

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
(Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll)

**Wirksamkeit verschiedener Multityrosinkinase-Inhibitoren und des  
Epothilon B-Derivates ZK219477 (Sagopilon) alleine und in Kombination in  
humanen Tumorzelllinien**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sandra Paul  
geboren am 18.08.1982 in Halle (Saale)

Betreuer: PD Dr. med. Wieland Voigt

Gutachter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll  
Prof. Dr. med. Dirk Vordermark  
Prof. Dr. med. Martin Schuler (Essen)

Eröffnung der Promotion: 18.06.2013

Verteidigung der Promotion: 14.01.2014

***Für meine Eltern***

## Referat

Global ist in den nächsten 20 Jahren von einer deutlichen Zunahme maligner Erkrankungen auszugehen. Der nach wie vor hohe Anteil fortgeschrittener Tumorstadien stellt dabei eine besondere Herausforderung in Bezug auf Diagnostik und Behandlung dar. Die Heilungschancen durch systemische Therapien bestehend aus aktuell vorwiegend noch klassischen Zytostatika sind aufgrund der limitierenden Toxizitäten und Resistenzentwicklungen begrenzt. Mit zunehmendem Verständnis der zu Grunde liegenden zellulären, molekularen und genetischen Mechanismen für die Entstehung und den Progress einer Tumorerkrankung gelang es in den letzten Jahren, zahlreiche neue tumorspezifische Therapieansätze zu entwickeln. Eine zentrale Rolle spielt dabei u.a. auch die Inhibierung von Rezeptortyrosinkinasen durch Tyrosinkinase-Inhibitoren. Diese neue Substanzklasse eignet sich aufgrund ihres differnten Wirkmechanismus und Nebenwirkungsprofils prinzipiell gut für die Kombination mit konventionellen Zytostatika.

Die vorliegende Dissertation hatte die Zielsetzung, an 4 humanen Tumorzelllinien das zytotoxische Potential 5 verschiedener inovativer Tyrosinkinase-Inhibitoren *in vitro* alleine oder in Kombination mit dem Epothilon B-Derivat Sagopilon näher zu untersuchen. Die Charakterisierung des zytotoxischen Potentials der einzelnen Substanzen erfolgte mit Hilfe des Sulforhodamin B-Zytotoxizitätsassays. Das Verhalten von behandelten Tumorzellen im Zellzyklus wurde mittels Durchflusszytometrie näher untersucht. Der Einfluss einer Behandlung mit Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wurde mittels Western Blot-Analysen erfasst.

In Abhängigkeit von der Tumorzelllinie zeigten die verschiedenen Multityrosinkinase-Inhibitoren im SRB-Assay ein unterschiedliches, teilweise vielversprechendes zytotoxisches Potential. Als Ausdruck eines spezifischen Eingreifens in intrazelluläre Signalkaskaden induzierten die TKI AEE788, GW572016 (Lapatinib), ZD6474 (Vandetanib) und ZD1839 (Gefitinib) eine Arretierung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase; während NVP-AEW541 umgehend Apoptose (Entwicklung eines SubG<sub>1</sub>-Peaks) auslöste. Eine eindeutige Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung konnte im Western-Blot nach Behandlung mit TKI nur partiell nachgewiesen werden. Die Kombination von Sagopilon mit den einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren wirkte bei paralleler Applikationsweise überwiegend synergistisch, während die Applikation der TKI vor Sagopilon vornehmlich antagonistisch wirkte.

Paul, Sandra: Wirksamkeit verschiedener Multityrosinkinase-Inhibitoren und des Epothilon B-Derivates ZK219477 (Sagopilon) alleine und in Kombination in humanen Tumorzelllinien, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, Dissertation, 80 Seiten, 2013.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 DIE ROLLE DER CHEMOTHERAPIE UND „TARGETED THERAPY“ IN DER         MEDIZINISCHEN TUMORTHERAPIE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 DAS MIKROTUBULÄRE SYSTEM ALS ANGRIFFSPUNKT IN DER TUMORTHERAPIE .....</b>	<b>3</b>
1.2.1 AUFBAU UND FUNKTION DER MIKROTUBULI .....	3
<b>1.3 MIKROTUBULI-INTERAGIERENDE AGENZIEN .....</b>	<b>3</b>
1.3.1 EPOTHILONE.....	4
<b>1.4 REZEPTORTYROSINKINASEN ALS „TARGET“ DER TUMORTHERAPIE .....</b>	<b>6</b>
1.4.1 AUFBAU EINER REZEPTORTYROSINKINASE .....	6
1.4.2 FUNKTIONSWEISE VON REZEPTORTYROSINKINASEN .....	7
1.4.3 REZEPTORTYROSINKINASEN IN DER TUMORZELLE .....	8
<b>1.5 REZEPTORTYROSINKINASE-INHIBITOREN .....</b>	<b>10</b>
1.5.1 WIRKPRINZIP.....	10
1.5.2 ÜBERBLICK ÜBER IN DIESER ARBEIT VERWENDETE TYROSINKINASE-INHIBITOREN .....	10
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....</b>	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 ZELLINIEN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 REZEPTORTYROSINKINASE-INHIBITOREN .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 FORMULIERUNG HÄUFIG VERWENDETER MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5 ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOT-ANALYSEN .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6 ZELLKULTIVIERUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>3.7 SRB-ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAY.....</b>	<b>22</b>
3.7.1 BESTIMMUNG DES IC <sub>30</sub> - UND IC <sub>50</sub> -WERTES DER TYROSINKINASE-INHIBITOREN.....	23
3.7.2 KOMBINATIONSVERSUCHE MITTELS SRB-ZYTOTOXIZITÄTS-ASSAY .....	23
<b>3.8 ZELLZYKLUS-ANALYSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.9 WESTERN BLOT-ANALYSEN .....</b>	<b>27</b>
3.9.1 PROTEINISOLIERUNG UND PROTEINQUANTIFIZIERUNG .....	27
3.9.2 WESTERN BLOTTING.....	28

---

<b>3.10 STATISTIK .....</b>	<b>29</b>
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 TESTUNG DER ANTIPROLIFERATIVEN AKTIVITÄT VON SAGOPILON SOWIE DER VERSCHIEDENEN TYROSINKINASE-INHIBITOREN IN HUMANEN TUMORZELLINIEN .</b>	<b>30</b>
4.1.1 WIRKSAMKEIT VON SAGOPILON.....	30
4.1.2 WIRKSAMKEIT VON AEE788.....	31
4.1.3 WIRKSAMKEIT VON NVP-AEW541 .....	32
4.1.4 WIRKSAMKEIT VON GW572016 (LAPATINIB, TYVERB®).....	33
4.1.5 WIRKSAMKEIT VON ZD6474 (VANDETANIB, ZACTIMA®).....	34
4.1.6 WIRKSAMKEIT VON ZD1839 (GEFITINIB, IRESSA®).....	35
<b>4.2 UNTERSUCHUNG DER WIRKSAMKEIT EINER KOMBINIERTEN SEQUENTIELLEN ODER PARALLELEN EXPOSITION VON SAGOPILON UND VERSCHIEDENEN TYROSINKINASE- INHIBITOREN IN EINEM PANEL HUMANER TUMORZELLINIEN.....</b>	<b>36</b>
4.2.1 AEE788.....	37
4.2.2 NVP-AEW541 .....	38
4.2.3 GW572016 (LAPATINIB, TYVERB®) .....	39
4.2.4 ZD6474 (VANDETANIB, ZACTIMA®) .....	40
4.2.5 ZD1839 (GEFITINIB, IRESSA®).....	41
<b>4.3 AUSWIRKUNGEN EINER BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN TYROSINKINASE- INHIBITOREN AUF DEN ZELLZYKLUS.....</b>	<b>42</b>
4.3.1 AEE788.....	42
4.3.2 NVP-AEW541 .....	43
4.3.3 GW572016 (LAPATINIB, TYVERB®) .....	45
4.3.4 ZD6474 (VANDETANIB, ZACTIMA®) .....	46
4.3.5 ZD1839 (GEFITINIB, IRESSA®).....	46
<b>4.4 EXPRESSION DER REZEPTORTYROSINKINASEN IN HUMANEN TUMORZELLINIEN UND AUSWIRKUNGEN EINER BEHANDLUNG MIT DEN ENTSPRECHENDEN TYROSINKINASE- INHIBITOREN AUF DIE REZEPTORPHOSPHORYLIERUNG .....</b>	<b>47</b>
4.4.1 AEE788.....	48
4.4.2 NVP-AEW541 .....	49
4.4.3 GW572016 (LAPATINIB, TYVERB®) .....	49
4.4.4 ZD6474 (VANDETANIB, ZACTIMA®) .....	50
<b>5 DISKUSSION.....</b>	<b>52</b>

---

<b>5.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DES ZYTOTOXISCHEN POTENTIALS UND ZUGRUNDE LIEGENDER WIRKMECHANISMEN DER EINZELNEN TYROSINKINASE-INHIBITOREN .....</b>	<b>53</b>
5.1.1	AEE788.....	53
5.1.2	NVP-AEW541 .....	55
5.1.3	GW572016 (LAPATINIB, TYVERB®) .....	57
5.1.4	ZD6474 (VANDETANIB, ZACTIMA®) .....	59
5.1.5	ZD1839 (GEFITINIB, IRESSA®).....	61
<b>5.2</b>	<b>ÜBERWINDUNG DER CHEMOTHERAPIERESISTENZ UND SEQUENZABHÄNGIGKEIT EINER KOMBINATION VON SAGOPILON MIT VERSCHIEDENEN TYROSINKINASE-INHIBITOREN .....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>THESEN .....</b>	<b>80</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABL	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog</i>
Akt	entspricht Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CML	Chronisch myeloische Leukämie
dest.	destilliert
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IC	<i>inhibitory concentration</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGFR	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
Il-6	Interleukin-6
IDEAL	<i>Ideal Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer</i>
INTACT	<i>Iressa NSCLC Trial Assessing Combination Treatment</i>
ISEL	<i>Iressa Survival Evaluation in Advanced Lung Cancer</i>
ISTANA	<i>Iressa as Second-line Therapy in Advanced NSCLC- Korea</i>
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

---

MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl
nM	nanomolar
p	phosphoryliert
P13	Phosphoinositoltriphosphat
PBS	<i>Phosphate buffered saline solution</i>
PBST	<i>Phosphate buffered saline Tween-20</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PFS	<i>Progression free survival</i>
PTB- Domäne	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
Raf	<i>Rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel</i>
SH <sub>2</sub> -Domäne	Src-homology 2 Domäne
SRB	Sulforhodamin B
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor- Alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
vs.	versus
ZEAL	<i>Zactima efficacy with Alimta in lung cancer</i>
ZEST	<i>Zactima efficacy study versus Tarceva</i>
ZETA	<i>Zactima Efficacy in Thyroid Cancer Assessment</i>
ZODIAC	<i>Zactima in combination with docetaxel in non-small lung cancer</i>
µM	mikromolar



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Rolle der Chemotherapie und „targeted therapy“ in der medizinischen Tumortherapie

Global nimmt die Inzidenz von Krebserkrankungen weiter zu. Speziell in Deutschland ist seit 1980 die Zahl der pro Jahr neu aufgetretenen Krebserkrankungen bei Frauen um 35 % und bei Männern um mehr als 80 % angestiegen (Krebs in Deutschland 2005/2006, S. 20, [www.rki.de](http://www.rki.de)). Von 2006 bis 2008 ist die Zahl der neu aufgetretenen Krebserkrankungen bei Männern von 229.200 auf 246.700 und bei Frauen von 197.600 auf 223.100 gestiegen (Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe, Robert-Koch-Institut, Berlin 2012).

In der Behandlung von soliden und hämatologischen Neoplasien spielt neben der Radiatio und Operation v.a. die medikamentöse Tumortherapie, welche die Chemo-, Immun-, Gen- und Hormontherapie sowie die „*targeted therapy*“ umfasst, eine große Rolle (Schmoll *et al.* 2006). Allerdings profitieren nicht alle Patienten von einer systemischen Chemotherapie gleichermaßen bzw. ist der Einsatz mancher Zytostatika aufgrund ihrer erheblichen Toxizitäten limitiert, was bei einigen Patienten zu einem Abbruch der Therapie führt. Neben einer primären Resistenz gegenüber einer Chemotherapie kann sich unter der laufenden Applikation eines Chemotherapieregimes eine sekundäre Therapieresistenz entwickeln, in deren Folge es zu einem Tumorprogress kommen kann. Aufgrund ihres erheblichen prognostischen Einflusses bleibt bei Vorliegen einer primären oder sekundären Chemotherapie-Resistenz ein systemischer Therapieansatz in der Regel palliativ.

Aus diesem Grund ist es von enormer Bedeutung, die medikamentöse Tumortherapie weiter zu optimieren und neue Tumormedikamente zu entwickeln. Neue Hoffnungen für die Verbesserung der medikamentösen Therapieoptionen gründen sich dabei auf die Entschlüsselung zahlreicher intrazellulärer Signaltransduktionswege mit Relevanz u.a. für die Tumorproliferation und Therapieresistenz. Mit Hilfe molekularer Screeningmethoden können immer mehr intrazelluläre „Targets“ identifiziert und der Tumor gezielter therapiert werden. Damit wäre auch die Möglichkeit gegeben, die antitumorale Therapie auf die Patienten bei Vorliegen bestimmter molekularer Marker individuell abzustimmen und damit auch eventuelle Nebenwirkungen zu minimieren.

Bei dieser sog. „*targeted therapy*“ wurde u.a. ein besonderes Augenmerk auf Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre zielgerichtete Inhibierung gerichtet. In den letzten Jahren konnten im Labor zahlreiche Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt werden, von denen sich einige bereits erfolgreich in Phase-I- bis III-Studien befinden. Des Weiteren sind einige „targeted drugs“ z.T. mit bahnbrechendem Erfolg bereits im klinischen Alltag im Einsatz;

Beispiele hierfür sind die Inhibierung von HER2 beim HER2-überexprimierenden Mammakarzinom mit Hilfe von Trastuzumab oder die Hemmung der BCR-ABL-Kinase bei der CML mittels Imatinib (Zander *et al.* 2011). Dabei sind viele der bisher entwickelten Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen mehrere „Targets“ innerhalb einer Zelle gerichtet (*Multi-target TKI*).

Wie bereits erwähnt sind Wachstumsfaktorrezeptoren ein häufiges „Target“ in der zielgerichteten Therapie, da sie eine zentrale Rolle in der Zelldifferenzierung und -proliferation sowie Apoptoseregulation spielen und in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert oder fehlreguliert sind (Bennasroune *et al.* 2004). So findet sich eine vermehrte EGFR-Expression in Tumoren von Lunge, Gehirn, Prostata, Niere, Brust, Ovar, Pankreas, Blase, Kopf-Hals und Kolon (Zwick *et al.* 2001; Harari 2004). Erhöhte Rezeptortyrosinkinasen-Spiegel korrelieren mit einer ungünstigen Prognose, einem aggressiven Wachstum und einer erhöhten Metastasierungs- und Rezidivrate (Zwick *et al.* 2001; Grünwald *et al.* 2003). Zusätzlich konnte in Studien gezeigt werden, dass die Überexpression oder Überaktivierung bestimmter Wachstumsfaktorrezeptoren zu einer Resistenz gegenüber Hormon- und Chemotherapie sowie Radiatio führen kann (Grünwald *et al.* 2003; Morelli *et al.* 2005). Mit der Kombination von klassischen Zytostatika und Tyrosinkinase-Inhibitoren wäre damit eine Möglichkeit zur Überwindung dieser Resistenzen gegeben. Neben der Möglichkeit Chemotherapieempfindlichkeit zu modulieren, eignen sich moderne Tyrosinkinase-Inhibitoren auch aufgrund ihres differentiellen Nebenwirkungsprofils und Wirkmechanismus hervorragend für die Kombinationstherapie mit verschiedenen Zytostatika (Schmoll *et al.* 2006). Diese Überlegungen werden durch zahlreiche präklinische Studien mit u.a. Cetuximab, ZD6474, Gefitinib und Erlotinib, die in der Kombination mit Zytostatika zu einer Verstärkung des Antitumor-Effektes geführt haben, unterstützt (Ciardiello *et al.* 2003; Morelli *et al.* 2005). Jedoch wurden im klinischen Einsatz solcher Kombinationstherapien die großen Hoffnungen aus den präklinischen Studien nicht immer erfüllt (Trarbach *et al.* 2010). Die Ursachen hierfür könnten zum einen darin liegen, dass im Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren spezifische Patienten-Subgruppen, die von solch einer Therapie profitieren, zuvor nicht genau bestimmt worden sind. Eine wesentliche Ursache könnte auch eine fehlende Berücksichtigung der Applikationssequenz sein. So haben bereits Xu *et al.* (2004) die Sequenzabhängigkeit einer Kombination aus EGFR-Inhibitoren und verschiedenen Zytostatika beschrieben.

## 1.2 Das mikrotubuläre System als Angriffspunkt in der Tumorthherapie

### 1.2.1 Aufbau und Funktion der Mikrotubuli

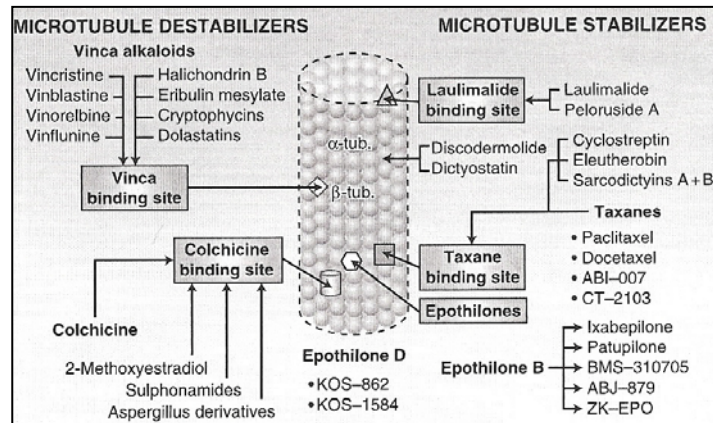
Mikrotubuli sind dynamische Strukturen, die neben Aktin-, Mikrofilamenten und intermediären Filamenten einen wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts darstellen (Fojo *et al.* 2007). Sie erfüllen eine zentrale Funktion in der Zellteilung, Zellmotilität, Transport von Zellorganellen und Proteinen und Übertragung von Zellsignalen (Lee JJ *et al.* 2008; Yue *et al.* 2010). Aufgrund des Vorkommens in allen eukaryotischen Zellen stellen sie einen interessanten Angriffspunkt in der Antitumor-Therapie dar (Fojo *et al.* 2007).

