gegen die Schlafkrankheit entwickelte Suramin [182] zeigte sein Potential als anti-Tumor Medikament zum ersten Mal in der Behandlung von Patienten mit HIV-assoziierten Lymphomen und Kaposi-Sarkomen [101]. Dies eröffnete die Möglichkeit zum Einsatz von Suramin bei soliden Tumoren. Suramin zeigte in klinischen Studien Aktivität in hormon-refraktären Prostatakarzinomen [110, 111] und Nebennierenrinden-Karzinomen [101]. Das Naphthyl-Harnstoff-Derivat inhibiert Tumorwachstum durch die Interaktion mit verschiedenen intrazellulären Zielmolekülen wie Wachstumsfaktoren, Enzymen der Signaltransduktion und DNA-Replikation sowie Polyaminen, welche für Zellwachstum und Differenzierung erforderlich sind [103-105, 183]. Die Fähigkeit von Suramin, in vitro Proliferation zu reduzieren, wurde unter anderem an Magenkarzinom- [184] und Ösophaguskarzinom-Zellen [185] sowie beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gezeigt [186]. Diese Studie evaluierte Suramin erstmals präklinisch im Nacktmausmodell für die Therapie des Pankreaskarzinoms.

4.3.1 In vitro Effekte auf Pankreaskarzinom-Zellen

In allen getesteten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien vermochte Suramin die Proliferation dosisabhängig zu reduzieren, während Zellviabilität nur in hohen Dosen beeinflusst wurde (Tabelle 7, Seite 57). Dies deutet darauf hin, daß Suramin eher zytostatisch, als zytotoxisch auf die Karzinomzellen wirkt. Die durchgeführte Analyse des Zellzyklus stützt diese Hypothese: DNA-

Färbung mit Propidiumjodid zeigte eine Umverteilung der Zellzyklusphasen durch Suraminbehandlung. Unter Suramineinfluß akkumulierten MIAPaCa-2, Capan-2 sowie AsPC-1 Zellen in der G0/G1-Phase, während die Zellzahl in der S-Phase reduziert war (Tabelle 8, Seite 57). Andere Autoren berichten über ähnliche Effekte von Suramin auf den Zellzyklus in Prostatakarzinom-, Gliom- und Magenkarzinom-Zellen [109, 183, 184]. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie Capan-1, wo der Anteil der S-Phase zu Lasten von G0/G1 erhöht war (Tabelle 8, Seite 57). Die über eine Färbung mit Annexin V analysierte Apoptose der Pankreaskarzinom-Zellen ergab keine signifikante Beeinflussung durch Suramin. Der antiproliferative Effekt von Suramin auf Pankreaskarzinom-Zellen scheint zumindest teilweise über eine Alteration des Zellzyklus vermittelt zu werden. Bezüglich einer möglichen antiangiogenen Wirkung von Suramin [106, 113] konnten wir zeigen, daß die Substanz in vitro die VEGF-Sekretion von undifferenzierten (MIAPaCa-2) und gut differenzierten (Capan-1) Pankreaskarzinom-Zellen dosisabhängig signifikant reduziert (Abb. 17A, Seite 58).

4.3.2 In vivo Effekte von Suramin

Niedrige Konzentrationen von Suramin (10 mg/kg) beeinflussten Primärtumorwachstum, Metastasierung sowie Angiogenese von undifferenzierten MIAPaCa-2 Tumoren im Nacktmausmodell nicht (Abb. 19, Seite 59). Eine hohe Suramindosis (60 mg/kg, [187]) verminderte die Volumina von MIAPaCa-2, schlecht differenzierten AsPC-1 und gut differenzierten Capan-1 Tumoren signifikant (Abb. 19A, Seite 59). Während der Disseminierungsscore in der MIAPaCa-2 Gruppe ebenfalls signifikant zurückging, waren die Unterschiede in AsPC-1 und Capan-1 Tieren nur tendenziell (Abb. 19B, Seite 59).

