

**Einfluss einer VEGF-/ Ang2- Inhibition auf die Tumorangiogenese
im Modell des kolorektalen Karzinoms**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Juana Freystein

geboren am 22.09.1984 in Wernigerode

Betreuer:

Prof. Hans-Joachim Schmoll

Gutachter:

Prof. Hans-Joachim Schmoll, Halle

Prof. Dirk Vordermark, Halle

Prof. Gerd Bendas, Bonn

Datum der Verteidigung: 28.02.2023

Referat

Im Jahr 2018 verstarben 24.248 Menschen in Deutschland am kolorektalen Karzinom (KRK). Wo die 5-Jahres-Überlebensrate im UICC-Stadium I + II noch bei ca. 90 % (im Stadium III bei 50-80 %) liegt, ist diese im metastasierten Stadium IV mit ca. 10 % gering. Dabei liegt bei einem Viertel der Erstdiagnosen das Stadium IV vor. Die Wirksamkeit der im Stadium IV etablierten Standard-Therapie aus Bevacizumab (einem VEGF-Inhibitor) und einer fluoropyrimidinhaltigen Chemotherapie, soll durch die zusätzliche Hemmung von Angiopoietin-2 (Ang-2) verbessert werden. Ang-2 ist neben VEGF ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor zur Gefäßbildung und Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Expression bei Krebserkrankungen mit einer schlechteren Prognose einhergeht. Zudem stellen Resistenzen einiger Zelllinien des KRK gegenüber Chemotherapie therapeutische Grenzen dar. Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der Wirksamkeit einer gleichzeitigen Hemmung von VEGF und Ang-2 durch einen bispezifischen CrossMab-Antikörper sowie in Kombination mit Chemotherapie. Diese Arbeit umfasst drei aufeinander aufbauende Studien anhand von Xenotransplantaten aus drei chemoresistenten Zelllinien des KRK (HT-29 WT, HT-29 FUPW, DLD-1) mit anschließender histologischer Analyse. In den ersten zwei Studien mit 3 Mäusen pro Gruppe sollen Wirkung und Nebenwirkung des Single-Targetings durch VEGF-Inhibition und Ang-2-Hemmung im Vergleich zur kombinierten VEGF-Ang-2-Hemmung (Co-Targeting) durch das bispezifische CrossMab analysiert werden. Unter Verwendung der Zelllinie HT-29 FUPW, einem Klon der HT-29 Wildtyp mit integriertem fluoreszierendem Protein, erfolgten erste Untersuchungen zur Metastasierung in der Lunge durch die Fluoreszenzbildgebung. Nach erfreulichen Ergebnissen wurde in einer größeren Studie (n = 10) die Wirksamkeit des bispezifischen CrossMab durch eine Chemotherapie (FOLFIRI) ergänzt und mit dem klinischen Standard (Bevacizumab + FOLFIRI) verglichen. Anschließend erfolgten immunhistochemische Analysen der Xenotransplantate auf Veränderungen in der Morphologie, Kapillarisation und Vorhandensein von Immunzellen, sowie die Expression von VEGF, Ang-2 und ihren Rezeptoren. In allen Studien bestätigte sich Ang-2 als erheblicher Einflussfaktor bei der angiogenen Hemmung. Die CrossMab- bzw. Ang-2-haltige Therapie zeigte sich hoch wirksam und war in Kombination mit einer Chemotherapie dem klinischen Standard überlegen und unterstützt die gemeinsame Ausrichtung der Therapie auf VEGF- und Ang-2. Die Tumorregression war mit histologischen Merkmalen wie der Gefäßrarifizierung, einem erhöhten Stroma- und Nekroseanteil, sowie mit einer Akkumulation von Immunzellen verbunden.

Freystein, Juana: Einfluss einer VEGF-/Ang-2-Inhibition auf die Tumorigenese im Modell des kolorektalen Karzinoms, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 71 Seiten, 2022.

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis

2. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

3. Einleitung.....	1
3.1. Kolorektales Karzinom	3
3.1.1. Epidemiologie.....	3
3.1.2. Pathogenese.....	5
3.1.3. Therapie	7
3.2. Tumorangiogenese und proangiogene Faktoren.....	10
3.2.1. VEGF	11
3.2.2. Ang-2	13
3.2.3. CrossMab	13
4. Ziele der Arbeit.....	15
5. Material und Methodik.....	16
5.1. Allgemeiner Versuchsablauf	16
5.1.1. Materialien.....	16
5.1.2. Methode.....	16
5.2. Verwendete Zelllinien und Zellkultivierung	17
5.2.1. Zelllinien	17
5.2.2. Zellkultur	18
5.3. Versuchstiere	18
5.4. Multispektral-Fluoreszenzimaging (msFI).....	19
5.4.1. Geräte und Software	19
5.4.2. Methode.....	19
5.5. Histologie	21
5.5.1. Material.....	21
5.5.2. Methode.....	22
5.6. Statistik.....	24

6. Ergebnisse	25
6.1. Studie 1: Beobachtung des Tumorwachstums und der Metastasierung unter Einfluss von VEGF-/Ang-2-Single-Targeting im Vergleich zum Co-Targeting anhand der Zelllinie HT-29 FUPW anhand Volumenmessung und multispektraler in-vivo-Fluoreszenzbildgebung	25
6.1.1. Fluoreszenzintensität	26
6.1.2. Metastasen.....	28
6.1.3. Nebenwirkungen.....	29
6.2. Studie 2: Vergleich des VEGF-/ Ang-2-Single- und Co-targeting in 3 verschiedenen Tumorzelllinien, sowie erste Beobachtungen unter Zugabe einer Chemotherapie.....	31
6.2.1. HT-29 FUPW	31
6.2.2. HT-29 Wildtyp	33
6.2.3. DLD-1.....	34
6.3. Studie 3: Auswirkung des Co-targetings von VEGF und Ang-2 (CrossMab) in Kombination mit Chemotherapie anhand der Zelllinie DLD-1	37
6.3.1. Verlauf und Beobachtung	37
6.3.2. Statistische Analyse.....	38
6.4. Histologische Analysen	42
7. Diskussion	57
7.1. Diskussion Studie 1	57
7.2. Diskussion Studie 2	58
7.3. Diskussion Studie 3	60
7.4. Diskussion der histologischen Analysen	61
8. Zusammenfassung	65
9. Literaturverzeichnis	66
10. Thesen	71
11. Anhang	

2. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

5-FU	5-Fluorouracil
Ang-2	Angiopoietin-2
APC-Gen	Adenomatöses Polyposis coli - Gen (Tumorsuppressorgen)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BRAF-Gen	menschliches Gen, welches für Wachstumssignalproteinkinasen kodiert
CIN	Chromosomeninstabilität
CM	CrossMab-Antikörper
CrossMab	bispezifischer Antikörper für VEGF und Ang-2
DLD-1	humane Darmkrebszelllinie
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor)
EGFR	engl. Epidermal Growth Factor Receptor
Fab-Fragmente	Antigen-bindendes Fragment (engl. Fragment antigen binding)
FAP	familiäre Polyposis-Syndrome
FOLFOX	5-FU/Folinsäure/Oxaliplatin
FOLFOXIRI	Folinsäure (Leucovorin), 5-Fluorouracil, Oxaliplatin, Irinotecan
HGIEN	hochgradige intraepitheliale Neoplasie
HIF	Hypoxie induzierende Faktoren
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Kolonkarzinom-Syndrom
HT-29 FUPW	Klon der HT-29 mit integriertem fluoreszierendem Protein mPlum
HT-29 WT	humane Darmkrebszelllinie, Wildtyp
IHC	Immunhistochemische Färbung
IL-8	Interleukin-8
KRAS	„Kirsten Rat Sarcoma“-Gen, physiologisch aktiv kodiert es Wachstumssignale
KRK	Kolorektales Karzinom
LGIEN	leichtgradige intraepitheliale Neoplasie
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
msFl	multispektrales Fluoreszenzimaging
MSI-H	hohe Mikrosatelliteninstabilität
MSI-L	niedrig instabiler Mikrosatellitenstatus
MSS	Mikrosatelliten-Status
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung

RAS	„Rat sarcoma“, Proto-Onkogen, physiologisch reguliert das Protein Wachstums- und Differenzierungsprozesse
SSA.....	sessiles serratiertes Adenom
TNF	Tumornekrosefaktor
TP53.....	Tumorsuppressor-Gen
TSA	traditionelles serratiertes Adenom
UICC.....	Internationale Vereinigung gegen Krebs (engl. Union for International Cancer Control)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-2.....	VEGF-Rezeptor-2

3. Einleitung

Der Eingriff in die Angiogenese ist bei verschiedenen Krebserkrankungen, u. a. beim metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRRK), ein anerkanntes therapeutisches Ziel. Die Einschränkung der Blutversorgung des Tumors behindert das Wachstum und die Metastasierung. Tumorzellen beziehen Sauerstoff und Nährstoffe zum Überleben aus der Umgebung durch Diffusion. Ist eine Größe von ca. 3 mm überschritten benötigt er sein eigenes Blutgefäßsystem (Hossfeld u. a. 2001). Dazu bildet er Wachstumsfaktoren, die die Neubildung von Blutgefäßen anregt, die sogenannte „Neoangiogenese“. Die Blutgefäße eines Tumors wachsen im Vergleich zu normalen Blutgefäßen chaotisch und weisen eine abnormale Gefäßarchitektur auf. Sie sind durchlässiger, da ihnen glatte Muskelzellen fehlen. Zudem ist das Endothel und die Basalmembran unregelmäßig ausgebildet. Dies führt zu einer verschlechterten Diffusionsgeometrie und es kommt zu hypoxischen Arealen im Tumor (Graham und Unger 2018). Gesundes Gewebe dagegen bildet kontrolliert und geordnet Kapillaren aus, deren Abstand zwischen Zellen und Kapillaren zu einer konstanten und gleichmäßigen Nährstoff- und Sauerstoffversorgung führt. Zudem gibt es im Falle einer Unterversorgung Anpassungsmechanismen der Kapillaren, welche durch die Regulierung der Perfusionsgeschwindigkeit bestimmt werden kann. Diese Eigenschaft fehlt im neoplastischen Gewebe, so dass entferntere Areale zum Gefäß nicht versorgt werden. Durch Ausschüttung von Hypoxie induzierenden Faktoren (HIFs) stellt der Tumor seine Prozesse auf einen anaeroben Stoffwechsel um und fördert die Expression von Genen, die die Angiogenese, den Stoffwechsel, das pH-Gleichgewicht und die Zellapoptose beeinflussen. Dies wiederum kann auch zu Resistenzen gegenüber Therapien - wie Chemotherapie, Bestrahlung oder Immuntherapien – führen (Graham und Unger 2018). Gelingt keine weitere Versorgung kommt es in Tumoren zum ungerichteten Zelltod, der Nekrose. Dabei schwellen die Zellen an, die Zellmembran bricht auf und entlässt den Zellinhalt in die Umgebung, welche durch Makrophagen phagozytiert werden. Dies geschieht im Rahmen einer Entzündungsreaktion mit Freisetzung von Zytokinen, wie TNF α und Interleukin-1 β und dem Verbleib von leukozyteninfiltrierten, strukturlosen Gewebe mit Kollagen- und elastischen Fasern, Zysten oder Narbengewebe (Hentsch 2020).

Physiologisch sind die Bildung neuer Blutgefäße (Angiogenese) und die Gefäßregression ein dynamische Prozesse, die man u. a. bei der Embryonalentwicklung, der Ovulation oder beim Auf- und Abbau des Brustdrüsenkörpers im Rahmen einer Schwangerschaft gut beobachten kann. Es ist ein Zusammenspiel von Aktivatoren, wie z. B. Zytokine und Wachstumsfaktoren (z. B. TNF α , IL-8, VEGF, EGF, Ang-2), und Inhibitoren (z. B. T-Lymphozyten, TNF-Rezeptoren, proteolytischen Spaltprodukten der Gerinnungskaskade und Kollagenen). Im gesunden Gewebe führen wachstumshemmende Faktoren zu einer Gefäßregression und schließlich zu einem

programmierten und geordneten Zelltod, der Apoptose (Korn und Augustin 2015). Zellreste werden phagozytiert, was jedoch ohne Entzündungsreaktion einhergeht.

Angiogenese-Hemmer erkennen Wachstumsfaktoren und hemmen den weiteren Signalweg, indem sie sie binden oder dessen Rezeptoren blockieren. Durch die fehlende Bildung von Gefäßen wird der Tumor unterversorgt und stirbt ab. Ein bekannter Wachstumsfaktor ist VEGF (engl. Vaskular Endothelial Growth Factor), der an Rezeptoren auf Blutgefäßzellen bindet und das Wachstum anregt. Klinisch etabliert ist der Anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®). Bevacizumab ist seit 2005 zugelassen und wird in Kombination mit fluoropyrimidin-haltigen Chemotherapien bei verschiedenen Krebserkrankungen (u. a. Lungen-, Brust-, Eierstockkrebs, sowie beim metastasierten KRK) als Standard angewendet (AWMF und Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2019). Ebenfalls Anwendung findet er als „Off-Label Use“ bei der feuchten Makuladegeneration. Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor für die Angiogenese ist Angiopoietin-2. In mehreren Studien wurde festgestellt, dass die Wachstumsfaktoren Ang-2 und VEGF beim KRK vermehrt exprimiert werden, v. a. bei vorbestehender Kolitis ulcerosa (Liu u. a. 2015), die für sich ein Risikofaktor bei der Entstehung von Darmkrebs ist. Somit scheint Ang-2 ein weiterer Angriffspunkt für neue Therapiemöglichkeiten zu sein.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Wachstumsfaktors Ang-2 auf die Wirksamkeit der antiangiogenen Therapie des KRK im Tiermodell athymischer Mäuse. Dies erfolgt im Vergleich zur klinischen Standardtherapie der VEGF-Blockade und Chemotherapie unter Verwendung von Xenotransplantaten aus den Tumorzelllinien (HT-29 FUPW, HT-29 Wildtyp und DLD-1). Zur kombinierten anti-angiogenen Hemmung von VEGF und Ang-2 wurde ein durch die CrossMab - Technologie hergestellter bispezifischer Antikörper verwendet. Dieser erkennt mit einem Arm VEGF-A, basierend auf Bevacizumab (Avastin®) und mit dem zweiten Arm Ang-2, basierend auf LC06 (ein Ang-2-selektiver humaner IgG1-Antikörper). Eine noch recht neue Methode zum nicht-invasiven Monitoring für das Ansprechen von Therapien kann durch nicht-invasive fluoreszenzbildgebenden Verfahren beurteilt werden. Dazu wird ein Fluoreszenzprotein exprimierender Zellklon (HT-29 FUPW) verwendet, der durch lentivirale Transduktion aus der humanen Zelllinie HT-29 hergestellt wurde. Durch Anregung mit monochromatischem Licht wird über ein Fluoreszenzbildgebungssystem Maestro™ das Emissionslicht des Fluoreszenzproteins sichtbar gemacht und die Fluoreszenzintensität ermittelt. Es wurden insgesamt 3 Studien durchgeführt. Die erste Studie erfolgte anhand des Zellklons HT-29 FUPW und beschäftigte sich neben der antiangiogenen Therapie (Anti-VEGF, Anti-Ang-2 und CrossMab), auch mit dem Therapiemonitoring subkutan wachsender Tumore und deren Metastasierung mittels des oben erwähnten in-vivo-Fluoreszenzimaging. In der

zweiten Studie wurde das Tumorwachstum und Therapieansprechen zwischen dem Klon HT-29 FUPW, seinem Wildtyp (HT-29 WT) und der Zelllinie DLD-1 verglichen und auf Wirksamkeit und Verträglichkeit geprüft. Aufgrund bekannter Chemoresistenzen in der Therapie des KRK erfolgten anhand der HT-29 FUPW erste Versuche mit Zugabe einer Chemotherapie auf Verträglichkeit und Wirkung. Die Antikörpertherapie soll zu einer besseren Wirksamkeit führen aufgrund einer Überbrückung der Chemoresistenz. Nach positiven Ergebnissen und Beobachtungen der ersten zwei Studien, wurde eine dritte große Studie durchgeführt mit einer statistisch auswertbaren Gruppengröße (n=10) anhand der Zelllinie DLD-1. Anschließend erfolgte die Aufbereitung der Tumore für histologische und immunhistochemische Analysen.

3.1. Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom umfasst Karzinome des Kolons (≥ 16 cm oral der Linea anocutanea) und des Rektums (Hofheinz u. a. 2018). Die Lokisationshäufigkeit steigt nach aboral an, so dass ungefähr 64% im Sigmoidium (Krummdarm) und Rektum (Enddarm) lokalisiert sind, 20% im Colon descendens (linker Dickdarm) und 16 % im Colon transversum und Colon ascendens (rechter Dickdarm) (Seufferlein 2021). Zu den prädisponierenden Faktoren gehören genetische Faktoren (z. B. familiäre Polyposis-Syndrome (FAP), eine positive Familienanamnese bezüglich KRK oder das hereditäre nicht-polypöses Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC) (Deutsches Krebsforschungszentrum und Krebsinformationsdienst 2018). Ursache sind hier Mutationen im APC-Gen (FAP) oder Keimbahnmutationen der HNPCC in DNA-Mismatch-Repair-Genen (MLH1, MSH2, MLH3, MSH6, PMS1, PMS2). Weiterhin spielen das Alter > 50 Jahren, die Ernährungsweise und der Lebensstil eine Rolle, wie beispielsweise eine fett- und fleischreiche, ballaststoffarme Ernährung, Alkohol und Nikotin. Auch Krankheiten, wie Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas, Colitis ulcerosa/M. Crohn, die primär sklerosierende Cholangitis oder kolorektale Adenome sind Risikofaktoren (Holmer und Kreis 2017). Die überwiegende Zahl der KRK entstehen aus adenomatösen Polypen (Schmiegel u. a. 2009), so dass durch die Entfernung von Adenomen ein Karzinom verhindert werden kann. Dementsprechend spielt die Koloskopie bei der Früherkennung als auch bei der Nachsorge eine entscheidende Rolle.

3.1.1. Epidemiologie

Darmkrebs ist unter den Frauen die zweithäufigste (nach dem Mammakarzinom) und unter den Männern die dritthäufigste (nach dem Prostata- und Lungenkarzinom) Krebsneuerkrankung in Deutschland (Robert-Koch-Institut 2019). Etwa zweidrittel der Darmkrebserkrankungen sind im Dickdarm lokalisiert. Im Durchschnitt liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 76 Jahren (Frauen) und 72 Jahren (Männer). Nur etwa 10 % dieser Krebserkrankung tritt vor dem 55. Lebensjahr

auf. Bei früher Diagnosestellung ist das KRK mit einer guten Prognose verbunden. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt im UICC-Stadium I-II bei 85-95 %. Im Stadium III zwischen 50 – 80 % (Ritz 2020). Dagegen beträgt diese im metastasierten Stadium (UICC IV) nur noch 5-10 % (Birkner, Raedch, und Strauch 2021; Brenner, Kloor, und Pox 2014). Bei Erstdiagnose lag bei 26-28 % der Krebsfälle 2016 ein metastasiertes KRK vor (Cardoso u. a. 2021), was die Bedeutung von Früherkennungsmaßnahmen hervorhebt. Nach Zahlen des RKI erkrankten im Jahr 2018 60.630 Menschen am KRK. Erfreulicherweise ist die Inzidenz in den letzten Jahren seit 2003 gesunken (vgl. im Jahr 2013 mit 62.400 Neuerkrankungen) mit Ausnahme des aufsteigenden Kolons. Ebenfalls zeigte sich ein deutlicher Rückgang der altersstandardisierten Sterberaten mit etwa 20 % bei beiden Geschlechtern in den letzten 10 Jahren. Trotz Früherkennungsmaßnahmen im Sinne von Präventivkoloskopien starben jedoch noch 24.248 Betroffene im Jahr 2018 (Robert-Koch-Institut 2021). Im Jahr 2016 waren es 24.802 Betroffene.

Tabelle 1: Zahlen der Darmkrebserkrankung aus dem Jahr 2018 durch das Robert-Koch-Institut (Robert-Koch-Institut 2021)

	2018	
	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	26.710	33.920
standardisierte Erkrankungsrate ¹	32,7	52,1
Sterbefälle	11.008	13.240
standardisierte Sterberate ¹	11,3	18,9
5-Jahres-Prävalenz	89.700	109.800
10-Jahres-Prävalenz	150.400	183.300
relative 5-Jahres-Überlebensrate*	65 %	63 %
relative 10-Jahres-Überlebensrate*	62 %	57 %

¹ je 100.000 Personen, altersstandardisiert nach altem Europastandard

* berechnet nach Periodenmethode für 2017 / 2018

3.1.2. Pathogenese

Intraepitheliale Neoplasien (Adenome) des Gastrointestinaltrakts (Magen, Dünndarm, Kolorektum) sind Vorläuferläsionen, aus denen sich nach unterschiedlichen Zeitabständen (mehrere Monate bis Jahre) Adenokarzinome entwickeln können (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Die Begrifflichkeiten für Vorläuferläsionen haben sich in den letzten Jahren spezifiziert, so dass ungenaue Begrifflichkeiten wie „Dysplasie“ oder „Atypie“ durch den Begriff der „intraepithelialen Neoplasie (EIN)“ ersetzt wurde. Unter der Bezeichnung einer intraepithelialen Neoplasie ist eine eindeutige neoplastische Epithelproliferation zu verstehen, welche mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden ist (= präkanzeröse Läsion), welche durch den Pathologen festgelegt wird. Hierbei handelt es sich nicht mehr um eine entzündlich-regenerative oder hyperplastische Veränderung, sondern eine echte, wenn auch noch nicht invasive, Neoplasie (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Adenome werden nach der WHO in niedriggradige (LGIEN = leichtgradige intraepitheliale Neoplasie) und hochgradige (HGIEN = hochgradige intraepitheliale Neoplasie) Formen eingeteilt. Wird ein Adenom nicht entfernt, proliferieren die Adenomzellen weiter. Im Durchschnitt vergrößern Adenome ihr Volumen innerhalb von 2 Jahren um 52 %. Die meisten Adenome (66–77 %) sind im Rektosigmoid lokalisiert (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Je nach histologischem Wachstumsmuster lassen sich tubulöse, villöse und tubulo-villöse Adenome unterscheiden. Die häufigste Form (70-80 % aller Adenome) machen die tubulären Adenome mit > 80 % tubulärem Baumuster aus (circa 90 % der Adenome < 1cm). Tubulo-villöse Adenome (20-80 % villösen Anteilen) machen ca. 20 % der Adenome aus. Villöse Adenome mit > 80 % villöse Strukturen machen den kleinsten Teil aus (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Das Auftreten einer HGIEN oder eines invasiven Karzinoms steigt mit zunehmender Größe und der Anzahl der Adenome, zunehmender villöser Architektur und höherem Patientenalter (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). In den 80er Jahren wurde durch Morson und Fearon et al. das Modell zur Entstehung des KRK durch die „Adenom-Karzinom-Sequenz“ beschrieben und galt als entscheidender Pfad der Karzinogenese des KRK. Durch neue molekulargenetische Befunde wurde mittlerweile ein weiterer Pfad bewiesen, die sogenannte „serratierte Karzinogenese“. In dessen Vorläuferläsion wird die neue Entität des „sessilen serratierten Adenoms (SSA)“ definiert. Weiterhin wird ein Mischtyp aus beiden Wegen diskutiert, der molekulare Charakteristika beider Karzinogenesewege vereint und dessen Vorläuferläsionen das „traditionelle serratierte Adenom (TSA)“ oder villöse Adenome sein können (Tannapfel, Andrea u. a. 2010).

Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Adenom-Karzinom-Sequenz ist ein Modell zur Tumorgenese, bei dem aus gutartigem Epithelgewebe der Kolonschleimhaut über Adenome ein kolorektales Karzinom entstehen kann (Escher 2020). Adenome entstehen, wenn Mechanismen zur DNA-Regulierung und Zellproliferation verändert werden. Aufgrund des sich ständigen Lösen von Oberflächenepithel aus der Darmschleimhaut ist eine regelmäßige Erneuerung des Epithels erforderlich. Die Proliferation neuer Zellen findet an der Kryptenbasis statt und es folgt die weitere Differenzierung in Richtung Lumen bis hin zur Apoptose. Wird dieser Prozess aufgrund von Mutationen unterbrochen bilden sich Adenome, die an Größe zunehmen und dysplastische Merkmale bis hin zum invasiven Wachstum entwickeln (Nguyen, Goel, und Chung 2020). Primäres Ereignis ist eine Schlüsselmutation zur Inaktivierung im adenomatösen Polyposis coli-Gen (APC-Gen), welches zu weiteren Störungen der Funktionen der Tumorsuppressorgene KRAS und TP53 führt, sowie zur Entwicklung einer Chromosomeninstabilität (CIN). Der Mikrosatelliten-Status (MSS) bleibt jedoch stabil. Nach aktuellen Erkenntnissen entstehen circa 60 % der sporadischen Karzinome via Adenom-Karzinom-Sequenz (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Die Vorläuferläsionen dieses Mehrschrittkonzepts sind die tubulären, tubulovillösen und villösen Adenome mit unterschiedlichem Grad einer intraepithelialen Neoplasie.

Serratierte Karzinogenese

Die neuen Entitäten umfassen flache, sessile und sägezahnartige Polypen, die durch ein sternförmiges Muster der Krypteneinfaltung gekennzeichnet sind. Sie umfassen 3 Typen: hyperplastische Polypen, sessile serratierte Adenome (SSA) und die traditionellen serratierte Adenome (TSA). SSA und TSA gelten als Vorläufer der Karzinome, die nach dem serratierten Karzinogeneseweg entstehen. Die hyperplastischen Polypen (HP) machen fast 2/3 der der serratierten Adenome aus, sind meist im Rektum oder linksseitigen Kolon lokalisiert und gelten bei < 1 cm als wenig-kanzerogen. Ab einer Größe > 1 cm können sich SSA und TSA bilden, so dass die Empfehlung zu einer endoskopischen Abtragung besteht (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Sessile serratierte Adenome sind die zweithäufigste und TSAs die dritthäufigste Form, wobei sich TSAs schwer von tubulären Adenomen unterscheiden lassen (Nguyen u. a. 2020). Die Mutation im BRAF-Gen ist hier die primäre Schlüsselmutation und führt zu einer Störung der Apoptose, gefolgt von einer Überalterung, Genausfällen und einer hohen Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H), (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Die BRAF-Kinase ist eine Kinase aus der Familie der RAF-Kinasen (Proteine im Signaltransduktionsweg zur Regulation des Zellwachstums und Apoptose) und wird im RAS/RAF/MAP-Signalweg durch RAS aktiviert. Bei BRAF-Mutationen ist die BRAF-Kinase ohne Aktivierung aktiv und es kommt zur unkontrollierten Zellteilung und -proliferation.

BRAF ist bei den meisten serratierten Adenomen mutiert, aber selten bei den konventionellen Adenomen, was das Konzept eines alternativen Weges zur Bildung eines KRK unterstützt. Das zeitliche Ausmaß des Tumorprogresses ist zwar noch nicht vollständig charakterisiert, jedoch ist das Risiko von der Präkanzerose zum Karzinom bei allen sessilen Tumoren mit einer MSI erhöht (Nguyen u. a. 2020).

Beim Mischtyp führt eine KRAS-Mutation zu sekundären Genausfällen. Weiterhin liegen Mutationen im APC-Gen und TP53-Gen vor und führt meist zu einer niedrig instabilen Mikrosatellitenstatus (MSI-L) oder stabilen Mikrosatellitenstatus (MSS), (Tannapfel, Andrea u. a. 2010). Das KRAS-Gen (Abk. für Kirsten Rat Sarcoma) ist auf Chromosom 12 lokalisiert und gehört zur Familie der GPTasen. Es ist beteiligt an der Signalweiterleitung des EGF-Rezeptors der Zellmembran zum Zellkern, wo das EGF-Signal an Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt ist. Bei onkogenen Mutationen im (K)RAS-Gen, sind Medikamente auf Grundlage der Hemmung der EGFR-Tyrosinkinase nicht wirksam (Nguyen u. a. 2020).

In der Klinik ist die Unterscheidung der Genesewege bedeutsam, da Karzinome aus dem serratierten Weg meist rechtsseitig (proximal) wachsen und mit einer guten Prognose einhergehen (5-Jahren-Überlebensrate > 70 %). Zudem scheint ein großer Teil der KRK, die innerhalb eines Überwachungszeitraums von 3-5 Jahren entstehen, auf dem serratierten Weg zu entstehen (Nguyen u. a. 2020).

3.1.3. Therapie

Vor der Therapie ist die Einschätzung der Situation und die Entscheidung über das Therapieziel zu stellen. Dazu ist der Allgemeinzustand des Patienten, das Tumorstadium und eine molekularbiologische Diagnostik notwendig. Die bedeutendsten Tumorklassifikationssysteme sind die UICC-Stadien (Union internationale contre le cancer), welche Tumore in Entwicklungsstadien einteilt, und die TNM-Klassifikation, welche die Tumorausdehnung und -verbreitung verteilt und somit auch die Resektabilität einschätzt. Resektable Tumorbefunde haben ein kuratives Therapieziel und eine gute Prognose, so dass die chirurgische Resektion an oberste Stelle steht. Tabelle 2 zeigt einen Überblick über die Therapien des KRK. Beim Carcinoma in situ (Tis, UICC 0) haben die Tumorzellen die Basalmembran noch nicht durchbrochen, so dass hier eine endoskopische Abtragung möglich ist. Bei fehlendem Lymphknotenbefall oder Metastasierung (UICC 0-I) wird keine Chemotherapie angewendet. Im Stadium UICC II kann eine Chemotherapie bei Risikofaktoren, wie z.B. Tumorperforation, Operation unter Notfallbedingungen, erwogen werden mit Fluoropyrimidinen als Monotherapie. Bei nachgewiesener Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) sollte eine adjuvante

Chemotherapie im Stadium II nicht erfolgen (AWMF und Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2019). Im Stadium UICC III sollte eine adjuvante Chemotherapie in Kombination mit Oxaliplatin erfolgen, aufgrund nachgewiesener Verlängerung der Überlebensrate und eines rezidivfreien Intervalls. 5-FU (5-Fluorouracil) war die erste wirksame Substanz in der KRK-Therapie und wird als Standard-Therapie (FOLFOX: 5-FU/Folinsäure/Oxaliplatin) geführt. Es zeigte sich, dass Capecitabin mindestens so effektiv wie 5-FU/Folinsäure ist. Es wird empfohlen Capecitabin/Oxaliplatin (CAPOX- /XELOX-Schema) bei geringem Rezidivrisiko anzuwenden aufgrund der reduzierten Langzeit-Neurotoxizität (Hofheinz u. a. 2018). Irinotecan oder monoklonale Antikörper werden in der adjuvanten Therapie nicht empfohlen.