Mikrotubuli bestehen generell aus zwei Polypeptiden,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin. Bisher konnten 6 Isotypen für  $\alpha$ - und 7 Isotypen für  $\beta$ -Tubulin identifiziert werden. Beide Tubuline bilden Heterodimere, welche sich zu Protofilamenten zusammenlagern. 13 Protofilamente bilden den typischen Hohlzylinder mit einem Außendurchmesser von 25 nm und einem Innendurchmesser von 12 nm (Risinger *et al.* 2009). Die Funktion wird u.a. von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) gesteuert (Fojo *et al.* 2007). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Medikamente, welche die Stabilität der Mikrotubuli beeinflussen und damit zu einer Inhibierung der Mitose führen, entwickelt.

### 1.3 Mikrotubuli-interagierende Agenzien

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle in der Zellteilung eukaryotischer Zellen eignen sich Mikrotubuli als „Target“ in der Krebstherapie. In Abhängigkeit ihrer Auswirkungen auf das mikrotubuläre System kann man Mikrotubuli-interagierende Agenzien in 2 größere Gruppen unterteilen: die Mikrotubuli-Stabilisatoren und Mikrotubuli-Destabilisatoren (Perez 2009) (*Abb. 1, S. 4*). Die Stabilisatoren bewirken durch Förderung der Polymerisation eine Stabilisierung der Tubulin-Polymere. Zu dieser Gruppe gehören u.a. Taxane und Epothilone (Yue *et al.* 2010).

Die Destabilisatoren, u.a. Vinca-Alkaloide, inhibieren die Polymerisation. Beide Gruppen führen in der Folge zu einem Arrest der Mitose und zur Induktion der Apoptose. Betrachtet man die unterschiedlichen Angriffspunkte der Mikrotubuli-interagierenden Agenzien, so kann man wie in *Abb. 1, S. 4* dargestellt folgende Einteilung vornehmen: (1) Agenzien, die an der Colchicin-Bindungsseite andocken, (2) Agenzien, welche mit der Vinca-Alkaloiden Bindungsseite interagieren, (3) Agenzien, die die Taxan-Bindungsseite benutzen und (4) Agenzien, die andere Bindungsseiten benutzen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der verschiedenen Mikrotubuli-Agenzien und ihre Angriffspunkte (Morris *et al.* 2008).

### 1.3.1 Epothilone

Epothilone zählen zu den mikrotubuli-stabilisierenden Agenzien, welche erstmals bei der Suche eines Metaboliten mit antifungizider Aktivität gegen *Mucor hiemalis* 1986 entdeckt worden (Kingston 2009). Bereits in den frühen 1990igern gelang es Höfle und Reichenbach Epothilon A und B aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* zu isolieren (Altmann *et al.* 2000). In weiteren Versuchen wurde dann ein ähnlicher Wirkmechanismus wie bei den Taxanen nachgewiesen (Altmann *et al.* 2000; Kavallaris *et al.* 2001).

Strukturell bestehen Epothilone aus einem makrolidischen Ring. In Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit einer Epoxid-Gruppe in Position C12 zu C13 kann man sie in Epoxide (Epothilon A, B, E, F) und Olefine (Epothilon C und D) einteilen (Fumoleau *et al.* 2007). Ähnlich wie Taxane stabilisieren Epothilone die Mikrotubuli, in dem sie an die  $\beta$ -Tubulin Untereinheit binden und damit die Tubulin-Polymerisation induzieren. In der Folge kommt es zu einem Mitosearrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus und zur Induktion der Apoptose in den betroffenen Zellen (Perez 2009). Aufgrund überlappender Bindungsstellen sind Epothilone in der Lage, die Bindung von Paclitaxel an Tubulinpolymere kompetitiv zu inhibieren (Lee JJ *et al.* 2008).

Im Vergleich zu Taxanen weisen Epothilone eine größere Wasserlöslichkeit, einen größeren antiproliferativen Effekt in zahlreichen Tumorzelllinien sowohl in vivo als auch in vitro sowie in multiresistenten Tumorzelllinien auf (Altmann *et al.* 2000; Kavallaris *et al.* 2001). Damit könnten Epothilone eine große Rolle in der Behandlung multiresistenter Tumoren spielen.

*Multidrug resistance* kann u.a. durch eine vermehrte Expression von P-Glykoprotein und  $\beta$ III-Tubulin verursacht werden. Epothilone sind in der Lage, die P-Glykoprotein-induzierte Resistenz zu überwinden. Beim P-Glykoprotein handelt es sich um einen membranassoziierten

Transporter aus der Gruppe der ABC-Transporter, der in zahlreichen Tumorzelllinien überexprimiert wird und die intrazellulären Konzentrationen zahlreicher Chemotherapeutika durch einen ATP-abhängigen Pumpmechanismus vermindert (Perez 2009).

Viele Epothilone befinden sich in der Erforschung, u.a. Epothilon B (patupilone, Epo 960) und seine vier synthetischen Derivate Ixabepilon (aza-epothilon B, BMS- 247550), BMS 310705, ZK-EPO (Sagopilon, ZK-219477), 20-Desmethyl-20-Methylsulfanylepothilon B und Epothilon D und sein Derivat KOS-1584 (Fumoleau *et al.* 2007). Im Unterschied zu Epothilon B weisen alle Derivate einen größeren antiproliferativen Effekt in Tumorzellen sowie eine höhere Wasserlöslichkeit auf.

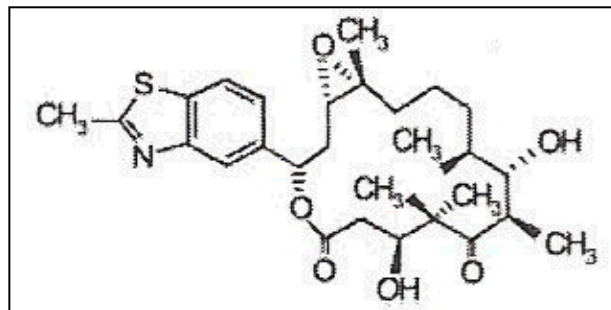
Epothilon B wurde bereits auch in zahlreichen klinischen Studien v.a. bei soliden Tumoren eingesetzt und konnte dort eine gute Wirksamkeit beweisen. Epothilon B ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dies konnte in der Therapie progredienter Hirnmetastasen des NSCLC gezeigt werden. Die häufigsten beobachteten Nebenwirkungen waren Diarrhoe, Nausea und Fatigue (Perez 2009).

Ixabepilon konnte bereits 2007 von der amerikanischen FDA in der Behandlung von lokal fortgeschrittenen oder metastasierten taxan- und anthrazyklin-resistenten Mammakarzinomen zugelassen werden (Kingston 2009; Risinger *et al.* 2010). Im Makrolidring ist ein Lacton des Epothilons B gegen ein Lactam ausgetauscht. Aufgrund dessen weist Ixabepilon eine höhere Wasserlöslichkeit und Plasmastabilität als Epothilon B und D auf (Fumoleau 2007). Es zeigt eine gute klinische Aktivität in Brust-, Prostata-, Nieren-, Pankreaskarzinomen und NSCLC. Häufig beobachtete Nebenwirkungen waren Polyneuropathie, Neutropenie, Fatigue, Arthralgien, Myalgien und Diarrhoe (Perez 2009).

BMS-310705 ist ein semisynthetisches Derivat von Epothilon B mit einer Aminogruppe in Position C21 der Methylthiazolseitenkette. Es besitzt eine 10-fach höhere Wasserlöslichkeit als Epothilon B und wirkt im Vergleich zu Epothilon D zytotoxischer in zahlreichen Tumorzelllinien (Fumoleau *et al.* 2007).

Bei Sagopilon handelt es sich um das erste vollsynthetische Epothilon B der 3. Generation (*Abb. 2, S. 6*) (Klar *et al.* 2008). Es zeigt v.a. einen Antitumor-Effekt in multiresistenten Tumorzelllinien und ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. So konnte bereits die gute Wirksamkeit von Sagopilon in Xenograftmodellen, wie bspw. in zerebral- und ossär metastasierten Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Lee JJ *et al.* 2008). In einer Phase-I-Studie an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren wurde Sagopilon einmalig als 30 min-Kurzinfusion aller 3 Wochen appliziert. 47 Patienten wurden bis zu einer Dosis von 29

mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche behandelt. Die dosislimitierenden Nebenwirkungen, wie die periphere Neuropathie III° und die Ataxie III°, zeigten sich bei einer Dosis von 16 bzw. 29 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Allerdings konnte bei Patienten mit taxan-vorbehandelten Mammakarzinomen nur in 2 Fällen eine partielle Remission erreicht werden (Larkin *et al.* 2006). Bei Patienten mit NSCLC, Cholangio-, Kopf-Hals, Nierenkarzinomen und Melanomen konnte zumindest eine stabile Erkrankung erreicht werden (Cortes *et al.* 2007). Des Weiteren wird in mehreren Phase-II-Studien die Wirksamkeit von Sagopilon allein oder in Kombination mit verschiedenen Zytostatika untersucht. So wird bspw. die Wirksamkeit einer Kombination von Sagopilon mit Prednisolon als First-line Therapie bei Patienten mit metastasiertem, androgen-unabhängigen Prostatakarzinom in einer Phase-II-Studie untersucht (Cortes *et al.* 2007).



**Abb. 2:** Strukturformel von Sagopilon (Cortes *et al.* 2007).

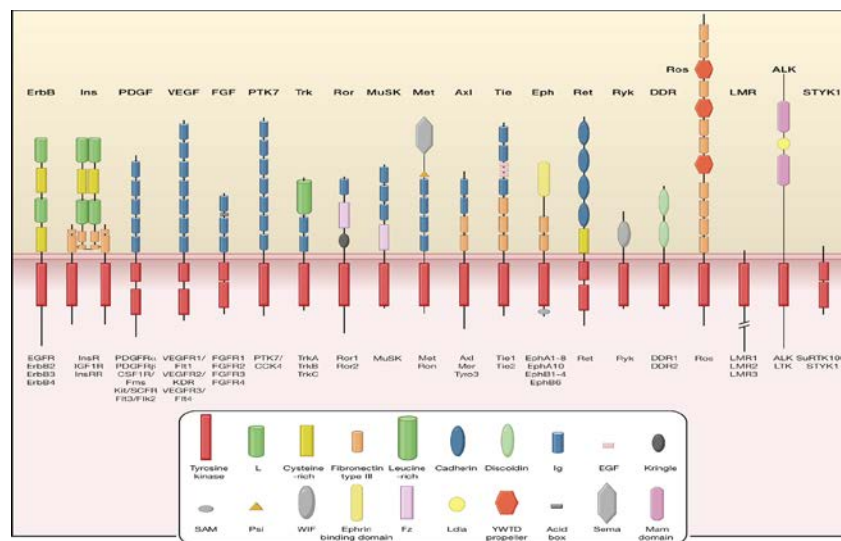
## 1.4 Rezeptortyrosinkinasen als „Target“ der Tumorthherapie

### 1.4.1 Aufbau einer Rezeptortyrosinkinase

Rezeptortyrosinkinasen durchspannen als Zelloberflächenproteine die Plasmamembran. Sie katalysieren die Übertragung von Phosphatresten aus ATP auf die Hydroxylgruppen des Tyrosins (Bennasroune *et al.* 2004) und spielen eine zentrale Rolle in der Regulation von zahlreichen biologischen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Resistenz, Metabolismus, Migration und Regulation des Zellzyklus von Zellen (Zwick *et al.* 2001). Bisher sind 58 RTK identifiziert worden, welche, wie in *Abb. 3, S. 7* dargestellt, in 20 Subfamilien eingeteilt werden (Lemmon *et al.* 2010). Die Rezeptortyrosinkinasen liegen mit Ausnahme der Insulin-Rezeptor Familie primär als Monomere in der Zellmembran vor (Schlessinger 2000).

Alle Rezeptortyrosinkinasen haben einen ähnlichen molekularen Aufbau. Sie bestehen aus einer glykosylierten, extrazellulären, ligandenbindenden Domäne, einer hydrophoben, transmembranen Region sowie einer zytoplasmatischen Region mit Tyrosinkinasen-Aktivität

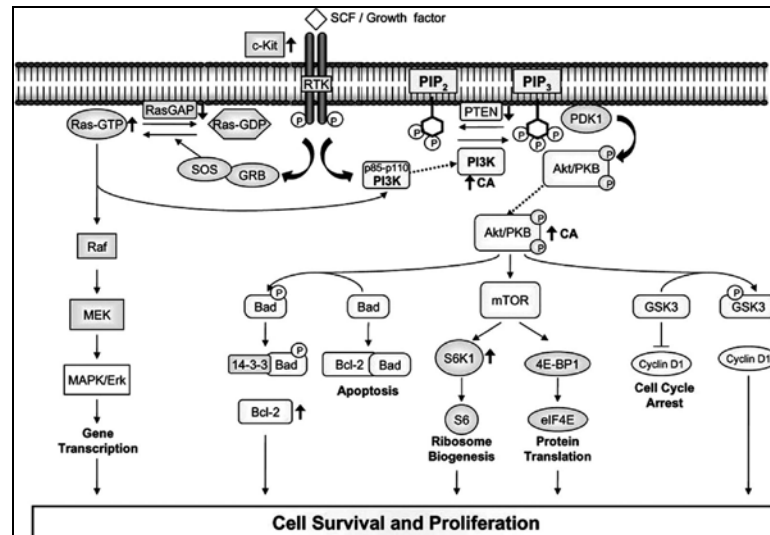
(Bennasroune *et al.* 2004). Die Einteilung in verschiedene Untergruppen basiert auf den unterschiedlichen Strukturmotiven in der extrazellulären Domäne.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Subfamilien der Rezeptortyrosinkinasen und deren Aufbau (Lemmon *et al.* 2010).

### 1.4.2 Funktionsweise von Rezeptortyrosinkinasen

Ein wesentliches Prinzip der Signalvermittlung über die Zellmembran ist die Autophosphorylierung des Rezeptors. Nach der Bindung eines Liganden an die ligandenbindende Domäne kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptormonomere. Dabei kann es zur Dimerisierung zwischen 2 identischen oder unterschiedlichen Monomeren einer Rezeptorfamilie kommen. Diese können sich dann unter Verbrauch von ATP an Tyrosinresten gegenseitig phosphorylieren (Lemmon *et al.* 2010). Die Phosphotyrosylreste dienen anschließend als Andockstelle für Adaptermoleküle, die eine sog. SH<sub>2</sub>- oder PTB-Domäne besitzen (Favoni *et al.* 2000). In der Folge werden weitere Signalwege aktiviert, u.a. der Ras/Raf/MAPK/Erk- und der P13/Akt-Signalweg (Abb. 4, S. 8), die regulierend Einfluss auf die Zellproliferation, -differenzierung, Apoptose, Angiogenese und den Zellzyklus nehmen.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Rezeptortyrosinkinase-Aktivierung in einer Zelle und durch sie initiierte Signalwege. Nach der Bindung eines Liganden an die entsprechende Rezeptortyrosinkinase und deren Aktivierung werden intrazellulär verschiedene Signalwege in Gang gesetzt, die wiederum für die Steuerung von Zelldifferenzierung und –proliferation eine Rolle spielen. GAP = GTPase activating protein; PDK1 = 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; GSK3 = Glykogensynthase-Kinase 3 (Pennel *et al.* 2009).

### 1.4.3 Rezeptortyrosinkinasen in der Tumorzelle

Rezeptortyrosinkinasen und durch sie initiierte Signalwege besitzen eine zentrale Stellung in der Regulation von Zellmigration, Gentranskription, Zellzyklus, Proliferation und Resistenz einer Zelle (Zwick *et al.* 2001).

Somit können Veränderungen innerhalb der Signalketten, z.B. durch Gen-Mutationen, eine Reihe von Erkrankungen auslösen. Mutationen in Rezeptortyrosinkinasen und mit konsekutiv fehlerhafter Aktivierung der intrazellulären Signalwege können u.a. Diabetes, Arteriosklerose, überschießende Entzündungsreaktionen und Krebs induziert werden (Lemmon *et al.* 2010). Bei der malignen Transformation von Zellen infolge einer Rezeptortyrosinkinasen-Dysregulation spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle: Überexpression von Liganden und Rezeptormolekülen, Mutationen des Rezeptorgens sowie autokriner Loop bzw. konstitutive Stimulation der RTK (Favoni *et al.* 2000; Grünwald *et al.* 2003).

Tumorzellen können sowohl Wachstumsfaktorrezeptoren als auch die korrespondierenden Liganden überexprimieren. Die Liganden-Rezeptorbindung führt zur kontinuierlichen Autostimulation. So findet sich bei 20-60 % der EGFR-exprimierenden Tumoren, hier insbesondere Glioblastome, auch eine Expression der Liganden TGF- $\alpha$  oder EGF (*autokriner Loop*, Favoni *et al.* 2000). Gleiches konnte in Tumorzellen des Mammakarzinoms für das IGF-



System nachgewiesen werden (Favoni *et al.* 2000). Deletionen oder Mutationen innerhalb der extrazellulären Region oder Alterationen der katalytischen Domäne führen zu einer konstitutiven Aktivität der Tyrosinkinase. Mutationen innerhalb der Transmembranregion können bspw. zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität führen, wie z.B. beim HER2-Rezeptor (Zwick *et al.*, 2001). So findet sich ein mutierter EGF-Rezeptor (EGFRvIII) in Brust-, Ovar- und Bronchialkarzinomen sowie in hochgradigen und in > 80 % der niedriggradigen Gliome (Marmor *et al.* 2004; Yarden 2005). Hier kommt es infolge eines alternativen mRNA splicings zu einem Verlust von 801 Basenpaaren in der extrazellulären Region und damit zu einer konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase (Grünwald *et al.* 2003). Beim IGF-I-Rezeptor spielen Mutationen eher eine untergeordnete Rolle (Maki 2010). In zahlreichen Tumorentitäten kommt es zu einer Überexpression des Rezeptors (Yarden 2005). Dies ist häufig mit einer Zunahme der Invasivität und Verschlechterung der Prognose assoziiert. Ein gehäuftes Vorkommen von EGFR findet sich in NSCLC, Kolon-, Blasen-, Zervix-, Ovar-, Nieren-, Pankreas- und Kopf-Hals-Karzinomen (Herbst *et al.* 2003; Harari 2004). Eine HER2-Überexpression als Marker für eine schlechtere Prognose, kürzeres Gesamtüberleben und eine zunehmende Chemotherapieresistenz zeigt sich v.a. bei Mamma-, Ovarial- und Magenkarzinomen (Zwick *et al.* 2001). Eine Überexpression des IGF-IR findet sich in > 90 % der kolorektalen Karzinome (Höpfner *et al.* 2006). In einigen Tumorzellen kann des Weiteren eine Koexpression von EGFR/IGF-IR mit anderen Mitgliedern der EGFR-Familie nachgewiesen werden, was zu einer Dimerisierung z.B. zwischen EGFR und HER2 führen kann. Die so entstandenen sehr stabilen Komplexe dissoziieren nur langsam und bewirken so eine anhaltende Signaltransduktion (Levitcki 2003).