Suramin vermochte in der hohen Dosierung die mikrovaskuläre Gefäßdichte in allen drei untersuchten Tumorentitäten zu reduzieren (Abb. 19C, Seite 59). Dieser antiangiogene Effekt war allerdings im Vergleich zum mehr spezifischen Angiogenesehemmer TNP-470 (siehe Abschnitt 4.4, Seite 96) schwächer ausgeprägt. Wie in vitro gezeigt werden konnte, ist der

antiangiogene Suramin-Effekt möglicherweise durch eine verminderte VEGF-Sekretion der behandelten Tumorzellen bedingt. Als weiterer Wirkmechanismus wurde bereits beschrieben, daß Suramin über eine Bindung an den VEGF-Rezeptor 2 als funktioneller VEGF-Antagonist wirken kann [106]. Für die Wirkung von Suramin über das VEGF-System spricht auch die Tatsache, daß behandelte Tiere zum einen weniger Aszites entwickelten, zum anderen die VEGF-Spiegel im Aszites deutlich reduziert waren (MIAPaCa-2 Gruppe: - 35 %, Capan-1 Gruppe: - 45 %; Abb. 17B, Seite 58): Permeabilität und damit auch Aszitesbildung wird direkt von VEGF beeinflusst [188-190].

Während toxische Nebenwirkungen wie die Entwicklung einer Polyneuropathie den klinischen Einsatz von Suramin erschweren [191-194], traten in dieser Studie keine offensichtlichen Nebenwirkungen von Suramin auf: Nahrungsaufnahme, Aktivität und Tiergewichte (3.3.4, Seite 56) zeigten als Surrogatmarker für etwaige Nebenwirkungen keine signifikanten Unterschiede, weder während der Beobachtungsphase, noch bei der Autopsie am Versuchsende.

4.4 Therapiestudie mit TNP-470

Das Fumagillin-Analogon TNP-470 wurde als Angiogenese-Inhibitor zuerst 1990 beschrieben [114] und ist seither intensiv in einer Reihe von Tumoren untersucht worden [116-118, 195, 196]. Der Wirkmechanismus von TNP-470 ist nur teilweise bekannt [115]; es scheint jedoch die Proliferation von Endothel-Zellen direkt über den Cyclin D1-Mechanismus der Zellzyklusregulation zu inhibieren [197]. Weiterhin reguliert TNP-470 mit E-Selectin ein Membran-gebundenes Protein hoch, das an der Inhibierung metastatischer Aktivität beteiligt ist [198]. Generell geht man davon aus, daß TNP-470 nicht direkt mit VEGF interagiert, obwohl von einer Gruppe die Inhibierung der VEGF-Sekretion von Uterus-Sarkomzellen *in vitro* beschrieben wurde [199]. Diese Studie untersuchte die Wirkung von TNP-470

auf humane Pankreaskarzinome in vitro und im orthotopen Nacktmausmodell [200].

4.4.1 In vitro Effekte auf Pankreaskarzinom- und Endothel-Zellen

In niedrigen, physiologischen Konzentrationen inhibierte TNP-470 die Proliferation von humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC), was mit früheren Untersuchungen [201] übereinstimmt. Die untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zellen wurden durch physiologische TNP-470 Konzentrationen in ihrer Proliferation nicht beeinflusst (Abb. 20, Seite 62). Die Wachstumsinhibierung der Karzinomzellen bei hohen TNP-Dosierungen ist möglicherweise das Resultat eines unspezifischen toxischen Effekts der Substanz.

4.4.2 In vivo Wirkung von TNP-470

Im Gegensatz zur fehlenden in vitro Wirkung von physiologisch dosiertem TNP-470 auf Pankreaskarzinom-Zellen, zeigte sich in vivo eine deutliche Reduktion von lokalem Tumorwachstum und metastatischer Tumorprogression. Die Volumina von undifferenzierten MIAPaCa-2, schlecht differenzierten AsPC-1 und gut differenzierten Capan-1 Tumoren waren in den behandelten Gruppen signifikant niedriger, als bei Kontrolltieren (Abb. 21, Seite 62). Die Disseminierungsscores waren ebenfalls signifikant auf etwa die Hälfte des Kontrollniveaus erniedrigt (Abb. 22, Seite 62).