Table 2: Überblick über das Therapieregime des KRK anhand der S3-Leitlinie des Kolorektalen Karzinoms (AWMF und Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2019, Hofheinz u. a. 2018).

UICC-Stadium	TNM	Leitliniengerechte Therapieempfehlung
0 - I	Tis – T2, N0, M0	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kuratives Therapieziel ▪ Resektion ▪ Weiteres Vorgehen abhängig von Histopathologie: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Low-Risk-Situation + Komplette Resektion (R0): Keine Nachresektion ▪ Inkomplette Resektion: Nachresektion ▪ High-Risk-Situation: Radikale chirurgische Resektion ▪ Keine adjuvante Chemotherapie
II	Bis T4, N0, M0	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kuratives Therapieziel ▪ radikale chirurgische Resektion ▪ Adjuvante Chemotherapie (Monotherapie mit Fluorpyrimidine) individuell erwägen (T4, Tumorperforation, R0, stabiler MSS)
III	Jedes T, N1, M0	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Kuratives Therapieziel ▪ Radikale chirurgische Resektion ▪ Adjuvante Chemotherapie mit Oxaliplatin (CAPOX oder FOLFOX)
IV	Jedes T, jedes N, M1	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Palliativ, jedoch 25% mit kurativem Potential ▪ Resektion, Metastasen-Resektion ▪ Individuell nach Tumorkonferenz (Abb. 1)

Ist das kolorektale Karzinom metastasiert (mKRK) sollte das Therapiekonzept in einer Tumorkonferenz erstellt werden. Früher galt dieses Stadium als palliativ, jedoch zeigte sich in den letzten 20 Jahren ein kuratives Potential bei bis zu 25 % der Patienten (Hofheinz u. a. 2018).

Die Intensivität der Therapie (Operation, Chemotherapie) erfolgt nach Beurteilung des Allgemeinzustandes (siehe Abb. 1). Bei resektablen Tumormanifestationen und günstiger Risikokonstellation sollte primär die Metastasenresektion (z.B. in Lunge oder Leber) angestrebt werden. Bei fehlender chirurgischer Interventionsmöglichkeit sollte eine möglichst effektive Chemotherapie mit dem Ziel einer maximalen Tumorresektion erfolgen. Die Effektivität hängt hier von dem molekularpathologischen Profil ab, so dass eine Analyse des Mutationszustands der RAS-Gene (u. a. KRAS) und des BRAF-Gens erfolgen sollte. Bei RAS-Wildtyp Tumoren ist die Lokalisation von Bedeutung (Abb. 1), da linksseitig gelegene Tumore von einer Anti-EGFR-Therapie profitieren (AWMF und Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2019).

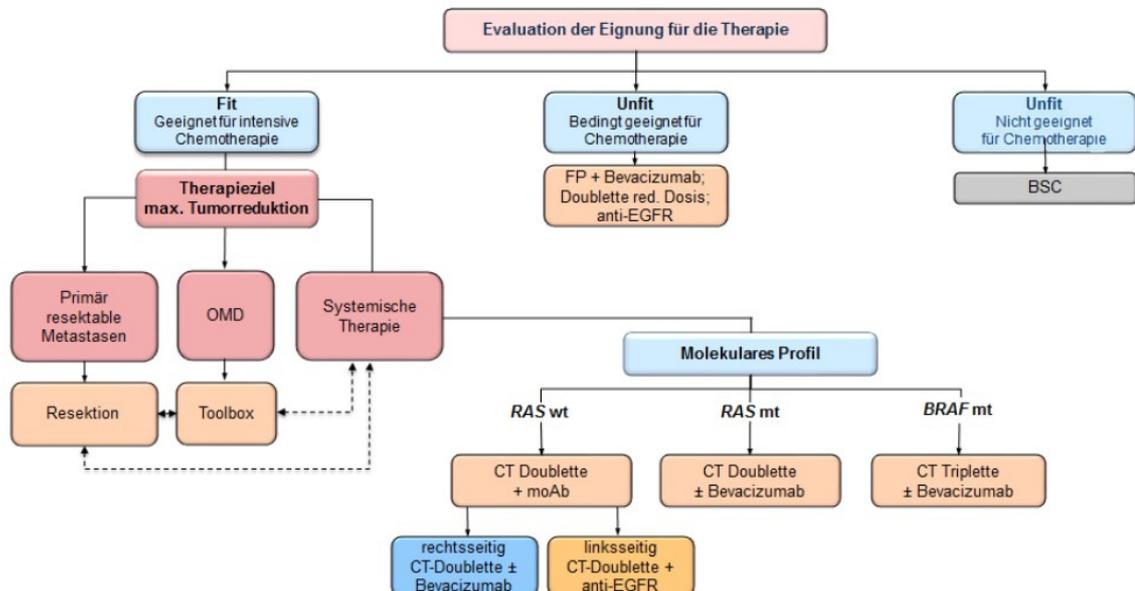


Abbildung 1: Therapiealgorithmus Erstlinientherapie des mKRC (AWMF und Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2019); Doublet: Kombination von Fluoropyrimidin (FP) plus entweder Oxaliplatin oder Irinotecan; Triplet: Kombination von 5-FU plus Oxaliplatin plus Irinotecan; Anti-EGFR-AK: Antikörper gegen den EGF-Rezeptor; BSC: Best Supportive Care; moAb: monoklonaler Antikörper (engl. monoclonal Antibody); OMD: Oligometastasierung (engl. oligometastatic disease).

In erster Linie werden Fluoropyrimidin-basierte Kombinationschemotherapien mit intravenösen 5-Fluorouracil (FOLFIRI, FOLFOX oder FOLFOXIRI) oder mit dem oralen Fluoropyrimidin Capecitabin mit Oxaliplatin (CAPOX) eingesetzt. FOLFOXIRI gehört zu den effektivsten Chemotherapie-Regimen, jedoch auch mit der größten Nebenwirkungsrate, so dass es nur bei gutem Allgemeinzustand eingesetzt werden sollte. Die Zugabe von

Bevacizumab, einem monoklonalen Anti-VEGF-Antikörper, führt nachgewiesen zu einer signifikanten Effektivitätssteigerung in Hinblick auf das progressionsfreie Intervall und konnte in Kombination mit 5-Fu/Irinotecan die Gesamtüberlebenszeit verlängern (Hofheinz u. a. 2018). Bevacizumab ist etablierter Standard in der Erst- und in der Zweitlinientherapie des mKRK. Jedoch zeigt sich der Vorteil dieser gezielten Therapie im klinischen als auch präklinischen Setting zeitlich begrenzt, bis sich ein erneuter Tumorprogress einstellt. Es werden zwei Arten von Resistenzen vermutet: Eine bereits bestehende, intrinsische Resistenz und eine Art Ausweichresistenz, die sich im Rahmen der Therapie entwickelt. Es wird vermutet, dass der Tumor alternative Wege aktiviert zur Aufrechterhaltung des Tumorwachstums (Bergers und Hanahan 2008).

3.2. Tumorangiogenese und proangiogene Faktoren

Als Angiogenese bezeichnet man das Wachstum von neuen Blutgefäßen durch Aussprossung und Abspaltung aus vorhandenen Blutgefäßen. Die Neubildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen dagegen wird als Vaskularisation bezeichnet (Weingärtner 2020). Fördernde und hemmende Faktoren befindet sich unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht und ist nur während der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung oder im Rahmen des weiblichen Zyklus zugunsten der Gefäßbildung verschoben. Krebstumore ab einer Größe von 3 mm können seine Zellen durch Diffusion nicht mehr versorgen. Durch aktivierende Faktoren wie Hypoxie, Zytokinen und Onkogenen wird eine Kaskade mit Überexpression von proangiogenen Faktoren aktiviert und die Gefäßneubildung initiiert. Die Einsprossung von Kapillaren in den Tumor wird als „Neoangiogenese“ bezeichnet (Hossfeld u. a. 2001). Das zeitlich begrenzte Ereignis von der avaskularisierten Hyperplasie zum vaskularisierten Tumor und folgender Tumorprogression durch Überschuss von proangiogenen Faktoren wird als „angiogener switch“ bezeichnet (Bäriswyl und Christofori 2009). Primär erfolgt bei der Tumorneoangiogenese die Aktivierung der Endothelzellen vorhandener Blutgefäße, was zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität führt. Zudem beginnen sich die Endothelzellen durch Mitogene zu teilen und produzieren eiweißspaltende Enzyme (Matrixmetalloproteasen). Folgend kommt es zur Wanderung der Endothelzellen in Richtung Tumor, wobei auf diesem Weg durch die Matrixmetalloproteasen extrazelluläres Material abgebaut wird und „Röhren“ entstehen, welche Anschluss an das Gefäßsystem finden. Diese Aktivierung, Proliferation und Migration wird durch mehrere Mediatoren vermittelt, wobei bFGF (engl. basic fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) die Hauptwachstumsfaktoren darstellen. Weitere wichtige Wachstumsfaktoren sind z. B. EGF (Epidermal Growth Factor), PlGF (Placental Growth Factor), IL-8 (Interleukin-8), TNF-alpha (Tumor Necrose Factor alpha), Ang-1 und Ang-2. Die Prognose

von Tumorerkrankungen hängt von der Fähigkeit zur Gefäßneubildung des Tumors ab. In der Tumorhistologie kann das Ausmaß der Neoangiogenese bestimmt werden durch immunhistochemische Anfärbung von Antigenen, die durch die Endothelzellen der Kapillaren gebildet werden, wie z.B. CD31, CD34 oder des Von-Willebrand-Faktor. Cluster of Differentiation 31 (CD31) ist ein Transmembran-Glykoprotein, welches auch als PECAM-1 (Thrombozyten-Endothelzelladhäsionsmolekül 1) bezeichnet wird und u. a. Bestandteil der endothelialen interzellulären Verbindung ist und somit ein sensitiver und spezifischer Marker für die endotheliale Differenzierung (Pusztaszeri, Seelentag, und Bosman 2006). Beim Mamma-, Bronchial-, Prostata- oder Harnblasenkarzinom und Gliom konnte gezeigt werden, dass die Zahl der angefärbten Kapillaren pro Gesichtsfeld mit dem Langzeitleben reziprok korreliert. Andere Untersuchungen im Nierenzell-, Ovarialkarzinom und Non-Hodgkin-Lymphom zeigten einen Zusammenhang zwischen der VEGF-Serumkonzentration und dem Tumorstadium und Prognose (Hossfeld u. a. 2001). Hier liegen therapeutische Angriffspunkte, wie die Hemmung von Wachstumsfaktoren, z. B. von VEGF, EGF oder Ang-2. Andere Studien beschäftigen sich mit der Vermeidung von Hypoxie als Initiator für die Überexpression an angiogenen Faktoren.

3.2.1. VEGF

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist strukturell mit der Familie der PDGFs (Platelet-derived-Growth-Faktoren) verwandt, welche einen mitogenen Einfluss besitzen und zentrale Regulatoren der Angiogenese sind. 5 Mitglieder der VEGF-Familie sind im Säugetiergenom kodiert: VEGF-A, -B, -C, -D und PlGF (Placenta Growth Faktor). VEGF-A, oft nur VEGF genannt, als Hauptfaktor reguliert über Bindung an zwei Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (VEGFR-1 und VEGFR-2) die Endothelproliferation, Migration und Gefäßpermeabilität. Dabei zeigt VEGFR-2 (oder auch Flk-1/KDR) eine erhöhte Aktivität gegenüber proangiogenen Signalen. Der lösliche VEGFR-1, auch Flt-1 (Fms-like Tyrosinkinase-1) genannt, wirkt dagegen inhibierend. Der VEGFR-3 reguliert die Lymphangiogenese (Shibuya 2013). VEGFR-2 gilt als Hauptakteur in der Gefäßbildung. Bereits in der Embryonalentwicklung spielt die Angiogenese durch VEGF und seine Rezeptoren eine maßgebliche Rolle. Es zeigte sich, dass Mausembryonen mit inaktivierten VEGF-Rezeptor-2 frühzeitig im Uterus verstarben (Ferrara u. a. 1996). VEGF ist mittlerweile ein Hauptziel in der antiangiogenen Therapie und klinischer Standard beim metastasierten KRK. Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A (siehe Abb. 2), durch dessen Neutralisierung eine Tumorangiogenese verhindert werden soll und wurde in Europa 2005 (USA 2004) für die Therapie des mKRK zugelassen. Mittlerweile ist Bevacizumab auch bei fortgeschrittenem Lungen-, Brust-, Nierenzell- und Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs zugelassen (Maucher 2020) und in der Augenheilkunde als Off-Label-Use zur Behandlung der

feuchten altersabhängigen Makuladegeneration. Studien haben gezeigt, dass die Zugabe von Bevacizumab zur Chemotherapie das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Intervall verlängert bei metastasierten soliden Tumorerkrankungen (Amit u. a. 2013). Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit ist eine vollständige Therapie des mKRK nicht in allen Fällen möglich. Laut (Bergers und Hanahan 2008) werden zwei Resistenzpfade gegen den VEGF-Inhibitor postuliert. Einerseits die intrinsische (vorbestehende) Resistenz und andererseits die adaptive Resistenz. Bei der vorbestehenden Resistenz fehlt jegliche vorteilhafte Wirkung der Therapie, also weder das Stabilisieren noch das Schrumpfen eines Tumors oder eine Verbesserung der Lebensqualität. Im Rahmen der adaptiven Resistenz umgeht der Tumor die therapeutische Blockade nach anfänglicher Reaktion durch neue induzierte Mechanismen der Neoangiogenese. Ein Mechanismus ist die Hypothese der Hochregulierung proangiogener Signalwege, wie der der Angiopoietin-Familie.

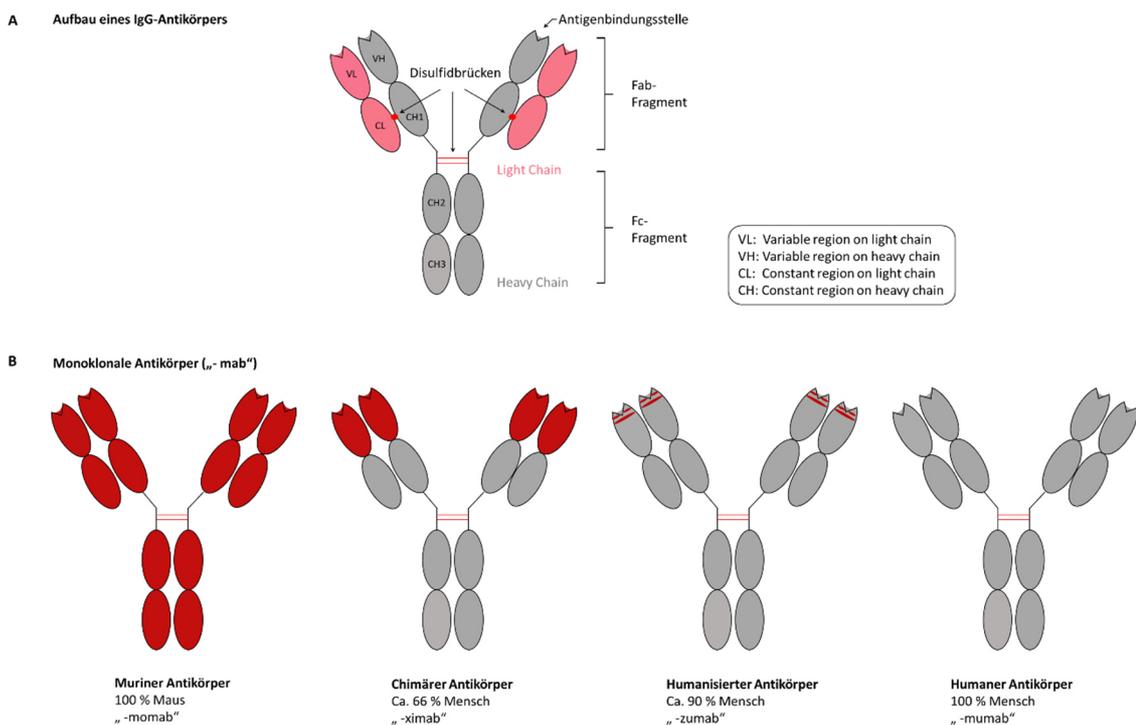


Abbildung 2: Aufbau und Entwicklung therapeutischer Antikörper. Eigene Darstellung auf Grundlage von Wohlgemuth und Li 2012. Darstellung eines Antikörpers mit 2 schweren Ketten (grau) und zweit leichten Ketten (rosa), die durch Disulfidbrücken verbunden sind (A). Die variablen Regionen der Fab-Fragmente beinhalten die Antigenbindungsstellen. Die Entwicklung therapeutischer Antikörper (B) von einem murinen Antikörper bis zu einem humanen Antikörper. Je geringer der Maus-Anteil ist, umso besser ist die Wirksamkeit und geringer die Immunogenität.

3.2.2. Ang-2

Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2) sind Liganden der Tie-2-Rezeptor-Tyrosinkinase, welche auf Gefäßendothel exprimiert werden. Ang-1 wirkt als Agonist auf den Tie-2-Rezeptor und wird von Perizyten, Muskelzellen und Fibroblasten gebildet. Es fördert die Bildung von Perizyten und glatten Muskelzellen und dient als Reifungsfaktor bzw. stabilisiert reife Gefäßsysteme. Im Gegensatz dazu dient Ang-2 als Antagonist des Tie-2-Rezeptors, in dem es die Ang-1-abhängige Tie-2-Aktivierung blockiert. Er dient als Destabilisierungsfaktor, der das Gefäßsystem für das Austreiben, auch unter Hilfe anderer angiogener Zytokine (wie z. B. VEGF), zugänglich macht (Kienast u. a. 2013). Es wurde gezeigt, dass sich die Expression von Ang-1:Ang-2 zugunsten von Ang-2 in Neoplasien verschiebt (Tait und Jones 2004). In unterschiedlichen Tumoren wurde eine erhöhte Ang-2-Expression nachgewiesen, was mit einer schlechteren Prognose einherging, so dass es ein Hauptakteur im „angiogenen switch“ bei der Tumorprogression zu sein scheint und ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt (Kienast u. a. 2013). Aufgrund dieser Annahme wurde in einer Studie zur Behandlung des mKRC nachgewiesen, dass unter der Therapie mit Bevacizumab ein niedriger Ang-2-Serumspiegel zu einer besseren Ansprechrate, ein längeres progressionsfreies Intervall und niedrige Mortalität führt (Goede u. a. 2010).

3.2.3. CrossMab

Aufgrund der Annahme von Fluchtwegen im Rahmen der VEGF-Therapie soll die kombinierte Therapie durch die gleichzeitige VEGF- und Angiopoietin-Hemmung zur Überbrückung eines Resistenzmechanismus ein besseres Ansprechen der antiangiogenen Behandlung bewirken. Die primäre Kombination zweier unterschiedlicher Antikörper durch Fusion zweier Hybridomzelllinien zur Erzeugung monospezifischer, bivalenter Antikörper mit den entsprechenden Spezifitäten („Quadroma-Technologie“) ergab ein untrennbares Gemisch fast identischer Antikörpern mit nur geringem Anteil des gewünschten bispezifischen Antikörpers (Schaefer u. a. 2011). Um unerwünschte Nebenprodukte zu verhindern wurde von der Firma Roche und anderen die CrossMAB-Technologie entwickelt, bei der die schweren Ketten zweier Antikörper durch die KiH („Knobs-in-Hole“) Methode assoziiert werden, sowie die spezifische Bindung der Leichtketten an ihre verwandten Schwereketten durch Austausch der Leichtketten- und Schwereketten-domänen innerhalb der Antigenbindungsfragmente (Fab), (siehe Abb. 3). Diese Methode erzeugt vorhandene Antikörper in ein bispezifisches IgG-Format, bei dem beide Fab-Arme an jeweils einem Target spezifisch binden (Klein, Schaefer, und Regula 2016; Schaefer u. a. 2011). Vanucizumab ist ein humanisierter bispezifischer IgG1-Antikörper (Anti-Ang-2-VEGF CrossMAB), vgl. Abbildung 2. Er trägt das ursprüngliche unmodifizierte Bevacizumab-Fab und

den Ang-2(LC06) -Arm, ein Fab mit einem CH1-CL-Domänen-Crossover (vgl. Abbildung 3, C). Bereits in präklinischen Studien zeigten murinierte bispezifische Surrogat-CrossMabs in humanen Tumor-Xenotransplantaten eine antitumorale Wirksamkeit (Kienast u. a. 2013). Vanucizumab wurde 2012 zum ersten Mal in klinischen Studien verwendet (Klein u. a. 2016).

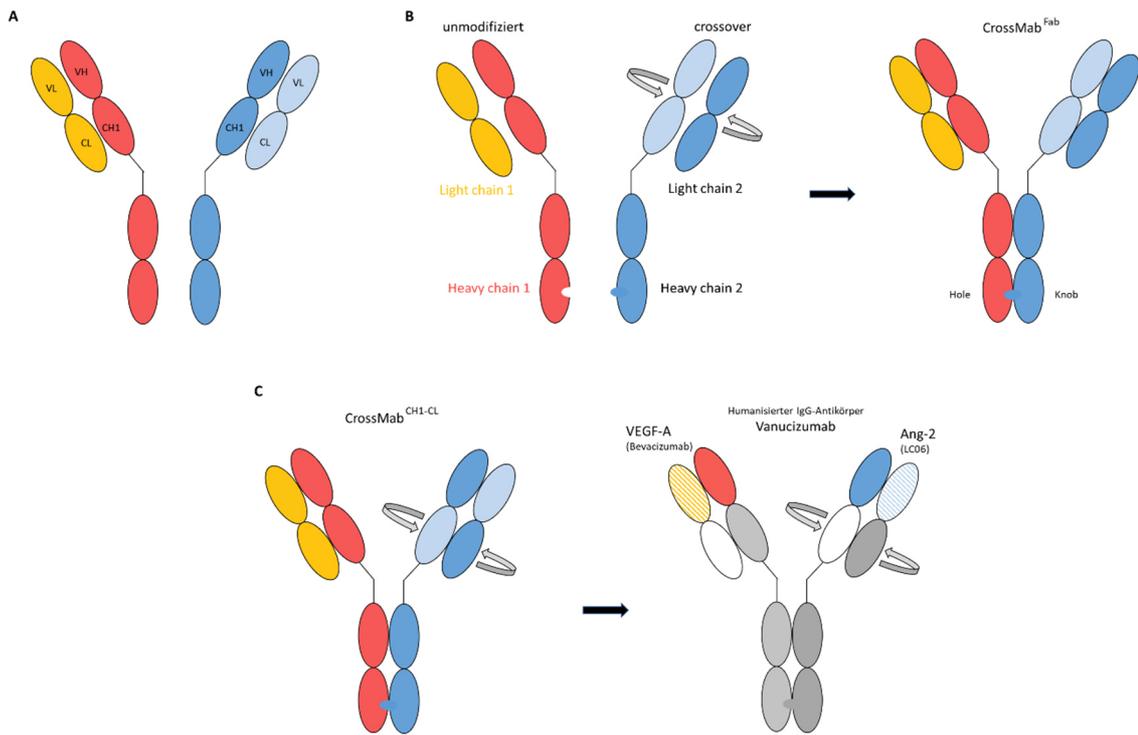


Abbildung 3: Darstellung der Bildung eines bispezifischen Antikörpers und Ableitung der Herstellung des humanisierten IgG Vanucizumab. Eigene Darstellung modifiziert nach Schaefer u. a. 2011; Klein u. a. 2016. Allgemeiner Aufbau eines zukünftigen bispezifischen Antikörpers (A). Entwurf der 4 Ketten des bispezifischen Antikörpers und Heterodimesierung der schweren Ketten durch die Koble-in-Hole (KiH)-Technologie zu einem CrossMab^{Fab} mit den vollständigen VH-CH1- und VL-CL-Domänen (B). Bei Austausch der alleinigen CH1- und CL-Domäne entsteht CrossMab^{CH1-CL} (C). Auf dessen Grundlage wird Vanucizumab hergestellt: Nur die variablen Regionen haben noch murine Antigenbindungsstellen mit den bispezifischen Bindungen für VEGF-A und Ang-2, die restlichen Regionen sind menschlich (Austausch der CH1- und CL-Domäne am Ang-2).

4. Ziele der Arbeit

Die Behandlung des mKRK mit einem VEGF-Inhibitor und Chemotherapie ist eine klinische Standardtherapie. Ein Problem ist die Beobachtung von Resistenzen gegenüber der Chemotherapie und das begrenzte Ansprechen auf VEGF-Inhibitoren aufgrund angiogener Fluchtwege (de Gramont u. a. 2012; Haibe u. a. 2020; Itatani u. a. 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand von drei vorklinischen Studien die Auswirkung einer zusätzlichen Hemmung des Wachstumsfaktors Angiopoietin-2 untersucht. Hierzu wurde die kombinierte Hemmung von VEGF- und Angiopoietin-2 auf die Tumorangiose und Metastasierung im Vergleich zu einer Einzelbehandlung in einem vorklinischen Xenograftmodell beobachtet. Zur Kombinationstherapie der VEGF-/Ang-2-Inhibition (Co-Targeting) wird in den Studien der bispezifische Antikörper „CrossMab“ der Firma Roche verwendet.

Weiterhin erfolgte eine immunhistologische Aufarbeitung der Tumore der unterschiedlichen Therapiereihen, um zu klären, ob unterschiedliche histologische Merkmale bei unterschiedlichem Therapieansprechen zu beobachten sind.

Ein erster Ansatz zur Klärung der Metastasierung zeigte sich unter Zuhilfenahme des Multispektral-Fluoreszenz Imaging.

Zusammenfassung der Ziele:

1. Welche Wirksamkeit hat die kombinierte Hemmung von VEGF und Ang-2 im Vergleich zur Monotherapie mit einer VEGF-Inhibition?
2. Welche Wirksamkeit hat die kombinierte Therapie aus Chemotherapie und CrossMab auf das Tumorwachstum am Xenograftmodell?
3. Wie unterscheidet sich die Wirksamkeit der Therapie in verschiedenen humanen Tumorzelllinien?
4. Das KRK metastasiert häufig in die Lungen. Welchen Einfluss hat eine Angiopoietin-2 - Inhibition bzw. das Co - Targeting auf die Metastasierung der Lungen?
5. Zeigen sich histologische Unterschiede in der Angiose in den Tumoren zwischen den Therapiegruppen.
6. Welche Nebenwirkungen ergaben sich aus den unterschiedlichen Therapien.

5. Material und Methodik

5.1. Allgemeiner Versuchsablauf

5.1.1. Materialien

Zur Behandlung der Xenotransplantate in Mäusen wurden spezifische IgG-Antikörper gegen VEGF und Ang-2 als Single-Targeting verwendet, sowie der chimäre monoklonale Antikörper „CrossMab“, zur gleichzeitigen Bindung von Ang-2 oder VEGF.

Table 3: *Verwendete Antikörper und Chemotherapie in den Tierstudien*

Antikörper/Chemotherapie	Dosierung	Hersteller
Anti-VEGF-Antikörper:	10 mg/kg KG	RO6872895
Chimärer Maus-IgG2a-mAB basierend auf mAB B20-4.1		Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland)
Anti-Ang-2-Antikörper:	10 mg/kg KG	RO6872894
Chimärer Maus-IgG2a-mAb basierend auf mAB LC06		Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland)
Bispezifisches Anti-Ang-2-VEGF- CrossMab:	10 mg/kg KG	RO6872840
Chimäres Maus-IgG2a basierend auf LC06 + B20-4.1		Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, Deutschland)
Irionotecan	50mg/kg KG	Irinotecan-Hydrochlorid, 20 mM in NaCl (Sigma Aldrich)
5-Fluorouracil	30 mg/kg KG	50 mM in NaCl (Sigma Aldrich)
PBS	150 µl	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA

5.1.2. Methode

Nach Kultivierung der KRK-Zelllinien DLD-1, HT-29 und HT-29 FUPW erfolgte die Generierung von subkutanen Xenotransplantat-Tumoren. Dazu wurden 5 Mio. Zellen (in 150 µl PBS) einer Zelllinie mit einer 1 ml – Feindosierspritze und 27 G Kanülen (BD Medical, Heidelberg, Deutschland) in die rechte Flanke männlicher Nacktmäuse geimpft, so dass eine kleine subkutane Blase sichtbar wurde. Anschließend erfolgte die engmaschige Kontrolle des Zustandes der Mäuse und des Tumorwachstums 2-3 x wöchentlich, bei großen Tumoren oder

Auffälligkeiten auch täglich. Dazu erfolgte die Beobachtung des Verhaltens sowie die Messung des Gewichtes. Das Tumorwachstum wurde in jeder Studie mittels Volumenmessung durch einen Messschieber ermittelt und anhand der Formel $V = a^2 \times b \times \pi/6$ (V: Tumolvolumen, a: Tumorbreite als die kürzere Dimension, b: Tumurlänge als die größere Dimension) errechnet (Tomayko und Reynolds 1989). Zusätzlich erfolgte in Studie 1 die Beobachtung des Tumorwachstums der Zelllinie HT-29 FUPW mit Hilfe der Ermittlung der Fluoreszenzintensität durch das Multispektral-Fluoreszenzimaging. 2 - 3 Wochen nach Zellsetzung haben sich die Tumore entwickelt und es erfolgte eine Gruppierung der Mäuse mit gleichen mittleren Tumorgößen, so dass in jeder Gruppe große, mittlere und kleine Tumore zu finden waren. Die Mäuse wurden am Ohr zur Unterscheidung markiert. Die Mäuse wurden je nach Box und Anzahl der Mäuse pro Box benannt (z. B. Maus „A2“ ist die zweite Maus (Ohrmarkierung) aus Box A), so dass sie den Therapien zugeordnet werden konnten. Anschließend erfolgte einmal wöchentlich die intraperitoneale Injektion der jeweiligen Therapie (Anti-Ang-2, Anti-VEGF, CrossMab, Chemo, PBS). In den jeweiligen Studien werden die Therapien spezifisch erläutert. Die Chemotherapie erfolgte als Kombination aus 5-FU/Irinotecan mit 30 mg/kg KG. Die Antikörper wurden in einer Dosis von 10 mg/kg KG als Monotherapie oder in Kombination mit der genannten Chemotherapie verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt PBS-Injektionen. Nach Eintritt der Abbruchkriterien erfolgte die Tötung der Mäuse durch CO₂ oder zervikaler Dislokation. Anschließend wurden die Tumore entnommen, in 5% Formalin fixiert und für histologische Analysen aufgearbeitet. Zur Übersicht erfolgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Immunhistochemisch wurden die Präparate auf ihre Gefäßdichte (CD31), den Leukozyteneinstrom (CD45), sowie Unterschiede in den Expressionen von VEGF und seinem Rezeptor (VEGF-R 2), Ang-2 und Tie-2 untersucht. Den Mäusen mit dem Xenotransplantat aus der Zelllinie HT-29 FUPW wurden ergänzend die Lungen entnommen und im Fluoreszenzimaging ex vivo auf Metastasen durch Messung der Fluoreszenzintensität untersucht.