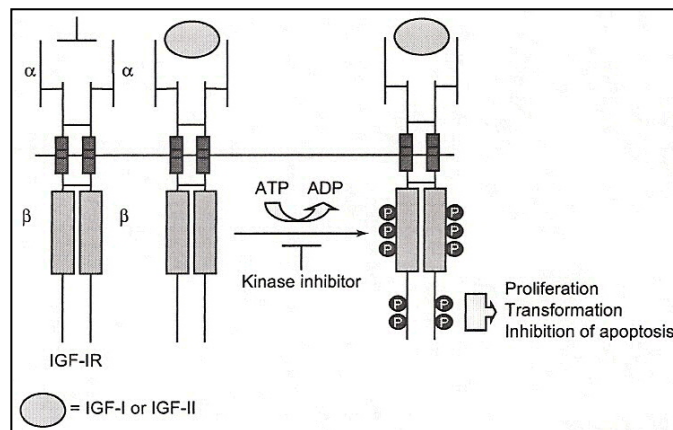
Das VEGF-System spielt in der Tumorgenese eine besondere Rolle. Das Wachstum eines soliden Tumors oder von Metastasen hängt in besonderem Maß von der Ausbildung eines eigenen Gefäßsystems ab. Ohne adäquate Gefäßversorgung erreichen solide Tumoren nur eine maximal kritische Größe von 1-2 mm, da die nutritive Versorgung durch Diffusion allein limitiert ist. Bei einem weiteren Tumorwachstum kommt es v.a. innerhalb der expandierenden Zellen zu einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel (Carmeliet 2005). Aufgrund der Hypoxie werden verschiedene Prozesse in Gang gesetzt. So bindet der Hypoxie-induzierbare Faktor (HIF-1 $\alpha$ ) an seine Bindungsstelle im Bereich des VEGF-Promoters. In Folge dessen kommt es zur Anregung der Transkriptionsaktivität und damit zu einer vermehrten Bildung von VEGF mRNA. Daneben wird die Expression durch verschiedene angiogene Faktoren angeregt: PDGF, bFGF, IGF-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha/\beta$ , KGF und die Zytokine Il-1 $\beta$  und Il-6 (Pradeep *et al.* 2005). Infolge der gesteigerten Expression von VEGF kommt es ebenfalls zur Bildung von v.a. VEGFR-1/2. Des Weiteren sind einige Tumorzellen in der Lage sowohl VEGF als auch die entsprechenden Rezeptoren zu bilden, u.a. Zellen des Melanoms, Ovar-, Pankreas- und

Prostatakarzinoms (Carmeliet 2005). VEGF schützt weiterhin das Gefäßnetz des Tumors vor Apoptose durch Induktion der anti-apoptotischen Faktoren Bcl-2 und Survivin.

## 1.5 Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

### 1.5.1 Wirkprinzip

Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren sind synthetische, niedermolekulare Substanzen (*small molecules*), die meist mehrere „Targets“ in der Signaltransduktion einer Zelle beeinflussen (Harari 2004). Sie konkurrieren mit Adenosintriphosphat um dessen Bindungsstelle an der Tyrosinkinase-Domäne (Abb. 5). Über eine kompetitive Inhibierung verhindern sie die Autophosphorylierung des entsprechenden Rezeptors und damit die Aktivierung weiterer Signalwege innerhalb einer Zelle (Zwick *et al.* 2001; Grünwald *et al.* 2003). In der Folge kommt es u.a. zu einer Hemmung der Zellproliferation, Zellteilung und der Angiogenese.

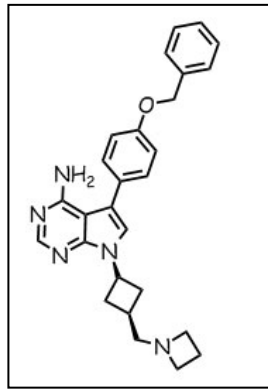


**Abb. 5:** Prinzip der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase am Beispiel des IGF-IR und Angriffspunkt der Tyrosinkinase-Inhibitoren (Hofmann *et al.* 2005).

### 1.5.2 Überblick über in dieser Arbeit verwendete Tyrosinkinase-Inhibitoren

#### AEW541

AEW541 ist ein von der Firma Novartis entwickeltes Pyrrolo (2,3-d)-Pyrimidin-Derivat, welches die Phosphorylierung von IGF-IR inhibiert (Tazzari *et al.* 2007) (Abb. 6, S. 11).



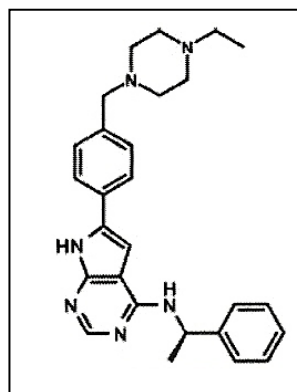
**Abb. 6 :** Strukturformel von NVP-AEW541 (Novartis Pharma).

In zahlreichen *in vitro* Versuchen konnte weiterhin eine Inhibierung der Phosphorylierung der „downstream targets“ Akt, STAT3 und Erk1/2 nachgewiesen werden (Höpfner *et al.* 2006; Moser *et al.* 2008). Es zeigt v.a. eine therapeutische Aktivität in zahlreichen experimentellen Tumormodellen wie z.B. gastrointestinalen Tumoren, Ovarialkarzinomen, Mesotheliomen, Multiplen Myelomen, Kopf-Halstumoren, AML-Zellen und Mammakarzinomen (Gotlieb *et al.* 2005; Höpfner *et al.* 2006; Moser *et al.* 2008; Maiso *et al.* 2008).

Aufgrund schwerwiegender Toxizitäten in den bereits initiierten klinischen Studien wurde eine weitere klinische Erprobung von NVP-AEW541 im Jahr 2008 abgebrochen.

#### AEE788

Bei AEE788 handelt es sich um ein 7H-Pyrrolo(2,3-d)-Pyrimidin-Derivat (Abb. 7), welches insbesondere die Phosphorylierung von EGFR, dem HER2-Rezeptor und VEGFR1/2 inhibiert (Meco *et al.* 2010).



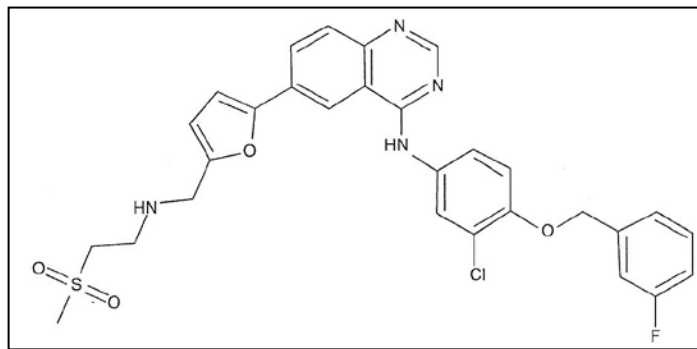
**Abb. 7:** Strukturformel von AEE788 (Novartis Pharma).

In verschiedenen *in vitro* Versuchen und Xenograft-Modellen konnte bereits ein antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden, u.a. in Medulloblastomen, Schilddrüsen-,

Kolonkarzinom-, Zervixkarzinom- und AML-Zellen (Traxler *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Younes *et al.* 2005; Mitsiades *et al.* 2006; Meco *et al.* 2010; Barbarroja *et al.* 2010). Basierend auf den Daten erster klinischer Studien wurde aufgrund schwerwiegender Toxizitäten (v.a. gastrointestinal/Leber) und einer geringen Wirksamkeit von einer weiteren Erprobung von AEE788 abgesehen (siehe auch Baselga *et al.* 2012; Reardon *et al.* 2012).

#### Lapatinib (GW572016, Tyverb®)

Bei GW572016 handelt es sich um ein 4-Anilinoquinolin-Derivat, welches von GlaxoSmithKline entwickelt wurde (Abb. 8) (Xia *et al.* 2002; Bence *et al.* 2005). Als oraler, reversibler, dualer Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor ist er in der Lage, die Phosphorylierung sowohl von EGFR als auch HER2 zu inhibieren (Bonomi, 2003). Des Weiteren konnte eine Inhibierung der Autophosphorylierung der „downstream targets“ Erk1/2 und P13/Akt nachgewiesen werden (Xia *et al.* 2002).



**Abb. 8:** Strukturformel von Lapatinib (Oakman *et al.* 2010).

Bereits in zahlreichen präklinischen Modellen konnte eine gute Wirksamkeit von GW572016 gezeigt werden (Diaz *et al.* 2010). Dabei sind v.a. Tumorzellen betroffen, die EGFR und ErbB2 überexprimieren, u.a. Kopf-Hals-, Lungen-, Brust-, Magen- und Vulvatumorzellen. In zahlreichen Phase-I-Studien zeichnete sich GW572016 durch eine gute Verträglichkeit aus. Dabei waren die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen Rash, Diarrhoe, ein Anstieg der Transaminasen und Kopfschmerzen (Bonomi 2003; Bence *et al.* 2005). In der Folge dieser Ergebnisse kam es zur Initiierung einer Reihe von Phase-II- und III-Studien, wobei besonders bei Patientinnen mit Mammakarzinomen die größten Erfolge erzielt werden konnten.

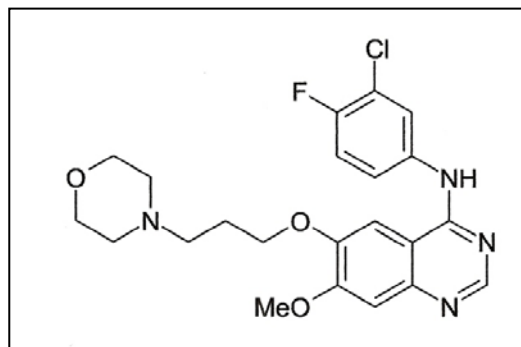
Basierend auf den Daten der EGF100151-Studie wurde Lapatinib im Juni 2008 von der FDA zur Behandlung von Frauen mit metastasierten HER2-überexprimierenden Mammakarzinom nach Vorbehandlung mit Anthracyclinen, Taxanen und Trastuzumab zugelassen. In dieser Studie wurden 399 Frauen mit Capecitabin plus Lapatinib vs. Lapatinib mono behandelt. In der Kombinationstherapie konnte eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls von 27,1 vs.

18,6 Monate verzeichnet werden (Oakman *et al.* 2010). Des Weiteren konnte das Auftreten von Hirnfiliae von 6 % bei alleiniger Gabe von Lapatinib auf 2 % nach Applikation der Kombinationstherapie gesenkt werden. In der EGF30008-Studie konnte das mediane krankheitsfreie Überleben von 3 auf 8,2 Monate verlängert werden. Hierbei erhielten Patientinnen mit erster Fernmetastasierung eine Kombination von Lapatinib plus Letrozol vs. Letrozol alleine (Johnston *et al.* 2009; Oakman *et al.* 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Juni 2010 die Zulassung von Lapatinib erweitert. Demzufolge erhalten Patientinnen mit HER2-positivem metastasiertem Mammakarzinom und wenn keine Chemotherapie vorgesehen ist in der First-line Therapie eine Kombination aus Lapatinib und einem Aromatasehemmer. Aufgrund seiner molekularen Struktur ist Lapatinib in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Dies stellt eine therapeutische Option bei der Behandlung von Hirnmetastasen bei HER2-positivem Mammakarzinom dar (Lin *et al.* 2009; Kroep *et al.* 2010). So konnten Bachelot *et al.* (2011) in ihrer Studie die Überlegenheit einer Kombinationstherapie von Lapatinib mit Capecitabin bei Patientinnen mit HER2-positivem, zerebral metastasiertem Mammakarzinom vor einer Ganzhirnbestrahlung nachweisen.

In der Behandlung anderer Tumorentitäten, u.a. gastrointestinale Tumoren, konnten selten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Iqbal *et al.* 2011).

#### Gefitinib (ZD1839, Iressa®)

Gefitinib (ZD1839, AstraZeneca) ist ein oral verfügbares (4-(3-chloro-4-fluoroanilino)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy) quinazolin (Abb. 9), welches selektiv und reversibel die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors inhibiert und damit zu einer Blockade des Tumorzellwachstums führen kann (Cohen *et al.* 2003; Langer 2004).



**Abb. 9:** Strukturformel von Gefitinib (Holm *et al.* 2008).

In höheren Dosierungen ist Gefitinib in der Lage, weitere Proteinkinasen u.a. HER2 zu inhibieren. In zahlreichen präklinischen Untersuchungen konnte eine Wachstumshemmung sowie proapoptische Effekte, u.a. bei Lungen-, Prostata-, Kolon- und Ovarialkarzinomen

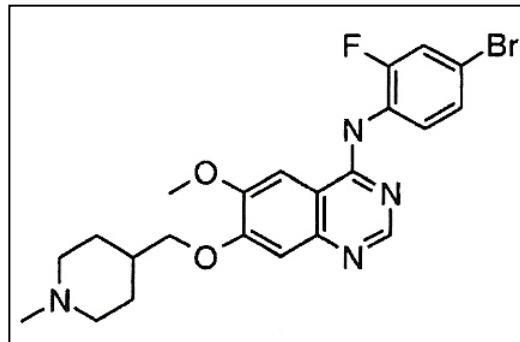
nachgewiesen werden. Des Weiteren nimmt Gefitinib Einfluss auf die Angiogenese durch Hemmung angiogenesefördernder Substanzen. Bereits in zahlreichen Phase-I-Studien, in denen v.a. Patienten mit Bronchialkarzinomen vertreten waren, konnte eine Stabilisierung der Erkrankung und eine Verminderung von tumorbedingten Symptomen nachgewiesen werden (Langer 2004). Die am häufigsten dokumentierten Nebenwirkungen waren Hautreaktionen (Rash) und Diarrhoe (Trarbach *et al.* 2010).

Bereits im Juni 2002 (Japan) bzw. Mai 2003 (Amerika) wurde durch die FDA Gefitinib als Monotherapie bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Bronchialkarzinom, welche auf eine Platin- oder Docetaxel-haltige Chemotherapie nicht angesprochen haben, zugelassen. Dies beruhte u.a. auf dem Erfolg zweier prospektiv randomisierter Phase-II-Studien. In der IDEAL 1/2-Studie wurde Gefitinib in 2 unterschiedlichen Dosierungen gegeneinander getestet (250 vs. 500 mg). Die Ansprechraten lagen zwischen 10 und 20 % (Langer 2004; Reck *et al.* 2005). In der darauffolgenden INTACT I-Studie, die die Wirksamkeit von Cisplatin und Gemcitabin mit oder ohne Gefitinib untersuchte, und der INTACT II-Studie, die die Kombination von Carboplatin, Paclitaxel mit oder ohne Gefitinib untersuchte, konnte jedoch kein Überlebensvorteil für Gefitinib gesichert werden (Giaccone *et al.* 2004; Herbst *et al.* 2004). In der großen ISELS-Studie, die insgesamt über 1600 Patienten randomisierte, konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben festgestellt werden (Reck *et al.* 2005). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Zulassung von Gefitinib auf bestimmte Subgruppen beschränkt. So zeigte Lee *et al.* (2008) in der ISTANA-Studie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens unter Therapie mit Gefitinib im Vergleich zu Docetaxel bei koreanischen Patienten. Interessanterweise zeigten einige Studien, dass bei Patienten mit soliden Tumoren, die aktivierende Mutationen im EGF-Rezeptor aufweisen und mit Gefitinib behandelt werden, eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens erreicht werden kann (Mitsudomi *et al.* 2010). In der Folge wurde Iressa in der First-line Therapie von Patienten mit NSCLC und einer Punkt-Mutation L858R (Exon 21) oder Exon 19-Deletion im EGF-Rezeptor zugelassen (Mitsudomi *et al.* 2010). In der Behandlung anderer solider Tumoren konnte bisher selten ein Überlebensvorteil gesichert werden (Trarbach *et al.* 2010).

#### Vandetanib (ZD6474, Zactima®)

Bei ZD6474, einer von AstraZeneca entwickelten Substanz, handelt es sich um ein oral verfügbares [N-(4-bromo-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl) methoxy] quinazolin-4-amin (Abb. 10, S. 15), welches die Phosphorylierung von EGFR, VEGFR2, VEGFR3 als auch der Ret-Kinase inhibiert (Wedge *et al.* 2002; Morabito *et al.* 2006; Pennell NA *et al.* 2009). Damit nimmt ZD6474 nicht nur einen Einfluss auf die Tumor-Angiogenese,

sondern auch auf die Zellproliferation und Metastasierung (Ryan *et al.* 2005; Azzariti *et al.* 2006; Herbst *et al.* 2007).



**Abb. 10:** Strukturformel von ZD6474 (Wedge *et al.* 2002).

Bereits in zahlreichen präklinischen Versuchen konnte u.a. eine Aktivität in gefitinib- oder erlotinib-resistenten NSCLC Xenograft-Tumoren nachgewiesen werden (Heymach *et al.* 2006). In einer Phase-I-Studie war ZD6474 in einer Dosierung von < 300 mg besonders gut verträglich (Heymach 2005; Herbst *et al.* 2007). Die am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen waren Diarrhoe, Fatigue, Hypertonie, Proteinurie, asymptotische QT-Verlängerung und Rash (Zakarija *et al.* 2005, Pennell *et al.* 2009).