Die immunhistochemische Bestimmung der mikrovaskulären Gefäßdichte mit anti-CD31 Antikörpern ergab zunächst eine vier bis sechsmal höhere Gefäßdichte in unbehandelten Kontrolltumoren im Vergleich zu nativem Pankreasgewebe. Die Behandlung mit TNP-470 reduzierte die mikrovaskuläre Gefäßdichte in Primärtumoren um etwa ein Drittel im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 25, Seite 64). Dieser Effekt auf die mikrovaskuläre Gefäßdichte scheint unabhängig von der VEGF-Aktivität zu sein, da sowohl Plasma-, als auch Aszites-Spiegel von VEGF in Kontroll- und Behandlungsgruppen vergleichbar waren (Abb. 24, Seite 63). Die genannten Ergebnisse deuten auf einen antiangiogenen Mechanismus von TNP-470 in dieser Studie hin, nicht auf eine direkte Beeinflussung der Karzinomzellen.

Obwohl sich in den MIAPaCa-2 und AsPC-1 Gruppen ein Trend in Richtung Überlebensverbesserung zeigt, waren die Unterschiede in den relativ kleinen Testgruppen (n = 10) nicht signifikant different. Das 14-Wochen-Überleben verbesserte sich in der MIAPaCa-2 Gruppe von 20 auf 50 %, in der AsPC-1 Kohorte von 10 auf 40 %. Keines der Tiere in den Capan-1 Gruppen starb an ihrem gut differenzierten und langsamwachsenden Tumor (Abb. 23, Seite 63).

Andere Untersucher haben den Effekt von TNP-470 auf das experimentelle Pankreaskarzinom ebenfalls untersucht. In einem Lebermetastasenmodell in SCID-Mäusen konnte nach intrasplenischer Injektion von Pankreaskarzinom-Zellen durch TNP-470-Therapie einer Verminderung der hepatischen Filialisierung erreicht werden [202]. Übereinstimmend mit unseren Daten wurde auch hier als Wirkmechanismus eine Inhibierung der Endothel- und nicht der Karzinomzellen beschrieben. Eine andere Gruppe vermochte durch Kombination von TNP-470 mit Cisplatin die Bildung von Lebermetastasen zu verhindern, was durch TNP-Monotherapie nicht gelang [127].

4.5 Therapiestudie mit dem Anti-VEGF-Antikörper A4.6.1

4.5.1 VEGF-Rezeptorexpression und in vitro Effekte von A4.6.1

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Pankreaskarzinome VEGF überexprimieren und humane Pankreaskarzinom-Zellen VEGF in biologisch relevanten Konzentrationen produzieren [94, 95, 126]. Die vorliegende Studie untersuchte, ob VEGF neben der parakrinen Förderung der Tumor-Neoangiogenese einen direkten, autokrinen Proliferationsreiz auf Pankreaskarzinom-Zellen ausübt. Dies scheint nicht der Fall zu sein, da sich die Proliferation der Tumorzellen in-vitro weder mit VEGF stimulieren, noch durch VEGF-Blockade inhibieren ließ [203]. Hingegen vermochte der anti-VEGF Antikörper die Proliferation von humanen Endothelzellen dosisabhängig zu vermindern (Abb. 27, Seite 66). Erklären läßt sich dieses Ergebnis durch die in den Tumorzellen im Gegensatz zu Endothelzellen

fehlende mRNA Expression für den VEGF-Rezeptor 2 (Abb. 26, Seite 66), der die proliferationsstimulierende Wirkung von VEGF vermittelt [204-206]. Die Rolle des VEGF-Rezeptors 1, der von einigen Tumor-Zelllinien exprimiert wird (Abb. 26, Seite 66) und in Endothelzellen Zellmigration vermittelt, ist noch unklar und bedarf weiterer Untersuchung [205].