5.2. Verwendete Zelllinien und Zellkultivierung

5.2.1. Zelllinien

Die in den Xenograftmodellen wurden die humanen KRK-Zelllinien DLD-1 und HT-29 verwendet. DLD-1 gilt als chemoresistent und ist daher für die Beurteilung neuer Therapieansätze zur Überbrückung von Resistenzen geeignet. Weiterhin wurde der Zellklon HT-29 FUPW verwendet, der in der KIM IV der AG Müller generiert wurde. HT-29 FUPW wurde aus dem Wildtyp der KRK-Zelllinien HT-29 durch Markierung mit dem tiefrot fluoreszierenden Protein mPlum generiert (Caysa u. a. 2012).

Tabelle 4: Zelllinien zur Erstellung der Xenotransplantate

Zelllinie	Ursprung	Referenz (nach der American Type Culture Collection)
DLD-1	Humane CRC Zelllinie	ATCC - Nr. CCL-221
HT-29	Humane CRC Zelllinie	ATCC - Nr. HTB-38
HT-29 FUPW	HT-29 mit transduziertem FP mPlum	generiert durch (Caysa u. a. 2012)

5.2.2. Zellkultur

Die Kultivierung der KRK-Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen von etwa 25 cm² Bodenfläche unter Standardbedingungen im Brutschrank (Temperatur 37 °C, CO₂-Gehalt 5%, Luftfeuchtigkeit > 95%) und tägliche lichtmikroskopische Kontrollen. Das Wechseln des auf 37 °C angewärmten Zellkulturmediums (RPMI-1640 [Sigma Aldrich], 10 % Fetales Kälberserum [Biochrom AG, Berlin; DE], 1 % Penicillin/Streptomycin [100x Stammlösung Biochrom AG] erfolge ca. aller 2 Tage. Jedes öffnen der Flaschen wurde unter sterilen Bedingungen an Laminar Flow-Werkbänken durchgeführt. Nach Erreichen einer Dichte des Monolayers von 90-100 % erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und mit PBS 1 % gewaschen. Nach dessen Entfernung erfolgte die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden. Nach mikroskopischer Kontrolle und vollständiger Ablösung erfolgte die Zugabe von 3 ml Nährmedium, welches die Proteinasewirkung stoppt. Anschließend erfolgte der Übertrag von 1-2 ml dieser Suspension in eine neue Flasche mit Zugabe von frischem Medium (8-9 ml), so dass ¼ bzw. ½ der Zellen weitergeführt wurden. Die Kontrollen der Zellen bezüglich Anzahl und Zustand erfolgen durch eine Neubauer-Zählkammer.

5.3. Versuchstiere

Aufgrund der Tierversuche erfolgte ein einwöchiger Kurs zum Erwerb von Kenntnissen und Fähigkeiten und die Genehmigung der Studien durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Referat für Veterinärangelegenheiten. Für die Studien wurde die immundefiziente athymische Nacktmaus (Athymic Nude-Foxn1^{nu}, Fa. Charles River Laboratories) verwendet. Aufgrund einer genetischen Mutation besitzt diese Art von Mäusen keine Thymusdrüse und können nur eine reduzierte Zahl von T-Zellen bilden, was zu einem unvollständigen Immunsystem führt. Infolge dessen zeigen sie keine Abstoßungsreaktion gegenüber

Tumorzellen und werden daher bevorzugt in Krebsstudien eingesetzt. Zudem besitzen sie keine Behaarung, weshalb sich Tumore gut identifizieren lassen. Die Versuche wurden gemäß den örtlichen Richtlinien durchgeführt.

5.4. Multispektral-Fluoreszenz Imaging (msFI)

5.4.1. Geräte und Software

Es wurden folgende Geräte und Programme verwendet:

1. Maestro™ in vivo Fluorescence Imaging System (CRi, Woburn, MA., USA)
2. Maestro™ Software Version 2p22 (Update 2.4.3) und Compare images (Version 2.10.0)
3. Gelber Filtersatz (Abk. ye): Anregungsfilter 575 - 605 nm, Emissionsfilter 645 nm LP (Emissionslangpassfilter), Aufnahmebedingungen 630 - 850 nm

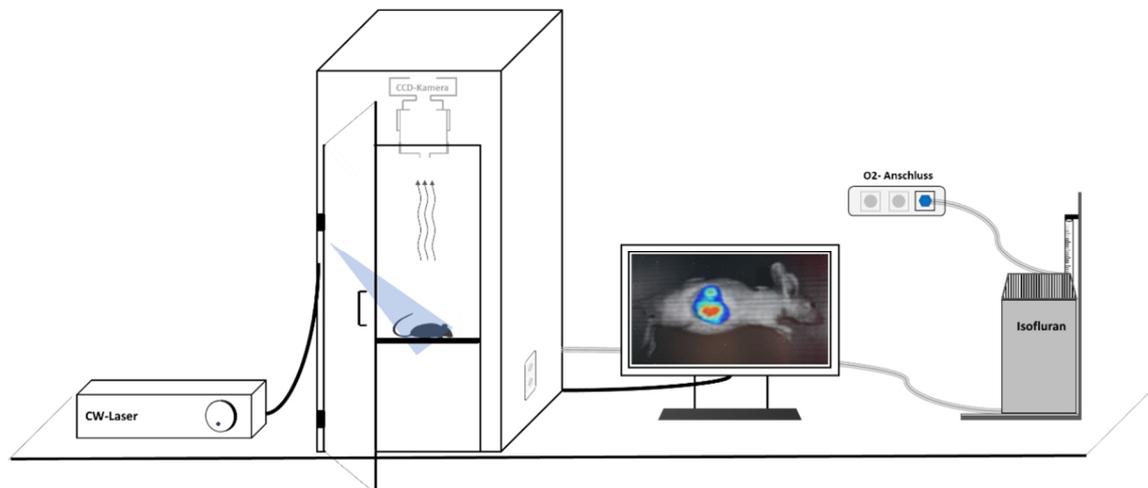


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau der in vivo Fluoreszenzbildgebung. Eigene Darstellung.

5.4.2. Methode

Für die in vivo Fluoreszenzbildgebung wird das rot fluoreszierende Protein (RFP) mPlum in den Tumorzellklon HT-29 FUPW durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Dabei werden Photonen absorbiert und Elektronen der Moleküle des RFP in ein energetisch höheres Orbital gehoben, also angeregt. Fallen sie von dort auf ihr ursprüngliches Niveau zurück, wird die freiwerdende Energie als Wärme und Photonen (Fluoreszenzlicht) abgegeben. Das Fluoreszenzlicht (Emissionslicht) ist aufgrund der Energieaufteilung, also der Wärmeabgabe, energieärmer und besitzt eine größere Wellenlänge. Bei der msFI wird dieses Signal aufgefangen und soll von der Autofluoreszenz getrennt werden. Für verschiedene

Fluorophosphore benötigt man demnach verschiedene Filter, um die Spektren voneinander zu trennen. Dazu wird ein Schmalbandanregungsfilter in Kombination mit einem Langpassemissionsfilter verwendet, was Aufnahmen verschiedener definierter Wellenlängen ermöglicht. Für mPlum wurde der gelbe Filter mit dem definierten Wellenlängenbereich benutzt (Anregungslicht mit der Wellenlänge 575-605 nm, Emissionswellenlänge 645 nm). Mit der Maestro Software lassen sich anschließend die Fluoreszenzsignale isolieren. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die msFI-Messungen erfolge in Kurznarkose durch ein Isoflurangasnarkosesystem (Fa. Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland). Dazu wurden die Tiere auf eine schwarze, nicht fluoreszierende Wärmeplatte bei 35°C gelegt, um ein Auskühlen zu verhindern. Der Sauerstoffzustrom erfolgte konstant bei 2-3 l/min. Zur Narkoseeinleitung wurde eine Isoflurankonzentration von 2,5 % verwendet und zur weiteren Narkoseaufrechterhaltung 0,8 – 2,0 %. Für die Mauseaufnahmen wurde der Probenstisch (Stufe 1C) und die Lampenposition (Position 2) in Stellung gebracht, damit die Maus voll erfasst und ausgeleuchtet wird. Anschließend wurde mit Weißlicht zunächst ein Graustufenbild aufgenommen (Gelber Filter mit 30 ms), dann folgte die Umschaltung auf das Anregungslicht. Die optimale Belichtungszeit wurde automatisch gemessen. Die Aufnahme der gesamten spektralen Daten erfolge als „Cube“ und wurden anschließend in einzelne Fluoreszenzsignale aufgetrennt. Im Programm sind Bibliotheken hinterlegt, die die Referenzspektren - und auch die Spektren der Autofluoreszenz - zum Vergleich beinhalten (Caysa u. a. 2012). Nach dem Auftrennen wird ein zusammengesetztes Bild mit den für die Spektren definierten Farben generiert. Die Software stellt nach Feststellung der Fläche die Gesamtfluoreszenzintensität FI [counts/s] als Summe der in der Fläche enthaltenden Pixeleinzelsignale zur Verfügung. Bei unterschiedlichen Belichtungszeiten der zu vergleichenden Cubes, müssen diese auf eine Belichtungszeit normiert werden (Caysa u. a. 2012).

5.5. Histologie

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte wurden folgende Materialien und Antikörper verwendet:

5.5.1. Material

Tabelle 5: *Verwendete Materialien für die Histologie*

Material	Firma
Aqua dest.	B. Braun, Meslungen, Deutschland
Target Retrieval Solution, Citrate pH 6,1, ready to use	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS) 10x	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
2-Propanol	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Luis, USA
Roti®-Histol	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Dual Endogenous Enzyme Block	Dako North America Inc., Carpinteria, CA
Albumin Fraktion V, endotoxin-geprüft (zur Herstellung von BSA)	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Paraffinstift	Dako, DK-Glostrup, Denmark
DAB + Substrate Chromogen System	Dako North America Inc., Carpinteria, CA
Hämatoxylin ready to use	Dako, DK-Glostrup, Denmark
Roti®-Histokitt	Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

Tabelle 6: *Verwendete Antikörper für die Immunhistologie*

Primärer Antikörper	Konzentration, Inkubationsbedingung	Firma
CD 31	1:100, 3 h bei RT	Abcam, ab28364
CD 45	1:40, 3 h bei RT	BD, 550539
Ang-2	1:20, 3 h bei RT	R&D Systems, AF623
VEGFA-20	1:50, 3 h bei RT	Santa Cruz, sc-152
Tie-2	1:100, 18 h bei 4 °C	Santa Cruz, sc-9026
VEGF-R 2	1:600, 18 h bei 4 °C	Cell Signaling, #2479
Sekundärer Antikörper		
Anti-rabbit IgG, biotinyliert	1:800, 1 h bei RT	Santa Cruz, sc-2040
Anti-rat IgG, biotinyliert	1:800, 1 h bei RT	Santa Cruz, sc-2041
Anti-goat IgG, biotinyliert	1:800, 1 h bei RT	Santa Cruz, sc-2042
Verstärker		
Streptavidin/HRP	1:1660, 30 min bei RT	Dako North America Inc., Carpinteria, CA

Abk: Raumtemperatur (RT)

5.5.2. Methode

Bearbeitung und Anfertigung histologischer Schnitte

Nach Exzision der Xenografte und Formalinfixierung über 48 h erfolgte die automatische Dehydratation der Proben im Entwässerungsautomat, sowie die Einbettung in Paraffin zu Paraffingewebeblöcke am Microm EC350-1, Geräte der Firma Thermo Scientific, im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I. Anschließend wurden die Blöcke am Rotationsmikrotom RM 2245 (Leica, Wetzlar, Deutschland) in 4 µm dicke Serienschnitte in unterschiedlichen Ebenen angefertigt. Im Wasserbad erfolgte die Streckung der Schnitte von wo sie dann auf die Objektträger (Menzel-Gläser Superfrost, Thermo Scientific) gezogen und bei Raumtemperatur getrocknet und aufbewahrt wurden.

Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Die Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) erfolgte nach dem etablierten Standardprotokoll des Labors. Dazu wurden die Paraffinschnitte eine Stunde bei 50 °C im Wärmeschrank angeschmolzen und anschließend sofort in einer absteigenden Alkoholreihe je 5 min. entparaffiniert und gewässert (2 x Roti®-Histol → 2-Propanol → Ethanol 96 % → 80 % → 70 % → 50 % → bidest. Aqua). Dann erfolgte über 30 s die Färbung mit Hämatoxylin und 2 x 5 min Bläuen mit Leitungswasser. Nach kurzem Waschen in Aqua dest. erfolgte die Färbung mit 0,1% Eosinlösung (nach Verdünnung und Ansäuerung mit Essigsäure) für 5 min. Nach dem Waschen in Aqua dest. über 2 min erfolgte die Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (bidest. Aqua → Ethanol 50% → 70% → 80% → 96% → 2-Propanol → 2 x Roti®-Histol), wobei die Schritte bis zum 2-Propanol schneller erfolgten (ca. 10 s) um ein Entfärben zu vermeiden. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Histokitt eingedeckelt. Anschließend wurden die Schnitte alle mit gleichem Linsen-Präparat-Abstand fotografiert.

Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung (IHC) erfolgte ebenfalls gemäß Protokoll unter Beachtung der verschiedenen Antikörperkonzentrationen nach Herstellerangaben. Nach vorausgehender Testung erfolgten die Konzentrationen gemäß der Tabelle 6. Zunächst wurden die Paraffinschnitte erneut in absteigender Alkoholreihe entparaffinisiert, gewässert und anschließend im Target-Retrieval-Solution bei 95 °C für 30 min demaskiert um Epitope zurückzugewinnen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) wurden die Schnitte in PBS gewaschen und kurz in Aqua dest. gehalten. Dann erfolgte der Peroxidaseblock (Dual Endogenous Enzyme Block) in der feuchten Kammer über 15 min bei RT, erneutes Spülen mit PBS und blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 3 % BSA (Bovines Serum Albumin in PBS) für 20 min. Im nächsten Schritt erfolgte nach kurzem Spülen mit 1% BSA die Inkubation der primären Antikörper in 1 % BSA mit der Konzentration und Zeitangabe nach Tabelle 6 . Zur Kontrolle wurde bei jedem Durchgang ein Schnitt nur mit 1 % BSA ohne Primärantikörper mitgeführt. Folgend wurden die Schnitte erneut in PBS für 3 x 10 min gespült und anschließen mit dem sekundären, biotinylierten Antikörpern in PBS für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS über 3 x 10 min erfolgte die Inkubation der Schnitte über 30 min mit Streptavidin/HRP-Konjugat in PBS um später die biotinylierten Antikörper nachweisen zu können. Für die braune Färbung des Zielantigens erfolgt nach Verwendung von HRP („Horseradish-Peroxidase“) im vorherigen Schnitt nun die Anwendung von DAB + Substrate Chromogen Systems durch Auftropfen über 5 min bei RT. Um überschüssiges Chromogen zu entfernen erfolgte das Eintauchen in Aqua dest. Anschließend erfolgte die Färbung der Kerne

durch Hämatoxylin über 30 s und 2 x 5 min Bläuen im Leitungswasser. Nach Überführung in Aqua dest. erfolgte die Entwässerung durch die aufsteigende Alkoholreihe und Versiegelung mit Histokitt und einem Deckglas.

5.6. Statistik

Die Studienergebnisse werden in den Diagrammen als Mittelwert + Standardabweichung (SD) abgebildet. Die statistische Analyse der 3. Studie (n=10) erfolgte mittels SPSS. Die Berechnungen erfolgten durch das Institut für Epidemiologie, Biometrie und Informatik der MLU Halle-Wittenberg. Das Tumolvolumen als abhängige Variable wird an verschiedenen Zeitpunkten getestet. Der Einflussfaktor ist die Therapie. Im Levene-Test (Varianzhomogenitätstest) wurde zunächst die Verteilung an Tag 0 und zu späteren Zeitpunkten getestet. Nur an Tag 0 gab es eine Normalverteilung, so dass hier der ANOVA Post Hoc Tukey-Test angewendet wurde. Zu späteren Zeitpunkten unter Therapie variierten die Gruppen stark, so dass an Tag 18 zu Dunnett-T3 gewechselt wurde, um Gruppenunterschiede herauszuarbeiten. Nach Studienende (Tag 49) wurden noch zwei Kombinationsbehandlungen aus Antikörper und Chemotherapie miteinander mittels Students-T-Test verglichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

6. Ergebnisse

6.1. Studie 1: Beobachtung des Tumorwachstums und der Metastasierung unter Einfluss von VEGF-/Ang-2-Single-Targeting im Vergleich zum Co-Targeting anhand der Zelllinie HT-29 FUPW anhand Volumenmessung und multispektraler in-vivo-Fluoreszenzbildgebung

In dieser ersten vorläufigen Studie mit 3 Mäusen pro Gruppe wurde zunächst das Tumorwachstum als auch mögliche Nebenwirkungen der Antikörper-Therapie gegen VEGF-, Ang-2- und des neuen CrossMab-Antikörpers untersucht. In der Kontrollgruppe erfolgte die Applikation von PBS. Das Volumen wurde anhand der Formel $V = a^2 \times b \times \pi/6$ (V : Tumolvolumen, a : Tumorbreite als kürzere Dimension, b : Tumurlänge als längere Dimension) gemessen und ermittelt. Die Untersuchungen erfolgten anhand der Zelllinie HT-29 FUPW. HT-29 FUPW ist ein Zellklon aus dem Wildtyp HT-29, welcher mit einem tiefroten Fluoreszenzprotein mPlum markiert wurde (Caysa u. a. 2012). Diese lassen sich aufgrund der Spektraleigenschaften durch nicht-invasive multispektrale in-vivo-Fluoreszenzbildgebung detektieren. Somit konnte das Tumolvolumen mit der Fluoreszenzintensität verglichen werden und erste Beobachtungen zur Metastasierung zwischen den Therapiegruppen erfolgen.

Zu Beginn der Therapie (Behandlungstag 0) enthielt jede Gruppe ein ähnliches mittleres Tumolvolumen von 564 mm^3 (VEGF), 520 mm^3 (Ang-2), 548 mm^3 (CrossMab) und 516 mm^3 in der PBS-Gruppe. Am 28. Tag nach Behandlungsbeginn erreichte die erste Maus in der PBS-Gruppe bzw. der Studie das Maximalvolumen von 1500 mm^3 und die Behandlung wurde beendet (vgl. Abbildung 5). Das mittlere Tumolvolumen in der PBS-Gruppe zu diesem Zeitpunkt betrug 1246 mm^3 . In dieser Studie hatten bereits auch Tumore in der VEGF-Gruppe zu diesem Zeitpunkt ein ähnlich schnelles Wachstum mit einem mittlerem Tumolvolumen von 1160 mm^3 . 2 Mäuse hatten auch hier ein Tumolvolumen von 1470 und 1260 mm^3 , so dass die Therapie an Tag 32 beendet wurde. In der Ang-2-Gruppe und in der CrossMab-Gruppe kam es nach Therapiebeginn zunächst zu einer Remission bis zum 18. Tag mit einem mittlerem Volumen von 356 mm^3 in der Ang-2-Gruppe und 457 mm^3 in der CrossMab-Gruppe. Am Tag 28, d. h. beim Erreichen des Maximalvolumens in der Kontroll-Gruppe, hatten die Mäuse in der Ang-2-Gruppe ein mittleres Volumen von 556 mm^3 bzw. 676 mm^3 in der CrossMab-Gruppe. In der CrossMab-Gruppe erreichte die erste Maus das Tumorendvolumen am Tag 41 und die zweite am Tag 52 der Behandlung. Die dritte Maus zeigte eine komplette Tumorstase. In der Ang-2-Gruppe erreichte die erste Maus am Tag 45 nach Behandlungsbeginn ein Tumolvolumen von 1500 mm^3 , die letzte Maus an Tag 55.

Zusammenfassend zeigt sich in dieser ersten Studie ein deutlicher Therapievorteil durch die Ang-2-Hemmung und durch die Therapie mit CrossMab. Bei Erreichen des maximalen Tumolvolumens der ersten Maus der Studie aus der Kontrollgruppe, zeigte sich in der CrossMab- und in der Ang-2-Gruppe ein nur sehr geringes Wachstum. Ein Tumor der CrossMab-Gruppe ist in eine Stase übergetreten.

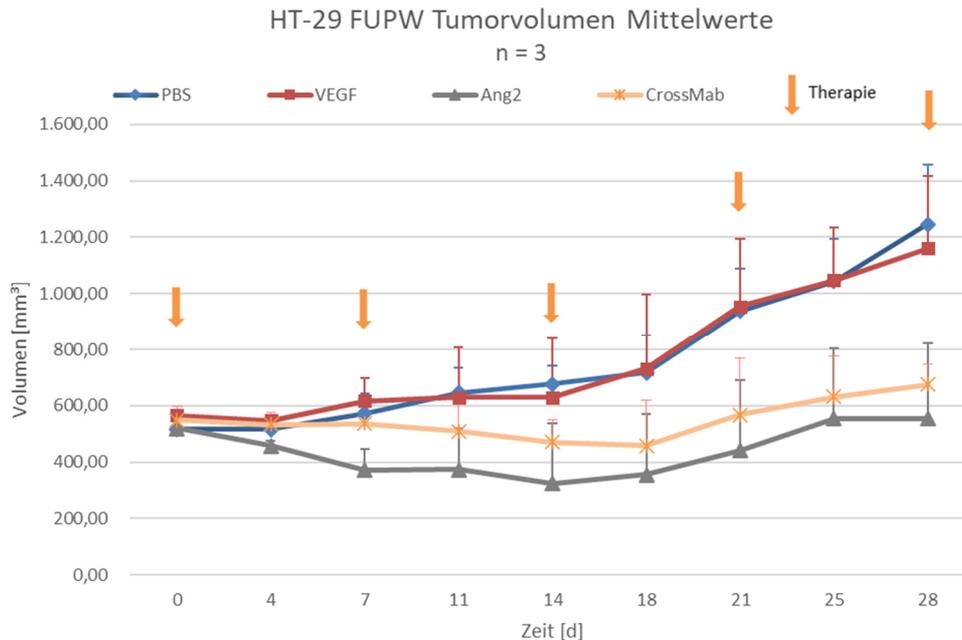


Abbildung 5: Analyse der Effekte der Antikörpertherapien auf das Tumorstadium der Zelllinie HT-29 FUPW, Studie 1. Darstellung der Tumorstadiumen als Mittelwerte ($n = 3$) bei Therapiebeginn an Tag 0 bis zum Erreichen der maximalen Größe des ersten Tumors der Studie an Tag 28 (PBS-Gruppe). Die Therapie erfolgte einmal wöchentlich (Pfeile).

6.1.1. Fluoreszenzintensität

Neben der Bestimmung des Tumorstadiums erfolgte die Auftragung der Fluoreszenzintensität, welche mittels des Maestros™ in vivo Fluorescence Imaging System bestimmt wurde. Die Messungen der Fluoreszenzintensität waren in der ersten Studienhälfte bei allen drei Antikörpern zunächst fallend. In der Ang-2-Gruppe konnte die geringste FI gemessen werden. Dagegen wurde in der PBS-Gruppe die höchsten FI gemessen. Tumore der CrossMab-Gruppe zeigen eine ähnliche, sogar höhere Fluoreszenzintensität als die VEGF-Gruppe bei geringerem Tumorstadium (vgl. Abbildung 6).

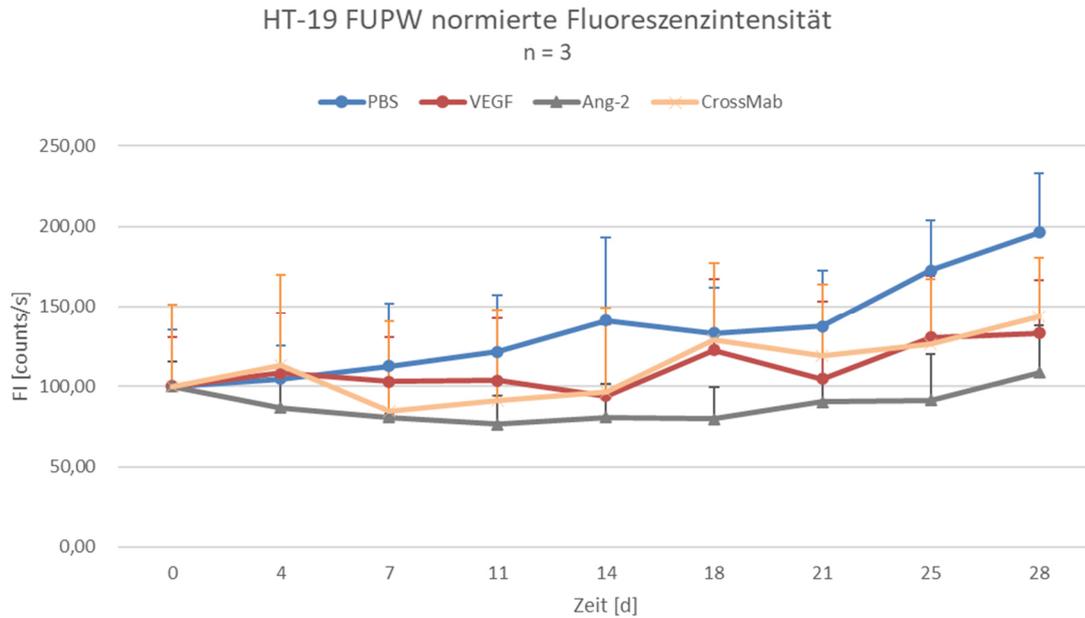


Abbildung 6: Analyse der Messwerte der Fluoreszenzintensität normiert auf die Ausgangsintensität bei Therapiebeginn an Tag 0 bis zum Erreichen des maximalen Volumens des ersten Tumors an Tag 28 (aus der Kontrollgruppe), Zelllinie HT-29 FUPW, Studie 1.

Mit zunehmender Tumorgröße wurde eine stärkere Fluoreszenzintensität gemessen (vgl. Abbildung 6). Es zeigt ein proportionales Verhalten zwischen Tumolvolumen und Fluoreszenzintensität in den allen Therapiegruppen (n=3). In der VEGF-Gruppe zeigten sich bei Größenzunahme eine stärkere Abweichung der FI zur Geraden. Ein Zusammenhang zwischen dem Tumorendgewicht und Fluoreszenzintensität war nicht ersichtlich.

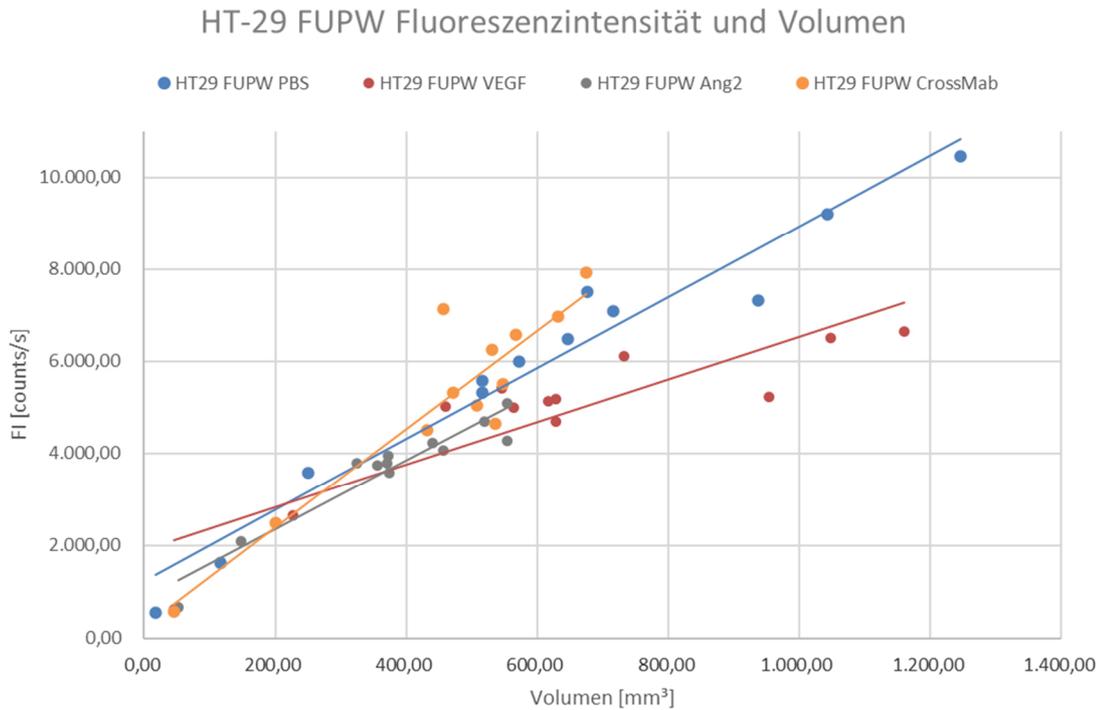


Abbildung 7: Zusammenhang Tumorzellen und Fluoreszenzintensität (FI), Zelllinie HT-29 FUPW, Studie 1. Die Tumorzellengröße korreliert mit der FI.