Die Aktivität von ZD6474 wurde in den unterschiedlichsten Tumorentitäten untersucht, wobei das gute Ansprechen auf ZD6474 in Patienten mit NSCLC und medullärem Schilddrüsenkarzinom zur Initiierung einer Reihe von Phase-II-Studien bei diesen Tumortypen führte (Heymach 2005; Herbst *et al.* 2007). In einer Phase-II-Studie wurde eine Kombination von Docetaxel mit ZD6474 bei insgesamt 127 Patienten mit progredientem NSCLC nach Erstlinienbehandlung mit platinbasierter Chemotherapie getestet. Dabei erhielten die Patienten entweder eine Kombination, ZD6474 300 mg/d allein oder ein Placebo. Im progressionsfreien Überleben zeigte sich ein Vorteil zugunsten der Kombination mit 18,8 vs. 17 vs. 12 Wochen. Basierend auf diesem Erfolg folgte eine Reihe von Phase-III-Studien, in denen teils enttäuschende Ergebnisse erzielt wurden. In der ZODIAC-Studie, in der 1391 Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem NSCLC entweder mit Docetaxel plus ZD6474 oder Placebo plus Docetaxel behandelt worden, konnte keine signifikante Verlängerung des PFS erzielt werden (4 vs. 3,2 Monate) (Herbst *et al.* 2010). Sowohl in der ZEAL- als auch in der ZEST-Studie konnte keine Verbesserung erreicht werden (Natale *et al.* 2009; De Boer *et al.* 2009). Des Weiteren wurde die Wirksamkeit von ZD6474 als Monotherapie u.a. bei Patienten mit Mammakarzinomen, Multiplen Myelomen und SCLC untersucht. Prinzipiell zeigte sich bei den Patienten eine gute Verträglichkeit der Substanz mit nur milden Nebenwirkungen wie Rash und Diarrhoe. Ein Ansprechen auf die Therapie konnte jedoch nur selten erzielt werden

(Heymach 2005). Eine Ausnahme bildet dabei das medulläre Schilddrüsenkarzinom. Bereits in einer Phase-II-Studie an insgesamt 30 Patienten zeigte eine Therapie mit Vandetanib bei 20 % eine partielle Remission und bei 53 % eine stabile Erkrankung (Wells *et al.* 2010). Basierend auf den Daten der doppelblinden, Multi-Center Phase-III-Studie ZETA wurde Zactima® im August 2011 von der FDA für Patienten mit nicht-operablen oder metastasierten medullärem Schilddrüsenkarzinom zugelassen. In dieser Studie erhielten 331 Patienten mit nicht-operablen, lokal fortgeschrittenen oder metastasierten medullärem Schilddrüsenkarzinom einmal täglich 300 mg Vandetanib vs. Placebo. Das mediane PFS konnte von 16,4 Monaten im Placeboarm auf 22,6 Monate unter einer Behandlung mit Vandetanib erhöht werden. In seltenen Fällen kam es bei den Patienten es zu einer Verlängerung der QT-Zeit, Torsades de pointes und zum plötzlichen Herztod (Deshpande *et al.* 2011).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Wirksamkeit verschiedener Tyrosinkinase-Inhibitoren allein und in Kombination mit dem Zytostatikum ZK219477 (Sagopilon) anhand von *in vitro*-Testungen an humanen Tumorzelllinien näher analysiert werden. Dabei sollten im Speziellen folgende Fragen beantwortet werden:

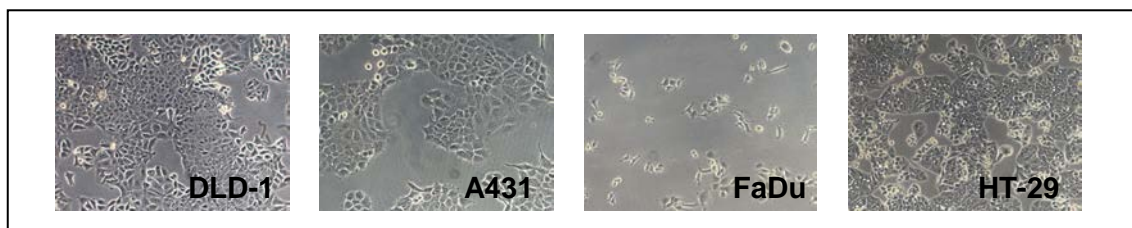
- *Charakterisierung der antiproliferativen Aktivität der Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788, NVP-AEW541, GW572016, ZD6474 und ZD1839 sowie des Zytostatikums Sagopilon in einem Panel unterschiedlicher humaner Tumorzelllinien.*
- *Charakterisierung der Interaktion zwischen Sagopilon und den verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren unter Einstufung von Effekten der Zellwachstumshemmung als additiv, synergistisch oder antagonistisch.*
- *Charakterisierung des Einflusses von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf den Zellzyklus.*
- *Untersuchung der Auswirkung einer Tyrosinkinase-Inhibitoren-Exposition auf die Phosphorylierung und Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren.*



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden 2 humane Kolonkarzinomzelllinien (HT-29, DLD-1), eine humane Zervixkarzinomzelllinie (A431) und eine humane Kopf-Halskarzinomzelllinie (FaDu) verwendet (Abb. 11). Bei der A431 und FaDu handelt es sich jeweils um Plattenepithelkarzinomzelllinien, die DLD-1 und HT-29 werden zu den Adenokarzinomen gerechnet.



**Abb. 11:** Phasenmikroskopische Aufnahme der verwendeten Zelllinien in Kulturmedium (Vergrößerung 100fach).

#### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Chemikalien und Reagenzien verwendet:

Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, D
Dithiothreitol (DTT) 10 mM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Dulbeccos PBS (10x) ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Epothilon-Stammlösung 0,1 mM (in Ethanol)	Bayer Schering
Ethanol 96 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Fetales Kälberserum 10 % Charge 0446K Charge 0115	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Protease-Inhibitor (40 Units)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Protein-Assay-Färbereagenz	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
Propidiumiodid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 100 mM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ponceau S	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Ribonuklease A 1mg/ml (in PBS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Roti®-Lumin 1+2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Sulforhodamin B	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
TEMED	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
Tris Ultra Qualität	Carl Roth Chemie, Karlsruhe, D
Tween 20	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
Trypsin-EDTA (1x) 0,05 %/0,02 %	PAA Laboratories GmbH, Pasching, D
Trockenmilch	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Trichloressigsäure (TCA) 10%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

### 3.3 Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren

**Tab. 1:** Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren, ihre Hersteller, verwendete Konzentrationen und Lösungsmittel.

TKI	Handelsname	Hersteller	c	Lösungsmittel
AEE788	/	Novartis Pharma	10 mM	DMSO
NVP- AEW541	/	Novartis Pharma	10 mM	DMSO
GW572016 (Lapatinib)	Tyverb®	GlaxoSmithKline	10 mM	DMSO
ZD6474 (Vandetanib)	Zactima®	Astra Zeneca	10 mM	DMSO
ZD1839 (Gefitinib)	Iressa®	Astra Zeneca	10 mM	96 % Ethanol

### 3.4 Formulierung häufig verwendeter Medien, Puffer und Lösungen

#### Nährmedium

RPMI 1640 mit L-Glutamin  
 + Penicillin/Streptomycin (1x) (10000 Units/ml  
 Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)  
 + FKS 10 %  
 vor Verwendung auf 37 °C erwärmen

**Spülen mit PBS**

Destilliertes Wasser  
Dulbeccos PBS

Sulforhodamin B-Zytotoxizitäts-Assay**TCA-Fixierlösung**

Trichloressigsäure 10 %  
Destilliertes Wasser  
(für 500 ml TCA: 50 g Trichloressigsäure und  
450 ml dest. Wasser)

**Tris-Pufferlösung**

Tris Base 10 mM, ph 10,0  
Destilliertes Wasser

**SRB-Färbelösung**

Sulforhodamin B 0,4 %  
Essigsäure 1 %  
Destilliertes Wasser  
(für 500 ml SRB-Lösung: 50 ml SRB 4 % und  
450 ml 1 %ige Essigsäure)

Zellzyklus-Analyse**„Staining Buffer“**

Fetales Kälberserum 2 %  
Natrium-Azid 0,01 % (in PBS)  
PBS

**Propidiumiodid-Puffer**

Propidiumiodid 1 mg/ml (in Aqua dest.)  
“Staining-Buffer“

Proteinisolierung und Konzentrationbestimmung**RIPA-Puffer**

NaCl 100 mM  
Tris-HCl 50 mM, ph 8,0 (in Aqua dest.)  
Na-Desoxycholat 0,5 %  
SDS 0,5 %  
Igepal 0,5 %  
In Aqua dest. lösen, ph auf 8,0 einstellen  
und auffüllen

Western Blotting

<b>Sammelgel 5 %</b> (für 4 Gele insg. 15 ml)	8,61 ml Aqua dest. 3,75 ml Tris-HCl 0,5 M ph 6,8 (in Aqua dest.) 2,5 ml Acrylamid 30 % 200 µl SDS 10 % 15 µl TEMED 75 µl Ammoniumpersulfat (APS) 10 %
<b>Trenngel 8 %</b> (für 4 Gele insg. 20 ml)	9,3 ml Aqua dest. 5 ml Tris-HCl 1,5 M ph 8,8 (in Aqua dest.) 5,3 ml Acrylamid 30 % 100 µl SDS 10 % 12 µl TEMED und 50 µl APS 10 %
<b>Lauf- Puffer</b>	Tris/Glycin/SDS- Puffer 1x
<b>Lade- Puffer</b>	Bromphenolblau 0,05 % Glycerol 30 % 2β- Mercaptoethanol 5 % SDS 2 % Tris 0,5 M ph 6,8 12,5 % (in Aqua dest.)
<b>Transfer- Puffer</b>	Methanol 20 % Rotiphorese 10 x 8 % (in Aqua dest.)
<b>PBST</b>	PBS Tween 20 0,1 %
<b>BSA 5 %</b> (je Antikörper 6 ml)	6 ml PBST 300 µl Albumin Fraktion V

**3.5 Antikörper für Western Blot-Analysen**

Die folgende Tabelle (S. 21) gibt einen Überblick über alle verwendeten Antikörper. Die Primärantikörper wurden dabei in einem Trockenmilch-PBST-Gemisch (Aktin) bzw. BSA-PBST-Gemisch gelöst und die Sekundärantikörper in einem BSA-PBST-Gemisch gelöst.

**Tabelle 2:** Darstellung der verwendeten Antikörper, ihrer eingebrachten Konzentrationen bzw. verwendeten Verdünnungen sowie Hersteller.

Antikörper	Isotyp	Hersteller	Konzentration / Verdünnung
EGF-Rezeptor	Maus, mono	BD Transduction Laboratories	0,1 µg/ml
EGF-Rezeptor (activated form)	Maus, mono	BD Transduction Laboratories	0,25 µg/ml
IGF-Rezeptor	Kaninchen, poly	Cell-Signaling	1:1000
IGF-Rezeptor (activated form)	Kaninchen, poly	Cell-Signaling	1:1000
HER2-Rezeptor	Kaninchen, poly	Cell-Signaling	1:1000
HER2-Rezeptor (activated form)	Kaninchen, poly	Cell-Signaling	1:1000
Anti-goat IgG	HRP-konj. Schaf-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:10000
Anti-Maus IgG	HRP-konj. Schaf-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:5000
Anti-rabbit IgG	HRP-konj. Schaf-AK	Santa Cruz Biotechnology Inc.	1:5000
β-Aktin	Ziege, poly	Santa Cruz Biotechnology Inc.	0,2 µg/ml

Abkürzungen: mono = monoklonal, poly = polyklonal, HRP *Horse Radish Peroxidase*.

### 3.6 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Tumorzelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und ≥ 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Das Nährmedium wurde täglich gewechselt. Bei ausreichender Konfluenz (visuell mind. 90 %) der Zellen konnte die Passagierung durchgeführt werden. Dabei wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurde 1 ml Trypsin zugegeben und die Zellen für ca. 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von Nährmedium konnte 1/3 bzw. 1/5 (A431) der Zellsuspension in eine neue 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben und auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt werden. Die Quantifizierung der Zellzahl zur Planung eines Zytotoxizitäts-Tests erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen in einer Laminarair-Flow-Box statt.

### 3.7 SRB-Zytotoxizitäts-Assay

Zur Untersuchung der Aktivität der einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren und Sagopilon alleine sowie der Kombinationen aus Sagopilon und TKI wurde der Sulforhodamin B (SRB)-Assay angewendet. Dieser von Skehan bereits 1990 entwickelte Test beruht auf der Tatsache, dass Sulforhodamin B im sauren Milieu an zelluläre Proteine bindet. Bei basischem pH-Wert wird der gebundene Farbstoff wieder freigesetzt und kann photometrisch erfasst werden (Skehan *et al.* 1990). Hierbei korreliert die Zellzahl mit der Proteinmenge und damit mit der Farbtintensität im Test.

Zur Vorbereitung eines Zytotoxizitäts-Tests wurden zunächst Tumorzellen in den entsprechenden Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und anschließend nach homogenem Aufmischen in Zellkulturmedium in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten mit der jeweils für jede Zelllinie spezifischen Zellzahl pro Loch (*Tab. 3, S. 23*) bestückt und für 24 h im Brutschrank in jeweils 100 µl Medium pro Loch inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl einer individuellen Verdünnungsreihe je Loch (eine Konzentration pro 8er Lochreihe) des jeweiligen Tyrosinkinase-Inhibitors oder Sagopilon mit einer 8-Kanal-Pipette pipettiert und anschließend im Brutschrank für 96 h inkubiert. Nach Abschluss der Behandlung wurde durch Dekantieren das Kulturmedium vorsichtig entfernt und die Zellen anschließend durch Zugabe von TCA-Fixierlösung (100 µl/Loch) für mind. 2 h bei 4 °C fixiert. Die Platten wurden anschließend mit Hilfe eines automatischen Plattenwaschgerätes (Plate washer SLT 96PW) 5-mal mit Aqua dest. gewaschen. Nach Zugabe von 0,4 %iger Sulforhodamin B-Färbelösung (100 µl/Loch) zu den Zellen für mind. 30 min wurden diese anschließend mit 1 %iger Essigsäure mit dem Plattenwaschgerät 5-mal gewaschen und danach bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Nach Zugabe von Tris-Pufferlösung (100 µl/Loch) konnte der an Protein gebundene Farbstoff wieder gelöst und nach gründlicher Aufmischung der Lösung die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm am Plate reader (SLT Rainbow) gemessen werden. Die ermittelten Extinktionswerte wurden in die Excel-Software (Microsoft®) übertragen. Die weitere Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe einer standardisierten Rechenmatrix (Spreadsheet) mittels Excel-Software (Microsoft®). Für die jeweils 8 Messwerte pro Reihe wurden die entsprechenden Mittelwerte berechnet. Anschließend erfolgte die Umrechnung der Mittelwerte in Prozentwerte relativ zur unbehandelten Kontrolle als 100 % Marke. Der prozentuale Anteil überlebender Tumorzellen wurde dann gegen die Konzentration des Sagopilons oder der verschiedenen TKI aufgetragen.

**Tab. 3:** Darstellung der für den SRB-Assay verwendeten Zellzahlen pro Loch.

Zelllinie	Zellzahl/Well
A431	350
FaDu	3.000
DLD-1	2.000
HT-29	1.000

### 3.7.1 Bestimmung des IC<sub>30</sub>- und IC<sub>50</sub>-Wertes der Tyrosinkinase-Inhibitoren

Für die folgenden Versuche wurden die für jede Zelllinie spezifischen IC<sub>30</sub>- und IC<sub>50</sub>-Werte der einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren ermittelt. Dabei handelt es sich um die Konzentration der Substanz, bei der das Zellwachstum um 30 bzw. 50 % inhibiert wird. Dabei wurde die mittlere inhibitorische Konzentration IC<sub>30</sub> ausschließlich aus den entsprechenden Konzentrations-Zellwachstumskurven durch Fällung des Lotes graphisch ermittelt. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde sowohl aus den Dosis-Wirkungskurven durch Fällung des Lotes als auch unter Verwendung des Grafik- und Datenanalyse-Programms *SigmaPlot* für Windows graphisch ermittelt. Hierbei wurden die aus den optischen Dichten berechneten Mittelwerte der Zellviabilität (*siehe 3.7*) und die Konzentrationen zunächst in ein Worksheet übertragen und die Werte der Zellviabilität gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen. Anschließend wurde der Kurvenverlauf den Messpunkten bestmöglich durch sigmoidale Regression unter zu Hilfenahme der Hill-Gleichung angepasst (*Abb. 12*).

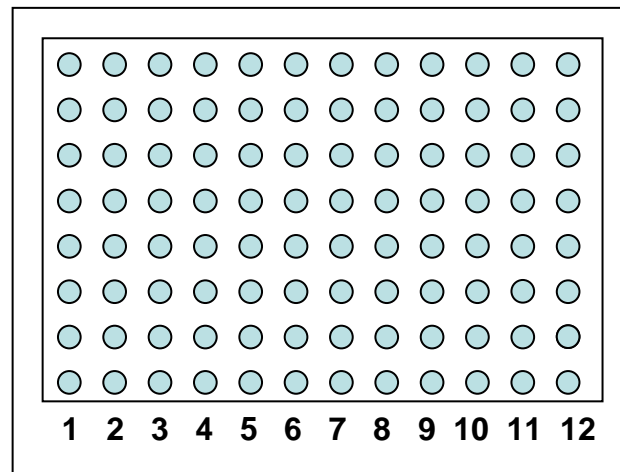
$$E/E_{\max} = [A]^h / ([A]_{50}^h + [A]^h)$$

**Abb. 12:** Hill-Gleichung. E = Effekt, E<sub>max</sub> = maximaler Effekt, A = Medikament A, [A] = Konzentration des Medikamentes A, h = Hill-Koeffizienz, [A]<sub>50</sub> = Konzentration des Medikamentes A, welche 50 % des maximalen Effektes E<sub>max</sub> hervorruft (modifiziert nach Weiss JN 1997).

### 3.7.2 Kombinationsversuche mittels SRB-Zytotoxizitäts-Assay

Zur Testung der Aktivität einer Kombination aus Sagopilon und den in dieser Arbeit verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden die verschiedenen Tumorzelllinien entweder mit einer Kombination aus TKI und Sagopilon parallel oder sequentiell inkubiert.

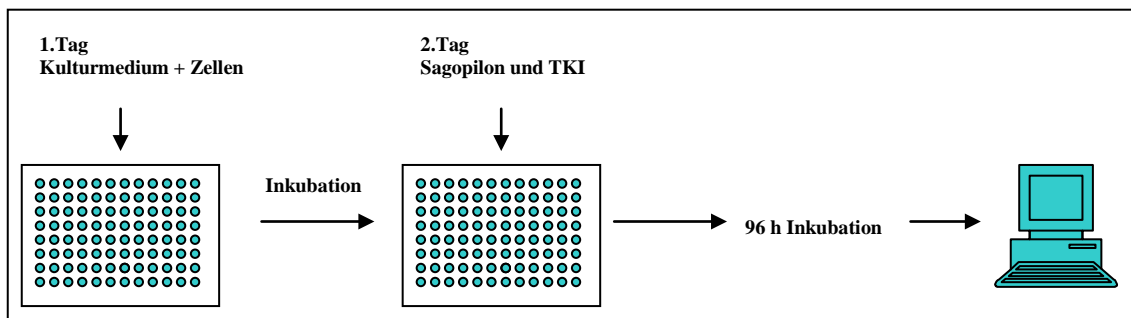
In allen Kombinationsversuchen wurden am 1. Tag zunächst die 96-Loch-Mikrotiterplatten, wie in *Abb. 13* dargestellt, von Reihe 2 bis 12 mit der für jede Zelllinie spezifischen Zellzahl pro Loch (*siehe Tab. 3, S. 23*) bestückt (100 µl pro Loch) und für 24 h inkubiert. Für alle Kombinationsversuche wurde als Kontrolle eine nur mit der Verdünnungsreihe von Sagopilon bestückte 96-Loch-Mikrotiterplatte über 96 h mitgeführt.



**Abb. 13:** Belegungsschema einer 96-Loch-Mikrotiterplatte in den Kombinationsversuchen. Es gilt folgendes Pipettierschema: (1) nur Medium, (2) Medium + Tumorzellen, (3) Tumorzellen + TKI, (4)-(12) Tumorzellen + TKI + Verdünnungsreihe Sagopilon.