4.5.2 In vivo Wirkung von A4.6.1

Therapeutische VEGF-Blockade mit dem neutralisierenden Antikörper A4.6.1 verlangsamte die lokale und systemische Tumorprogression in-vivo [207]. Der Effekt auf Primärtumorwachstum (Abb. 28, Seite 67) und Tumordisseminierung (Abb. 29, Seite 67) war am deutlichsten in jenen Tumoren ausgeprägt, welche sich immunhistochemisch stark und disseminiert positiv für VEGF darstellten: mittelgradig differenzierte HPAF-2 Karzinome (Abb. 32, Seite 69). Möglicherweise ist die therapeutische VEGF-Blockade eine nützliche adjuvante Therapieoption für VEGF-positive Pankreaskarzinome. Die gefundenen in-vivo Ergebnisse demonstrieren jedoch, daß die antiangiogene Monotherapie mit A4.6.1 in einem klinisch relevanten, orthotopen Nacktmausmodell des Pankreaskarzinoms keine Tumoreradikation erreichen kann.

4.6 Therapiestudie mit dem VEGF-Antisense Molekül AS-3

In der vorangegangenen Studie wurde das Prinzip der Neutralisierung von VEGF-Protein durch einen Antikörper verfolgt. Im zweiten anti-VEGF-Therapieansatz suchten wir die Produktion von VEGF-Protein selbst durch Applikation eines die VEGF mRNA inhibierenden Antisensemoleküls (AS-3) zu unterbinden [57].

4.6.1 In vitro Effekte von AS-3

In vitro wurde zunächst festgestellt, daß die untersuchten humanen Pankreaskarzinom-Zellen (schlecht differenzierte AsPC-1, mittelgradig differenzierte HPAF-2) VEGF-Protein in hohen, biologisch relevanten

Konzentrationen produzieren (3.6.1, Seite 69). Die gefundenen Werte waren vergleichbar mit jenen, die für Zellen mit hoher VEGF-Produktion, wie Kaposi-Sarkom-Zellen, beschrieben worden sind [57]; im Gegensatz hierzu sezernieren normale humane Pankreasgang-Epithelien (HPDE) nur niedrige VEGF-Spiegel [208]. Der VEGF-Spiegel im Zellkulturmedium war für mittelgradig differenzierte HPAF-2 Zellen signifikant höher als für schlecht differenzierte AsPC-1 (3.6.1, Seite 69). Die VEGF-Sekretion von Pankreas-Karzinomzellen korreliert möglicherweise mit dem Differenzierungsgrad. Diese Ergebnisse passen zu der Beobachtung einer im Vergleich zu AsPC-1 Tumoren stärkeren immunhistochemischen Färbung für VEGF in Schnitten von HPAF-2 Karzinomen (Abb. 32, Seite 69).

Die potente Inhibierung von VEGF mRNA und nachfolgender VEGF-Protein Produktion durch AS-3 wurde in vitro und in vivo beim Kaposi-Sarkom demonstriert, welches als gut vaskularisierter Tumor ein Modellsystem für die Untersuchung von VEGF-Effekten auf Tumorwachstum darstellt [57]. Die Spezifität der Oligonukleotid-Wirkung beim Pankreaskarzinom wurde im Western-Blot dadurch gezeigt, daß die VEGF-Proteinexpression in HPAF-2 and AsPC-1 Zellen nur durch AS-3, nicht jedoch durch ein Kontroll-Oligonukleotid unterdrückt werden konnte (Abb. 33, Seite 71).

4.6.2 In vivo Wirkung von AS-3

Zum ersten Mal konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, daß die Ausbildung von Pankreaskarzinomen im Nacktmausmodell mit erhöhten VEGF-Plasmaspiegeln einhergeht. Wie schon in vitro im Zellkulturüberstand (3.6.1, Seite 69) und immunhistochemisch in Tumorschnitten (Abb. 32, Seite 69), waren die Plasmaspiegel in Mäusen mit mittelgradig differenzierten HPAF-2 Tumoren signifikant höher, als in Tieren mit undifferenzierten AsPC-1 Karzinomen (3.6.6, Seite 70).