6.1.2. Metastasen

Nach Nekropsie wurden die Mäuse der verschiedenen Therapiegruppen auf intraabdominelle und pulmonale Metastasen untersucht (siehe folgende Tabelle 7). Hier konnten bei den Tieren der PBS-Gruppe (also die Mäuse A1, A3 ohne Therapie) und der CrossMab-Gruppe (Mäuse B1 und C1) Metastasen am Magen, Pankreas, Dünndarm, sowie auch zervikale Metastasen festgestellt werden. In der VEGF-Gruppe wurde das Wachstum eines zweiten Tumors beobachtet. In der Ang-2- Gruppe war kein makroskopischer Metastasenwachstum feststellbar. In keiner der Gruppen konnten makroskopische Lungenmetastasen gesehen werden. Nach Messung der Fluoreszenzintensität wurden größere Lungenmetastasen in zwei Mäusen aus der PBS-Gruppe und in einer Maus in der VEGF-Gruppe nachgewiesen (vgl. folgende Tabelle 8). In der Ang-2- Gruppe konnten die wenigsten Lungenmetastasen festgestellt werden. Die folgenden Tabellen stellt die Beobachtungen übersichtlich dar:

Tabelle 7: Überblick über beobachtete makroskopische Metastasierungen des Abdomens und der Lunge nach Nekropsie, sowie Grund der Nekropsie, Zelllinie HT-29 FUPW, Studie 1.

	PBS	VEGF	Ang-2	CrossMab
Abdominelle Metastasen	A1: Pankreas- Mx A3: Magen- + Pankreas- Mx D2: -	C2: - C3: zweiter TU s.c. D3: -	B2: - B3: - E1: -	B1: kleine intraperitoneale Mx C1: Dünndünndarm-Mx + zervikale Mx E3: -
Lungenmetastasen	A1: +++ A3: ++ D2: -	C2: +++ C3: - D3: +	B2: - B3: (+) E1: -	B1: + C1: ++ E3: +
Grund der Nekropsie:	A1: AZ A3: TG, AZ, Diarrhoe D2: TG	C2: TG + AZ C3: TG D3: TG	B2: TG B3: TG E1: AZ, Gewicht	B1: TG C1: TG E3: Studienende

Mx = Metastase, AZ = schlechter Allgemeinzustand, TU = Tumor, TG = max. Tumorgroße

Die Messungen der FI aller Lungen in Tabelle 8 wurden auf die Belichtungszeit der Lunge mit dem größten Tumor (Maus A1) aus der PBS-Gruppe normiert. Zu erkennen sind hier die deutlichen Signale der Lunge in der VEGF-Gruppe, sowie noch leichte Fluoreszenzsignale der Lunge der zweiten Maus aus der PBS-Gruppe (Maus A3) und der VEGF-Gruppe (Maus D3). Minimale Signale zeigen auch die Lungen der Mäuse aus der CrossMab-Gruppe in Tabelle 8.

6.1.3. Nebenwirkungen

Bei keiner Maus unter Antikörpergabe konnten Nebenwirkungen der Therapie beobachtet werden. In der Kontrollgruppe mussten jedoch zwei von drei Mäusen aufgrund eines schlechten Allgemeinzustandes getötet werden. In der CrossMab- Gruppe zeigten alle Tiere, auch bei erreichter Tumorgroße, einen guten Allgemeinzustand unter der Therapie. Generell lassen die Beobachtungen die Aussage zu, dass die Therapie in allen Gruppen, insbesondere auch durch den neuen Antikörper CrossMab, gut vertragen wurden.

Tabelle 8: Metastasen der Lungen aller Tumore der HT-29 FUPW in der Fluoreszenzbildgebung, Studie 1.

	A1 (alle auf A1)		A3	D2
PBS			<p>A3R_H1729-p11_Tag77_Lunge1_773ms_yc_yc_10er_Plum(pure) A3R_H1729-p11_Tag77_Lunge2_1440ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>	<p>D2R_H1729-p11_Tag91_Lunge1_2695ms_yc_yc_10er_Plum(pure) D2R_H1729-p11_Tag91_Lunge2_100ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>
VEGF	<p>C2</p>		<p>C3</p>	<p>D3</p>
Ang2	<p>B2</p> <p>C2R_H1729-p11_Tag76_Lunge1_222ms_yc_yc_10er_28_Plum(pure) C2R_H1729-p11_Tag76_Lunge2_249ms_yc_yc_10er_28_Plum(pure)</p>		<p>B3</p> <p>C3R_H1729-p11_Tag94_Lunge1_4165,67ms_yc_yc_10er_Plum(pure) C3R_H1729-p11_Tag94_Lunge2_3597,78ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>	<p>E1</p> <p>D3R_H1729-p11_Tag91_Lunge1_1190ms_yc_yc_10er_Plum(pure) D3R_H1729-p11_Tag91_Lunge2_1404ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>
Crossstab	<p>B1</p> <p>B2R_H1729-p11_Tag91_Lunge1_100ms_yc_yc_10er_Plum(pure) B2R_H1729-p11_Tag91_Lunge2_2839ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>		<p>C1</p> <p>B3R_H1729-p11_Tag97_Lunge1_100ms_yc_yc_10er_Plum(pure) B3R_H1729-p11_Tag97_Lunge2_2349ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>	<p>E3</p> <p>E1R_H1729-p11_Tag84_Lunge1_4281ms_yc_yc_10er_Plum(pure) E1R_H1729-p11_Tag84_Lunge2_2683ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>
	<p>B1R_H1729-p11_Tag91_Lunge1_1540ms_yc_yc_10er_Plum(pure) B1R_H1729-p11_Tag91_Lunge2_615ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>		<p>C1R_H1729-p11_Tag77_Lunge1_509ms_yc_yc_10er_Plum(pure) C1R_H1729-p11_Tag77_Lunge2_660ms_yc_yc_10er_Plum(pure)</p>	<p>E3R_H1729-p11_Tag136_2614ms_yc_yc_10er_28_Plum(pure) E3R_H1729-p11_Tag136_500ms_yc_yc_10er_28_Plum(pure)</p>

6.2. Studie 2: Vergleich des VEGF-/ Ang-2-Single- und Co-Targeting in 3 verschiedenen Tumorzelllinien, sowie erste Beobachtungen unter Zugabe einer Chemotherapie

In dieser Studie erfolgte die Erweiterung der Antikörpertherapie um eine Chemotherapie in der Zelllinie HT-29 FUPW. Diese Zelllinie wurde auch in der ersten Studie verwendet. Weiterhin wurde zeitgleich das Ansprechen der Antikörpertherapien in den Tumorzelllinien HT-29 Wildtyp und DLD-1 überprüft.

6.2.1. HT-29 FUPW

In diesem Studienteil wurde erneut die Antikörpertherapie durch VEGF, Ang-2 und CrossMab im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit der Injektion von PBS untersucht. Ergänzend erfolgte erstmalig im Rahmen dieser Arbeit die Beobachtung unter Zugabe einer Chemotherapie mittels 5-FU und Irinotecan. Es wurde die Chemotherapie allein (unter PBS - Injektionen) und in Kombination mit einer CrossMab-Antikörper-Behandlung verglichen. In allen 6 Gruppen erfolgte die Behandlung mittels intraperitonealer Injektionen am Tag 0 und anschließend aller 7 Tage bis Tag 63. Die folgenden Zeitangaben beziehen sich ebenfalls wieder auf Tage nach Therapiebeginn. Das mittlere Tumolvolumen zu Beginn der Injektionen betrug 73 mm^3 (PBS-Gruppe), $83,3 \text{ mm}^3$ (VEGF-Gruppe), $88,1 \text{ mm}^3$ (Ang2-Gruppe), $81,1 \text{ mm}^3$ (CM-Gruppe), $88,0 \text{ mm}^3$ (Chemo- + PBS-Gruppe) und $77,0 \text{ mm}^3$ (CM- + Chemo-Gruppe). Die Studie wurde am Tag 66 beendet als die erste Maus das Tumorendgewicht von 1500 mm^3 überschritten hatte (vgl. Abbildung 8).

Die größten Tumorumfänge erreichten am Tag 66 die ersten 2 Mäuse aus der PBS-Gruppe mit 1731 und 1687 mm^3 . Bei der dritten Maus betrug es 968 mm^3 in der PBS-Gruppe. Aus der Chemo- + PBS-Gruppe erreichte ebenfalls eine Maus ein Tumolvolumen von 1549 mm^3 zu diesem Zeitpunkt. Jedoch zeigten die beiden anderen Mäuse ein deutlich geringeres Wachstum mit einem Endgewicht von 256 bzw. 288 mm^3 . In der VEGF-Gruppe zeigte sich insgesamt ein abgeschwächtes Tumorstadium im Vergleich zu PBS. Die zwei größten Tumore dieser Gruppe mit 725 mm^3 und 1080 mm^3 zeigten ein langsames Wachstumsverhalten. Der kleinste Tumor der Gruppe mit 162 mm^3 stagnierte. In der Ang2-Gruppe befand sich ein mittelgroßer Tumor mit 1188 mm^3 . Bei einem weiteren Tumor kam es zur vollständigen Rückbildung am Tag 45. Das Tumolvolumen zu Therapiebeginn betrug $60,8 \text{ mm}^3$. Die dritte Maus verstarb aus unerklärlichen Gründen am Tag 21 nach Therapiebeginn trotz eines geringen Tumorumfanges von 128 mm^3 . Metastasen wurden nicht gefunden. In der CrossMab-Gruppe kam es ebenfalls bei einer Maus zu einer kompletten Tumorrückbildung am Tag 17 nach Therapiebeginn bei einem Tumorumfang von $106,3 \text{ mm}^3$ zu Beginn. Die beiden Tumore zu Therapieende betrugen 100

mm³ und 996 mm³. In der Kombination CrossMab- + Chemo betragen die Endvolumina 972,0 mm³, 506,3 mm³ und 220,5 mm³. Unter dieser Therapie kam es zu einem besseren Ansprechen als die alleinige Chemotherapie, jedoch schlechter im Vergleich mit CrossMab und Ang2 als Monotherapie.

Zusammengefasst zeigten alle Therapien eine deutliche Wachstumshemmung, auch die alleinige Chemotherapie. So zeigte sich das Wachstum unter der Chemotherapie bzw. der Therapie mit VEGF um über die Hälfte reduziert gegenüber der Kontrollgruppe (VEGF um 55 %, Chemo um 52 %). Die Therapien mit Ang-2 und Chemo/CrossMab zeigten eine ähnliche Reduktion im Tumorwachstum um 60 % (59 %, 61 %). Überraschenderweise wurde die 3-fache Wachstumshemmung unter der CrossMab-Therapie von 76 % erzielt. Um zu klären, ob es eine Überdeckung eines Therapieeffektes bei der Kombination aus CrossMab und Chemotherapie gibt, soll dies in einer weiteren Studie (Studie 3) überprüft werden.

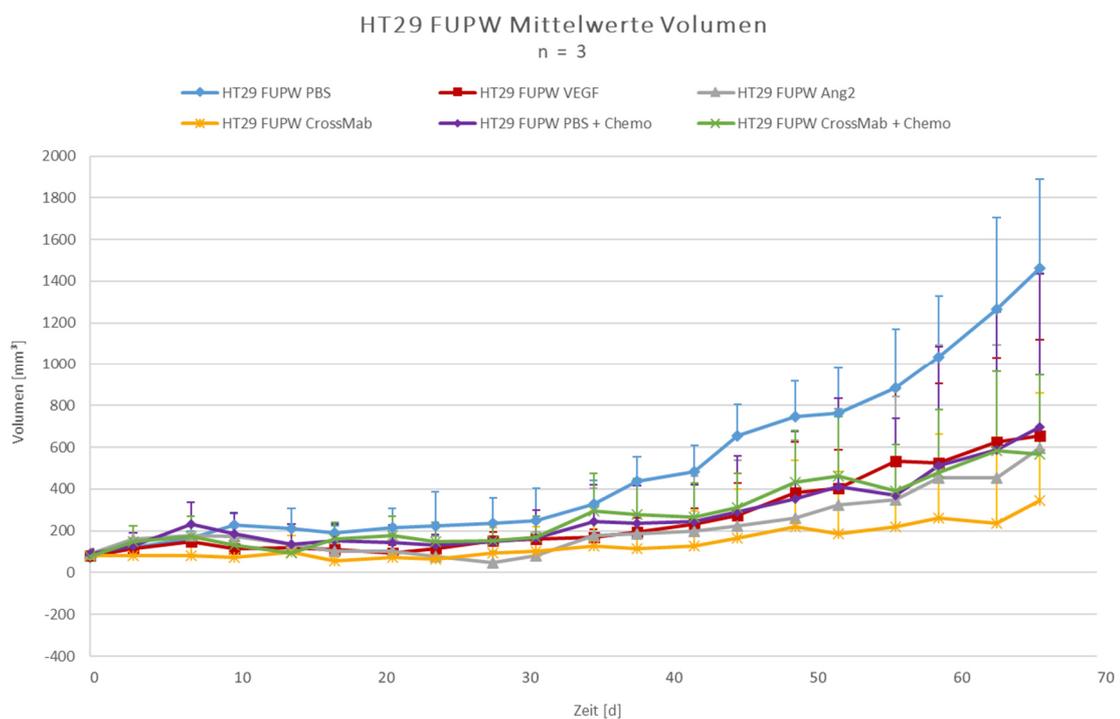


Abbildung 8: Analyse der Mittelwerte der Tumorumfänge der Zelllinie HT-29 FUPW unter Zugabe einer Chemotherapie, Studie 2. Endpunkt ist das Erreichen des max. Tumorumfanges der ersten Maus der Studie, was die Kontrollgruppe (PBS) betrifft. Alle Therapien zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Wachstumshemmung von 52-76 %. Die Therapie mit VEGF (rot) und Chemo (lila) je als Monotherapie zeigen einen ähnlichen Verlauf. Auch die Zugabe von CrossMab zur Chemo (grün) zeigt keine wesentliche Verbesserung. Die CrossMab-Kurve (gelb) stellt den geringsten Tumorprogress dar mit einer 3-fachen Wachstumshemmung (76 %) gegenüber PBS.

6.2.2. HT-29 Wildtyp

Der Versuchsaufbau erfolgte identisch mit 3 Mäusen pro Antikörpertherapie (VEGF, Ang-2 und CrossMab) sowie einer Kontroll-Gruppe mit der Gabe von PBS. Leider verstarb aus der PBS-Gruppe eine Maus bei Studienbeginn vorzeitig, so dass die Studie mit 2 Mäusen in der Kontrollgruppe geführt werden musste. Am Tag 0 erfolgte die erste Injektion der Therapie bzw. PBS bei ähnlichen Tumorumfängen im Mittel: 76 mm³ (VEGF-Gruppe), 81 mm³ (Ang-2-Gruppe), 111 mm³ (CrossMab) und 82 mm³ (PBS-Gruppe). Der Verlauf der Ermittlung der Tumormessungen ist in Abbildung 9 dargestellt.

In der Kontrollgruppe erreichte am Tag 35 die erste Maus das Tumorendvolumen von 1500 mm³. Das Tumorumfang der zweiten Maus betrug zu diesem Zeitpunkt 847 mm³. Das Endvolumen wurde hier am Tag 56 überschritten. Als nächstes überschritt eine Maus aus der CrossMab-Gruppe das Tumorendvolumen am Tag 45. Zu diesem Zeitpunkt betrugen die Tumorumfänge der beiden anderen Mäuse aus dieser Gruppe 654 mm³ und 567 mm³. Sie erreichten das Zielvolumen am Tag 84 und 77. In der VEGF-Gruppe erreichte die erste Maus am Tag 49 das Zielvolumen. Der zweite Tumor hatte ein Volumen von 600 mm³ und erreichte das Zielvolumen am Tag 70. Die dritte Maus in der VEGF-Gruppe zeigte ein Tumorumfang von 128 mm³ und hielt anschließend eine Tumorstase bis Studienende am Tag 91 mit 269 mm³. In der Ang-2 Gruppe wurde durch die erste Maus am Tag 52 das Zielvolumen mit 1666 mm³ überschritten. Die zweite Maus erreichte zu diesem Zeitpunkt ein Tumorumfang von 518 mm³. Im Folgenden kam es bei 600 mm³ zur Tumorstase bis Studienende. Bei der dritten Maus bildete sich der Tumor nach der 2. Injektion zurück und war makroskopisch nicht mehr nachweisbar.

In dieser Zelllinie zeigte sich insgesamt erneut ein Vorteil in der Antikörpertherapie zur Kontrollgruppe, die als erstes beendet wurde. Alle 3 Antikörper zeigen bis Tag 35 ein ähnlich verzögertes Wachstumsverhalten. In allen Gruppen erfolgte insgesamt das Tumorstadium der HT-29 WT langsamer, was ein Charakteristikum der Zelllinie ist. Das beste Ergebnis zeigte die Ang-2-Gruppe mit einer vollständigen Rückbildung eines Tumors als auch einer Tumorstase. Die VEGF-Therapie erwies sich vorteilhafter gegenüber der CrossMab-Therapie.

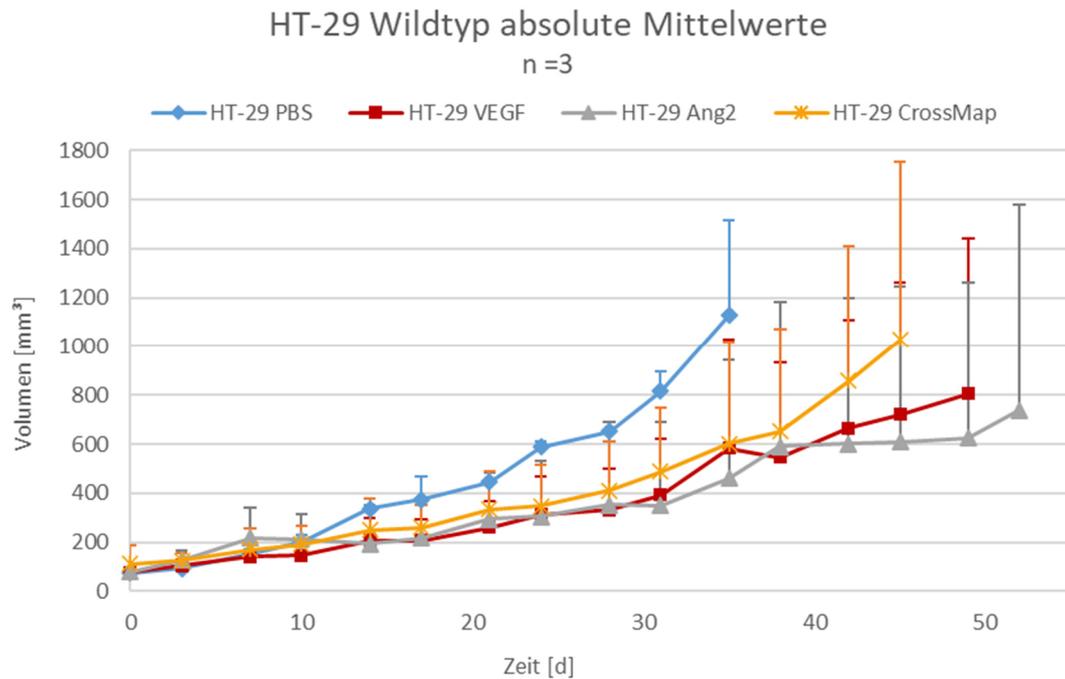


Abbildung 9: Analyse der Mittelwerte der Tumorumfänge der Zelllinie HT-29 Wildtyp, Studie 2. Die Endpunkte im Diagramm erfolgten nach Erreichen der Tumorgößen von max. 1500 mm³ der ersten Maus der jeweiligen Gruppe. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die letzte Ermittlung der Mittelwerte aller Tumorumfänge in den jeweiligen Gruppen. An Tag 35 erreichte die erste Maus der Studie aus der Kontrollgruppe das Endvolumen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in den Therapiegruppen eine Wachstumshemmung von fast die Hälfte (VEGF, CrossMab) und bei Ang-2 um 60 %. Anschließend zeigten die Mittelwerte aller Therapiegruppen ein Tumorprogress, wobei die Tumorumfänge innerhalb der einzelnen Gruppen variierten. So zeigte in der VEGF-Gruppe ein Tumor eine Stase bei 128 mm³. In der Ang-2-Gruppe zeigte einer von 3 Tumoren eine Stase bei 600 mm³ und ein weiterer Tumor bildete sich zurück.

6.2.3. DLD-1

Die Antikörpertherapie (VEGF-, Ang-2 und CrossMab-Antikörper) in der Zelllinie DLD-1 erfolgte wie in Studie 1 beschrieben mit 3 Mäusen pro Gruppe im Vergleich zu einer Kontroll-Gruppe mit Gabe von PBS je einmal pro Woche. Zu Beginn der Behandlung bestand in jeder Gruppe ein ähnliches Tumorumfang: 94 mm³ (VEGF), 98 mm³(Ang-2), 88 mm³ (CrossMab) und 90 mm³ (PBS-Gruppe). Tag 0 entspricht der ersten Therapiengabe. Der Verlauf ist in Abbildung 10 dargestellt.

In der PBS-Gruppe wurde am Tag 21 das mittlere Volumen von 1350 mm³ erreicht, wobei der größte Tumor zu diesem Zeitpunkt das Zielvolumen von 1500 mm³ überschritt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich unter allen drei Antikörpertherapien eine Verzögerungsphase, sogar Remission der Tumore. In der VEGF-Gruppe wurde an Tag 35 das Zielvolumen durch einen

Tumor überschritten bzw. durch einen zweiten Tumor erreicht. Der dritte Tumor hatte zu diesem Zeitpunkt ein Volumen von 400 mm³. Dieser zeigte im Verlauf ein Wachstum und erreichte das Zielvolumen an Tag 91. In der Ang-2- Gruppe erreichten am Tag 45 zwei Tumore das Zielvolumen. Der dritte Tumor zeigte am Tag 17 sein größtes Volumen mit 384 mm³ mit anschließender Remission und Stase bis zum Studienende am Tag 91 mit einer Größe von 144 mm³. In der CrossMab-Gruppe zeigte sich die längste Verzögerungsphase. Hier überschritt der erste Tumor am Tag 59 das Zielvolumen, der zweite Tumor am Tag 77. Der dritte Tumor erreichte eine Tumorstase bis Ende der Studie an Tag 91.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Zellreihe (DLD-1) das schnellste Tumorwachstum. Wie bereits in der ersten Studie im Modell HT-29 FUPW hemmt auch hier Ang-2 als Single-Targeting das Tumorwachstum besser als das VEGF-Single-Targeting. Insgesamt zeigte sich unter bispezifischer Hemmung (CrossMab) die längste Verzögerungsphase. Das bispezifische Targeting zeigt sich hier am effektivsten in der antiangiogenen Therapie.

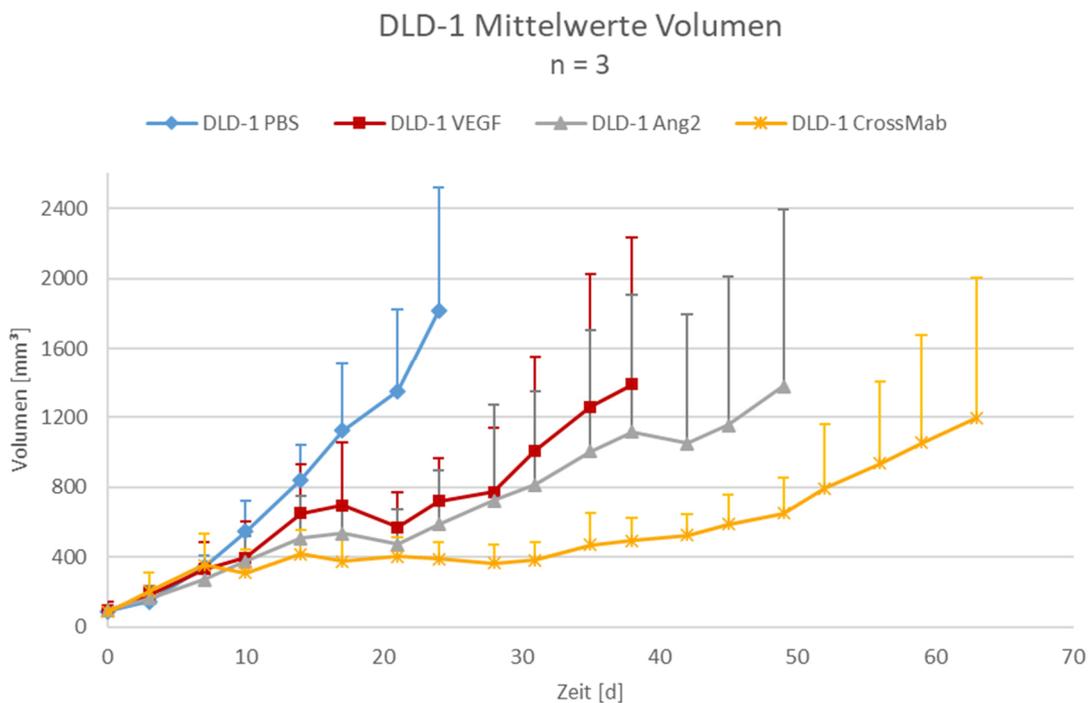


Abbildung 10: Mittelwerte der Tumorumfänge der Zelllinie DLD-1, Studie 2. Endpunkte der Gruppen ist das Erreichen des Endvolumens mit Überschreitung von 1500 mm³ der ersten Maus innerhalb der jeweiligen Gruppe. Bereits an Tag 21 erreichte die erste Maus der Kontrollgruppe (und auch der gesamten Studie) das Endvolumen. Die Zelllinie ist insgesamt durch ein schnelles Tumorwachstum gekennzeichnet. Zu diesem Zeitpunkt konnte in den Therapiegruppen eine Reduktion des Tumorwachstums um mehr als die Hälfte erreicht werden (VEGF um 60 %, Ang-2 um 67 %). Erneut zeigte CrossMab eine über 3-fache Wachstumshemmung mit 78 %. Auch in diesem Modell variierte das Tumorwachstum in den Therapiegruppen. Nach Beginn der Therapie

um Tag 17 kam es in der VEGF- und Ang-2-Gruppe zu einer Regression mit anschließendem Wachstum ab Tag 24. Unter Therapie erreichte in der VEGF-Gruppe die erste Maus das Endvolumen an Tag 35. Dagegen zeigte sich das Wachstum unter Ang-2 leicht verzögert. Die ersten Mäuse erreichte hier an Tag 45 das Endvolumen, wobei der dritte Tumor nicht weiterwuchs. In der CrossMab-Gruppe zeigte sich eine Stase ab Tag 17 mit langsamerem Wachstum ab Tag 35. In der Ang-2-Gruppe und in der CrossMab-Gruppe erreichte jeweils einer von 3 Tumoren eine Stase.

Nebenwirkungen

Spezifische Nebenwirkungen, wie Blutungen, Diarrhoen oder eine verstärkte Gewichtsabnahme konnte bei keinem der Mäuse jeder Zelllinie beobachtet werden. Zu jeder Zeit zeigten die Tiere ein gutes Allgemeinbefinden. Dennoch verstarben 2 Mäuse aus unerklärlichen Gründen vorzeitig aus der Ang-2 Gruppe der HT-29 FUPW und aus der PBS-Gruppe der HT-29 Wildtyp. Das Xenograftmodell der Zelllinie DLD-1 zeigte keine Auffälligkeiten dieser Art. Hier wurde das schnellste Tumorwachstum registriert.

Die Bildung von Chemoresistenzen unter der klinischen Standardtherapie wird immer wieder beobachtet und weitere Therapien zur Überbrückung dieser sind wünschenswert. In Studie 2 konnte in der HT29 eine Wirksamkeit der Chemotherapie gezeigt werden, so dass diese Zelllinie für weitere Untersuchungen zur Überbrückung einer Chemoresistenz wenig geeignet ist. In einer nächsten Studie anhand der chemoresistenten Zelllinie DLD-1 soll die klinische Standardtherapie mit der neu entwickelten Antikörpertherapie in Kombination einer Chemotherapie verglichen werden. Um eine Signifikanz herauszuarbeiten wird mit einer stärkeren Gruppenpopulation gearbeitet.

6.3. Studie 3: Auswirkung des Co-Targetings von VEGF und Ang-2 (CrossMab) in Kombination mit Chemotherapie anhand der Zelllinie DLD-1

In dieser dritten Studie wurde die Standardtherapie (VEGF-Inhibition und Chemotherapie) mit dem neuen, bispezifischen Antikörper verglichen und konnte aufgrund einer größeren Gruppenpopulation statistisch ausgewertet werden.

6.3.1. Verlauf und Beobachtung

Ziel dieser Studie ist bei einer stärkeren Gruppengröße ($n = 10$) die Auswirkungen der kombinierten VEGF- und Ang2-Therapie als Co-Targeting (CrossMab) mit einer Chemotherapie zu untersuchen und die Wirksamkeit mit der klinisch etablierten Therapie eines VEGF-Inhibitors und Chemotherapie (Bevacizumab + FOLFIRI) zu vergleichen. Die Einteilung der Mäuse erfolgte in 6 Gruppen mit je 10 Mäusen. Neben der Kontrollgruppe (PBS) mit normalem Wachstum, erfolgte die Therapie mit Anti-VEGF, CrossMab und Chemotherapie (5-Fluoruracil/Irinotecan) als Monotherapie und je als Kombination mit Chemotherapie. Zu Beginn der Therapie bestanden je Gruppe ähnlich mittlere Tumervolumina (unter Angabe der Standardabweichung) mit 127 (33) mm^3 in der PBS-Gruppe, die Gruppe mit der Therapie 5-FU/Irino 132 (56) mm^3 , VEGF mit 134 (44) mm^3 , VEGF + 5-FU/Irino mit 128 (45) mm^3 , CrossMab mit 131 (55) mm^3 und CrossMab + 5-FU/Irino 137 (42) mm^3 . Die Standardabweichung zeigt das schon in den Vorstudien beobachtete unterschiedliche Tumorwachstum in jeder Gruppe, unabhängig vom Startvolumen (Vgl. Abbildung 11) In der PBS-Gruppe erreichten an Tag 18 ein mittleres Tumervolumen von 1400 mm^3 , wobei 4 von 10 Tumoren 1500 mm^3 überschritten und die Behandlung beendet wurde. Eine geringe Wachstumshemmung wurde durch Anti-VEGF- und 5-FU/Irinotecan-Monotherapie induziert. Die jeweiligen Therapien wurden am Tag 27 beendet als 4 Tumore aus jeder Gruppe 1500 mm^3 überschritten. Dies belegt das begrenzte Ansprechen der Chemotherapie auf das DLD-1-Tumormodell. Die in den Vorstudien beobachtete primäre Wachstumsverzögerung zu Beginn der Therapie mit Anti-VEGF zeigte sich in dieser Studie weniger ausgeprägt. Dagegen sprachen besonders die Therapien mit CrossMab als auch die kombinierte Therapie durch Chemotherapie mit Anti-VEGF oder CrossMab an. In diesen 3 Gruppen wurde die Therapie an Tag 49 beendet als je 2 Tumore der CrossMab- Gruppe und der Anti-VEGF + Chemotherapie das Volumen von 1500 mm^3 überschritten. In der CrossMab + Chemo-Gruppe wurde bei keinem Tumor das Zielvolumen überschritten und es konnte eine Tumorstase bei 3 Tumoren festgestellt werden. Ein Tumor war in Remission, alle weiteren zeigten eine sehr geringe Progredienz. Der größte Tumor diese Gruppe hatte ein Volumen von 634,8 mm^3 . Die mittleren Tumorgrößen in den zuletzt genannten Gruppen betrug 295,6 mm^3 (CrossMab + 5-Fu/Irino), 828,9 mm^3 (CrossMab) und 1018,5 mm^3 (VEGF + 5-FU/Irino).