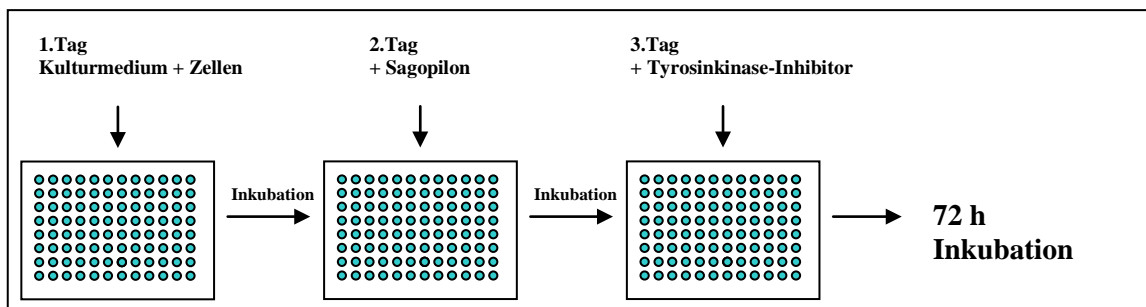
Bei der parallelen Inkubation wurde am 2. Tag eine Verdünnungsreihe von Sagopilon hergestellt und diese von Reihe 4 bis 12 mit jeweils 50 µl Volumen pro Loch zu den Zellen hinzugegeben (*siehe Abb. 13*). Für den jeweiligen Tyrosinkinase-Inhibitor wurde eine Lösung mit einer Konzentration entsprechend der jeweiligen  $IC_{30}$  des Inhibitors erstellt. Hierbei war sowohl für die Sagopilon-Verdünnungsreihe als auch für die Lösung des TKI zu berücksichtigen, dass es durch die Zugabe von nur 50 µl auf ein Gesamtvolumen von 200 µl pro Kulturloch zu einer Verdünnung um den Faktor 4 kam. Es müssten also die Lösungen 4-fach höher konzentriert angesetzt werden. Nach Pipettieren von jeweils 50 µl der TKI-Lösung in eine Kontrollreihe (*siehe Abb. 13*) sowie die Kombination mit Sagopilon erfolgte anschließend die Inkubation im Brutschrank für 96 Stunden (*Abb. 14, S. 25*).





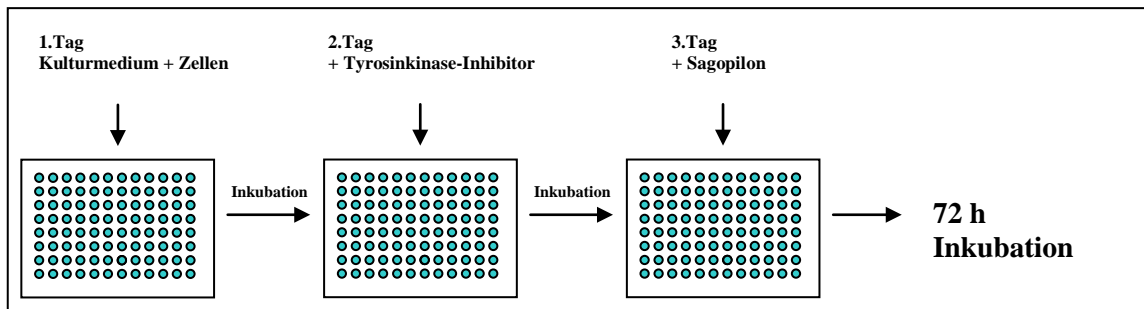
**Abb. 14:** Schematische Darstellung der parallelen Applikation.

Bei der sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor TKI) wurden die Zellen nach einer 24 h Inkubation im Brutschrank zunächst mit jeweils 50 µl einer individuellen Verdünnungsreihe je Loch des Sagopilons behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Am 3. Tag wurde eine Lösung mit der Konzentration entsprechend der jeweiligen  $IC_{30}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors hergestellt und jeweils 50 µl je Loch, gemäß der *Abb. 13* (S. 24) und *15*, hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für weitere 72 h inkubiert.



**Abb. 15:** Schematische Darstellung der sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor TKI).

Bei der sequentiellen Applikation 2 (TKI vor Sagopilon) wurde nach einer 24 h Inkubation im Brutschrank zunächst eine Lösung mit der Konzentration entsprechend der jeweiligen  $IC_{30}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors hergestellt und jeweils 50 µl je Loch, gemäß der *Abb. 13* (S. 24) und *16* (S. 26), zu den Tumorzellen hinzugegeben. Anschließend wurden die Tumorzellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Am 3. Tag begann die Behandlung mit einer Verdünnungsreihe des Sagopilons für weitere 72 h.



**Abb. 16:** Schematische Darstellung der sequentiellen Applikation 2 (TKI vor Sagopilon).

Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte analog der unter 3.7 (S. 22) beschriebenen Vorgehensweise mit Trichloressigsäure und Sulforhodamin B. Die Auswertung der 96-Loch-Mikrotiterplatten und die Erstellung von Diagrammen führten wir analog der Einzelversuche mit Hilfe einer standardisierten Rechenmatrix (Spreadsheet) mittels Excel-Software (Microsoft®) durch (siehe auch 3.7, S. 22). Nach Berechnung der entsprechenden Mittelwerte wurden die Dosis-Wirkungskurven zum einen für Sagopilon und zum anderen für die Kombination mit Hilfe der Excel-Software (Microsoft®) dargestellt. Anschließend erfolgte die Umrechnung der Mittelwerte in Prozentwerte relativ zur mit TKI-behandelten Kontrolle als 100 % Marke (Fraktionsanalyse) (siehe auch Drewinko *et al.* 1985). Nach Erstellung der Dosis-Wirkungskurven für die alleinige Sagopilongabe und für die Kombinationen konnten die entsprechenden  $IC_{50}$ -Werte graphisch ermittelt und der Kombinationsindex berechnet werden (siehe 3.10, S. 29).

### 3.8 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Zur Beurteilung des Einflusses der verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren auf den Zellzyklus wurden die Zellzykluskompartimente einer Kontrollkultur sowie einer behandelten Kultur mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Hierzu wurden die Tumorzellen mit Kulturmedium, welches mit dem jeweiligen Tyrosinkinase-Inhibitor in seiner  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  versetzt wurde, behandelt. Nach jeweils 24, 48 und 72 h wurde das Medium entfernt und in Falcon-Tubes aufbewahrt, die Zellen mit Trypsin abgelöst und anschließend mit dem entsprechenden zurückgestellten Medium resuspendiert. Nach der Zentrifugation (1300 rpm, 5 min, Labofuge 400) wurden die Zellpellets mit PBS gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und das PBS wieder entfernt. Damit es nicht zu einer Verklumpung der Zellen kam, wurde das Zellpellet in dem restlichen PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 2 ml 70 %igen Ethanol (eiskalt) wurde das Zellpellet für mind. 1 h bei 4 °C fixiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, Labofuge 400) wurden die Zellpellets mit je 2 ml „Staining Buffer“ gewaschen und wieder zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, Labofuge 400).

Anschließend wurden je Probe 75 µl der RNase A zugefügt, die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert und zum Schluss der Propidiumiodid-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden für mind. 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert und konnten dann am Durchflusszytometer (BD FACSCalibur) mit der CellQuest Software (BD BioSciences) gemessen werden. Für jede Messung wurde eine Mindestzellzahl von 10.000 Zellen herangezogen. Anschließend wurde die Zellverteilung in den einzelnen Zellzyklusphasen in einem Diagramm mit Hilfe der Excel- Software (Microsoft®) dargestellt.

### **3.9 Western Blot-Analysen**

#### **3.9.1 Proteinisolierung und Proteinquantifizierung**

Die Effekte einer Behandlung mittels Tyrosinkinase-Inhibitoren sollten auf Ebene der Signaltransduktion weiter untersucht werden. Hierzu wurde das Proteinexpressionslevel von Schlüsselproteinen in der Signaltransduktion sowie der Phosphorylierungsstatus mittels Western Blot bestimmt.

In Vorbereitung der Western Blot-Analysen führten wir eine Proteinisolierung und -konzentrationsbestimmung durch. Dabei wurden die Tumorzelllinien im Vorfeld über 96 h mit der IC<sub>30</sub> bzw. IC<sub>50</sub> des jeweiligen TKI behandelt. Gleichzeitig wurde eine Kontrolle für die korrespondierenden Zeiten angesetzt. Nach jeweils 24, 48, 72 und 96 h konnten die Zellen mit Trypsin abgelöst und mit Kulturmedium resuspendiert werden. Nach erfolgter Zentrifugation (1300 rpm, 5 min, Labofuge 400) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1300 rpm, 5 min, Labofuge 400). Anschließend wurden die Zellpellets bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt. Nach Auftauen der Zellpellets und Dekantieren von residualer Flüssigkeit im Falcon-Tube wurden die Zellen durch Zugabe von RIPA-Puffer lysiert (pro 10<sup>6</sup> Zellen ca. 100 µl RIPA- Puffer; dieser wird versetzt mit 10 µl 100 mM PMSF, 10 µl Protease-Inhibitor und 10 µl 10 mM DTT pro 1 ml RIPA-Puffer). Anschließend wurden die Lösungen in Eppendorf-Tubes überführt und mit Hilfe einer 27 G-Kanüle homogenisiert. Die Proben wurden dann für 45 min auf Eis inkubiert, danach bei 4 °C zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, Biofuge fresco) und anschließend die Überstände abpipettiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Überstände erfolgte mit Hilfe der kolorimetrischen Methode nach Bradford. Hierfür wurden 2 µl der jeweiligen Probe mit 798 µl destilliertem Wasser und 200 µl des Protein-Assay-Reagenz in einem 5 ml Falcon-Tube gemischt und nach 5 bis 60 min bei einer Wellenlänge von 595 nm die optische Dichte ermittelt (BioSpec-1601 E). Die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben wurden

anschließend mit RIPA-Puffer angeglichen, um die gleiche Proteinkonzentration in allen Proben zu erzielen.

### 3.9.2 Western Blotting

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgte mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli. Hierzu wurden zw. 30 und 40 µg Protein je Probe in ca. 2 µl je Probe Protein-Lade-Puffer aufgenommen und für ca. 10-15 min bei 95 °C denaturiert. Nach Vorbereitung der 5 %igen Sammel- und der 8 %igen Trenngele sowie Vorbereitung der Elektrophorese-Kammer wurde jedes Slot mit Protein beladen. Zur Größenquantifizierung der Proteine wurde ein entsprechender Marker (Spectra™ Multicolour High Range Protein Ladder Thermo Scientific, bis 300 kD) in ein separates Slot eingefüllt und anschließend die Elektrophoresekammer mit Lauf-Puffer aufgefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 200 V über ca. 30 bis 45 min durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgeschnitten und das Trenngel zusammen mit dem Filterpapier und der Nitrozellulosemembran für 1-2 min in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulosemembran und 2er Filterpapiere luftfrei geschichtet und anschließend die Proteine mittels Trans-Blot SD System bei 4 °C und konstant 150 mA über Nacht auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Ein homogener Proteintransfer sowie eine gleichmäßige Beladung der Banden wurden vor Fortsetzung des Versuchs durch Anfärben der Membran mit Ponceau S überprüft.

Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden unter ständigem Schwenken durch eine automatische Schwenkvorrichtung durchgeführt. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren wurde die Membran zunächst mit PBST und 5 %igem Milchpulver für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht. Dabei wurde der Primärantikörper für Aktin in einem Trockenmilch-PBST-Gemisch und die Primärantikörper für die einzelnen Wachstumsfaktorrezeptoren in einem BSA-PBST-Gemisch gelöst. Am folgenden Tag erfolgte nach 3 x 5 min und 3 x 10 min Waschen mit PBST die Inkubation mit dem in BSA-PBST gelösten Sekundärantikörper für 45-60 min; die Membran wurde erneut dreimalig für je 5 min mit PBST gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit Roti®-Lumin 1 + 2 im Verhältnis 1:1 versetzt und die Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Chemilumineszenz auf Amersham Hyperfilm ECL sichtbar gemacht. Dafür wurde der entsprechende Röntgenfilm zwischen 30 sec und max. 5 min exponiert.

### 3.10 Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche mindestens 3mal durchgeführt. Eine Ausnahme bildete aus Verfügbarkeitsgründen der Tyrosinkinase-Inhibitor ZD1839 (Iressa®) mit nur einem oder keinem Versuchsdurchlauf. Die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe der Excel-Software (Microsoft®). Die Bestimmung der IC<sub>30</sub>- und IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte zum einen graphisch aus den entsprechenden Konzentrations-Zellwachstumskurven, zum anderen wurde der IC<sub>50</sub>-Wert mit dem Datenanalyseprogramm *SigmaPlot* (siehe 3.7.1, Seite 23) ermittelt.

Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus führten wir den zweiseitigen, ungepaarten Student`s t-Test durch. Bei einem p-Wert < 0,05 wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen.

Für die Ermittlung der Kombinationsindices in den Kombinationsversuchen von Sagopilon und den TKI und damit Festlegung des resultierenden Effektes der Kombinationen wurden zunächst der IC<sub>50</sub>-Wert der Kontrolle, in diesem Fall Sagopilon, und der IC<sub>50</sub>-Wert der Kombination graphisch aus den Konzentrations-Zellwachstumskurven ermittelt. Nach mind. 3 Versuchen wurde dann aus den graphisch erfassten IC<sub>50</sub>-Werten der Mittelwert mittels Excel-Software (Microsoft®) bestimmt und letztendlich aus den gemittelten IC<sub>50</sub>-Werten der Kontrolle (Sagopilon allein) und der Kombination der Kombinationsindex berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes konnte eine Aussage über den resultierenden Effekt der Kombination und letztendlich die beste Applikationssequenz identifiziert werden.

$$\text{Kombinationsindex } K = \text{IC}_{50} \text{ Sagopilon} / \text{IC}_{50} \text{ Kombination}$$

K = 1	Additiver Effekt
K < 1	Antagonistischer Effekt
K > 1	Synergistischer Effekt

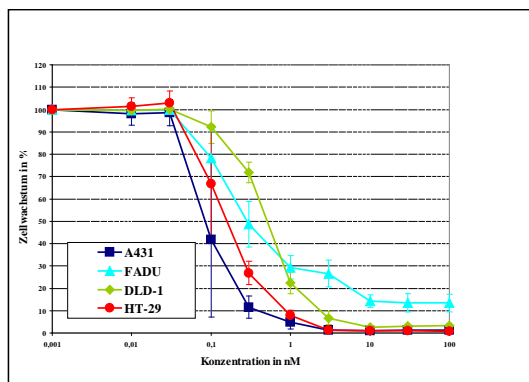
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Testung der antiproliferativen Aktivität von Sagopilon sowie der verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren in humanen Tumorzelllinien

Um das zytotoxische Potenzial der Tyrosinkinase-Inhibitoren und Sagopilon zu charakterisieren, wurden 4 verschiedene humane Tumorzelllinien mit den entsprechenden Substanzen in Mikrotiterplatten kontinuierlich über 96 h behandelt. Anschließend wurde der Dosis-Wirkungseffekt im Sulforhodamin-B-Zytotoxizitäts-Assay gemessen und die für jede Tumorzelllinie spezifischen IC<sub>30</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt.

#### 4.1.1 Wirksamkeit von Sagopilon

Für Sagopilon konnte bei allen 4 Tumorzelllinien eine konzentrationsabhängige Inhibierung des Zellwachstums mit sigmoidem Kurvenverlauf nachgewiesen werden (*Abb. 17*). Dabei zeigten sich die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 sowie die A431 und FaDu als sehr sensibel gegenüber Sagopilon. Auf der Basis der IC<sub>30</sub>- und IC<sub>50</sub>-Werte der Zelllinien erwies sich die Tumorzelllinie A431 am sensibelsten gegenüber Sagopilon gefolgt von der HT-29, FaDu und der DLD-1 (*Tab. 4, S. 31*). Beim Vergleich der IC<sub>30</sub>-Werte zeigte sich die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 3-fach sensibler als die DLD-1 ( $p = 0,035$ ) und die A431 ebenso 2-fach sensibler als die FaDu ( $p > 0,05$ ). Als Hinweis auf eine möglicherweise resistente Subpopulation bildete sich bei der Kopf-Halstumorzelllinie FaDu ab einer Konzentration von 1 nM ein Plateau bei ca. 15 % residualen Zellwachstums aus (*Abb. 17*).



**Abb. 17:** Dosis-Wirkungskurven von Sagopilon in 4 humanen Tumorzelllinien.  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  STABW.

**Tab. 4:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte nach einer Behandlung mit Sagopilon über 96 h. MW ( $\pm$  STABW).

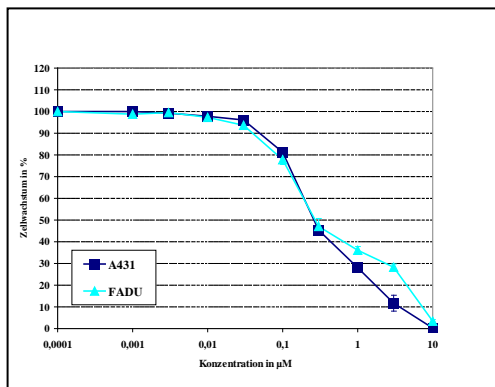
Zelllinie	$IC_{30}$ (nM)	$IC_{50}$ (nM)
DLD-1	0,27 ( $\pm$ 0,10)	0,51 ( $\pm$ 0,06)
HT-29	0,09 ( $\pm$ 0,05)	0,15 ( $\pm$ 0,06)
A431	0,07 ( $\pm$ 0,05)	0,10 ( $\pm$ 0,06)
FaDu	0,14 ( $\pm$ 0,06)	0,32 ( $\pm$ 0,12)

#### 4.1.2 Wirksamkeit von AEE788

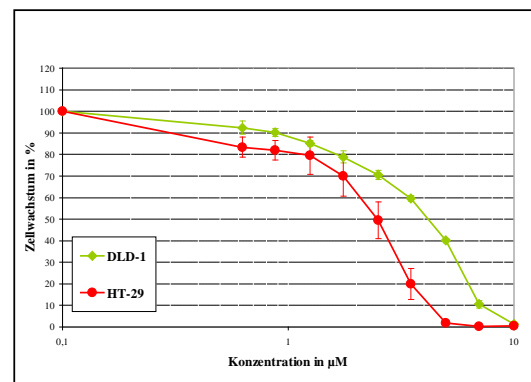
Der Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 erwies sich als unterschiedlich aktiv in den 4 getesteten humanen Tumorzelllinien (*Abb. 18*).