Die tägliche Applikation des VEGF-Antisense Oligonukleotids AS-3 resultierte in signifikanten biologischen in vivo Effekten auf das Pankreaskarzinom-Wachstum. Schlecht differenzierte AsPC-1 Tumoren führten mit ihrem

aggressiven Wachstumsmuster bei 7 von 8 Kontrolltieren zum Tod während der Beobachtungsphase. AS-3 Behandlung verbesserte das Überleben: nur 2 von 8 Tieren mußten vor dem Ende der Beobachtungsphase euthanasiert werden (Abb. 36A, Seite 73). Dieser positive Effekt auf das Überleben wurde vor allem durch eine Reduktion von lokaler Infiltration und Fernmetastasierung erreicht, die üblicherweise in Kontrolltieren zum Tod führen (Abb. 35A, Seite 72). Das Primärtumorwachstum in der AsPC-1 Therapiegruppe war nur moderat reduziert (Abb. 34A, Seite 72), was möglicherweise der längeren Lebensdauer im Vergleich zu den Kontrollen zu schulden ist, die ein zwar reduziertes, aber verlängertes Tumorwachstum erlaubt.

Die AS-3 Behandlung reduzierte in den weniger aggressiven HPAF-2 Tumoren sowohl das Primärtumorvolumen (Abb. 34B, Seite 72), als auch die Tumordisseminierung (Abb. 35B, Seite 72) signifikant. Während die Hälfte der HPAF-Kontrolltiere vorzeitig euthanasiert werden mußten, überlebten 7 von 8 Therapietieren für die volle Beobachtungszeit von 14 Wochen (Abb. 36B, Seite 73). In beiden untersuchten Tumorentitäten reduzierte die AS-3 Behandlung die VEGF Plasmaspiegel auf das Hintergrundniveau, welches in gesunden Mäusen gefunden wird (3.6.6, Seite 70). Keine der mit AS-3 therapierten Mäuse zeigte klinische Evidenz für toxische Nebenwirkungen, was Futteraufnahme, Aktivität und Körpergewicht angeht.

Neben seinen Effekten auf Endothelzell-Proliferation und -Migration trägt VEGF auch durch seine Induktion einer erhöhten vaskulären Permeabilität zur Progression von Neoplasien bei, daher auch die alternative Bezeichnung als Vascular Permeability Factor (VPF, [189]). Diese erhöhte vaskuläre Permeabilität resultiert nicht nur in der Extravasation von Blutproteinen als Matrix für das Wachstum von endothelialen und neoplastischen Zellen, sondern auch in der Entwicklung von malignen Pleuraergüssen und Aszites [189, 190, 209]. Die Hälfte der Kontrolltiere dieser Studie entwickelte malignen Aszites mit exorbitant hohen VEGF-Konzentrationen (> 1000 pg/ml, sowohl bei Tieren mit schlecht differenzierten AsPC-1, als auch mittelgradig differenzierten HPAF-2 Tumoren; 3.6.6, Seite 71). Im Gegensatz hierzu

bildete keines der AS-3 therapierten Tiere Aszites aus. Folglich scheint auch eine reduzierte vaskuläre Permeabilität ein Teil des Mechanismus zu sein, mit dem AS-3 die Progression des Pankreaskarzinoms im Nacktmausmodell verlangsamt.

4.7 Therapie mit Diphtherietoxin-VEGF Fusionsprotein (DT-VEGF)

Die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 sind im aktivierten Endothel der Tumorblutgefäße im allgemeinen und im Pankreaskarzinom im besonderen hochreguliert [210, 211], wohingegen normale reife Blutgefäße eine zu vernachlässigende Expression von VEGFR-1 und VEGFR-2 zeigen [128]. Die Kopplung von VEGF an Toxine erlaubt daher, gezielt Tumorblutgefäße zu schädigen. Wir nutzten die codierende Region der häufigsten VEGF-Isoform (VEGF₁₆₅), um ein 390 Aminosäuren großes Diphtherietoxin(DT)-Fragment, das seiner natürlichen Bindungsstelle für Säugerzellen beraubt ist, an die Ziel-(Endothel-)Zelle zu bringen [129]. Das trunkierte DT-Fragment ist für sich alleine harmlos, behält aber seine Funktionen der Translokation und Proteinsynthese-Inhibition, wenn es mit dem andockenden VEGF-Molekül kombiniert wird. Das DT-VEGF Konstrukt hat sich als hochtoxisch für proliferierende Endothel-Zellen erwiesen und darüberhinaus in vitro das Wachstum von neuen Blutgefäßen in CAM-Assays inhibiert [129]. Die Spezifität der DT-VEGF Wirkung konnte bewiesen werden, indem Antikörper gegen VEGF und VEGFR-2 die Aktivität des Fusionsproteins blockierten [129].