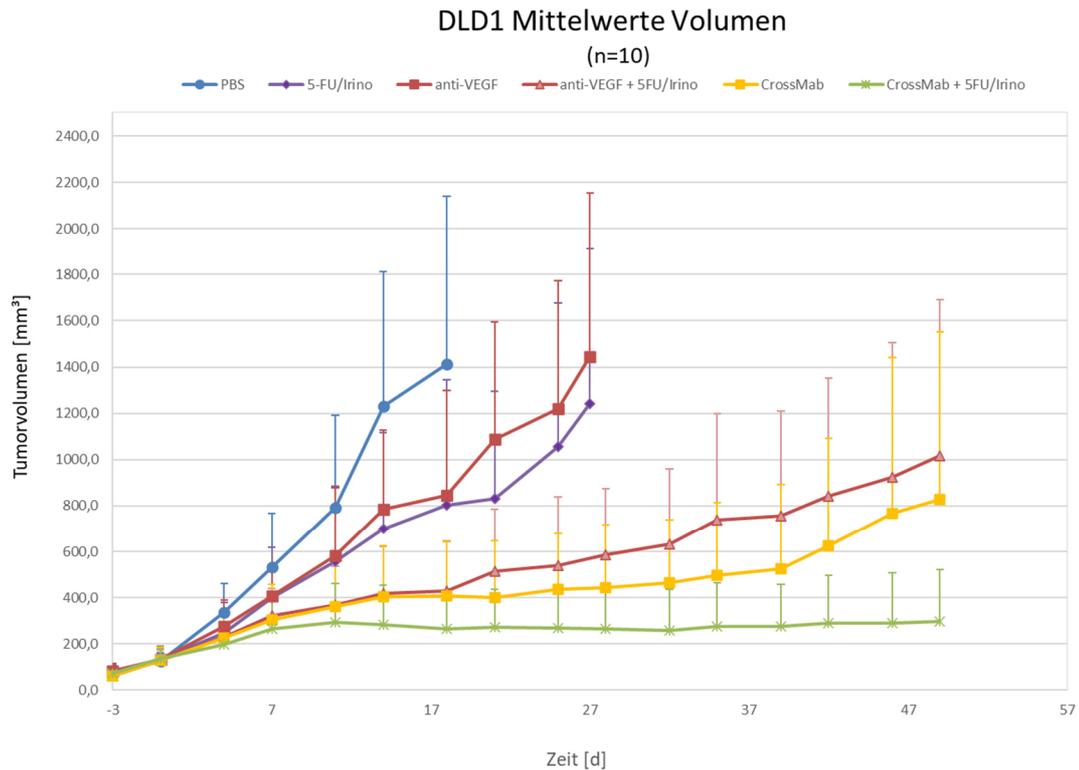


Abbildung 11: Analyse der Mittelwerte (n=10) der Tumorzumina + SD. Vergleich der Tumorzumshemmung durch die klinische Standardtherapie (VEGF/Chemo) und des Co-Targetings von Ang-2 und VEGF (CrossMab) in Kombination mit Chemotherapie an Xenotransplantaten der Zelllinie DLD-1, Studie 3. VEGF und Chemo als Monotherapie zeigen eine Wachstumshehmung gegenüber der Kontrollgruppe, jedoch mit deutlichem Progress nach dem 17. Tag. VEGF/Chemo (klinischer Standard) mit deutlich niedrigerer Wachstumsrate, aber ebenso Anstieg der Kurve über die Zeit. Die Kombination CrossMab/Chemo zeigt eine vollständige Wachstumsverzögerung.

6.3.2. Statistische Analyse

In der statistischen Analyse wurden die Gruppen untereinander verglichen. Zunächst erfolgte die Auswertung nach Abschluss der Kontrollgruppe (PBS) an Tag 18. Gegenüber der PBS-Gruppe zeigte sich die Therapie mit CrossMab + Chemo hoch signifikant mit $p = 0,009$ (vgl. Abbildung 12). Aber auch die Monotherapie mit CrossMab sowie Anti-VEGF + Chemo zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Wachstumshehmung ($p = 0,021$ und $p = 0,024$). Weiterhin war die Therapie mit CrossMab + Chemo auch der Anti-VEGF-Behandlung signifikant überlegen ($p = 0,035$) und am Tag 21 auch gegenüber der Chemotherapie allein mit $p = 0,048$ (vgl. Abbildung 13). Zu diesem Zeitpunkt konnte auch ein signifikanter Vorteil der CrossMab-Monotherapie gegenüber der Anti-VEGF-Monobehandlung festgestellt werden ($p = 0,024$). Am 49. Behandlungstag zeigte sich zudem eine signifikante Wachstumshehmung der

Kombinationstherapie durch CrossMab + Chemotherapie im Vergleich zur klinischen Standardtherapie mit Anti-VEGF + Chemotherapie ($p = 0,008$), vgl. Abbildung 14.

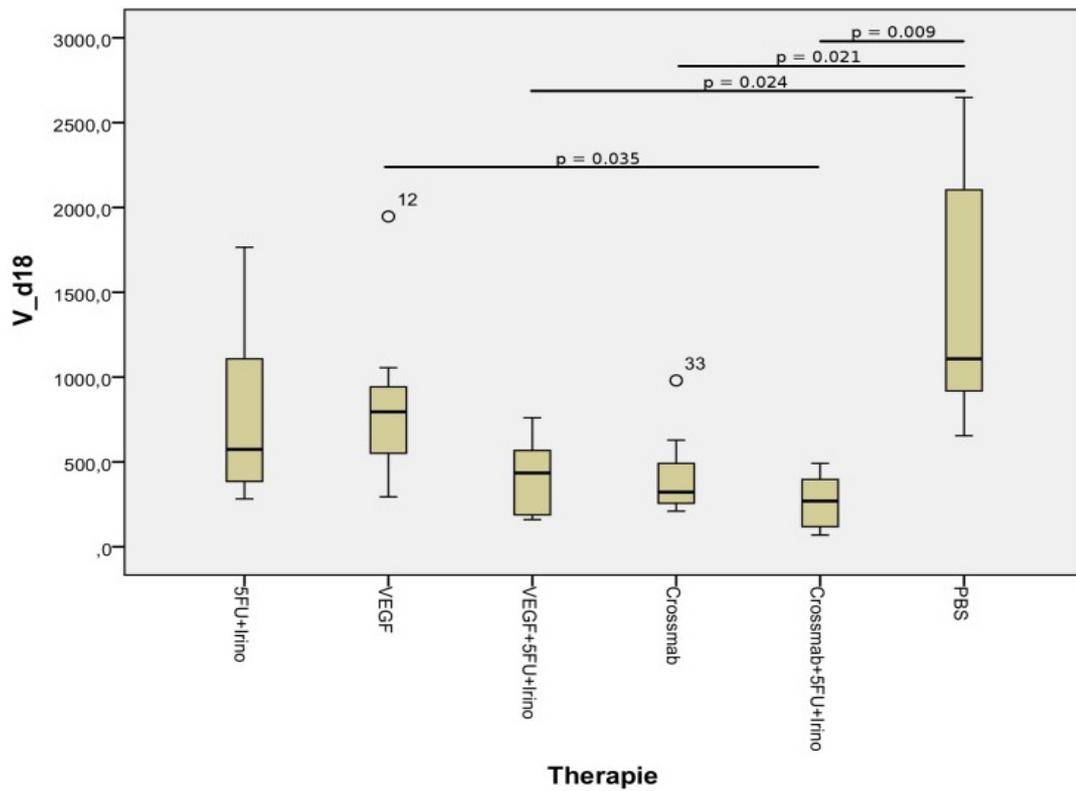


Abbildung 12: Statistische Analyse des Tumorvolumens an Tag 18 (Endpunkt: 1. Maus aus PBS-Gruppe erreichte Endvolumen) zum Vergleich aller Gruppen, ANOVA Post Hoc Dunnett-T3.

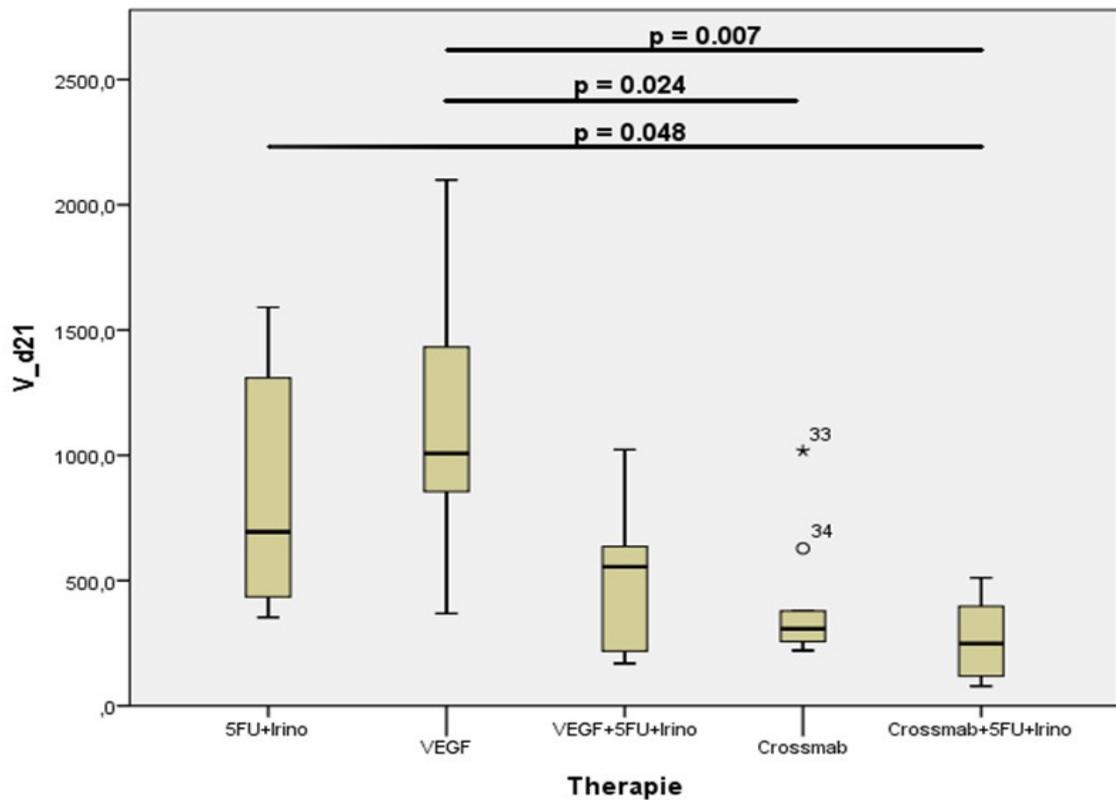


Abbildung 13: Statistische Analyse des Tumorvolumens Tag 21 bei Erreichen der Endvolumina aus den Gruppen mit VEGF- und Chemomonotherapie, ANOVA, Post Hoc Dunnett-T3.

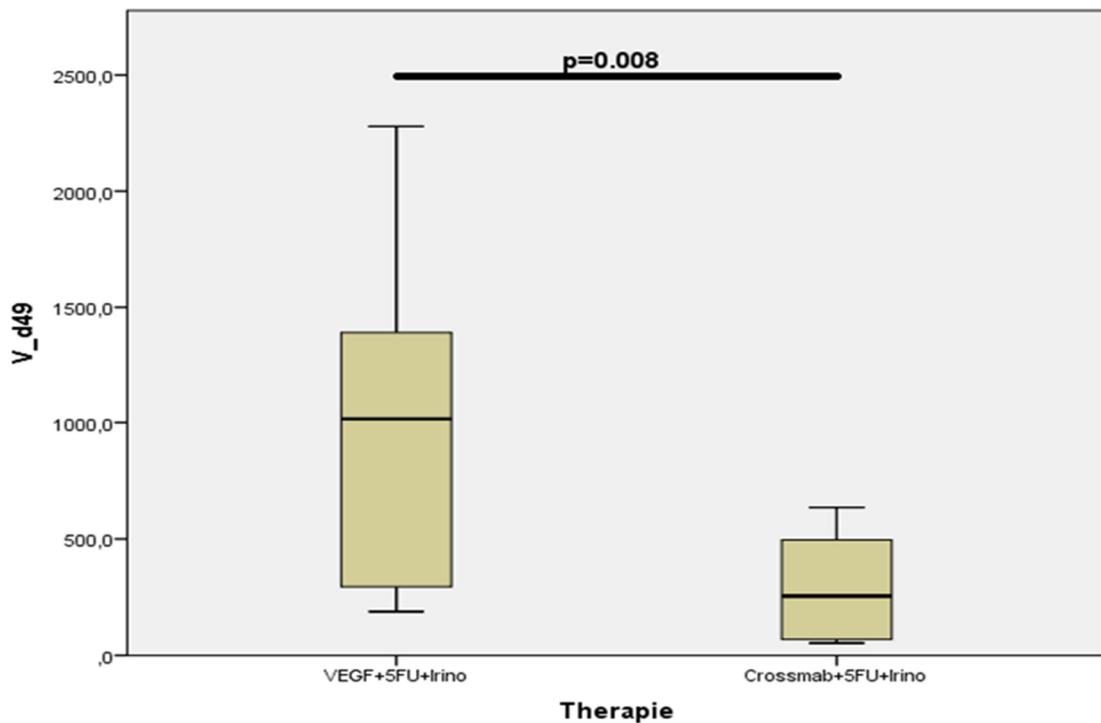


Abbildung 14: Statistische Analyse des Tumorvolumens zum Vergleich beider Kombinationsbehandlungen nach Abschluss der Studie, Tag 49 Student's T-Test (Studienende).

Nebenwirkungen

Neben dem Volumen wurde ebenfalls das Gewicht und Verhalten der Mäuse kontrolliert. Es zeigten sich keine Nebenwirkungen oder Auffälligkeiten in den Verhaltensweisen. Als Maßstab für die Verträglichkeit wurde das Gewicht in den jeweiligen Gruppen verglichen. Die Therapie mit CrossMab im Rahmen des Co-Targetings als Monotherapie als auch in Kombination mit Chemotherapie wurde gut vertragen. Die Mäuse jener Gruppen zeigten eine Gewichtszunahme. Die Monotherapie mit Chemo als auch durch VEGF zeigten jedoch eine leichte Gewichtsreduktion, was auch im Zusammenhang mit einem vermehrten Tumorwachstum betrachtet werden muss (vgl. Abbildung 15).

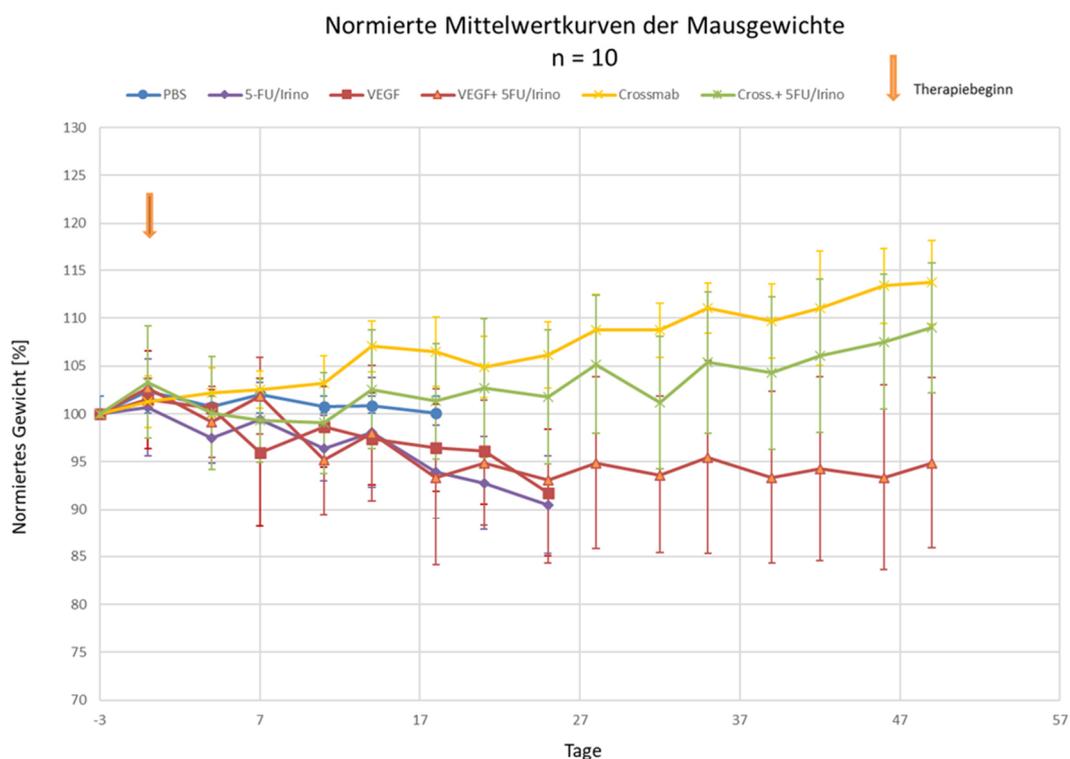


Abbildung 15: Analyse der Mausgewichte mit Xenotransplantaten der Zelllinie DLD-1 normalisiert auf das Gewicht vor der Behandlung, Studie 3. Die Behandlung erfolgte ab Tag 0 einmal in der Woche (Pfeil). Die Werte entsprechen den Mittelwerten (n=10) mit Standardabweichung.

6.4. Histologische Analysen

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Erstellung der Bilder erfolgte unter gleichen Abständen zwischen Schnitt und Linse der Kamera, so dass die Größen untereinander vergleichbar sind. In der Kontrollgruppe waren die größten Tumore am häufigsten zu sehen. In der HE-Makroaufnahme lassen sich gut die Tumorzellbereiche (blau-lila-Färbung aufgrund der großen Zellkerne) als auch die Nekrosezonen (rosa) abgrenzen. In den Übersichtsfärbungen wurde die Morphologie der Tumore deutlich, wie zum Beispiel die Muzinbildung in den HT-29-Zelllinien im Gegensatz zur DLD-1. Gut zu erkennen am Beispiel der Zelllinie HT-29 FUPW und HT-29 WT sind die zentral gelegenen Nekrosezonen (vgl. Abbildung 16 Bild A, B und D), welche von ca. 2 -3 mm dicken Tumorzellschichten ummantelt sind. Die Unterschiede auf das Ansprechen der Therapie wurde untersucht. Am Beispiel der Anti-VEGF werden die Größenunterschiede deutlich. Gut zu sehen ist, dass auch bei Respondern noch Tumorzellgewebe vorhanden ist. Am Beispiel der Ang-2-Therapie der Zelllinie DLD-1 unter 100-facher Vergrößerung ist der schmale Randsaum von Tumorgewebe im Responder zu erkennen, welcher aufgelockerter und unstrukturiert wirkt im Vergleich zum Non-Responder (vgl. Abbildung 17). Dieses Bild zeigte sich bei allen Zelllinien unter den Therapien. Der Responder ist gekennzeichnet durch großflächige Nekrosezonen mit Zelldetritus aus fragmentierten kollagenen Fasern, welche in Fibrinen, Serumbestandteilen und Zellkernresten eingebettet sind und sich stark eosinophil darstellen. Dazwischen zeigen sich noch wenige, isolierte Tumorzellen am Rand. Der Non-Responder zeigt v. a. zellreiches, kompaktes Tumorgewebe.

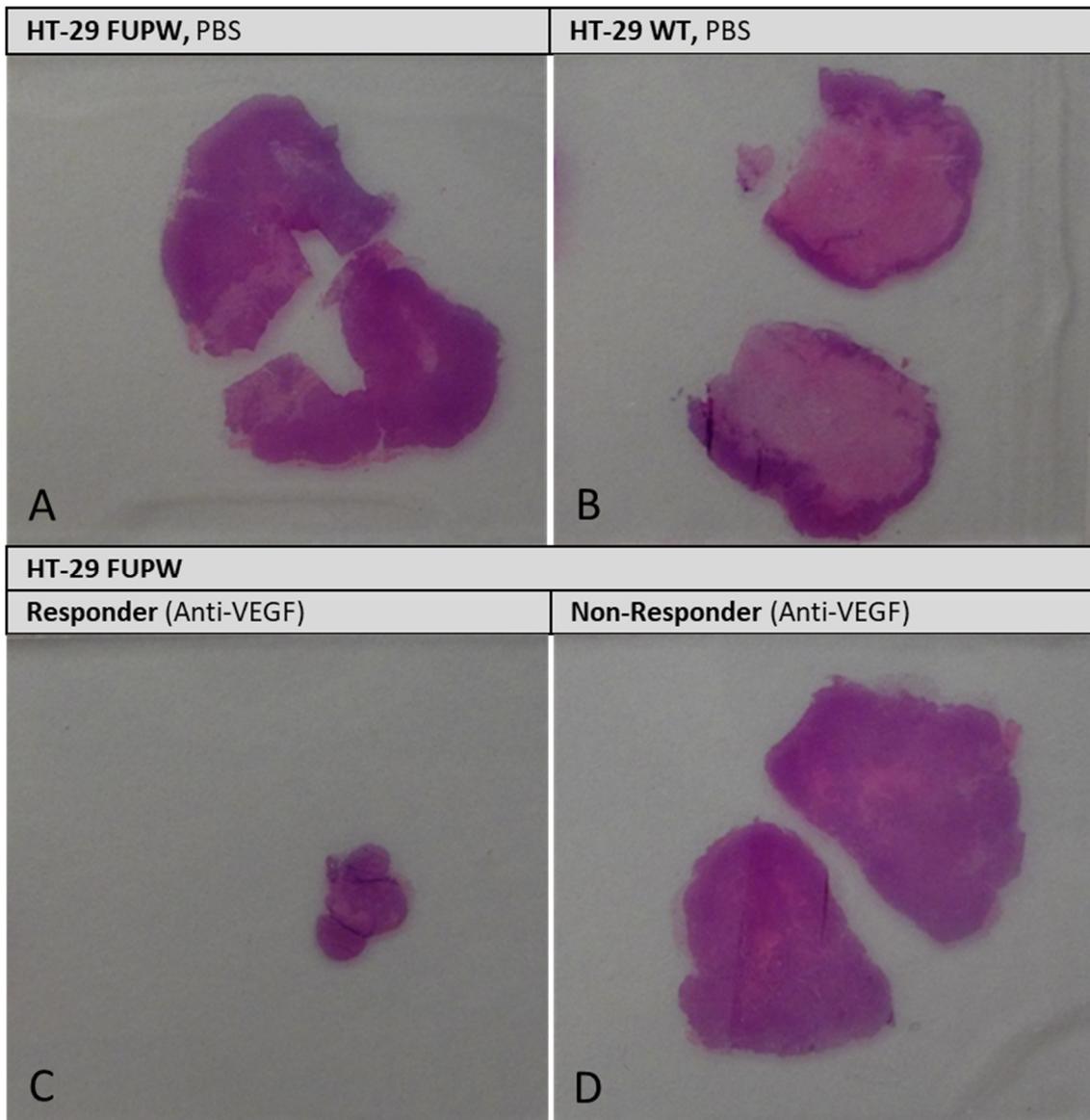


Abbildung 16: HE Makro-Aufnahmen von Tumoren der Kontrollgruppen der Zelllinien HT-29 FUPW und HT-29 WT, sowie eines Tumors der HT-29 FUPW mit Therapieansprechen unter Anti-VEGF im Vergleich zu einem Therapieversagen (Non-Responder). Tumore ohne Therapie (PBS) der Zelllinien HT-29 FUPW und HT-29 WT (Bild A + B); Tumore mit (C) und ohne Therapieansprechen (D) auf Anti-VEGF der Zelllinie HT-29 FUPW.

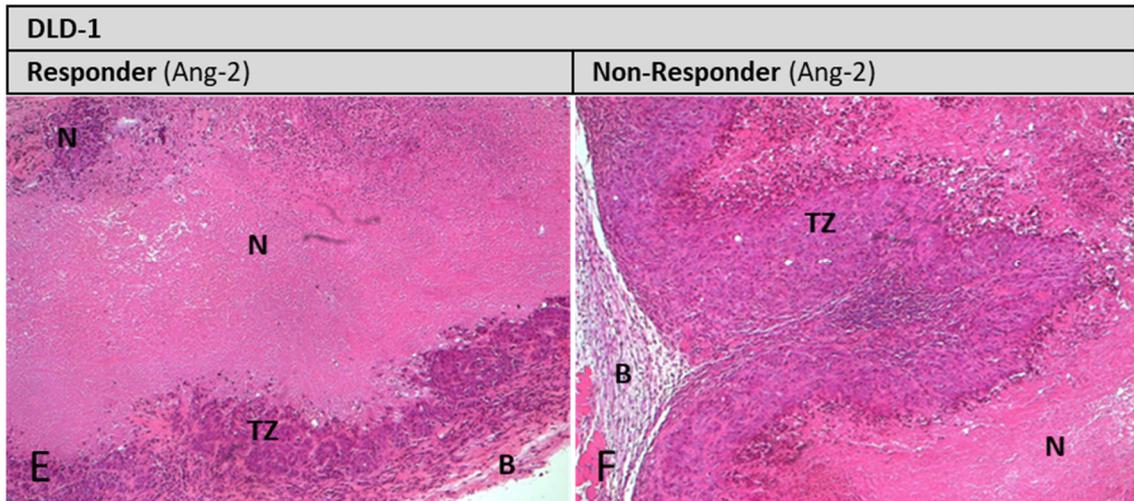


Abbildung 17: HE-Färbung der Zelllinie DLD-1 mit 100x Vergrößerung zum Vergleich bei Therapieerfolg und Therapieversagen am Beispiel einer Ang-2-Inhibition. Abk.: Therapieansprechen (Responder, E), Therapieversagen (Non-Responder, F) Nekrose (N), Tumorzellen (TZ), Bindegewebe (B).

Immunhistochemische Färbungen

Im Rahmen der antiangiogenen Therapie wurde die Tumore auf ihre Kapillarisation untersucht und mit CD31, welches auf den Gefäßendothelien exprimiert wird, angefärbt. Zudem wurde eine CD45-Färbung durchgeführt. Cluster of Differentiation 45 (CD45) ist als geltendes gemeinsames Leukozytenantigen eine Rezeptorprotein-Tyrosinphosphatase, welche auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Tchilian und Beverley 2006). Demnach sind Erythrozyten und Thrombozyten ausgenommen. Als wichtiger Immunmodulator wird er als Maß für den Einfluss des Immunsystems auf den Tumor angesehen. Über den VEGFR-2 gibt es bisher wenige Daten. Er wird vor allem in den Endothelzellen der Kapillaren exprimiert und bei deren Aktivierung hochreguliert. Studien zeigten das Vorkommen auch in verschiedenen Tumorzellen. Eine Studie beschreibt das Vorkommen neben dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom auch in Stromafibroblasten (Decaussin u. a. 1999).

CD31

Typisch für HT-29 zeigt der Wildtyp als auch der Klon die Bildung von Muzin in den Tumorzellnestern bei 100-facher Vergrößerung, welche sich durch die CD31-positiven Blutgefäße abgrenzen lassen. Gut zu erkennen sind in der Kontroll-Gruppe als auch bei den Non-Respondern die noch gut konsolidierten Tumorzellen (TZ) mit großen und kräftig braun gefärbten Kapillaren, welche den Tumor weiter versorgen. Dies wird in den histologischen Bildern der Kontrolle und der Non-Responder in der Zelllinie HT-29 FUPW (vgl. Abbildung 18)

besonders deutlich, ist aber in allen Zelllinien gut zu erkennen (vgl. Tabellen 11-13). Bei den Respondern zeigt sich in allen Therapiegruppen deutlich mehr Bindegewebe (B) und Nekrose (N). Die Kapillaren sind meist nur noch randständig oder rudimentär vorhanden, was das Bild des Responders der DLD-1 unter VEGF verdeutlicht. In der Ang-2-Behandlungsgruppe der DLD-1 (vgl. Abbildung 20) waren keine Gefäßstrukturen in normaler Morphologie mehr zu sehen bei Ansprechen der Therapie. Die Tumorzellen bei den Respondern sind deutlich aufgelockert und von Bindegewebe umgeben, so dass sie einzelne Nester bilden. Die Tumore der CrossMab-Gruppen zeigen bei Therapieansprechen in allen Zelllinien viel Stroma und nur wenige, kleine Kapillaren, welche vorwiegend von Stroma und Zellkernen umgeben sind. Besonders in der Ang-2 und in der CrossMab-Gruppe zeigen sich nur noch wenige Kapillaren bzw. Reste von Kapillaren.

CD45

Gut zu erkennen bei 100-facher Vergrößerung in allen Zelllinien sind die CD45-gefärbten Leukozyten mit ihren Ausläufern im Bindegewebe und in den aufgelockerten Zellnestern (vgl. Abbildungen 21 - 23). Eine starke Färbung und Zellreichtum - unabhängig von einer Behandlung - zeigte sich im Bindegewebe der Tumorrandgebiete. Ein gutes Beispiel zeigt die Färbung des PBS-Tumors der HT-29 WT (vgl. Abbildung 22). Kräftig zeigte sich die Färbung in den Tumoren mit Antikörperbehandlung. Die Zellen scheinen wenig kompakt und mit vielen Bindegewebssepten durchzogen, welche teils massiv durch Leukozyten infiltriert sind. In den Tumoren der Kontrollgruppe zeigen sich in der CD45-Färbung nur wenige und schwach gefärbte CD45 positive Zellen zwischen den überwiegend vorhandenen Tumorzellnestern.