Im Vergleich auf der Basis der  $IC_{30}$ -Werte erwiesen sich die beiden Zelllinien A431 und FaDu gleichermaßen als besonders sensitiv gegenüber einer Behandlung mit AEE788, wohingegen die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 17 bzw. 11-fach weniger empfindlich waren ( $p = 0,001$  bzw.  $p = 0,012$ ) (*Tab. 5, S. 32*). Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für den Vergleich auf der Basis der  $IC_{50}$ -Werte. Beim Vergleich der Kolonkarzinomzelllinien untereinander zeigte sich die HT-29 1,5-fach sensibler als die DLD-1 ( $p = 0,02$ ).

**A**



**B**



**Abb. 18:** Antiproliferative Wirkung einer Behandlung mit AEE788 über 96 h. Dargestellt sind die resultierenden Dosis-Wirkungskurven der (A) A431 und FaDu sowie (B) HT-29 und DLD-1. Im Vergleich zu den beiden Kolonkarzinomzelllinien zeigten sich die Tumorzelllinien A431 und FaDu deutlich sensibler gegenüber AEE788.  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  STABW.

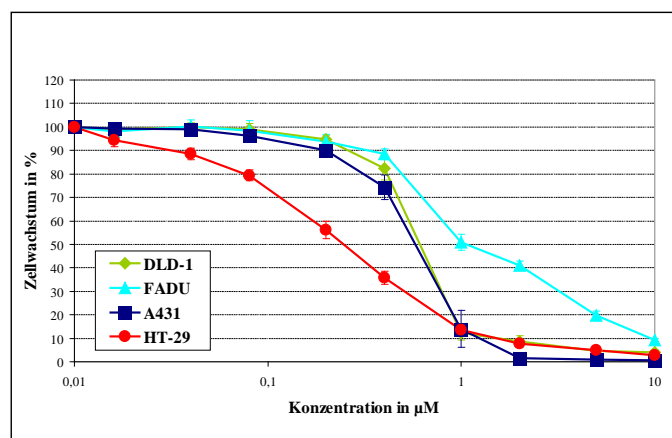
**Tabelle 5:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte nach einer Behandlung mit AEE788 über 96 h. MW ( $\pm$  STABW).

Zelllinie	$IC_{30}$ ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
DLD-1	2,60 ( $\pm$ 0,14)	4,10 ( $\pm$ 0,00)
HT-29	1,73 ( $\pm$ 0,31)	2,48 ( $\pm$ 0,30)
A431	0,15 ( $\pm$ 0,00)	0,26 ( $\pm$ 0,00)
FaDu	0,15 ( $\pm$ 0,01)	0,27 ( $\pm$ 0,04)

#### 4.1.3 Wirksamkeit von NVP-AEW541

Für den Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541 konnte in allen getesteten Tumorzelllinien eine unterschiedliche Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 19).

Bei einem Vergleich der ermittelten  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte (Tab. 6, S. 33) erwies sich die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 als besonders AEW541-sensibel im Vergleich mit allen anderen getesteten Tumorzelllinien. Im Vergleich der beiden Kolonkarzinomzelllinien untereinander war die HT-29 3,6-fach sensibler im Vergleich zur DLD-1 ( $p = 0,002$ ).



**Abb. 19:** Zytotoxische Wirksamkeit einer kontinuierlichen Behandlung mit NVP-AEW541 über 96 h. Dargestellt sind die resultierenden Dosis-Wirkungskurven aller getesteten Tumorzelllinien. Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 erwies sich im Vergleich zu allen anderen Zelllinien als besonders sensibel gegenüber einer Behandlung mit NVP-AEW541.  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  STABW.



Im Vergleich der  $IC_{30}$ -Werte und der resultierenden Dosis-Wirkungskurven (*Abb. 19, S. 32*) wiesen die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 und die Zervixkarzinomzelllinie A431 eine vergleichbare Sensitivität für NVP-AEW541 auf ( $p = 0,23$ ).

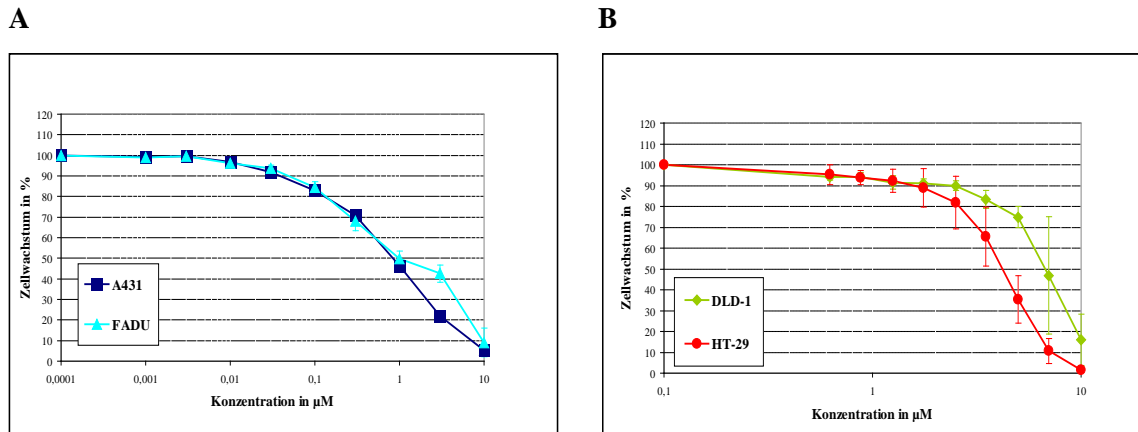
Die Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu wies die geringste Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit dem TKI NVP-AEW541 auf. Sie zeigte einen insgesamt sehr flachen sigmoiden Kurvenverlauf mit deutlich auslaufendem Plateau, was einen Hinweis auf eine möglicherweise vorhandene resistente Subpopulation geben könnte (*Abb. 19, S. 32*).

**Tab. 6:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte nach einer Behandlung mit NVP-AEW541 über 96 h. MW ( $\pm$  STABW).

Zelllinie	$IC_{30}$ ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
DLD-1	0,47 ( $\pm$ 0,03)	0,61 ( $\pm$ 0,03)
HT-29	0,13 ( $\pm$ 0,01)	0,25 ( $\pm$ 0,02)
A431	0,43 ( $\pm$ 0,03)	0,58 ( $\pm$ 0,04)
FaDu	0,63 ( $\pm$ 0,03)	1,14 ( $\pm$ 0,19)

#### 4.1.4 Wirksamkeit von GW572016 (Lapatinib, Tyverb®)

Vergleichbar mit dem Wirksamkeitsprofil von AEE788 zeigte der Tyrosinkinase-Inhibitor GW572016 in den Tumorzelllinien A431 und FaDu eine deutlich höhere Aktivität als in den beiden Kolonkarzinomzelllinien (*Abb. 20 A, S. 34*). Bei einem Vergleich der  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte konnte für die Tumorzelllinien A431 und FaDu eine vergleichbare Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit dem TKI GW572016 nachgewiesen werden ( $p = 0,47$ ). Die erhobenen  $IC_{30}$ -Werte sind für die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 ungefähr 18- bzw. 10,6-fach höher im Vergleich zur A431 und FaDu ( $p = 0,006$ ,  $p = 0,02$ ) (*Tab. 7, S. 34*). Auf der Basis der  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte erwies sich die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 als besonders resistent gegenüber einer Behandlung mit GW572016. In *Tabelle 7 (S. 34)* wurden die ermittelten  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte einer Behandlung mit GW572016 zusammenfassend gegenübergestellt.



**Abb. 20:** Zytotoxische Wirksamkeit einer kontinuierlichen Behandlung mit GW572016 über 96 h. Dargestellt sind die resultierenden Dosis-Wirkungskurven der (A) A431 und FaDu und (B) DLD-1 und HT-29.  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  STABW.

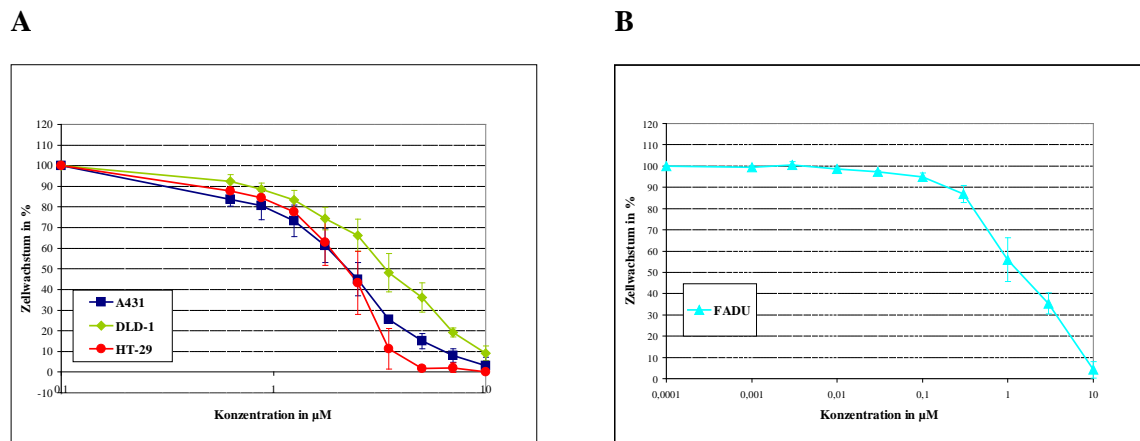
**Tab. 7:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen  $\text{IC}_{30}$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Werte nach einer Behandlung mit GW572016 über 96 h. MW ( $\pm$  STABW).

Zelllinie	$\text{IC}_{30}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
DLD-1	5,53 ( $\pm$ 0,67)	7,12 ( $\pm$ 1,21)
HT-29	3,17 ( $\pm$ 0,76)	4,43 ( $\pm$ 0,54)
A431	0,30 ( $\pm$ 0,00)	1,19 ( $\pm$ 0,25)
FaDu	0,30 ( $\pm$ 0,10)	1,13 ( $\pm$ 0,42)

#### 4.1.5 Wirksamkeit von ZD6474 (Vandetanib, Zactima®)

Wie bereits bei den vorherigen Tyrosinkinase-Inhibitoren beschrieben zeigte auch ZD6474 eine unterschiedliche Aktivität im Vergleich der 4 humanen Tumorzelllinien (Abb. 21 A und B, S. 35).

Die Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu erwies sich am sensitivsten gegenüber einer Behandlung mit ZD6474 gefolgt von der HT-29 und A431 ( $p = 0,003$ ). Die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 erwies sich als weniger sensibel mit einem  $\text{IC}_{30}$  von 2,2  $\mu\text{M}$ . Bei einem Vergleich der  $\text{IC}_{30}$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Werte wiesen die HT-29 und die A431 eine vergleichbare Sensitivität auf ( $p > 0,05$ ) (siehe Tab. 8, S. 35). Des Weiteren zeigten bei einem Vergleich der  $\text{IC}_{30}$ -Werte die DLD-1 eine 3,6-fach sowie die HT-29 und A431 eine 2,6-fach geringere Empfindlichkeit im Vergleich zur FaDu ( $p = 0,0008$ ,  $p = 0,003$ ).



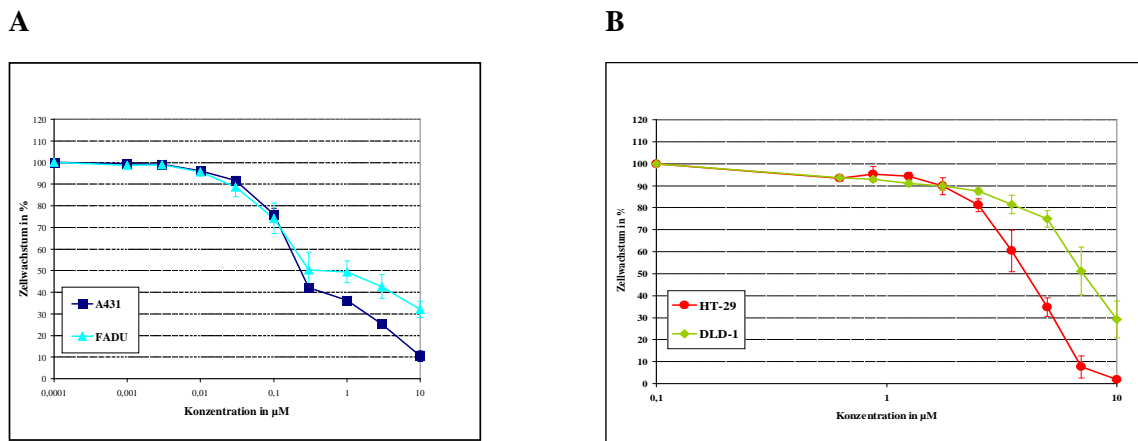
**Abb. 21:** Zytotoxische Wirksamkeit einer kontinuierlichen Behandlung mit ZD6474 über 96 h. Dargestellt sind die resultierenden Dosis-Wirkungskurven der (A) A431, HT-29 und DLD-1 sowie (B) FaDu.  $n \geq 3$ ,  $MW \pm$  STABW.

**Tab. 8:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen  $IC_{30}$ - und  $IC_{50}$ -Werte nach Behandlung mit ZD6474 über 96 h.  $MW (\pm$  STABW).

Zelllinie	$IC_{30}$ ( $\mu$ M)	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)
DLD-1	2,2 ( $\pm$ 0,44)	4,3 ( $\pm$ 1,17)
HT-29	1,6 ( $\pm$ 0,2)	2,3 ( $\pm$ 0,44)
A431	1,6 ( $\pm$ 0,2)	2,3 ( $\pm$ 0,36)
FaDu	0,6 ( $\pm$ 0,18)	2,1 ( $\pm$ 0,63)

#### 4.1.6 Wirksamkeit von ZD1839 (Gefitinib, Iressa®)

Nach einer Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD1839 über 96 h zeigten alle getesteten Tumorzelllinien ein Wirksamkeitsprofil vergleichbar mit GW572016 (Tab. 9, S. 36). Die beiden Tumorzelllinien FaDu und A431 wiesen eine vergleichbare Sensitivität mit einem  $IC_{30}$  von 0,13  $\mu$ M ( $p > 0,05$ ) auf. Ab einer Konzentration von ca. 0,2  $\mu$ M kam es bei beiden Tumorzelllinien zu einer zunehmenden Abflachung des Kurvenverlaufs als möglichen Hinweis auf eine resistente Subpopulation der Tumorzelllinien (Abb. 22 A, S. 36). Auf der Basis der  $IC_{30}$ -Werte zeigten die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 eine 42- bzw. 23-fach geringere Empfindlichkeit ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,005$ ) im Vergleich zur A431 und FaDu (Tab. 9, S. 36). Bei Vergleich der Kolonkarzinomzelllinien untereinander erwies sich die HT-29 sensibler als die DLD-1 ( $p = 0,0035$ ).



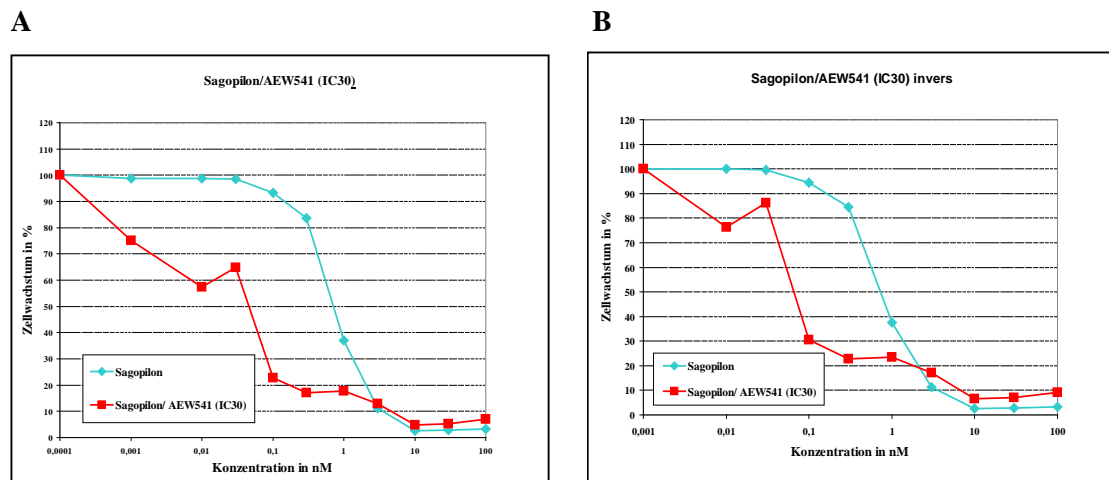
**Abb. 22:** Zytotoxische Wirksamkeit einer kontinuierlichen Behandlung mit ZD1839 über 96 h. Dargestellt sind die resultierenden Dosis-Wirkungskurven der (A) A431 und FaDu sowie (B) DLD-1 und HT-29.  $n \geq 3$ ,  $\text{MW} \pm \text{STABW}$ .

**Tab. 9:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen  $\text{IC}_{30}$ - und  $\text{IC}_{50}$ -Werte nach Behandlung mit ZD1839 über 96 h.  $\text{MW} (\pm \text{STABW})$ .

Zelllinie	$\text{IC}_{30}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
DLD-1	5,50 ( $\pm$ 0,50)	7,10 ( $\pm$ 1,05)
HT-29	3,10 ( $\pm$ 0,36)	4,27 ( $\pm$ 0,32)
A431	0,13 ( $\pm$ 0,01)	0,22 ( $\pm$ 0,03)
FaDu	0,13 ( $\pm$ 0,04)	0,59 ( $\pm$ 0,32)

#### 4.2 Untersuchung der Wirksamkeit einer kombinierten sequentiellen oder parallelen Exposition von Sagopilon und verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren in einem Panel humaner Tumorzelllinien

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Sagopilon mit den einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden Versuche mit paralleler und sequentieller Applikation aus Sagopilon und den verschiedenen TKI durchgeführt. Aus den resultierenden Dosis-Wirkungskurven der Behandlung mit Sagopilon alleine und der Kombination wurden die entsprechenden  $\text{IC}_{50}$ -Werte graphisch ermittelt und der Kombinationsindex berechnet (Abb. 23 A und B, S. 37). Anhand der Kombinationsindices konnte anschließend eine Aussage über die beste Applikationssequenz getroffen werden.



**Abb. 23:** Resultierende Dosis-Wirkungskurven einer parallelen Behandlung von Sagopilon mit dem  $IC_{30}$ -Wert des Tyrosinkinase-Inhibitors NVP-AEW541 am Beispiel der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1. (A) vor Fraktions- und (B) nach Fraktionsanalyse (siehe auch S. 26). Nach der Fraktionsanalyse wurden die  $IC_{50}$ -Werte von Sagopilon alleine und der Kombination aus den Dosis-Wirkungskurven graphisch ermittelt und der Kombinationsindex entsprechend S. 29 berechnet. Es zeigte sich ein synergistischer Effekt zwischen Sagopilon und dem TKI NVP-AEW541 für die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1.