4.7.1 In vitro Effekte von DT-VEGF

Zunächst konnte die inhibitorische Aktivität von DT-VEGF auf VEGFR-positive humane Umbilikalvenen-Endothelzellen bestätigt werden [212]: das Fusionsprotein reduzierte dosisabhängig die Proliferation und Viabilität von HUVEC (Abb. 38, Seite 76). Im Gegensatz hierzu zeigte DT-VEGF nahezu keine Beeinflussung von mittelgradig differenzierten humanen HPAF-2 Pankreaskarzinom-Zellen (Abb. 38, Seite 76), welche negativ für beide

VEGF-Rezeptoren sind (Abb. 26, Seite 66). Die Proliferation von schlecht differenzierten AsPC-1 Zellen, die positiv für VEGFR-1, aber negativ für VEGFR-2 sind (Abb. 26, Seite 66), wurde bei höheren DT-VEGF-Dosen inhibiert (Abb. 38, Seite 76). Dies paßt zu der Beobachtung, daß DT-VEGF nicht nur auf Endothelzellen zielt, sondern auch andere (Krebs-)Zelltypen beeinflusst - vorausgesetzt diese verfügen über eine Positivität für VEGF-Rezeptoren [129]. Der limitierte Effekt von DT-VEGF auf AsPC-1 Tumorzellen (positiv nur für VEGFR-1) im Vergleich zu HUVEC Endothelzellen (positiv für beide VEGF-Rezeptoren) resultiert aus dem Wirkmechanismus des Fusionsproteins, welcher hauptsächlich über den VEGFR-2 vermittelt wird [129].

4.7.2 In vivo Wirkung von DT-VEGF

Mittelgradig differenzierte HPAF-2 Tumore wuchsen in Nacktmäusen der Kontrollgruppe erneut zu großen, teilweise zystischen Raumforderungen heran (Abb. 39A, Seite 77) und zeigten lokal wie systemisch ein moderates Ausbreitungsmuster (Abb. 40A, Seite 77). DT-VEGF reduzierte Primärtumorwachstum und Disseminierung, was das Überleben (Abb. 41B, Seite 78) tendenziell verbesserte. Aggressive, schlecht differenzierte AsPC-1 Tumore ließen insbesondere eine Verlangsamung der Tumordisseminierung zu (Abb. 40B, Seite 77), was in einer signifikanten Verbesserung des 14-Wochen Überlebens resultierte (Abb. 41B, Seite 78).

Eine reduzierte angiogene Aktivität wurde sowohl in HPAF-2, als auch AsPC-1 Tumoren in Form einer signifikant reduzierten mikrovaskulären Gefäßdichte registriert (3.7.6, Seite 76). Da die in vitro Proliferation von HPAF-2 Zellen nicht durch DT-VEGF in physiologischen Konzentrationen beeinflusst wurde (Abb. 38, Seite 76), scheint bei dieser Tumorentität ein rein antiangiogener Therapiemechanismus zu bestehen. Im Gegensatz hierzu könnte eine direkte Toxizität von DT-VEGF auf VEGFR-1 positive AsPC-1 Zellen (Abb. 38, Seite 76) zu einem antitumoralen Effekt des Fusionsproteins - zusätzlich zur Angiogenesehemmung - in AsPC-1 Tumoren beitragen.