VEGFR-2

Die Expression des VEGF-Rezeptor 2 zeigt sich gut in der 400x Vergrößerung (vgl. Abbildungen 24 – 26). VEGFR-2 wird vor allem in den Endothelzellen exprimiert, und gemäß (Decaussin u. a. 1999) auch in Fibroblasten. Es zeigte sich hier in allen Zelllinien eine inhomogene Anfärbung der Kapillarendothelien innerhalb eines Präparates. Ein Unterschied innerhalb der einzelnen Therapiegruppen ist somit nicht ersichtlich. Weiterhin zeigt sich eine spezifische Anfärbung von Zellen im Stroma zwischen den Tumorzellnestern. Diese Zellen imponieren als große, schaumig wirkende Zellen mit eingesprenkeltem Muster und sind mit einem gestichelten Pfeil in den histologischen Bildern markiert.

VEGF/Ang-2/Tie-2

Die Anfärbung der Wachstumsfaktoren VEGF und Ang-2 zeigt eine deutliche zytoplasmatische Expression in den Tumorzellen und auch im Stroma ohne deutlich ersichtliche Unterschiede in den Therapiegruppen, weshalb von diesen Färbungen nur einzelne Auszüge dargestellt werden

(vgl. Abbildung 27). Gut zu sehen ist allerdings die unterschiedliche Tumormorphologie. Tumore aus den Kontrollgruppen weisen viel Tumorgewebe mit deutlicher Ang2-Anfärbung auf im Gegensatz zu den Tumoren unter Therapie mit CrossMab, welche nur noch kleine Zellnester mit viel Bindegewebe beinhalten. Die Immunhistochemische Färbung auf Tie-2 ergab keine spezifische Färbung.

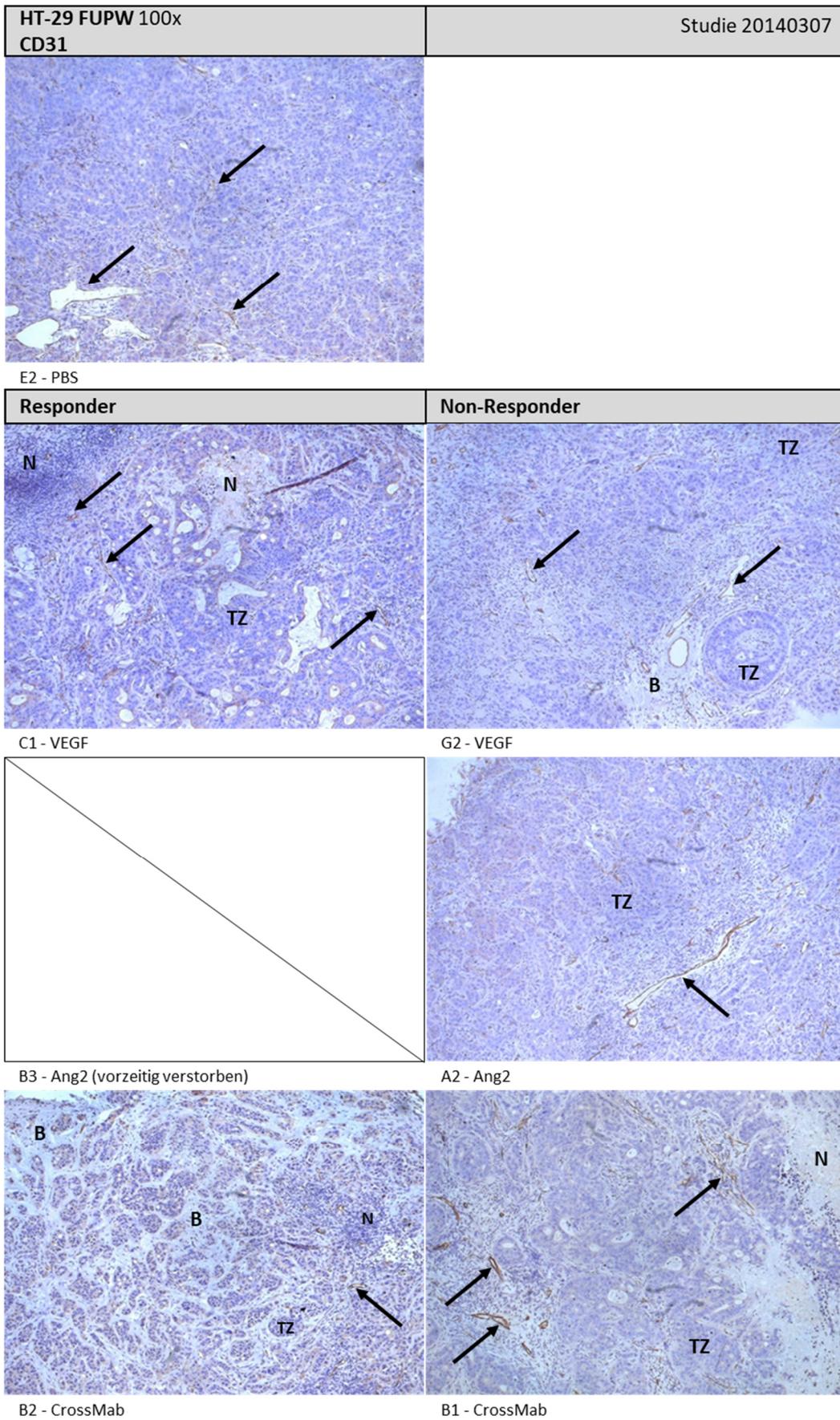


Abbildung 18: CD31-Färbung des Endothels der Zelllinie HT-29 FUPW in 100-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe, CD31-gefärbte Kapillaren (Pfeil).

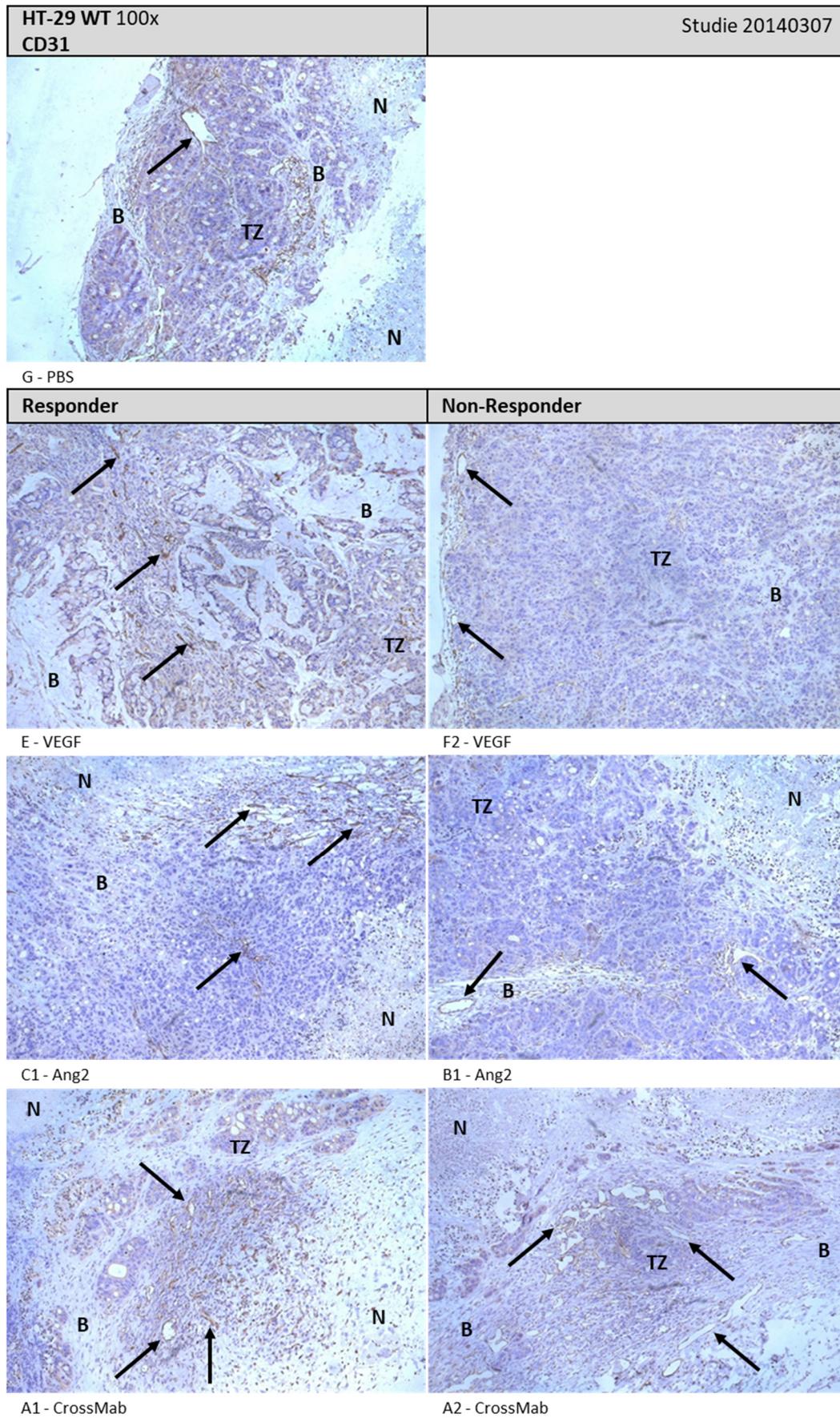


Abbildung 19: CD31-Färbung des Endothels der Zelllinie HT-29 Wildtyp in 100-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe, CD31-gefärbte Kapillaren (Pfeil).

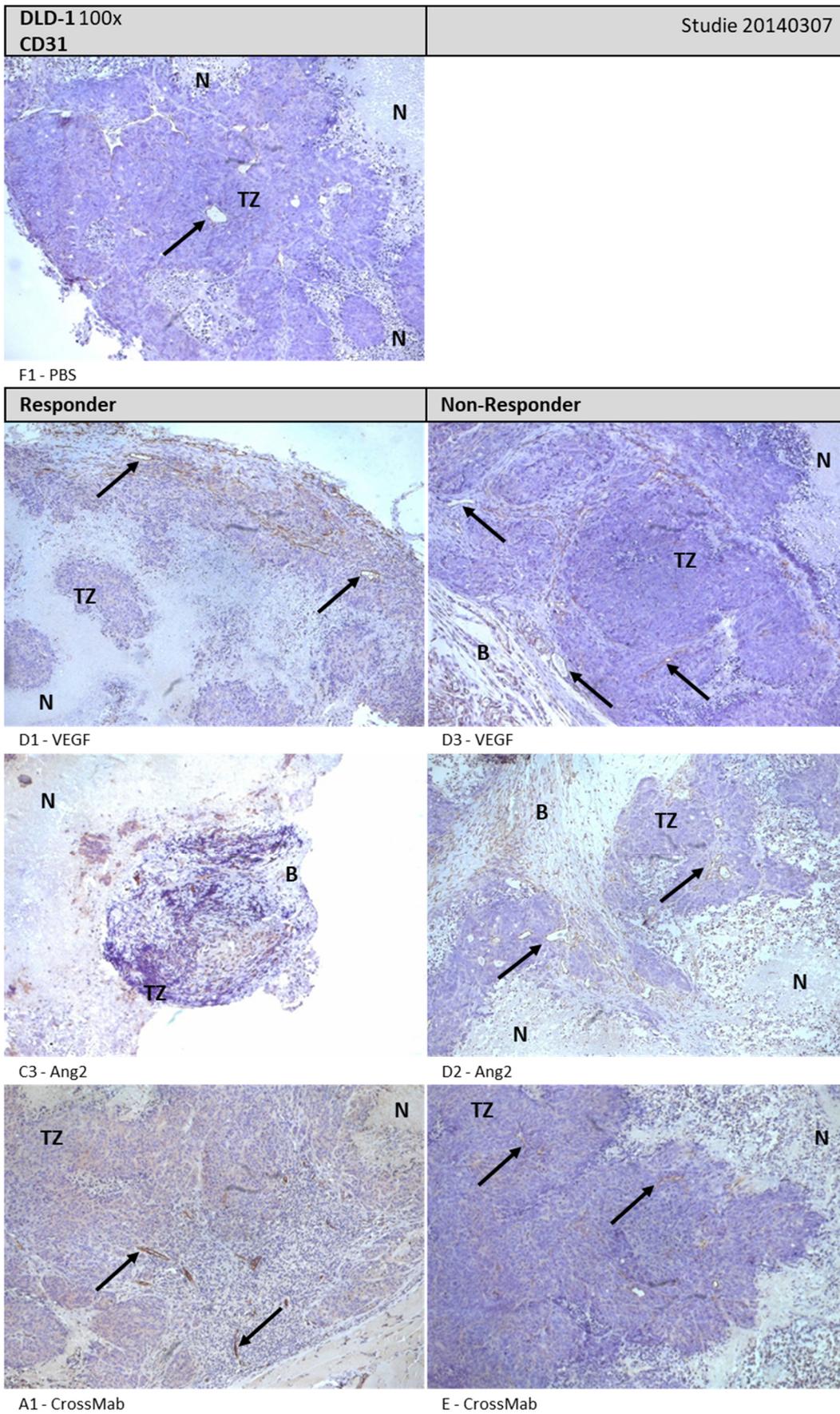


Abbildung 20: CD31-Färbung des Endothels der Zelllinie DLD-1 in 100-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe, CD31-gefärbte Kapillaren (Pfeil).

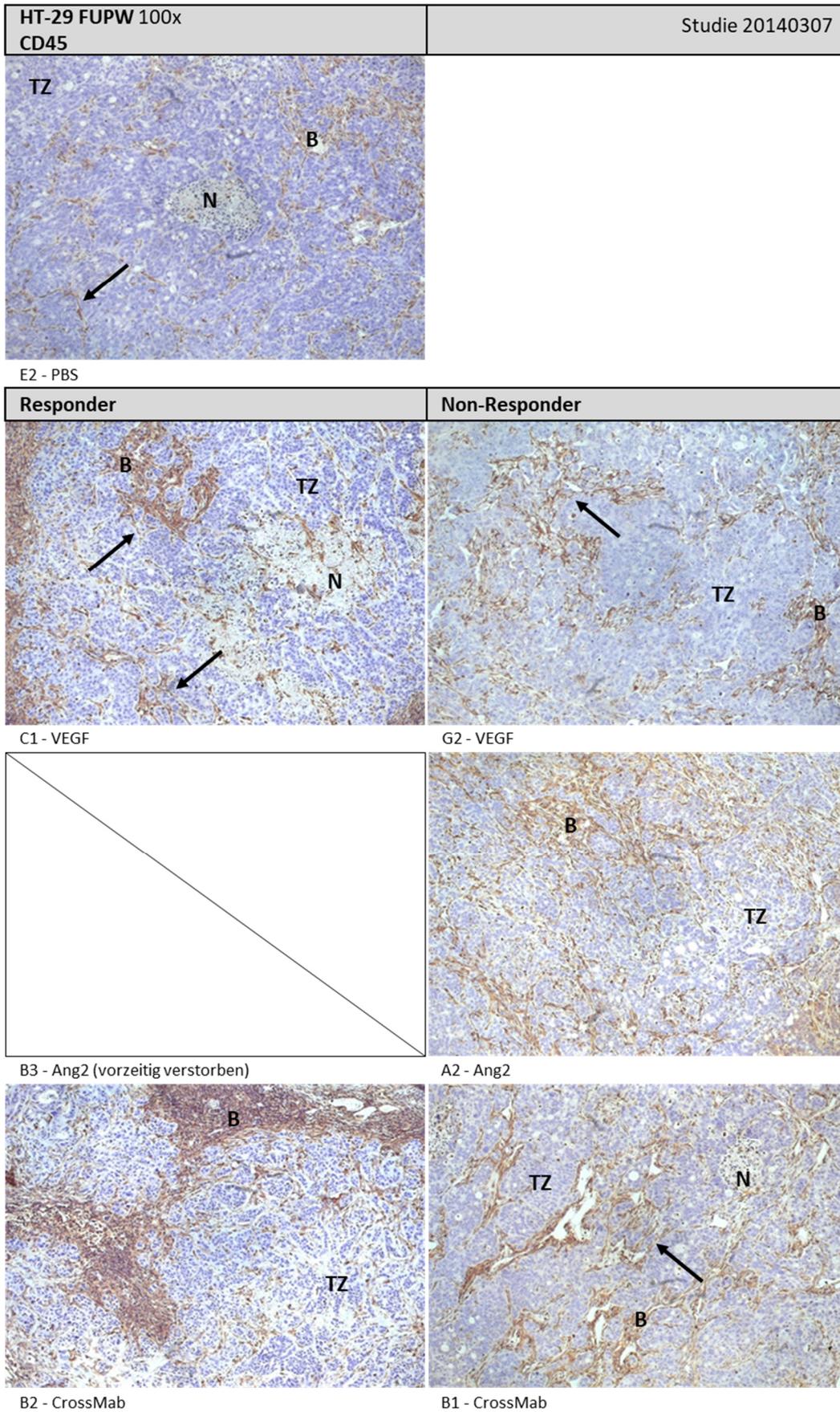


Abbildung 21: CD45-Färbung als Leukozytenmarker in der Zelllinie HT-29 FUPW in 100-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe, leukozytenreiche Septen (Pfeil).

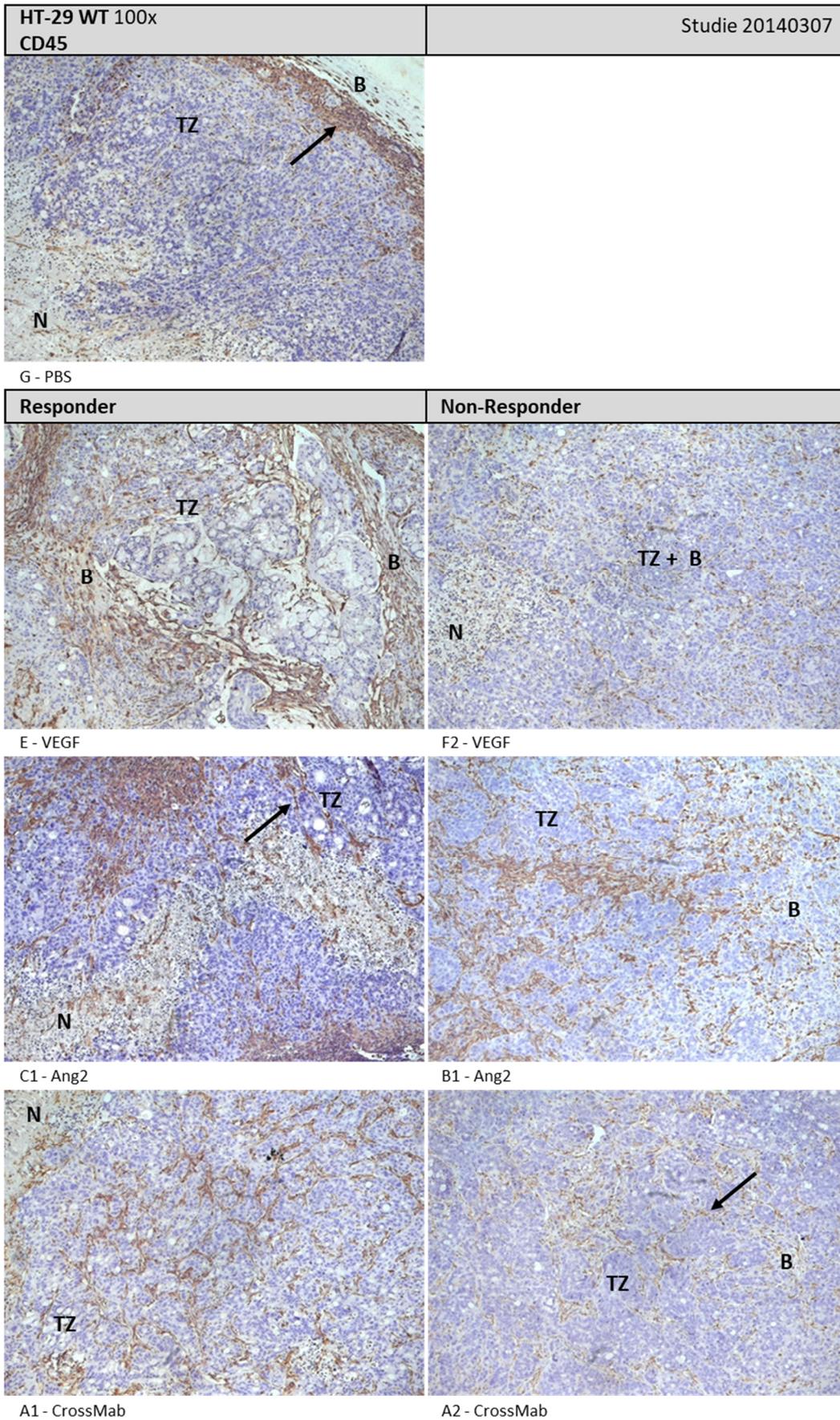


Abbildung 22: CD45-Färbung als Leukozytenmarker in der Zelllinie HT-29 Wildtyp in 100-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe, leukozytenreiche Septen (Pfeil).

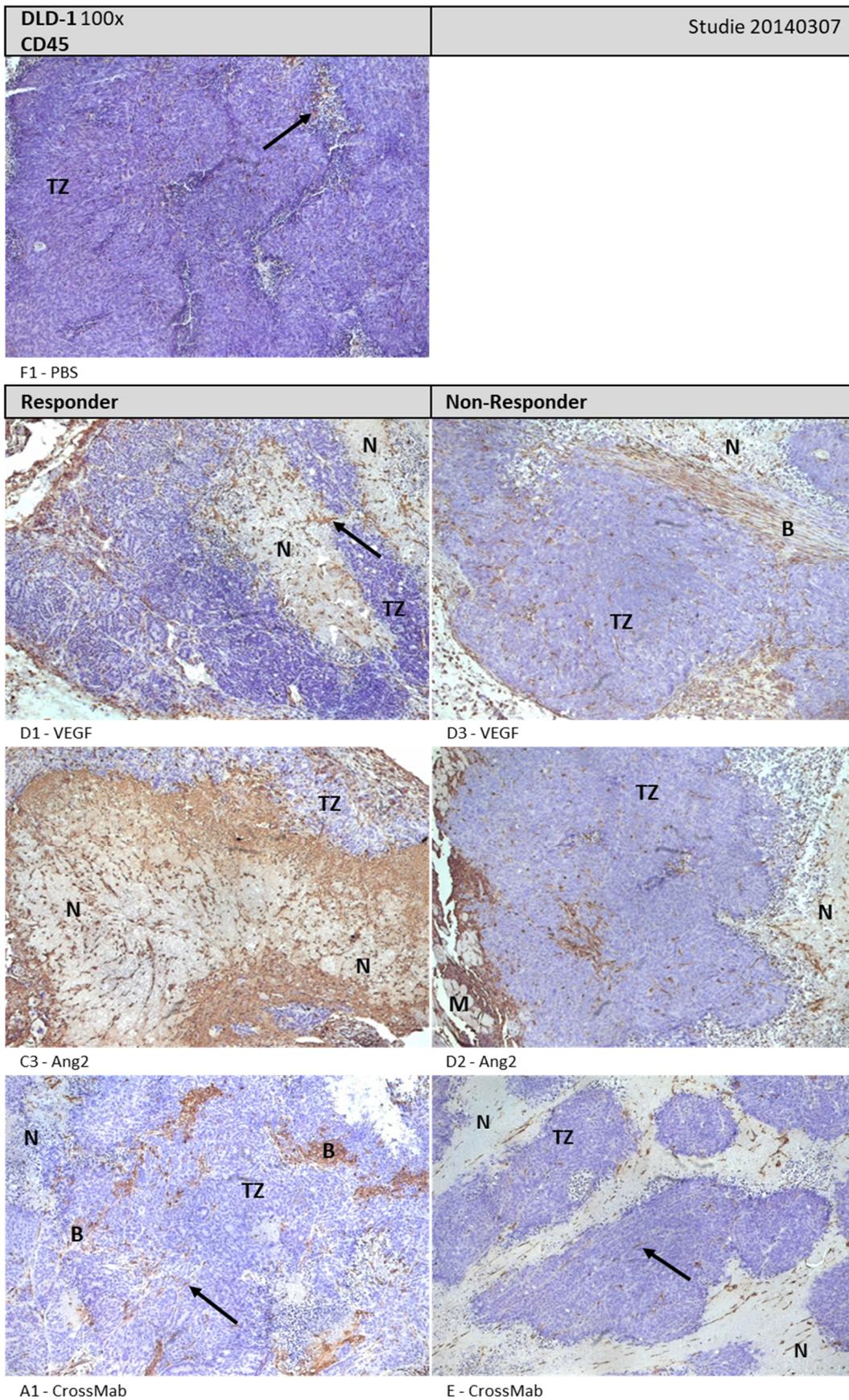


Abbildung 23: CD45-Färbung als Leukozytenmarker der Zelllinie DLD-1 in 100-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe (B), Muskelzellen (M), leukozytenreiche Septen (Pfeil).

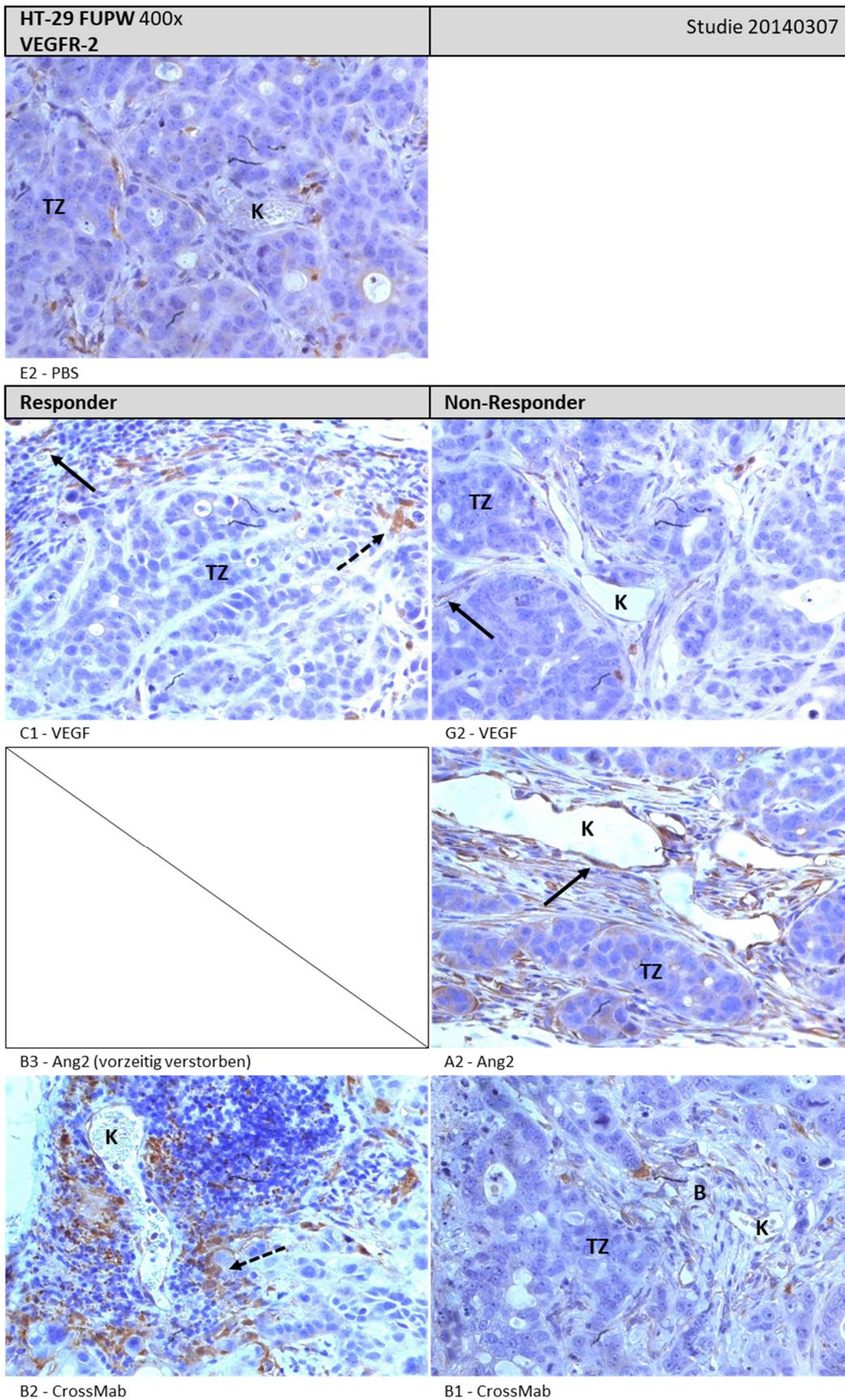


Abbildung 24: VEGF-Rezeptor-2-Färbung in der Zelllinie HT-29 FUPW in 400-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Bindegewebe (B), Kapillare (K), VEGFR-2 exprimierendes Endothel (Pfeil), große VEGFR-2 positive schaumige Stromazellen (gestrichelter Pfeil).