#### 4.2.1 AEE788

In der parallelen, sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor AEE788) und 2 (AEE788 vor Sagopilon) von Sagopilon mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 war bei den Tumorzelllinien A431 und HT-29 sowohl graphisch als auch anhand der Kombinationsindices ein additiver Effekt mit diskret synergistischer Tendenz (A431) zu verzeichnen; d.h. zwischen der Kombinationstherapie und der alleinigen Sagopilongabe konnte kein wesentlicher Unterschied in der Inhibierung des Zellwachstums festgestellt werden (Tab. 10, S. 38). Allerdings konnte nur für die parallele Applikation in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 ein signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden.

In der parallelen, sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor AEE788) und 2 (AEE788 vor Sagopilon) zeigte sich ein signifikanter synergistischer Effekt der Kombination bei der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1, d.h. bei Vergleich der alleinigen Sagopilongabe mit der Kombination kam es zu einer Zunahme der zytotoxischen Wirksamkeit ( $p < 0,05$ ). Die Applikation des TKI AEE788 vor Sagopilon resultierte bei der DLD-1 sogar in einer Verstärkung des Synergismus.

Die parallele und sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor AEE788) und 2 (AEE788 vor Sagopilon) resultierte in der Tumorzelllinie FaDu in einer antagonistischen Wirkung

(Tab. 10), d.h. die Kombination von TKI und Sagopilon führte zu einer moderaten Abnahme der Zellwachstumsinhibierung.

**Tab. 10:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen Kombinationsindices einer parallelen und sequentiellen Applikation von Sagopilon und dem Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788.

Zelllinie	PA	SA1	SA2
DLD-1	1,7*	1,9*	2,3*
HT-29	1*	0,92	0,94
A431	1,19	1,25	1,25
FaDu	0,75*	0,75	0,8

PA = parallele Applikation, SA1 = Sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor AEE788), SA2 = Sequentielle Applikation 2 (AEE788 vor Sagopilon). Dabei gilt folgendes: K = 1 Additiver Effekt, K < 1 Antagonismus, K > 1 Synergismus. n ≥ 3, MW. \* p < 0,05.

#### 4.2.2 NVP-AEW541

In der parallelen Applikation von Sagopilon mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541 zeigte sich im Vergleich zur alleinigen Sagopilongabe eine Zunahme der zytotoxischen Wirksamkeit in der Behandlung der DLD-1, A431 und FaDu. Insbesondere bei der Zelllinie DLD-1 fand sich ein signifikanter synergistischer Effekt (Tab. 11, S. 39 und Abb. 23, S. 37). Im Gegensatz zur Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 fand sich bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 kein Unterschied zw. der alleinigen Gabe von Sagopilon und der Kombinationstherapie (additiver Effekt).

Im Vergleich zur parallelen Applikation zeigte sich in der sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor NVP-AEW541) und 2 (NVP-AEW541 vor Sagopilon) bei der A431 und DLD-1 erneut ein synergistischer Effekt. Im Vergleich zur parallelen Applikation war der resultierende Effekt bei der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 jedoch geringer. Bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 war auch in der sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor NVP-AEW541) ausschließlich ein additiver Effekt nachzuweisen; in der sequentiellen Applikation 2 (NVP-AEW541 vor Sagopilon) resultierte in der Kombinationstherapie ein antagonistischer Effekt (Tab. 11, S. 39). Für die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 konnte erneut in keiner der Applikationen ein signifikanter Effekt erzielt werden.

Bei der Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu zeigte sich sequenzabhängig eine Änderung des therapeutischen Effektes. In der sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor NVP-AEW541)

fand sich ein additiver Effekt während sich in der umgekehrten sequentiellen Applikation 2 (NVP-AEW541 vor Sagopilon) ein nicht-signifikanter antagonistischer Effekt ergab (*Tab. 11*).

**Tab. 11:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen Kombinationsindices einer parallelen und sequentiellen Applikation von Sagopilon und dem Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541.

Zelllinie	PA	SA1	SA2
DLD-1	5*	2,3*	2,3*
HT-29	0,94	1	0,68
A431	1,4*	1,4	1,4
FaDu	2*	1	0,44

PA = parallele Applikation, SA1 = Sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor NVP-AEW541), SA2 = Sequentielle Applikation 2 (NVP-AEW541 vor Sagopilon). Dabei gilt folgendes: K = 1 Additiver Effekt, K < 1 Antagonismus, K > 1 Synergismus. n ≥ 3, MW; \* p < 0,05.

#### 4.2.3 GW572016 (Lapatinib, Tyverb®)

In den Kombinationsversuchen von GW572016 mit Sagopilon zeigte sich in allen 4 Tumorzelllinien kein signifikantes Ergebnis (*Tab. 12, S. 40*).

Bei der parallelen Applikation von Sagopilon und dem Tyrosinkinase-Inhibitor GW572016 zeigte sich bei den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 ein additiver Effekt mit leicht synergistischer Tendenz, v.a. bei der DLD-1. In der Behandlung der Zervixkarzinomzelllinie A431 konnte keine signifikante Änderung der zytotoxischen Wirksamkeit in der Kombinationstherapie gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Zelllinie FaDu in der parallelen Applikation ein Trend zum Antagonismus, d.h. in der Kombinationstherapie konnte eine Abnahme der Proliferationshemmung verzeichnet werden (*Tab. 12, S. 40*).

In der sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor GW572016) und 2 (GW572016 vor Sagopilon) von Sagopilon mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor GW572016 zeigte sich bei der DLD-1 und HT-29 ein zur parallelen Applikation vergleichbares Interaktionsverhalten (*Tab. 12, S. 40*). Interessanterweise wurde andererseits der antagonistische Effekt in der Behandlung der FaDu noch verstärkt. Zusätzlich bildete sich bei der Zelllinie A431 im Vergleich zur parallelen Applikation ein allerdings nicht signifikanter antagonistischer Effekt aus.

**Tab. 12:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen Kombinationsindices einer parallelen und sequentiellen Applikation von Sagopilon und dem Tyrosinkinase-Inhibitor GW572016.

Zelllinie	PA	SA1	SA2
DLD-1	1,7	1,75	1,6
HT-29	1,2	1	1,1
A431	0,97	0,83	0,86
FaDu	0,8	0,5	0,59

PA = parallele Applikation, SA1 = Sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor GW572016), SA2 = Sequentielle Applikation 2 (GW572016 vor Sagopilon). Dabei gilt folgendes:  $K = 1$  Additiver Effekt,  $K < 1$  Antagonismus,  $K > 1$  Synergismus.  $n \geq 3$ , MW; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.4 ZD6474 (Vandetanib, Zactima®)

Die parallele, sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor ZD6474) und 2 (ZD6474 vor Sagopilon) wirkte in der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 moderat synergistisch (Tab. 13). Im Gegensatz dazu bildete sich in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 der Synergismus der parallelen Applikation in der sequentiellen Applikation unabhängig von der Applikationssequenz zu einer additiven Interaktion zurück. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant.

**Tab. 13:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen Kombinationsindices einer parallelen und sequentiellen Applikation von Sagopilon und dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474.

Zelllinie	PA	SA1	SA2
DLD-1	1,4*	1,75*	1,6
HT-29	1,5*	1	0,98
A431	1,23*	1,43	1,7
FaDu	0,87	0,75	0,52*

PA = parallele Applikation, SA1 = Sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor ZD6474), SA2 = Sequentielle Applikation 2 (ZD6474 vor Sagopilon). Dabei gilt folgendes:  $K = 1$  Additiver Effekt,  $K < 1$  Antagonismus,  $K > 1$  Synergismus.  $n \geq 3$ , MW. \*  $p < 0,05$ .



Bei der Zervixkarzinomzelllinie A431 konnte in der parallelen, sequentiellen Kombinationstherapie 1 (Sagopilon vor ZD6474) und 2 (ZD6474 vor Sagopilon) eine Zunahme der Zytotoxizität nachgewiesen werden; dieser zumindest in der sequentiellen Applikation nicht signifikante Effekt wurde durch die Gabe von ZD6474 vor Sagopilon nicht verstärkt (Tab. 13, S. 40).

Die parallele, sequentielle Kombinationstherapie 1 (Sagopilon vor ZD6474) und 2 (ZD6474 vor Sagopilon) führte bei der Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu einheitlich zu einem antagonistischen Effekt, der in der Applikationssequenz 2 (ZD6474 vor Sagopilon) besonders ausgeprägt war (Tab. 13, S. 40).

#### 4.2.5 ZD1839 (Gefitinib, Iressa®)

In der parallelen, sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor ZD1839) und 2 (ZD1839 vor Sagopilon) konnte bei der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 ein synergistischer Effekt der Kombinationstherapie nachgewiesen werden (Tab. 14).

Ebenso zeigte sich bei der HT-29 sowohl in der parallelen als auch sequentiellen Applikation 1 (Sagopilon vor ZD1839) ein moderat synergistischer Effekt. Dagegen fand sich in der sequentiellen Applikation 2 (ZD1839 vor Sagopilon) in der Kombinationstherapie nur ein additiver Effekt.

**Tab. 14:** Tabellarische Zusammenfassung der für jede Zelllinie spezifischen Kombinationsindices einer parallelen und sequentiellen Applikation von Sagopilon und dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD1839.

Zelllinie	PA	SA1	SA2
DLD-1	1,7*	1,64	2*
HT-29	1,22	1,458	1
A431	1,04	1,09	1,1
FaDu	0,857*	0,875	1,1

PA = simultane Applikation, SA1 = Sequentielle Applikation 1 (Sagopilon vor ZD1839), SA2 = Sequentielle Applikation 2 (ZD1839 vor Sagopilon). Dabei gilt folgendes: K = 1 Additiver Effekt, K < 1 Antagonismus, K > 1 Synergismus. n ≥ 3, MW. \* p < 0,05.

Bei der Zervixkarzinomzelllinie A431 wirkten sowohl die parallele als auch die sequentiellen Applikationen 1 (Sagopilon vor ZD1839) und 2 (ZD1839 vor Sagopilon) additiv.

Sowohl bei der Zervixkarzinomzelllinie A431 als auch bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 konnten unabhängig von der Applikationssequenz keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Bei der Kopf-Halstumorzelllinie FaDu fand sich in der parallelen Applikation ein signifikanter Trend zum Antagonismus (*Tab. 14, S. 41*). In den sequentiellen Applikationen fand sich in den Kombinationstherapien ein nicht signifikanter additiver Effekt.

### **4.3 Auswirkungen einer Behandlung mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren auf den Zellzyklus**

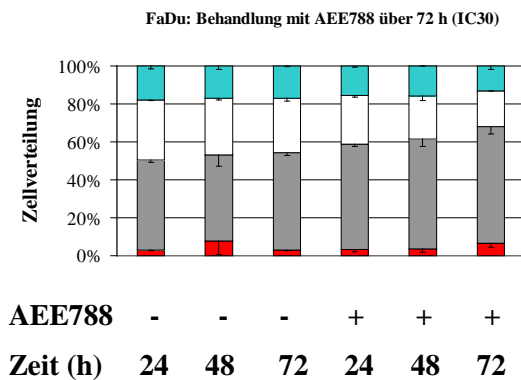
Zur Untersuchung des Einflusses einer Behandlung mit den unterschiedlichen Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Zellzykluskompartimentverteilung wurden die 4 Tumorzelllinien mit klinisch relevanten Konzentrationen der verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren über insgesamt 72 h behandelt und anschließend die Effekte mit der Durchflusszytometrie zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h gemessen. Zur besseren Beurteilbarkeit der Ergebnisse wurde eine unbehandelte Kontrolle über 72 h mitgeführt.

#### **4.3.1 AEE788**

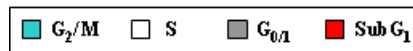
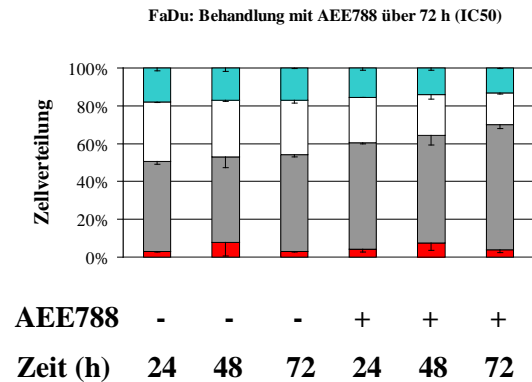
Bereits 24 h nach Start der Behandlung mit der  $IC_{30}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors AEE788 kam es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in allen 4 Tumorzelllinien zu einer Zunahme der  $G_1$ -Phasen Population (*Abb. 24, S. 43, Beispiel FaDu*). Dabei stieg der Anteil der Zellen in der  $G_1$ -Phase bei der A431 moderat von  $40,3 \% \pm 3,2 \%$  in der unbehandelten Kontrolle auf  $42,4 \% \pm 3,7 \%$  in den behandelten Zellen, bei der DLD-1 von  $41,3 \% \pm 1,4 \%$  in der unbehandelten Kontrolle auf  $50,8 \% \pm 1,6 \%$  in den behandelten Zellen, bei der HT-29 von  $47,5 \% \pm 10,9 \%$  in der unbehandelten Kontrolle auf  $51,3 \% \pm 10,8 \%$  in den behandelten Zellen und bei der FaDu von  $47,9 \% \pm 1,4 \%$  in der unbehandelten Kontrolle auf  $56 \% \pm 1,1 \%$  in den behandelten Zellen. Dieser  $G_1$ -Arrest wurde 48 bzw. 72 h nach Beginn der Behandlung noch verstärkt, wobei die Zellanreicherung in der  $G_1$ -Phase bei der Kopf-Halstumorzelllinie FaDu am deutlichsten sichtbar wurde mit einem Anstieg des  $G_1$ -Phasenteils von  $51,4 \% \pm 1,4 \%$  in der unbehandelten Kontrolle auf  $62 \% \pm 3,9 \%$  in den behandelten Zellen. Als Hinweis auf die zytotoxische Aktivität von AEE788 kam es 24, 48 und 72 h nach Behandlungsbeginn zu einem gehäuften Vorkommen apoptotischer und flottierender Zellen mit konsekutiver Ausbildung eines Sub $G_1$ -Peaks (*Abb. 24, S. 43, Beispiel FaDu*).

Die Exposition aller getesteten Tumorzelllinien mit der  $IC_{50}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors AEE788 zeigte fast identische Ergebnisse im Zellzyklus (*Abb. 24 B, S. 43, Beispiel FaDu*).

A



B

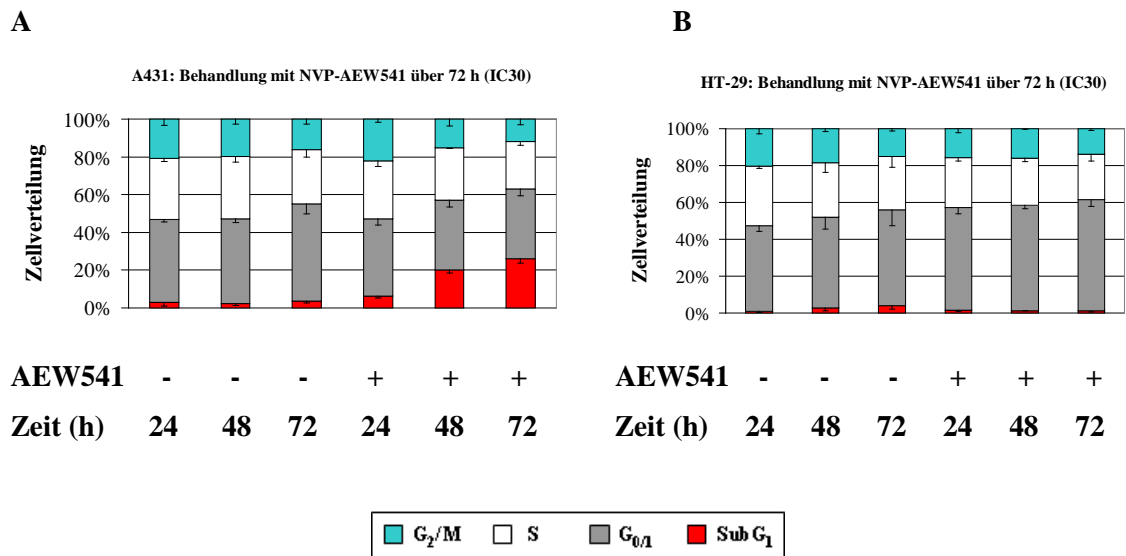


**Abb. 24:** Zellverteilung in den einzelnen Zellzykluskompartimenten nach einer Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 über 72 h am Beispiel der Kopf- Halstumorzelllinie FaDu. (A) Behandlung mit dem IC<sub>30</sub>-Wert des TKI. (B) Behandlung mit dem IC<sub>50</sub>-Wert des TKI. Die Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen des TKI AEE788 führte in allen Tumorzelllinien zu einem G<sub>1</sub>-Arrest und zu einer moderaten Akkumulation der Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion. MW-STABW, n ≥ 3.

### 4.3.2 NVP-AEW541

Die Exposition mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541 über 72 h führte in allen 4 getesteten humanen Tumorzelllinien zu unterschiedlichen Effekten auf die Zellzyklusverteilung. Durch eine Behandlung der A431 mit der IC<sub>30</sub> des TKI NVP-AEW541 resultierte 24 h nach Behandlungsbeginn eine Zunahme der SubG<sub>1</sub>-Fraktion als Hinweis auf Apoptoseinduktion von 2,9 % ± 1,9 % in der unbehandelten Kontrolle auf 6,4 % ± 1,2 % in den behandelten Zellen. Dieser Effekt nahm zeitabhängig weiter zu und es konnte zum Zeitpunkt 72 h eine SubG<sub>1</sub>-Fraktion von 3,7 % ± 1,1 % in der Kontrolle sowie 26,2 % ± 8,0 % in der Behandlungsgruppe als deutlicher Behandlungseffekt nachgewiesen werden (Abb. 25 A, S. 44).

In den Tumorzelllinien DLD-1 und FaDu führte die Exposition mit der IC<sub>30</sub> des TKI zu einem der A431 tendenziell vergleichbaren Verhalten im Zellzyklus. Jedoch war die Anreicherung der Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion nach 24, 48 und 72 h etwas weniger stark ausgeprägt im Vergleich zur A431 (ohne Abbildung).



**Abb. 25:** Zellverteilung in den einzelnen Zellzykluskompartimenten nach einer Behandlung mit dem IC<sub>30</sub>-Wert des Tyrosinkinase-Inhibitors NVP-AEW541 über 72 h am Beispiel der (A) Zervixkarzinomzelllinie A431 und (B) Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Die Exposition mit NVP-AEW541 führte bei der A431, DLD-1 und FaDu zu einer Zunahme des SubG<sub>1</sub>-Peaks. Die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 bildet eine Ausnahme: hier führte eine Behandlung mit dem TKI zu einem G<sub>1</sub>-Phasenarrest. MW-STABW, n ≥ 3.