Obwohl VEGF-Rezeptoren vorwiegend auf aktivierten Tumorendothelien exprimiert werden, besteht ein potentiell Risiko für dosisabhängige toxische Nebenwirkung von DT-VEGF auf normale Endothelien. So konnte gezeigt werden, daß VEGF165 auch an den Neuropilin-1 Rezeptor bindet [128]. Neuropilin-1 ist in normalem Gewebe weit verbreitet und stellt daher ein potentiell Ziel für ungewollte Toxizität dar. In dieser Studie wurden alle Mäuse mit 200 µg/kg jeden zweiten Tag therapiert und zeigten klinisch keinen Anhalt für Toxizität, was Nahrungsaufnahme und Aktivität angeht. Das Körpergewicht, als Surrogatmarker für Toxizität während der gesamten Versuchsdauer regelmäßig erfaßt, zeigte in beiden Tumorentitäten keine signifikanten Unterschiede (3.7.5, Seite 75). Gewebeschnitte von Niere, Leber und Lunge von DT-VEGF behandelten Tieren zeigten keinen mikroskopischen Anhalt von Organtoxizität im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Diese Daten stimmen mit früheren Untersuchungen überein, die keine toxischen Nebenwirkungen von DT-VEGF Konstrukten bei Kurzzeittherapien in Nagetieren berichteten [128, 129, 213]. Die aktuelle Studie war allerdings die erste, welche DT-VEGF für einen Zeitraum von bis zu 14 Wochen in Mäusen evaluierte.

4.8 Kombinationstherapie: Anti-VEGF Antikörper A4.6.1 und Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor Batimastat

Die vorgenannten Studien sowie eine Reihe von Arbeiten anderer Autoren [203, 207, 214, 215] haben das therapeutische Potential einer VEGF-Blockade für das experimentelle Pankreaskarzinom gezeigt; die Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen zeigte vergleichbare Effekte [139, 140]. Es ist allerdings ein gemeinsames Kennzeichen dieser monotherapeutischen Ansätze, daß sie die Tumorprogression zwar verlangsamen, jedoch nicht komplett unterdrücken können. Angesichts des komplexen, aus multiplen Schritten bestehenden Prozesses der Tumorprogression im allgemeinen und der Angiogenese im besonderen, welche von einer Vielzahl von Faktoren beeinflußt werden, ist dies auch wenig überraschend. Erste klinische Studien bestätigten das limitierte Potential einer Monotherapie für Patienten mit

fortgeschrittenem Pankreaskarzinom: der Effekt von Marimastat, einem oral verfügbaren Breitspektrum-MMP-Inhibitor, auf die 1-Jahres-Überlebensrate, war vergleichbar mit der Wirkung des etablierten, zytotoxisch wirkenden Gemcitabine [216].

4.8.1 In vivo Effekte der Kombinationstherapie

Die vorliegende Studie evaluierte zum ersten Mal eine Kombination aus VEGF-Blockade und MMP-Inhibition in einem orthotopen Nacktmausmodell des humanen Pankreaskarzinoms und verglich ihre Wirkung auf lokales Tumorstadium (Abb. 42, Seite 81), Tumordisseminierung (Abb. 43, Seite 82), Neoangiogenese (Abb. 46, Seite 85) und Überleben (Abb. 45, Seite 84) mit den entsprechenden Monotherapien [217]. Wir konnten hierbei das vergleichbare therapeutische Potential von A4.6.1, einem hochaffinen monoklonalen Antikörper, der alle VEGF-Isoformen neutralisiert [218, 219] und Batimastat bestätigen, einem synthetischen Hydroxamat mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen Matrix-Metalloproteinasen [220-222], das mit MMP-2 und MMP-9 jene MMPs einschließt, welche mit hohen Spiegeln in Pankreaskarzinomen gefunden wurden [223].

Beide Substanzen reduzierten die mikrovaskuläre Gefäßdichte als Parameter der Neoangiogenese in Primärtumoren signifikant, wobei die VEGF-Blockade effektiver als die MMP-Inhibition war (Abb. 46, Seite 85). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß Matrix-Metalloproteinasen eine komplexe Rolle im Prozeß der Angiogenese spielen, die nicht nur proangiogene, sondern auch antiangiogene Aktivität umfaßt [224, 225]. Obwohl eine große Zahl von Studien die antiangiogenen Effekte von MMP-Inhibitoren beschrieben hat, sind MMPs selbst mit der Produktion von Proteinfragmenten in Verbindung gebracht worden, die antiangiogen wirken. So sind einige MMPs wie MMP-9 in der Lage, Plasminogen in den potenten endogenen Angiogeneseinhibitor Angiostatin umzuwandeln [226]. Das Potential der antiangiogenen Aktivität von MMPs beim Pankreaskarzinom ist nicht bekannt; der Netto-Effekt der MMP-Inhibition bedeutete in diesem Modellsystem eine Reduktion der Tumor-Neovaskularisierung.