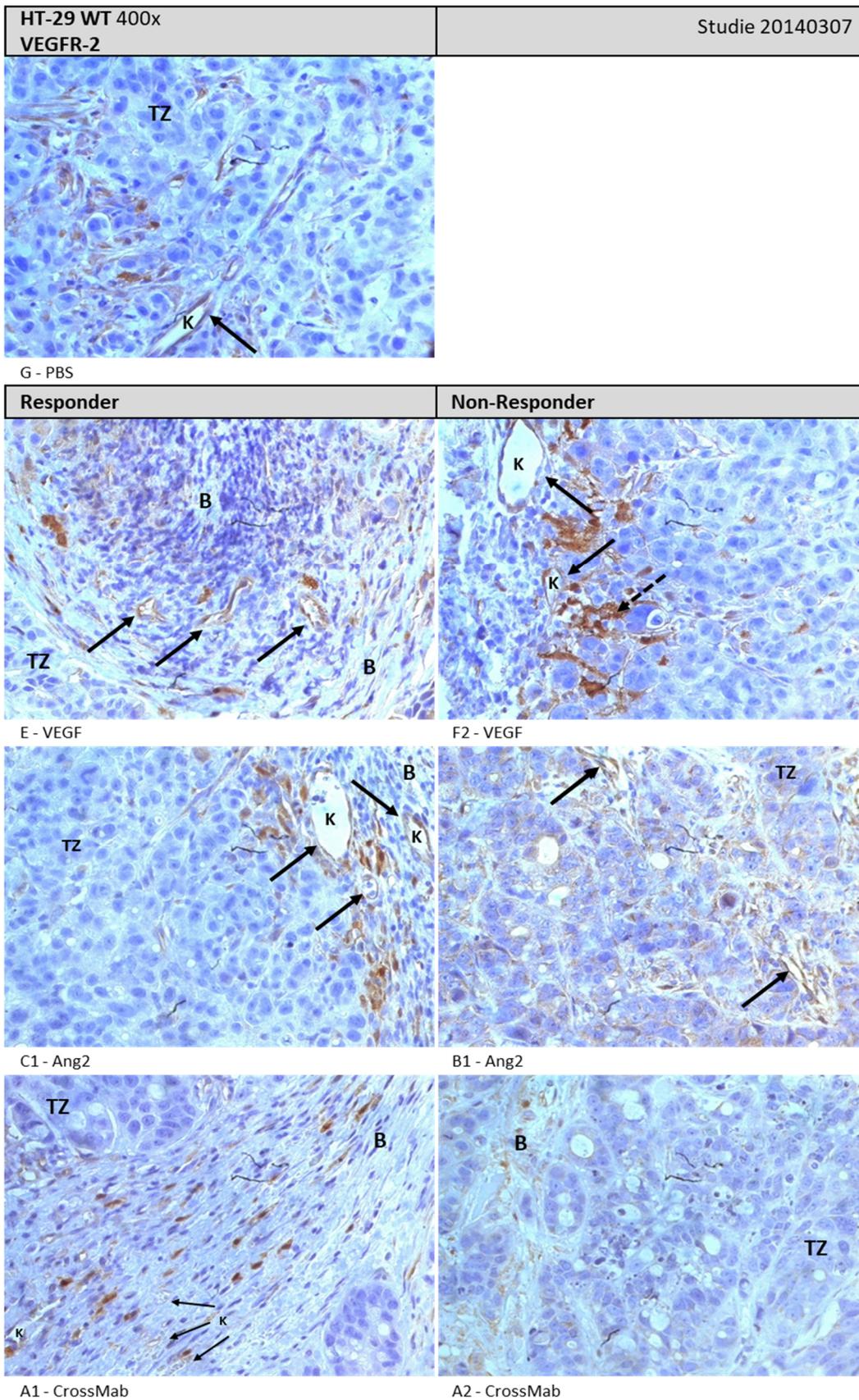
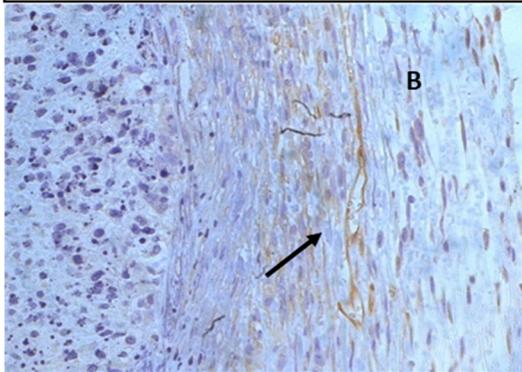


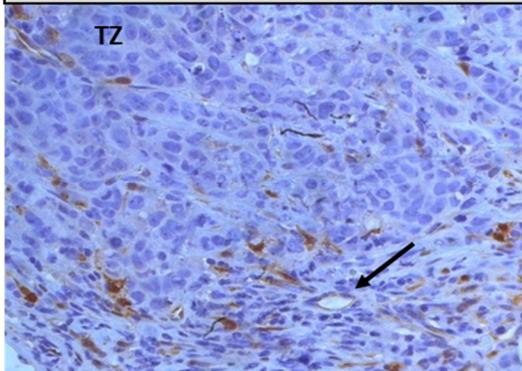
Abbildung 25: VEGF-Rezeptor-2-Färbung in der Zelllinie HT-29 Wildtyp in 400-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Bindegewebe (B), Kapillare (K), VEGFR-2 exprimierendes Endothel (Pfeil), große VEGFR-2 positive schaumige Stromazellen (gestrichelter Pfeil).

DLD-1 400x VEGFR-2	Studie 20140307
-----------------------	-----------------

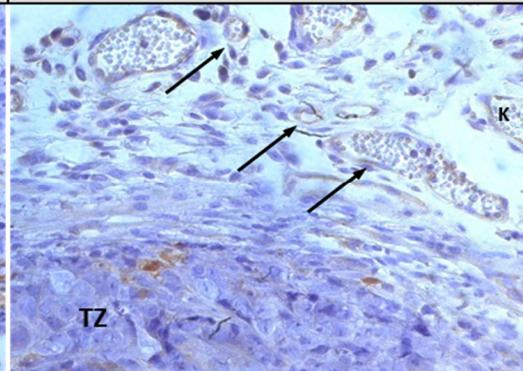


F1 - PBS

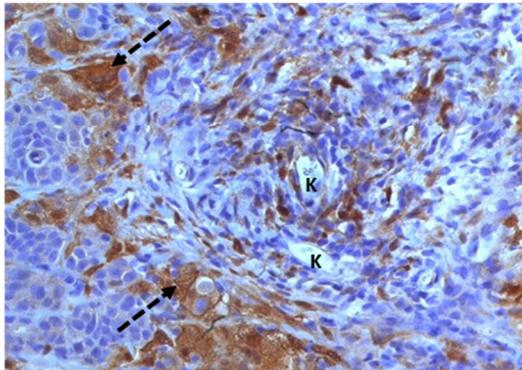
Responder	Non-Responder
-----------	---------------



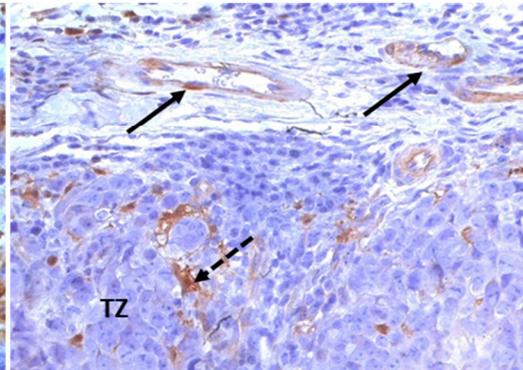
D1 - VEGF



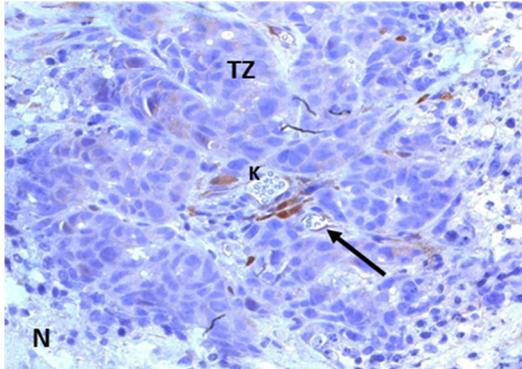
D3 - VEGF



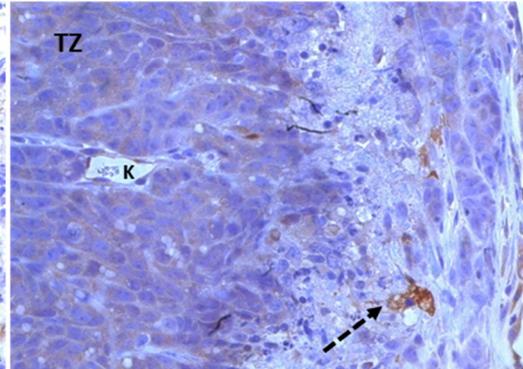
C3 - Ang2



D2 - Ang2



A1 - CrossMab



E - CrossMab

Abbildung 26: VEGF-Rezeptor-2-Färbung in der Zelllinie DLD-1 in 400-facher Vergrößerung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Bindegewebe (B), Kapillare (K), VEGFR-2 exprimierendes Endothel (Pfeil), große VEGFR-2 positive schaumige Stromazellen (gestrichelter Pfeil).

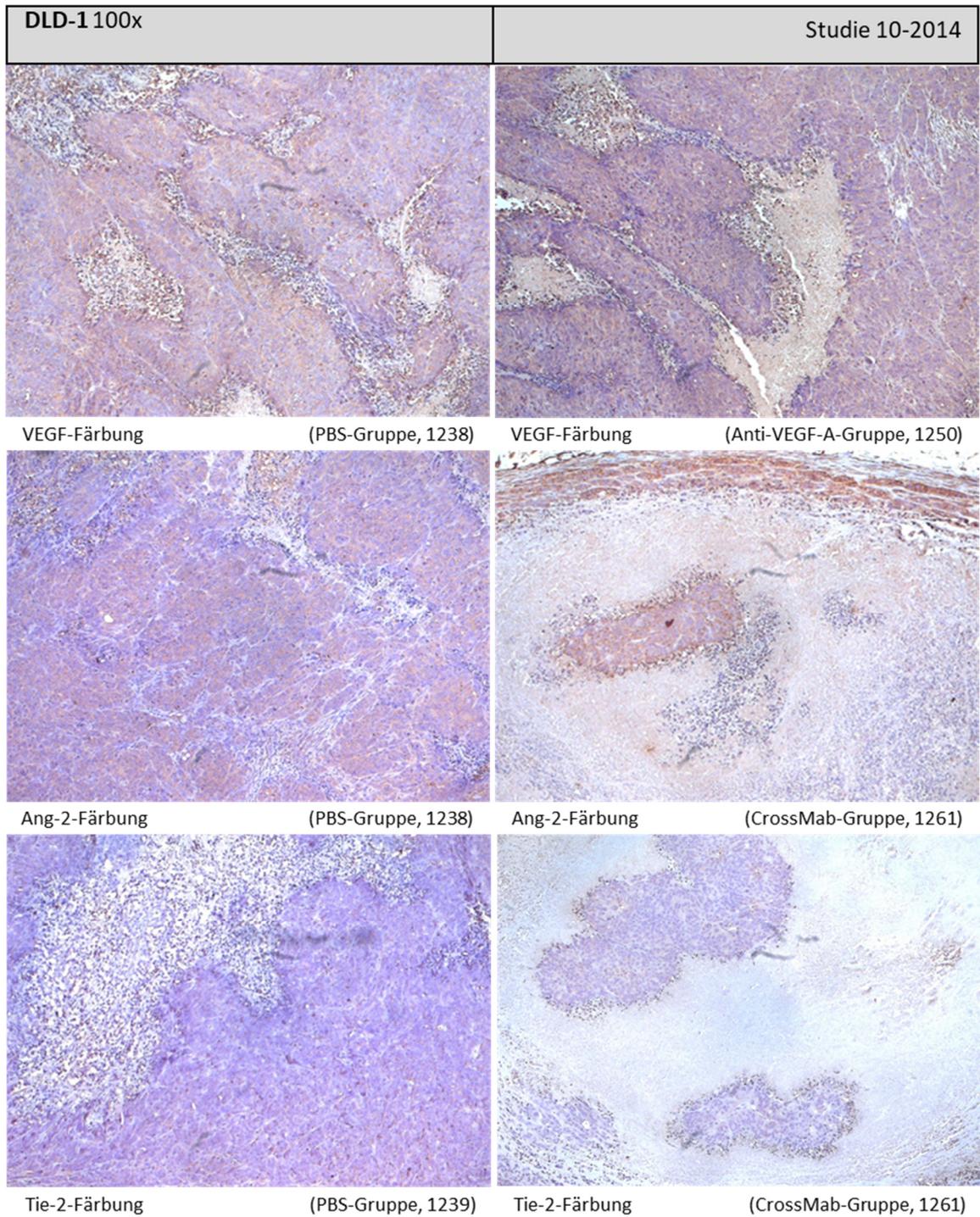


Abbildung 27: Immunhistochemische Anfärbung von VEGF, Ang-2 und Tie-2 in 100-facher Vergrößerung. VEGF und Ang-2 zeigen sich in allen Tumor- und Stromazellen zytoplasmatisch stark exprimiert. Die Anfärbung des Tie-2-Rezeptors erbrachte keine spezifische Färbung.

7. Diskussion

Das ursprüngliche Konzept der antiangiogenen Therapie war es die Blutperfusion des Tumors zu stören und die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zu unterbinden. Es gibt neue Hinweise, dass dieser Druck auf die Tumorzellen zu einer exzessiven Ausschüttung von proangiogenen Faktoren führt. Aufgrund der gestörten Angiogenese kommt es in Folge zu unreifen und permeablen Gefäßwänden, durch die Tumorzellen sich schneller und invasiver ausbreiten können. Demzufolge gilt es eine Balance zwischen Gefäßrückbildung und Gefäßnormalisierung zu erreichen. Es wurde festgestellt, dass eine antiangiogene Therapie zur Gefäßnormalisierung beiträgt, so dass die Wirksamkeit einer kombinierten Chemotherapie verstärkt wird (Kienast u. a. 2013). Zudem hatten Studien gezeigt, dass die VEGF-Expression signifikant mit einem größeren Tumolvolumen korreliert, sowie mit einem höhergradigem und fortgeschrittenem Tumorstadium (Mohamed u. a. 2019). Im Rahmen des metastasierten KKR hat die Kombination des VEGF-Rezeptor-Blockers Bevacizumab mit etablierten fluoropyrimidinhaltigen Chemotherapien zu einer signifikanten Effektivitätssteigerung im Gesamtüberleben, progressionsfreiem Intervall und gegenüber der Chemotherapie allein geführt (Grothey und Allegra 2012) und ist klinischer Standard. Jedoch zeigt sich die Therapie nur in einem begrenzten Zeitraum zufriedenstellend bei folgender Rezidivbildung, was zur Annahme von Fluchtmechanismen und alternativen Angiogenesewegen führt. In Tumoren verschiedener Histologie wurde eine verstärkte Expression von Ang-2 gefunden, welche mit einer schlechteren Prognose einhergehen, so dass hier ein neuer Forschungsschwerpunkt liegt. Mit einem neu entwickelten bispezifischen Antikörper, der VEGF und Ang-2 bindet, soll die bisherige Therapie mit VEGF verbessert werden.

7.1. Diskussion Studie 1

In dieser Studie wurden die Antikörper als Monotherapie anhand der Zelllinie HT-29 FUPW verglichen. Ang-2 und CrossMab riefen zu Beginn der Behandlung eine Regression hervor und zeigten bis zum Ende das geringste Tumorstadium gegenüber der Kontrollgruppe. Ang-2 zeigte sich hier am wirksamsten und scheint anhand der vorliegenden Ergebnisse einen maßgeblichen Einfluss auf das Tumorstadium im Modell HT-29 FUPW zu haben und bestätigt ihn als wichtigen Faktor für die antiangiogene Therapie des KKR. Zudem zeigten alle Therapiegruppen eine sehr gute Verträglichkeit. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet. Nach Ermittlung der Fluoreszenzintensität und im Vergleich mit dem Tumorstadium konnte eine Proportionalität festgestellt werden. Im Vergleich zu vorherigen Beobachtungen des Zellklons HT-29 FUPW durch die Arbeitsgruppe Caysa et al. konnte die Korrelation repliziert werden. Die Messungen der Fluoreszenzintensität zeigen bei allen drei Antikörpern zunächst

eine Hemmung während der ersten Hälfte der Beobachtungszeit. Tumore der CrossMab-Gruppe zeigen eine ähnlich, sogar höhere Fluoreszenzintensität als die VEGF-Gruppe bei geringerem Tumolvolumen. Histologisch zeigten sich hier jedoch keine Unterschiede im Tumor-Nekroseverhältnis, welche hätten ursächlich sein können. Tumore mit der Behandlung durch VEGF zeigten bei Responder als auch Non-Respondern ein genauso viel Tumorzellgewebe wie in der CrossMab-Gruppe. Möglicherweise spiegeln die Ergebnisse die Fehlerquote der angewandten Methode wieder, die je nach Einstellung bei 5 – 10 % angegeben wird (Caysa u. a. 2012). Der Zusammenhang zwischen Tumorendgewicht und Tumorendvolumen korrelierte nur in der Kontrollgruppe. In allen anderen Therapiegruppen war kein Zusammenhang zu erkennen, was auf eine unterschiedliche Ausbildung der Morphologie der Tumore unter Antikörpertherapie schließen lässt. Dies konnte auch histologisch mit einem größeren Anteil an Stromagewebe in den Therapiegruppen belegt werden. Ein weiterer Vorteil der antiangiogenen Therapie zeigte sich in der Metastasierung. Makroskopisch zeigten sich in der Kontrollgruppe die größten abdominelle Metastasen und auch in der CrossMab-Gruppe zeigten sich kleine abdominelle Metastasen. Im Gegensatz dazu konnten in der Ang-2-Gruppe keine makroskopischen Metastasen gefunden werden und in der VEGF-Gruppe nur ein einziger weiterer subkutaner Tumor. Die Metastasierung scheint hier besonders durch die Hemmung von Ang-2 reduziert werden zu können, was sich auch in der Untersuchung der Lungenmetastasierung nachweisen ließ. Die Metastasierung der Lungen wurde durch die Fluoreszenzbildgebung beurteilt. In der Ang-2-Gruppe waren keine Lungenmetasen nachweisbar und in CrossMab-Gruppe waren, im Gegensatz zur Kontroll- und VEGF-Gruppe, nur sehr kleine Metastasen sichtbar. Diese erste Studie mit einer geringen Gruppenpopulation zeigte bereits Vorteile in der antiangiogenen Therapie unter gemeinsamer Ausrichtung auf Ang-2 und lieferte hier auch Vorteile im Bezug zur Metastasierung mit Hilfe des Fluoreszenzimagings. Aufgrund der guten Verträglichkeit und Wirksamkeit wurde in den weiteren Studien die kombinierte Hemmung von VEGF und Ang-2 fokussiert und geprüft.

7.2. Diskussion Studie 2

Diese Studie beinhaltete drei Zelllinien mit Therapiegruppen nach bekanntem Schema und beinhalteten die Antikörper (VEGF, Ang-2 und CrossMab) als Monotherapie. Zur weiteren Analyse der Überbrückung dieses Abwehrmechanismus und der klinischen Relevanz bei der Standardtherapie sollte zusätzlich anhand einer noch kleinen Population (n = 3) der Zelllinie HT29 FUPW die Wirkung und Verträglichkeit der Zugabe einer Chemotherapie allein und in Kombination mit CrossMab geprüft werden. Aus diesem Grund wurde das Therapieregime durch eine Chemotherapie mit 5-FU/Irinotecan als Monotherapie und in Kombination mit CrossMab

beobachtet. Erneut zeigte sich in der Kontrollgruppe das schnellste und größte Tumorwachstum und gibt somit im Vergleich die Wirksamkeit aller therapeutischen Maßnahmen wieder. Die Monotherapie unter CrossMab zeigte in der Zelllinie HT29 FUPW den wirksamsten Gruppeneffekt. Auch bestätigte diese Studie erneut den vorteilhaften Effekt von Ang-2, da sich hier ein Tumor komplett zurückbildete. Leider verstarb aus dieser Gruppe jedoch eine Maus trotz unauffälligem Verhalten und gutem Allgemeinzustand im Vorfeld. Ob es im Rahmen der Therapie oder durch natürliches Verhalten in Hinsicht der Rangordnung bzw. Kannibalismus geschah, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Chemotherapie allein zeigte zum Ende eine ähnliche Wirksamkeit vergleichend zur alleinigen Therapie mit VEGF, obwohl letztere zu Beginn der Therapie vorteilhafter erschien. Die Kombination von CrossMab und Chemotherapie zeigte überraschenderweise eine ähnlich gute Wirksamkeit im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie. Die Chemotherapie war insgesamt gut verträglich und hemmte in der HT29 FUPW das Tumorwachstum. Aufgrund der Wirksamkeit der Chemotherapie allein ist die HT-29 nicht für weitere Untersuchungen zur Überbrückung einer Chemoresistenz geeignet. Neben der HT-29 FUPW sollte die Wirksamkeit und Verträglichkeit der Antikörper- Therapie, insbesondere in Bezug auf das Co-Targeting durch den neuen CrossMab-Antikörper, mit dem Wildtyp und der Zelllinie DLD-1 verglichen werden. In den zuletzt genannten Zelllinien zeigte sich auch hier erneut ein therapeutischer Effekt. In der HT-29 Wildtyp war die Monotherapie mit Ang-2 erneut überlegen mit der vollständigen Rückbildung eines Tumors. Die Inhibition von VEGF war in diesem Modell der CrossMab-Therapie überlegen. In der PBS-Gruppe verstarb eine Maus zu Beginn der Studie. Hier scheinen Einflussfaktoren aus dem Sozialverhalten der Mäuse ursächlich gewesen zu sein. Im DLD-1-Xenotranplantat war ein insgesamt schnelles Tumorwachstum auffällig, so dass die Tumore der Kontrollgruppe bereits 3 Wochen nach Therapiebeginn ein maximales Tumolvolumen erreichten. Bis zu diesem Tag zeigten alle Therapiegruppen eine Verkleinerung der Tumore. Die Monotherapie mit Ang-2 war auch in der DLD-1 vorteilhafter gegenüber VEGF, jedoch zeigte das beste Ergebnis die Therapie durch den bispezifischen CrossMab-Antikörper. Ein Tumor begab sich hier in komplette Stase. Nebenwirkungen, Ulzerationen oder einen Verlust eines Tieres wurden hier nicht beobachtet. In allen Zelllinien wurden die Therapien gut vertragen. Zusammenfassend kam es bei allen Zelllinien zu einem verzögerten Tumorprogress in den Therapiegruppen im Vergleich zur PBS-Gruppe. In den Zelllinien HT-29 FUPW und DLD-1 sogar zur kurzzeitigen Remission. Die Monotherapie mit CrossMab und Ang2 hemmten das Wachstum am effektivsten und konnte mehrmals repliziert werden. Es kam in jeder Zelllinie zu einer vollständigen Remission eines Tumors unter Beteiligung einer Ang-2-Inhibition. Auch die alleinige Chemotherapie erreichte eine Wachstumsverzögerung ähnlich gut wie die VEGF-Therapie. Die Kombination aus

Chemotherapie und CrossMab war gut verträglich. Eine klare Aussage zur Effektivität soll aufgrund der kleinen Gruppenpopulation an dieser Stelle noch nicht getroffen werden. Eine Ang-2-Hemmung bzw. bispezifische Hemmung scheint jedoch eine bessere Wirksamkeit gegenüber der Monotherapie mit VEGF zu haben. In der HT29 FUPW konnte durch Chemotherapie allein bereits ein gutes Ansprechen erzielt werden mit ähnlich gutem Ansprechen in Kombination mit CrossMab. Aus diesem Grund wurde in einer letzten Studie mit der chemoresistenten Zelllinie DLD-1 gearbeitet und die Gruppengröße erhöht. Das Augenmerk soll hier auf die klinisch etablierte Chemotherapie in Kombination mit der standardisierten Antikörpertherapie (Anti-VEGF, Bevacizumab) liegen im Vergleich zur Kombinationstherapie mit Ang-2. Letzteres im Sinne des Co-Targetings durch den Antikörper Vanucizumab, welcher hier, wie auch in den vorherigen Studien dieser Arbeit, durch den präklinischen Surrogat-Antikörper CrossMab mit murinem Anteil ersetzt wird.

7.3. Diskussion Studie 3

Ziel dieser Studie war es neben der Wiederholung des Ergebnisses der positiven Einflussnahme der kombinierten Hemmung von VEGF und Ang-2 auf das Tumorwachstum, auch die Überbrückung einer Resistenz gegen Chemotherapie bei gleichzeitiger kombinierter VEGF/Ang-2-Hemmung zu bewerten. In der klinischen Praxis stellt die Chemoresistenz ein häufiges Problem dar, so dass bereits zur konventionellen Chemotherapie eine antiangiogene Therapie mit Bevacizumab kombiniert wird, um die Wirksamkeit zu steigern. Dennoch ist eine Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten wünschenswert. In dieser Studie wurden Xenotransplantate der KRK-Zelllinie DLD-1 mit bekannter Chemoresistenz gegen 5-FU und Irinotecan verwendet, die sich in der vorherigen Studie als besonders geeignet erwies. Durch eine größere Gruppenpopulation mit 10 Mäusen pro Gruppe können statistische Aussagen getroffen werden. Es wurde die kombinierte Therapie mit Chemo und Anti-VEGF als klinischer Standard gegen die jeweiligen Monotherapien verglichen. Zusätzlich sollte der Einfluss der kombinierten antiangiogenen Hemmung durch CrossMab mit Anti-VEGF als Monotherapie verglichen werden, sowie unter Zugabe einer Chemotherapie. Alle Therapien erwiesen sich gegenüber der Kontrollgruppe im Vorteil. Die jeweiligen Monotherapien von Anti-VEGF und Chemotherapie zeigten erwartungsgemäß eine mäßige Wachstumshemmung, was die Hypothese von Resistenzmechanismen stützt und klinische Beobachtungen widerspiegelt, da die Kombination beider Therapien eine deutlich bessere therapeutische Wirksamkeit zeigt. Überraschenderweise zeigte sich die alleinige antiangiogene durch kombinierte Hemmung von VEGF/Ang-2 (CrossMab) als hochwirksam und konnte unter Zugabe einer Chemotherapie sogar noch verbessert werden. Unter zuletzt genanntem Regime kam es weder zu einem Tumorprogress

noch zu einem Nachwachsen der Tumore. Beide chemotherapiehaltigen Kombinationsbehandlungen zeigen einen signifikanten Vorteil ($p = 0,009$ und $p = 0,024$) gegenüber der Kontrollgruppe zugunsten der CrossMab-haltigen Therapie, die sich auch als Monotherapie als signifikant ($p = 0,021$) gegenüber der Kontrolle erwies. Dies macht erneut den bedeutenden Einfluss des Angiopoietin-2 in der Neovaskularisierung deutlich und sollte als wichtiger therapeutischer Einflussfaktor in der Behandlung der KRK in Betracht gezogen werden. Auch scheint die Theorie über Ang-2 als Fluchtmechanismus bei der Anti-VEGF-Behandlung korrekt, da das Co-Targeting signifikant wirksam gegenüber der alleinigen VEGF-Hemmung war. Ebenso bestätigt sich die bessere Wirksamkeit einer Chemotherapie durch Überbrückung der Resistenzen durch eine gezielte antiangiogene Therapie, wie die Zugabe eines VEGF-Hemmers. Allerdings konnte die Wirksamkeit durch die Kombination mit CrossMab noch verstärkt werden.

7.4. Diskussion der histologischen Analysen

Der Einfluss der Hemmung von Ang-2 und VEGF konnte in den histologischen Analysen bestätigt werden. So zeigte sich unter den Respondern (vgl. Abbildung 28, Reihe 2 + 3) in der immunhistochemischen Färbung der Kapillarendothelien mit CD31 häufig eine Gefäßrarifizierung im Gegensatz zu den gut ausgebildeten Kapillaren der Non-Responder (vgl. Abbildung 28, Reihe 1). Bei später wachsenden Tumoren konnten gut ausgebildete Gefäße ebenfalls dargestellt werden. Dies lässt erstens die Aussage zu, dass bei erfolgreichem Ansprechen der therapeutischen Hemmung von VEGF- und Ang-2 es zu einer verminderten Kapillarisation und somit fehlender Versorgung des Tumorgewebes kommt. Dies führt folgend zum Tumorzelluntergang mit Verschiebung des Tumorzellanteils zugunsten des Nekrose- und Stromaanteils. Zweitens scheint bei fehlendem Ansprechen der Therapie weitere Angiogenesefaktoren eine Rolle zu spielen, wie u. a. FGF, PDGF, PlGF (Itatani u. a. 2018), durch Schutz der Endothelien durch Erhöhung Perizytenabdeckung oder durch Invasion in benachbartes Gewebe zur Rekrutierung normaler Gefäße (Bergers und Hanahan 2008). Letzteres wird durch den Nachweis größerer Gefäße im Bereich den Tumorrandes im Übergang zur Subcutis und Muskulatur bestätigt. Das primäre Therapieansprechen und spätere Wachstum einiger Tumore könnte durch die Entstehung weiterer Resistenzen im Rahmen der Ang-2/VEGF-Hemmung erklärt werden. Gut geformte Gefäße in Tumoren, welche gut auf CrossMab ansprechen, unterstützen die Annahme der Gefäßnormalisierung. Diese neuere These besagt, dass antiangiogene Wirkstoffe vorübergehend die abnormale Gefäßstruktur von Tumoren normalisiert und somit effizienter für zusätzliche Wirkstoffe wird (Jain 2005), wie z. B. einer Chemotherapie. Dieser Ansatz steht im Gegensatz zur bisherigen Auffassung, dass die vaskuläre Regression durch die antiangiogene Therapie zum Nährstoff- und Sauerstoffentzug führt, gefolgt

von Zelltod und Nekrosebildung, was das Tumorwachstum hemmt. Eine Gefäßnormalisierung würde die deutlich verbesserte Wirksamkeit der kombinierten Therapie (CrossMab und Chemo) und die Tumorregression bei 10 von 10 Tumoren erklären. Es kann vermutet werden, dass Tumore unter CrossMab-Monotherapie nicht gewachsen wären, wenn sie eine Chemotherapie erhalten hätte. Andererseits muss gesagt werden, dass in jedem Tumorrest in der histologischen Analyse Tumorzellen sichtbar wurden, so dass bei Fortführung der Beobachtung oder nach Beenden der Therapie ein Rezidiv wahrscheinlich ist. Unter Vermittlung von CD31 an den Endothelien, v. a. im Interzellularspalt, kommt es zur Diapedese, einem Leukozytenausstrom ins umliegende Gewebe. Dies ist bekanntermaßen bei Entzündungsreaktionen der Fall, kann jedoch auch im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Die Infiltration mit CD45-positiven Leukozyten zeigte sich besonders gut in den Behandlungsgruppen. Besonders Tumore, die sich unter der Therapie zurückbildeten, zeigten eine ausgeprägte Infiltration von Abwehrzellen (vgl. Abbildung 28, Reihen 2 + 3). Dies bestätigt die kontroverse Annahme, dass ein hochreguliertes Immunsystem mit einer Hemmung des Tumorwachstums korreliert bzw. ein geschwächtes Immunsystem mit einer erhöhten Krebsinzidenz verbunden ist (Pernot u. a. 2014). Es ist zu beachten, dass das Modell der Nacktmaus aufgrund des fehlenden Thymus kein intaktes Immunsystem besitzt und die spezifische Abwehr aufgrund der fehlenden T-Zellen nicht vollständig entwickelt ist. Für die Immunabwehr sind nur Zellen der unspezifischen Abwehr (Makrophagen, Natürliche Killerzellen) und B-Lymphozyten beteiligt. Man kann sagen, dass eine Tumorverzögerung mit besonderen histologischen Merkmalen verbunden ist. Eine intratumorale Nekrose umgeben von Tumorzellen, welche deutlich aufgelockert erscheint und von Stroma durchzogen ist. Fasern aus Bindegewebe ummanteln den Tumor peripher. Im Grenzbereich zwischen peripheren Tumorzellen und Stroma befanden sich die meisten, gut ausgebildeten CD31-positiven Gefäße, was auf die Annahme der Gefäßnormalisierung hinweist. Zudem konnten besonders viele CD45-positiv Leukozyten in diesen Tumoren gefunden werden, was auf eine erleichterte Einwanderung in das Gewebe hinweist. Es ist anzunehmen, dass mehrere Effekte auf die Tumorregression Einfluss nehmen, wie die Gefäßnormalisierung, ein Entzug von Nähr- und Sauerstoff aufgrund der Gefäßdestruktion mit folgender Nekrosebildung sowie eine vermehrte Abwehrreaktion durch verstärkte Ansammlung von Immunzellen.