Die Kombinationstherapie resultierte in additiven Effekten bezüglich Primärtumorvolumen (Reduktion um weitere 50 %; Abb. 42A, Seite 81) und Aszitesbildung (komplette Unterdrückung; Abb. 44A, Seite 83) in Nacktmäusen mit mittelgradig differenzierten HPAF-2 Tumoren. Tumordisseminierung (Abb. 43A, Seite 82) und mikrovaskuläre Gefäßdichte (Abb. 46A, Seite 85) waren gegenüber der jeweils effektivsten Monotherapie nicht signifikant unterschiedlich. Alle drei Therapiemodalitäten verbesserten das 14-Wochen Überleben in den HPAF-Gruppen von 50 auf 100 %, so daß sich hier kein additiver Effekt feststellen ließ.

Bei Nacktmäusen mit schlecht differenzierten AsPC-1 Tumoren führten VEGF-Blockade und MMP-Inhibition zu einem tendenziell verbesserten Überleben, die Kombinationstherapie hatte allerdings keinen additiven Effekt auf Überleben (Abb. 45B, Seite 84), Primärtumorvolumen (Abb. 42b, Seite 81), Disseminierung (Abb. 43B, Seite 82), Entwicklung von Aszites (Abb. 44B, Seite 83) und mikrovaskuläre Gefäßdichte (Abb. 46b, Seite 85) in der AsPC-1 Gruppe.

4.8.2 Mechanismen der VEGF/MMP Interaktion

Mögliche Gründe für die relativ enttäuschenden Resultate der kombinierten VEGF/MMP Inhibition im Vergleich zu den Monotherapien schließen die Feststellung mit ein, daß VEGF und Matrix-Metalloproteinasen im Prozeß der Tumorangiogenese und -progression zum einen gemeinsame Wirkmechanismen teilen und diesbezüglich miteinander interagieren. So wurde VEGF als MMP-Regulator identifiziert, der die Produktion von MMPs in humanen Endothelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen sowie bestimmten Tumorzellen stimuliert [58, 224, 227, 228]. Man könnte nun spekulieren, daß eine VEGF-Blockade weiter Downstream zu einer reduzierten MMP-Expression führt, was wiederum das therapeutische Potential einer zusätzlichen MMP-Inhibierung beeinträchtigt. Der umgekehrte Fall einer Regulierung von VEGF durch MMPs wurde ebenfalls beschrieben: MMP-9 triggert den angiogenen Switch im RIP1-Tag2 transgenen Model der Pankreasinselzell-Karzinogenese über eine Freisetzung von VEGF [228].

Ein weiterer Grund für das eingeschränkte Potential der Kombinationstherapie mag zum anderen im zellulären Effekt beider Substanzen liegen: beide sind für Pankreaskarzinom-Zellen in therapeutischen Konzentrationen nicht zytotoxisch [227]. Stattdessen üben sie über eine Modulierung der Tumorzell-Umgebung einen zytostatischen Effekt aus. Es ist möglicherweise effektiver, einen anti-VEGF Antikörper oder MMP-Inhibitor mit zytotoxischen Substanzen zu kombinieren. Haq et al. berichteten über positive Effekte einer Kombination von BB-94 mit Gemcitabine in einem murinen Pankreaskarzinom-Modell [229]. Die beobachteten Unterschiede der Kombinationstherapie in den beiden evaluierten Tumorentitäten sind schwer zu interpretieren; sie könnten aus der unterschiedlichen Differenzierung der Zellen resultieren. Ob in diesem experimentellen Setting unterschiedliche Sekretionsmuster von Matrix-Metalloproteinasen und VEGF hier eine Rolle spielen, muß noch untersucht werden.