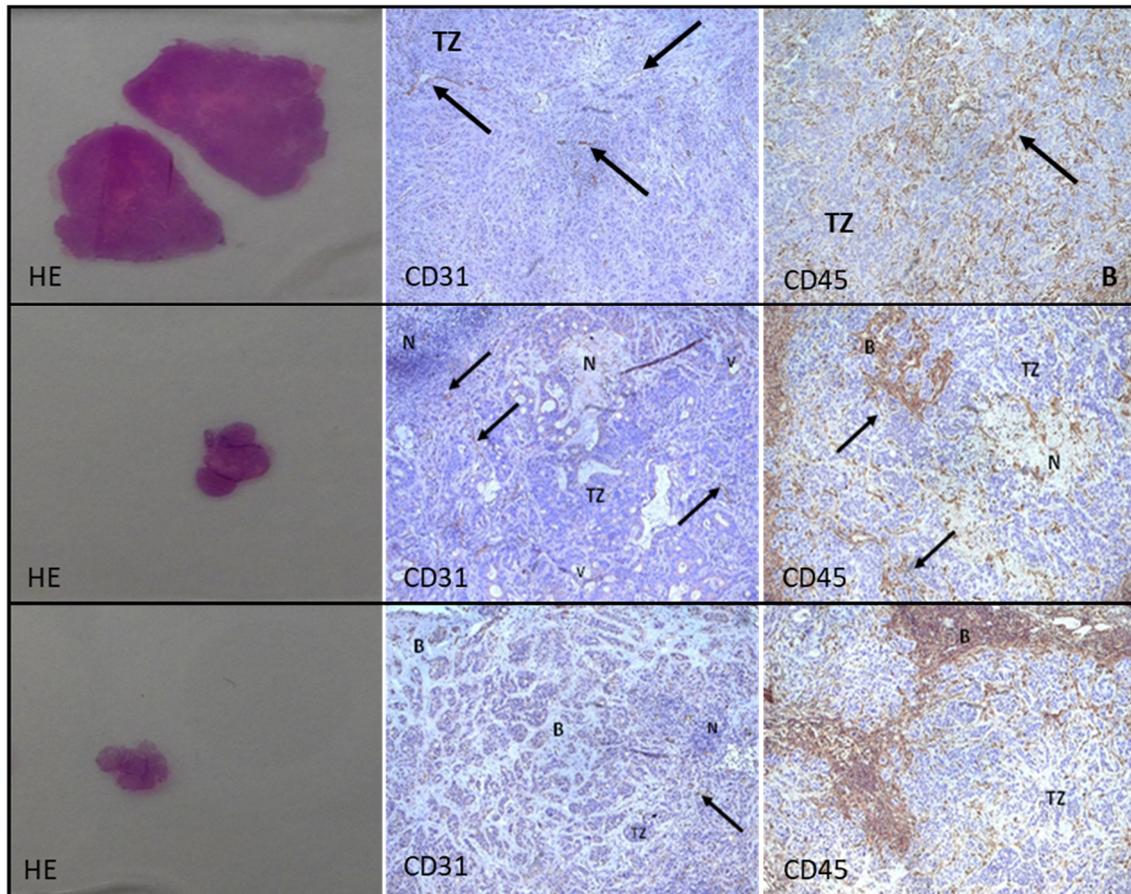


Abbildung 28: HT-29 FUPW in HE-Färbung als Makroaufnahme/ CD31- und CD45-Immunhistochemie je in 100-facher Vergrößerung. **Reihe 1:** Non-Responder unter Anti-VEGF. In der HE-Übersicht gut sichtbar ist der hohe Anteil von Tumorzellen (blau/lila) im Gegensatz zu den eosinophilen Nekrosezonen (rosa). Daneben stellt sich die große Zahl an CD31 positiven Blutgefäßen mit deutlichen Lumen dar. Braun gefärbte CD45 positive Zellen verteilen sich in den Septen. **Reihe 2:** Responder unter Anti-VEGF. In der CD31-Färbung zeigen sich noch kleine Gefäße mit deutlich mehr Nekrosezonen. Die CD45-Färbung erscheint stärker, auch hier deutlich mehr Nekrose. **Reihe 3:** Responder unter CrossMab. Auffällig wenig CD31 positive Zellen, viele Septen und ausgeprägte Infiltration von Leukozyten in der CD45-Färbung. Abk.: Tumorzellen (TZ), Nekrose (N), Bindegewebe (B).

Ang-2 und VEGF konnten in allen Tumorzellen mit zytoplasmatisch Expression, sowie auch in Nekrosegebieten deutlich nachgewiesen werden, wobei keine Unterschiede in den Therapiegruppen ersichtlich war. Eine weitere quantitative Bestimmung wäre bei der Immunhistochemie zur näheren Bestimmung im Weiteren denkbar. Der VEGF-Rezeptor-2 zeigte sich inhomogen in seiner Expression nicht nur innerhalb der Therapiegruppen, sondern auch im Präparat. Vorwiegend ließ er sich in den Gefäßendothelien nachweisen und auch in einigen Zellen im Stroma. Obwohl bewiesen wurde, dass VEGFR-2 ein Hauptakteur in der Angiogenese ist, ist die Datenlage noch gering. Es wurde lange angenommen, dass er ausschließlich von Gefäßendothelien exprimiert wird, doch wurde er mittlerweile auch in ovariellen

Granulosazellen (Greenaway u. a. 2004) oder auch in unterschiedlichen Tumorarten nachgewiesen, wie im Malignen Melanom (Molhoek u. a. 2011), in Tumorzellen von Brustkrebsproben (Yan u. a. 2015), bei Leukämien (El-Obeid u. a. 2004), im urotheliale Blasenkarzinom (Gakiopoulou-Givalou u. a. 2003) oder im Lungenkarzinom (Decaussin u. a. 1999). Im Multiplen Myelom wurde der Rezeptor ebenfalls nachgewiesen. Es wurde allerdings auch festgestellt, dass nicht alle Tumorzellen gleichermaßen den VEGFR-2 exprimierten (Kumar u. a. 2003). Die Heterogenität in der Expression von VEGF-Rezeptoren könnte demnach die Wirksamkeit der Anti-VEGF-Behandlungen beeinflussen und somit auch eine therapeutische Konsequenz bezüglich des Einsatzes von VEGF-Hemmern nach sich ziehen, z.B. in der Patientenauswahl. Erste immunhistochemische Analysen anhand von KRK-Zelllinien in anderen Studien bestätigen die Annahme über den Einfluss der VEGF-Rezeptoren als Prognosefaktor (D'Haene u. a. 2018).

8. Zusammenfassung

Alle präklinischen Studien an Xenograften im Mausmodell dieser Arbeit bestätigten einen deutlich positiven Einfluss der Ang-2-Blockade in verschiedenen Tumormodellen. In den ersten Versuchen im Rahmen des Fluoreszenzimagings war die Ang-2-Hemmung mit einer geringeren Metastasierung verbunden. Das Fluoreszenzimaging erwies sich als gute Methode zur Beobachtung des Tumorprogresses im s. c. Xenograftmodell anhand der Zelllinie HT-29 FUPW und zur Registrierung von Mikrometastasen, was weitere Studien zur Metastasierung unterstützen könnte. Wesentlichen Unterschiede in der Generierung oder dem Wachstumsverhalten von Tumoren der Zelllinien HT-29 Wildtyp und seinem fluoreszierenden Klon ergaben sich nicht. Auch Nachteile während der Therapien waren nicht zu beobachten, was für weitere Studien anhand der HT-29 FUPW als Darmkrebsmodell spricht im Zusammenhang mit der in-vivo Fluoreszenzbildgebung zum Monitoring von Therapien. In den Studien wurde gezeigt, dass die Wirksamkeit einer Anti-VEGF-Behandlung durch die Kombination mit Ang-2 verbessert werden kann und unterstützt die gemeinsame Ausrichtung auf Anti-VEGF-A- und Ang-2 (CrossMab). Besonders vorteilhaft zeigte sich der klinische Standard als Kombination von VEGF und Chemotherapie, wobei die Wirkung über die Zeit nachließ aufgrund der Entwicklung von Resistenzen. Hier konnte die Wirksamkeit durch CrossMab und Chemotherapie auch über die Zeit übertroffen werden. Insgesamt waren die antiangiogenen Therapien, insbesondere CrossMab, nebenwirkungsarm, auch in Kombinationsbehandlungen mit Chemotherapie. Diese und weitere erfreuliche Ergebnisse aus präklinischen Studien führte zur Einführung des humanisierten CrossMab-Antikörpers (Vanucizumab) in klinische Studien. In der Ende 2019 veröffentlichten McCaVE-Studie, einer 1:1 randomisierten Phase-II-Studie, wurde die Wirksamkeit von Vanucizumab + mFOLFOX-6 mit Bevacizumab + mFOLFOX-6 als Erstlinientherapie bei metastasiertem KRK an 189 Patienten untersucht (Bendell u. a. 2020). Leider bestätigte sich hier keine signifikant vorteilhafte Wirksamkeit, trotz der präklinischen Erfolge, gegenüber der alleinigen VEGF-A-Hemmung unter zusätzlicher Standardchemotherapie als Erstlinientherapie beim metastasierten Kolorektalkarzinom, so dass die weitere klinische Entwicklung von Vanucizumab eingestellt wurde. Auch wenn der Ansatz der Ang-2 Hemmung die Verbesserung der Wirksamkeit der Standardtherapie mit Anti-VEGF nicht erfüllte, ist das Wissen um die antiangiogene Therapie in den letzten Jahren stetig gewachsen und hat die VEGF-Hemmung in den Mittelpunkt gerückt. Ein Prognosefaktor für diese Therapie existiert jedoch noch nicht. Denkbar wäre hier die weitere Erforschung seiner Rezeptoren, v. a. VEGFR-2, als möglicher Biomarker, da er scheinbar in Endothelien und Geweben unterschiedlich exprimiert wird und daher eine VEGF-Inhibition auf unterschiedliche Weise beeinflussen könnte.

9. Literaturverzeichnis

- Amit, Limor, Irit Ben-Aharon, Liat Vidal, Leonard Leibovici, und Salomon Stemmer. 2013. „The Impact of Bevacizumab (Avastin) on Survival in Metastatic Solid Tumors - A Meta-Analysis and Systematic Review“. *PLoS ONE* 8(1):e51780. doi: 10.1371/journal.pone.0051780.
- AWMF, und Deutsche Krebsgesellschaft e.V. 2019. „Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 2.1, 2019“. 120.
- Bäriswyl, Vanessa, und Gerhard Christofori. 2009. „The Angiogenic Switch in Carcinogenesis“. *Seminars in Cancer Biology* 19(5):329–37. doi: 10.1016/j.semcancer.2009.05.003.
- Bendell, Johanna C., Tamara Sauri, Antonio Cubillo Gracián, Rafael Alvarez, Carlos López-López, Pilar García-Alfonso, Maen Hussein, Maria-Luisa Limon Miron, Andrés Cervantes, Clara Montagut, Cristina Santos Vivas, Alberto Bessudo, Patricia Plezia, Veerle Moons, Johannes Andel, Jaafar Bennouna, Andre van der Westhuizen, Leslie Samuel, Simona Rossomanno, Christophe Boetsch, Angelika Lahr, Izolda Franjkovic, Florian Heil, Katharina Lechner, Oliver Krieter, und Herbert Hurwitz. 2020. „The McCAVE Trial: Vanucizumab plus mFOLFOX-6 Versus Bevacizumab plus mFOLFOX-6 in Patients with Previously Untreated Metastatic Colorectal Carcinoma (mCRC)“. *The Oncologist* 25(3):e451–59. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0291.
- Bergers, Gabriele, und Douglas Hanahan. 2008. „Modes of resistance to anti-angiogenic therapy“. *Nature reviews. Cancer* 8(8):592–603. doi: 10.1038/nrc2442.
- Birkner, Bernd, Richard Raedsch, und Martin Strauch. 2021. „Prognose & Verlauf » Darmkrebs » Krankheiten » Internisten im Netz «“. *Internisten im Netz*. Abgerufen 15. Oktober 2021 (<https://www.internisten-im-netz.de/krankheiten/darmkrebs/prognose-verlauf.html>).
- Brenner, Hermann, Matthias Kloor, und Christian Peter Pox. 2014. „Colorectal Cancer“. *The Lancet* 383(9927):1490–1502. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- Cardoso, Rafael, Anna Zhu, Feng Guo, Thomas Heisser, Michael Hoffmeister, und Hermann Brenner. 2021. „Inzidenz und Mortalität proximaler und distaler kolorektaler Karzinome in Deutschland“. *Deutsches Ärzteblatt*. Abgerufen 15. Oktober 2021 (<https://www.aerzteblatt.de/archiv/218737/Inzidenz-und-Mortalitaet-proximaler-und-distaler-kolorektaler-Karzinome-in-Deutschland>).
- Caysa, Henrike, Stefan Hoffmann, Jana Luetzkendorf, Lutz Peter Mueller, Susanne Unverzagt, Karsten Mäder, und Thomas Mueller. 2012. „Monitoring of Xenograft Tumor Growth and Response to Chemotherapy by Non-Invasive In Vivo Multispectral Fluorescence Imaging“. *PLoS ONE* 7(10). doi: 10.1371/journal.pone.0047927.
- Decaussin, M., H. Sartelet, C. Robert, D. Moro, C. Claraz, C. Brambilla, und E. Brambilla. 1999. „Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Two Receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in Non-Small Cell Lung Carcinomas (NSCLCs): Correlation with Angiogenesis and Survival“. *The Journal of Pathology* 188(4):369–77. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199908)188:4<369::AID-PATH381>3.0.CO;2-X.
- Deutsches Krebsforschungszentrum, und Krebsinformationsdienst. 2018. „Wie entsteht Krebs?“ Abgerufen 21. Juli 2020

(<https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsentstehung.php>).

- D'Haene, Nicky, Caroline Koopmansch, Yves-Rémi Van Eycke, Françoise Hulet, Justine Allard, Sarah Bouri, Sandrine Rorive, Myriam Rimmelink, Christine Decaestecker, Calliope Maris, und Isabelle Salmon. 2018. „The Prognostic Value of the Combination of Low VEGFR-1 and High VEGFR-2 Expression in Endothelial Cells of Colorectal Cancer“. *International Journal of Molecular Sciences* 19(11):3536. doi: 10.3390/ijms19113536.
- El-Obeid, Adila, Nadia Sunnuqrut, Azhar Hussain, Khalid Al-Hussein, Marina I. Gutiérrez, und Kishor Bhatia. 2004. „Immature B Cell Malignancies Synthesize VEGF, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (KDR)“. *Leukemia Research* 28(2):133–37. doi: 10.1016/s0145-2126(03)00188-7.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, und M. W. Moore. 1996. „Heterozygous Embryonic Lethality Induced by Targeted Inactivation of the VEGF Gene“. *Nature* 380(6573):439–42. doi: 10.1038/380439a0.
- Gakiopoulou-Givalou, H., L. Nakopoulou, E. G. Panayotopoulou, A. Zervas, J. Mavrommatis, und A. Giannopoulos. 2003. „Non-Endothelial KDR/Flk-1 Expression Is Associated with Increased Survival of Patients with Urothelial Bladder Carcinomas“. *Histopathology* 43(3):272–79. doi: 10.1046/j.1365-2559.2003.01690.x.
- Goede, V., O. Coutelle, J. Neuneier, A. Reinacher-Schick, R. Schnell, T. C. Koslowsky, M. R. Weihrauch, B. Cremer, H. Kashkar, M. Odenthal, H. G. Augustin, W. Schmiegel, M. Hallek, und U. T. Hacker. 2010. „Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy“. *British Journal of Cancer* 103(9):1407–14. doi: 10.1038/sj.bjc.6605925.
- Graham, Kaitlin, und Evan Unger. 2018. „Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment“. *International Journal of Nanomedicine* 13:6049–58. doi: 10.2147/IJN.S140462.
- de Gramont, Aimery, Eric Van Cutsem, Hans-Joachim Schmoll, Josep Tabernero, Stephen Clarke, Malcolm J. Moore, David Cunningham, Thomas H. Cartwright, J. Randolph Hecht, Fernando Rivera, Seock-Ah Im, György Bodoky, Ramon Salazar, Frédérique Maindrault-Goebel, Einat Shacham-Shmueli, Emilio Bajetta, Martina Makrutzki, Aijing Shang, Thierry André, und Paulo M. Hoff. 2012. „Bevacizumab plus Oxaliplatin-Based Chemotherapy as Adjuvant Treatment for Colon Cancer (AVANT): A Phase 3 Randomised Controlled Trial“. *The Lancet Oncology* 13(12):1225–33. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70509-0.
- Greenaway, James, Kristin Connor, Hanne G. Pedersen, Brenda L. Coomber, Jonathan LaMarre, und Jim Petrik. 2004. „Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor, Flk-1/KDR, Are Cytoprotective in the Extravascular Compartment of the Ovarian Follicle“. *Endocrinology* 145(6):2896–2905. doi: 10.1210/en.2003-1620.
- Haibe, Yolla, Malek Kreidieh, Hiba El Hajj, Ibrahim Khalifeh, Deborah Mukherji, Sally Temraz, und Ali Shamseddine. 2020. „Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer“. *Frontiers in Oncology* 10. doi: 10.3389/fonc.2020.00221.

- Hentsch, Sebastian. 2020. „Pschyrembel Online | Nekrose“. *Pschyrembel Online*. Abgerufen 9. Oktober 2021 (<https://www.pschyrembel.de/Nekrose/K0F1C>).
- Hofheinz, Ralf-Dieter, Dirk Arnold, Marcus Borner, und Gunnar Folprecht, Ullrich Graeven, Holger Hebart, Susanna Hegewisch-Becker, Volker Heinemann, Thomas Meybier, Ron Pritzkeleit, Werner Scheithauer, Josef Thaler, Jürgen Weitz, Bernhard Wörmann. 2018. „Kolonkarzinom“. *Onkopedia*. Abgerufen 9. Oktober 2021 (<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/kolonkarzinom>).
- Holmer, Christoph, und Martin E. Kreis. 2017. „Darmkrebs — das Neueste in Diagnostik und Therapie“. *MMW - Fortschritte der Medizin* 159(16):54–62. doi: 10.1007/s15006-017-9592-7.
- Hossfeld, Dieter K., Walter Fiedler, Ursula Gehling, und Thorsten Mende. 2001. „Neoangiogenese und Tumorwachstum: Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze“. *Deutsches Ärzteblatt*. Abgerufen 9. Oktober 2021 (<https://www.aerzteblatt.de/archiv/27317/Neoangiogenese-und-Tumorwachstum-Pathophysiologie-und-neue-therapeutische-Ansaetze>).
- Itatani, Yoshiro, Kenji Kawada, Takamasa Yamamoto, und Yoshiharu Sakai. 2018. „Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer—Alterations to Anti-VEGF Pathway“. *International Journal of Molecular Sciences* 19(4). doi: 10.3390/ijms19041232.
- Jain, Rakesh K. 2005. „Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy“. *Science* 307(5706):58–62. doi: 10.1126/science.1104819.
- Kienast, Yvonne, Christian Klein, Werner Scheuer, Romi Raemsch, Erica Lorenzon, Dirk Bernicke, Frank Herting, Sidney Yu, Huynh Hung The, Laurent Martarello, Christian Gassner, Kay-Gunnar Stubenrauch, Kate Munro, Hellmut G. Augustin, und Markus Thomas. 2013. „Ang-2-VEGF-A CrossMab, a Novel Bispecific Human IgG1 Antibody Blocking VEGF-A and Ang-2 Functions Simultaneously, Mediates Potent Antitumor, Antiangiogenic, and Antimetastatic Efficacy“. *Clinical Cancer Research* 19(24):6730–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0081.
- Klein, Christian, Wolfgang Schaefer, und Jörg T. Regula. 2016. „The use of CrossMab technology for the generation of bi- and multispecific antibodies“. *mAbs* 8(6):1010–20. doi: 10.1080/19420862.2016.1197457.
- Korn, Claudia, und Hellmut G. Augustin. 2015. „Mechanisms of Vessel Pruning and Regression“. *Developmental Cell* 34(1):5–17. doi: 10.1016/j.devcel.2015.06.004.
- Kumar, S., T. E. Witzig, M. Timm, J. Haug, L. Wellik, R. Fonseca, P. R. Greipp, und S. V. Rajkumar. 2003. „Expression of VEGF and Its Receptors by Myeloma Cells“. *Leukemia* 17(10):2025–31. doi: 10.1038/sj.leu.2403084.
- Maucher, Dr. Isabelle Viktoria. 2020. „Bevacizumab - Anwendung, Wirkung, Nebenwirkungen | Gelbe Liste“. *Gelbe Liste Online*. Abgerufen 17. Oktober 2021 (https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Bevacizumab_48613).
- Mohamed, Salem Y., Hanan Lotfy Mohammed, Hanaa M. Ibrahim, Elshaimaa M. Mohamed, und Mona Salah. 2019. „Role of VEGF, CD105, and CD31 in the Prognosis of Colorectal Cancer Cases“. *Journal of Gastrointestinal Cancer* 50(1):23–34. doi: 10.1007/s12029-017-0014-y.

- Molhoek, Kerrington R., Gulsun Erdag, Jk Rasamny, Cheryl Murphy, Donna Deacon, James W. Patterson, Craig L. Slingluff, und David L. Brautigan. 2011. „VEGFR-2 Expression in Human Melanoma: Revised Assessment“. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 129(12):2807–15. doi: 10.1002/ijc.25963.
- Nguyen, Long H., Ajay Goel, und Daniel C. Chung. 2020. „Pathways of Colorectal Carcinogenesis“. *Gastroenterology* 158(2):291–302. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.059.
- Pernot, Simon, Magali Terme, Thibault Voron, Oriane Colussi, Elie Marcheteau, Eric Tartour, und Julien Taieb. 2014. „Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives“. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20(14):3738–50. doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3738.
- Pusztaszeri, Marc P., Walter Seelentag, und Fred T. Bosman. 2006. „Immunohistochemische Expression Der Endothelialen Marker CD31, CD34, von Willebrand-Faktor Und Fli-1 in Normalen Menschlichen Geweben“. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54(4):385–95. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.
- Ritz, Jörg-Peter. 2020. „Darmkrebs: Lebenserwartung und Heilungschancen | Helios Gesundheit“. <https://www.helios-gesundheit.de/>. Abgerufen 2. März 2022 (<https://www.helios-gesundheit.de/krebsmedizin/darmkrebs/lebenserwartung-und-heilungschancen/>).
- Robert-Koch-Institut. 2019. „Krebs - Krebsarten“. Abgerufen 9. Oktober 2021 (https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html).
- Robert-Koch-Institut. 2021. „Krebs - Darmkrebs“. *Zentrum für Krebsregisterdaten - Darmkrebs*. Abgerufen 2. März 2022 (https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html).
- Schaefer, Wolfgang, Jörg T. Regula, Monika Bähner, Jürgen Schanzer, Rebecca Croasdale, Harald Dürr, Christian Gassner, Guy Georges, Hubert Kettenberger, Sabine Imhof-Jung, Manfred Schwaiger, Kay G. Stubenrauch, Claudio Sustmann, Markus Thomas, Werner Scheuer, und Christian Klein. 2011. „Immunoglobulin Domain Crossover as a Generic Approach for the Production of Bispecific IgG Antibodies“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(27):11187–92. doi: 10.1073/pnas.1019002108.
- Schmiegel, Wolf, Christian Pox, Dirk Arnold, Rainer Porschen, Claus Rödel, und Anke Reinacher-Schick. 2009. „Kolonreales Karzinom“. *Deutsches Ärzteblatt*. Abgerufen 21. Juli 2020 (<https://www.aerzteblatt.de/archiv/67173/Kolonreales-Karzinom>).
- Seufferlein, Prof. Dr. Thomas. 2021. „Kolonkarzinom | Universitätsklinikum Ulm“. *Universitätsklinikum Ulm Kolonkarzinom*. Abgerufen 9. Oktober 2021 (<https://www.uniklinik-ulm.de/comprehensive-cancer-center-ulm-cccu/fuer-patienten-und-angehoerige/krebserkrankungen/kolonkarzinom.html>).
- Shibuya, Masabumi. 2013. „Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases“. *Journal of Biochemistry* 153(1):13–19. doi: 10.1093/jb/mvs136.
- Tait, Catherine R., und Pamela F. Jones. 2004. „Angiopoietins in Tumours: The Angiogenic Switch“. *The Journal of Pathology* 204(1):1–10. doi: 10.1002/path.1618.

- Tannapfel, Andrea, Neid, Matthias, Aust, Daniela, und Baretton, Gustavo. 2010. „Entstehung kolorektaler Karzinome“. *Deutsches Ärzteblatt*. Abgerufen 1. August 2020 (<https://www.aerzteblatt.de/archiv/78907/Entstehung-kolorektaler-Karzinome>).
- Tomayko, M. M., und C. P. Reynolds. 1989. „Determination of Subcutaneous Tumor Size in Athymic (Nude) Mice“. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 24(3):148–54. doi: 10.1007/BF00300234.
- Weingärtner, Jens. 2020. „Pschyrembel Online | Angiogenese“. *Pschyrembel Online*. Abgerufen 15. Oktober 2021 (<https://www.pschyrembel.de/Angiogenese/K0QX2>).
- Wohlgemuth, Viola, und Shu-Ming Li. 2012. „Monoklonale Antikörper, die magischen Kugeln Paul Ehrlichs“. *Pharmazeutische Wissenschaft, Apotheken Magazin*, 30(3): 7-14 (review article).
- Yan, Ji-Dong, Yanrong Liu, Zhi-Yong Zhang, Guang-Yin Liu, Jin-Heng Xu, Li-Yun Liu, und Yue-Ming Hu. 2015. „Expression and Prognostic Significance of VEGFR-2 in Breast Cancer“. *Pathology, Research and Practice* 211(7):539–43. doi: 10.1016/j.prp.2015.04.003.

10. Thesen

1. Die kombinierte Therapie durch CrossMab und Chemotherapie zeigt eine signifikante Überlegenheit durch ein verlängertes progressionsfreies Intervall und somit ein verlängertes Überleben im Vergleich zur kombinierten Therapie mit einer VEGF-Inhibition und Chemotherapie.
2. Die kombinierte Hemmung von Ang-2/VEGF ist der Monotherapie durch eine VEGF-Inhibition überlegen.
3. Am wenigsten Wirksam waren die jeweiligen Monotherapien unter einer VEGF-Inhibition bzw. unter einer Chemotherapie.
4. Ang-2 spielt eine entscheidende Rolle in der Tumorangiogenese.
5. Unter CrossMab zeigte sich kein erhöhtes Nebenwirkungsprofil.
6. Unterschiedliches Therapieansprechen ist mit unterschiedlicher Histologie verbunden.
7. In subkutan wachsenden Tumoren korrelierte die Messung der Fluoreszenzintensität mit dem berechneten Volumen und konnte bei allen Therapien vergleichend beobachtet werden.
8. Im Rahmen der Lungenmetastasierung zeigte sich unter Ang-2-Hemmung die geringste Fluoreszenzintensität, d. h. durch die Hemmung von Ang-2 kann eine Metastasierung reduziert werden.

11. Anhang**Erklärungen**

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Waake, 27.02.2022 Juana Freystein

Nachweis Versuchstierkunde

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Tierschutzkommission des Rektorats



Teilnahmebescheinigung/Certificate of Attendance

Juana Freystein

Geboren am / date of birth 22.09.1984
Geboren in / place of birth Wernigerode (Germany)

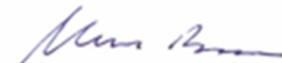
hat vom 24.3.2014 bis 28.3.2014 regelmäßig und erfolgreich am 42-stündigen Kurs

Tierschutz / Versuchstierkunde

teilgenommen. Der Kurs ist von der Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS) zertifiziert und entspricht inhaltlich den Empfehlungen der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) für die Aus- und Weiterbildung von Personen, die an der Durchführung von Tierversuchen beteiligt sind (FELASA, Kategorie B). Der Kurs wurde von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung, Halle (Saale), Deutschland, durchgeführt.

has successfully completed a 42-hours course on Laboratory Animal Science. The course has been certified by Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS), its contents are in accordance with the recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) on the education and training of persons carrying out animal experiments (FELASA, category B). the course was organized and performed by the Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Center for Medical Basic Research, Halle (Saale), Germany.

Halle, den 28.03.2014


PD Dr. Bernhard Hiebl

(Kursleitung)


Heike Weinert

Danksagung

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei all jenen, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll für die Möglichkeit der Umsetzung dieser Arbeit im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danken.

Großer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. Thomas Müller für die gute Betreuung bei der Durchführung der Experimente, für die konstruktiven Ratschläge, die Erschaffung eines schönen Arbeitsklimas und natürlich für die Durchsicht des Manuskripts.

Auch möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Miriam Widder, Frau Dr. rer. nat. Henrike Caysa und Frau Franziska Reipsch für ihre herzliche und humorvolle Aufnahme in die Arbeitsgruppe, ihre Unterstützung beim Gelingen der Labortätigkeiten und Experimente, sowie für die wertvollen Ratschlägen bedanken.

Für ihre Geduld und großartige Unterstützung auf meinem Weg möchte ich mich an dieser Stelle noch ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken. Und auch bei meinem Partner, ohne dessen entlastende Hilfe in der Pandemie neben Beruf und Fortbildung die letzten Schritte zu dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.