In gleicher Weise und ohne Zunahme des Effektes im Vergleich zur IC<sub>30</sub> führte die Exposition der Tumorzelllinien A431, FaDu und DLD-1 mit der IC<sub>50</sub> des TKI 24, 48 und 72 h nach Behandlungsbeginn zu einer Zunahme des SubG<sub>1</sub>-Bereiches.

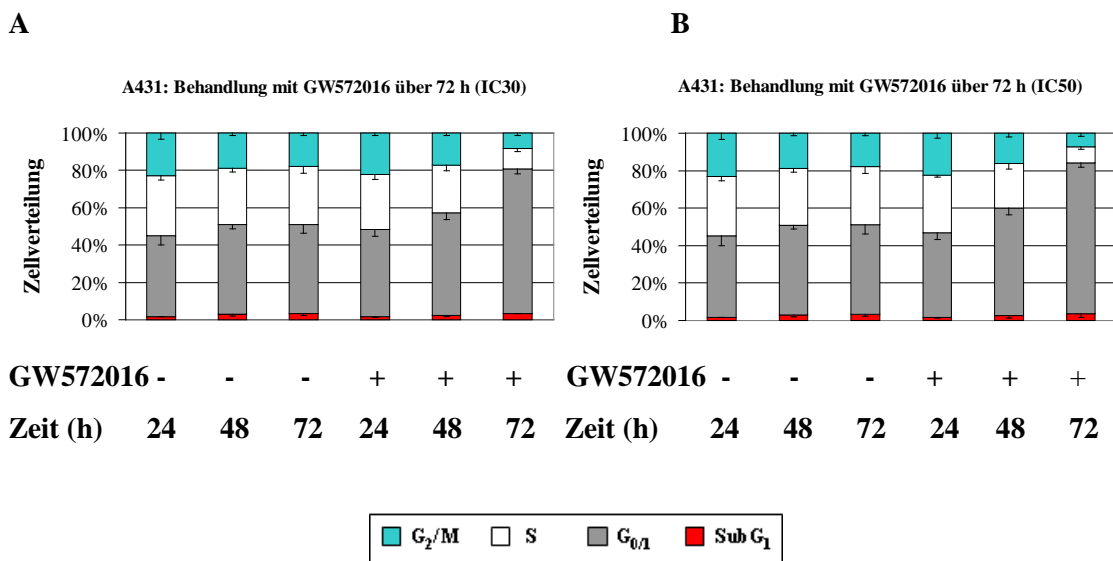
In der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 führte die Exposition mit dem IC<sub>30</sub>-Wert des TKI NVP-AEW541 bereits nach 24 h zu einer Akkumulation der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit Reduktion der S-Phasen Population (*Abb. 25 B*). Der G<sub>1</sub>-Phasenanteil stieg von 46,7 % ± 3 % in der unbehandelten Kontrolle auf 55,8 % ± 3,4 % in den behandelten Zellen. Nach 48 und 72 h nahm dieser Effekt noch zu.

Die Exposition der HT-29 mit dem IC<sub>50</sub>-Wert des TKI führte bereits nach 24 h zu einer deutlichen Akkumulation der Tumorzellen in der G<sub>1</sub>-Phase mit Abnahme des S- und auch G<sub>2</sub>/M-Phasenanteils. Der G<sub>1</sub>-Phasenanteil erhöhte sich von 46,7 % ± 3 % in der Kontrolle auf 68,6 % ± 2,9 % in den behandelten Zellen. Diese Effekte nahmen zum Zeitpunkt 48 und 72 h noch mehr zu. Im Vergleich zur Behandlung der A431, FaDu und DLD-1 mit dem TKI NVP-AEW541 führte die Exposition mit der IC<sub>30</sub> und IC<sub>50</sub> über 72 h in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 nur zu einer minimalen Anreicherung der Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion (ohne Abbildung).

### 4.3.3 GW572016 (Lapatinib, Tyverb®)

Eine Exposition der Zelllinien A431, FaDu und HT-29 mit der  $IC_{30}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors GW572016 führte bereits nach 24 h zu einer Akkumulation der Zellen in der  $G_1$ -Phase. Diese Zellanreicherung nahm zeitabhängig im Verlauf weiter zu. So stieg der  $G_1$ -Phasenanteil bei der A431 von  $48\% \pm 4,8\%$  in der unbehandelten Kontrolle auf  $77,6\% \pm 2,7\%$  in den behandelten Zellen (Abb. 26 A, Beispiel A431).

Die Exposition aller Tumorzelllinien mit der  $IC_{50}$  des TKI GW572016 induzierte vergleichbare Effekte im Zellzyklusverhalten. Auch hier zeigte sich nach einer 24-, 48- und 72-stündigen Behandlung eine Zunahme des  $G_1$ -Phasenarrestes (Abb. 26 B, Beispiel A431). Des Weiteren führte die Exposition mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des TKI nach 72 h im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer diskreten Anreicherung von Zellen in der  $SubG_1$ -Fraktion. Dieser Effekt war v.a. bei der Kopf- Halskarzinomzelllinie FaDu ausgeprägt. Bei der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 kam es nach einer Exposition mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des TKI zu keiner nennenswerten Zellakkumulation in einer spezifischen Phase des Zellzyklus (ohne Abbildung).

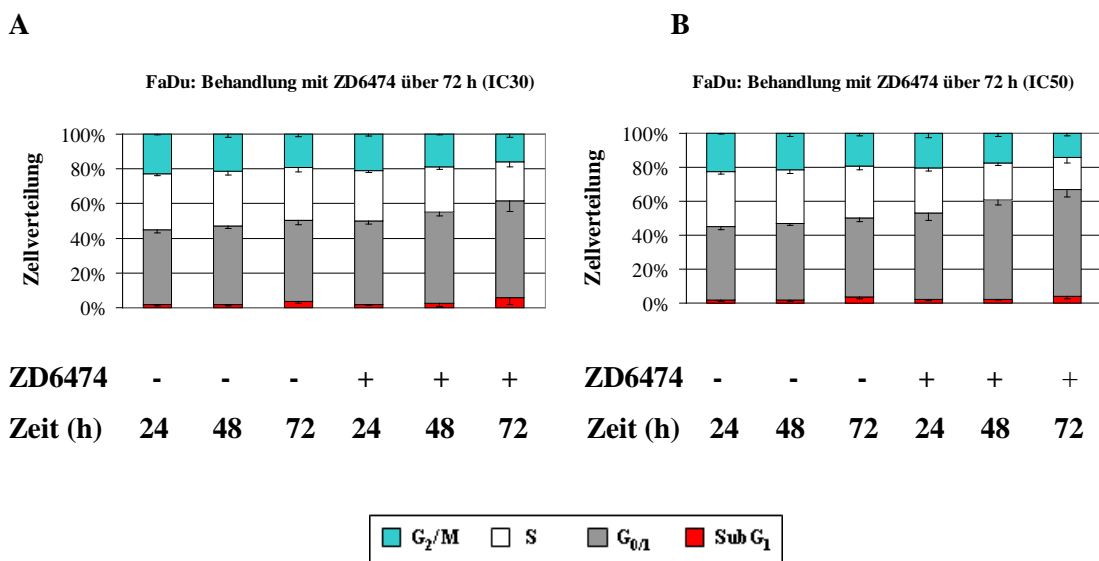


**Abb. 26:** Zellverteilung in den einzelnen Zellzykluskompartimenten nach einer Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor GW572016 über 72 h am Beispiel der Zervixkarzinomzelllinie A431. (A) Behandlung mit dem  $IC_{30}$ -Wert des TKI. (B) Behandlung mit dem  $IC_{50}$ -Wert des TKI. Die Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen des TKI führte bei den Tumorzelllinien A431, FaDu und HT-29 zu einem  $G_1$ -Arrest. Bei der DLD-1 zeigte sich keine wesentliche Beeinflussung der Zellzyklusphasen. MW-STABW,  $n \geq 3$ .

#### 4.3.4 ZD6474 (Vandetanib, Zactima®)

Die Exposition aller 4 Tumorzelllinien mit der  $IC_{30}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors ZD6474 führte nach 24 h zu einem moderaten  $G_1$ -Phasenarrest mit Abnahme der S- und z.T.  $G_2/M$ -Phase. Dieser Trend setzte sich nach 48 und 72 bei den Tumorzelllinien A431 und FaDu weiter fort (Abb. 27 A, Beispiel FaDu).

Bei den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 führte eine Exposition mit der  $IC_{30}$  nach 72 h zu einem moderaten Übergang der Zellen von der  $G_1$ - in die S-Phase und die Sub $G_1$ -Fraktion. Ein ähnliches Verhalten aller Tumorzelllinien konnte nach Exposition mit der  $IC_{50}$  des TKI ZD6474 nachgewiesen werden. (Abb. 27 B, Beispiel FaDu).



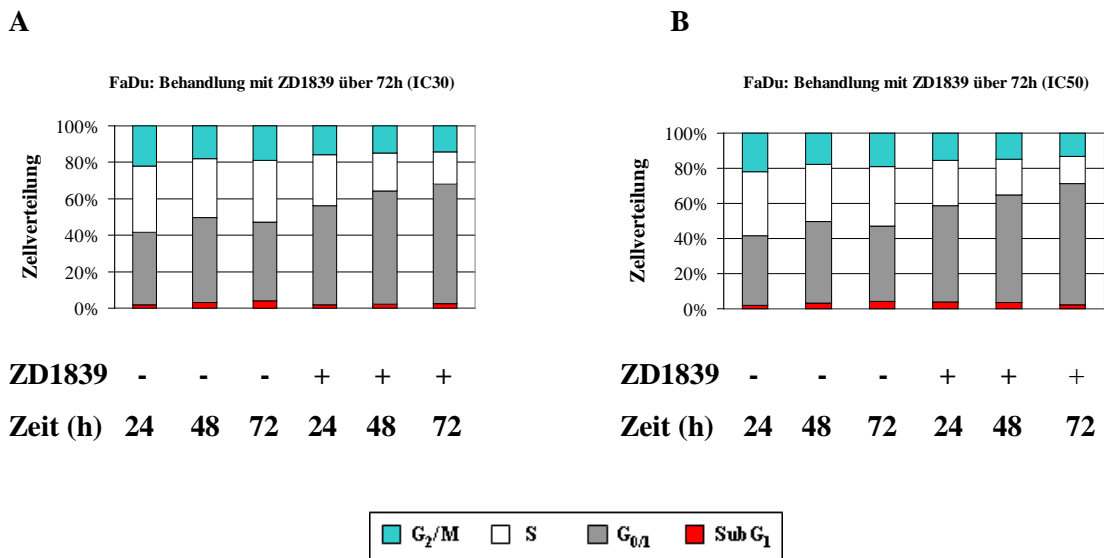
**Abb. 27:** Verteilung der Zellzykluskompartimente nach einer Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 über 72 h am Beispiel der Kopf- Halskarzinomzelllinie FaDu. (A) Behandlung mit dem  $IC_{30}$ -Wert des TKI. (B) Behandlung mit dem  $IC_{50}$ -Wert des TKI. Die Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen des TKI führte bei allen 4 Zelllinien zu einem  $G_1$ -Arrest. Nach 72 h Exposition zeigte sich bei den Kolonkarzinomzelllinien jedoch ein Übergang der Zellen aus der  $G_1$ -Phase in die Sub $G_1$ -Fraktion/S-Phase. MW-STABW,  $n \geq 3$ .

#### 4.3.5 ZD1839 (Gefitinib, Iressa®)

Bereits 24 h nach Beginn der Behandlung mit der  $IC_{30}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors ZD1839 zeigte sich bei allen 4 Zelllinien eine Akkumulation der Zellen in der  $G_1$ -Phase mit konsekutiver Abnahme der S-Phase. Dieser Effekt nahm zeitabhängig nach 48 und 72 h weiter zu (Abb. 28 A,

*Beispiel FaDu*). Dieser Effekt war insgesamt bei den Tumorzelllinien A431 und FaDu stärker ausgeprägt als bei den beiden Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29.

Die Exposition aller Tumorzelllinien mit der  $IC_{50}$  des TKI ZD1839 führte zu einer ähnlichen Beeinflussung der einzelnen Zellzykluskompartimente mit deutlicher Zunahme der  $G_1$ -Phase über die Zeit (*Abb. 28 B, Beispiel FaDu*). Interessanterweise konnte durch eine Erhöhung der Konzentration kein stärkerer  $G_1$ -Phasenarrest induziert werden.



**Abb. 28:** Verteilung der Zellzykluskompartimente nach einer Behandlung mit dem TKI ZD1839 über 72 h am Beispiel der Kopf- Halskarzinomzelllinie FaDu. (A) Behandlung mit dem  $IC_{30}$ -Wert des TKI. (B) Behandlung mit dem  $IC_{50}$ -Wert des TKI. Die Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen des TKI führte bei allen 4 Tumorzelllinien zu einem  $G_1$ -Arrest, der v.a. bei der A431 und FaDu besonders ausgeprägt war. MW,  $n \geq 3$  (FaDu  $n = 1$ ).

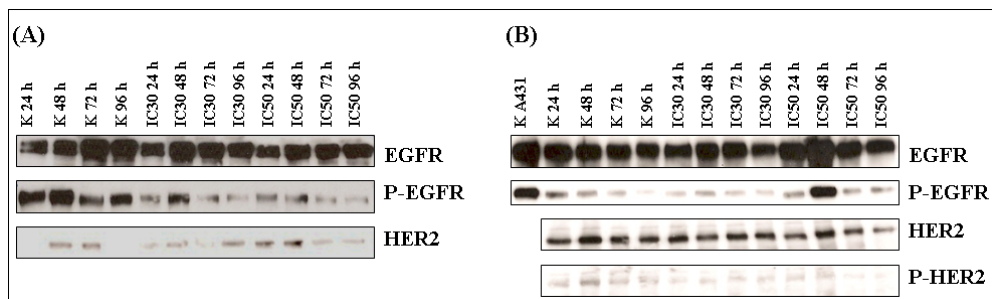
#### 4.4 Expression der Rezeptortyrosinkinasen in humanen Tumorzelllinien und Auswirkungen einer Behandlung mit den entsprechenden Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Rezeptorphosphorylierung

Zur weiteren Charakterisierung der Wirkungsweise der Tyrosinkinase-Inhibitoren wurden die 4 humanen Tumorzelllinien mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  der einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren über 96 h behandelt und in den anschließenden Western Blot-Analysen die Expression der einzelnen Rezeptortyrosinkinasen in der jeweiligen Zelllinie sowie die Auswirkungen einer Behandlung mit den TKI auf die Rezeptorphosphorylierung näher analysiert. Zur besseren Beurteilbarkeit der Ergebnisse wurde eine unbehandelte Kontrolle über 96 h mitgeführt.

#### 4.4.1 AEE788

Eine Behandlung aller Tumorzelllinien mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors AEE788 über 96 h konnte die EGFR-Expression zu keiner Zeit beeinflussen (*Abb. 29, Beispiel A431 und FaDu*). In der Betrachtung der Rezeptorphosphorylierung führte eine Exposition mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors in der Tumorzelllinie A431 zu einer Hemmung der Rezeptorphosphorylierung bereits nach 24 h (*Abb. 29 A*), die über die gesamte Expositionszeit anhält. In der Zelllinie FaDu rief eine TKI-Exposition keine relevante Beeinflussung der Rezeptorphosphorylierung hervor. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die verstärkte Bande von P-EGFR in der Tumorzelllinie FaDu, welche nach einer 48-stündigen Behandlung mit AEE788 zustande kommt, mglw. auf die Variabilität der Gelbeladung zurückzuführen ist. In den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 zeigte sich nur eine marginale Expression des phosphorylierten EGF-Rezeptors. Die Rezeptorphosphorylierung konnte durch eine Behandlung mit AEE788 nicht wesentlich beeinflusst werden (ohne Abbildung), was mit den Ergebnissen aus den Zytotoxizitätsmessungen korreliert.

Für den HER2-Rezeptor wurde ebenfalls weder zeit- noch dosisabhängig eine Veränderung der Expression in allen Tumorzelllinien beobachtet. Eine Expression der phosphorylierten Form des HER2-Rezeptors konnte in allen Tumorzelllinien kaum detektiert werden.

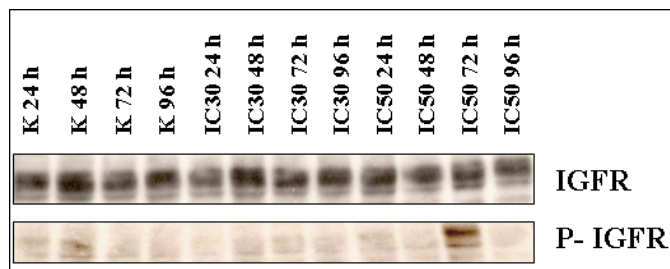


**Abb. 29:** Expression der nicht-aktivierten und aktivierten Form des EGF- und des HER2-Rezeptors nach einer Behandlung mit dem TKI AEE788 über 96 h am Beispiel der (A) Zervixkarzinomzelllinie A431 und (B) Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu. Als Positivkontrolle für den EGFR wurde die Zervixkarzinomzelllinie A431 verwendet. AEE788 führt bei der A431 bereits nach 24 h zu einer Abnahme der Rezeptorphosphorylierung des EGFR. K = Kontrolle, P = Phospho.



#### 4.4.2 NVP-AEW541

Eine Behandlung aller Tumorzelllinien mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors NVP-AEW541 über 96 h führte zu keinem Zeitpunkt zu einer relevanten Beeinflussung der IGF-Rezeptorexpression. Ein Nachweis der Expression der phosphorylierten Form des IGF-Rezeptors gelang nur diskret in den Tumorzelllinien FaDu, A431 und HT-29 (*Abb. 30, Beispiel FaDu*). Eine Beeinflussung der Rezeptorphosphorylierung unter einer Behandlung mit dem TKI NVP-AEW541 konnte jedoch zu keiner Zeit verzeichnet werden. Dies ist mglw. auf eine fehlende oder nicht ausreichende Sensitivität der Methode zurückzuführen. Andererseits korrelieren diese Ergebnisse teilweise mit denen aus der Zellzyklusanalyse. Hier konnte eine Anreicherung der Zellen in einer spezifischen Phase des Zellzyklus nur bei der HT-29 verzeichnet werden. Bei den Zelllinien DLD-1, A431 und FaDu zeigte sich eine ausgeprägte Anreicherung der Zellen in der SubG<sub>1</sub>-Fraktion. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass NVP-AEW541 eher direkt Apoptose bzw. einen unspezifischen Wirkmechanismus initiiert. Die verstärkte Bande von P-IGFR, welche nach einer 72-stündigen Behandlung mit NVP-AEW541 zustande kommt, ist mglw. auf eine Fehlbeladung des Gels zurückzuführen.

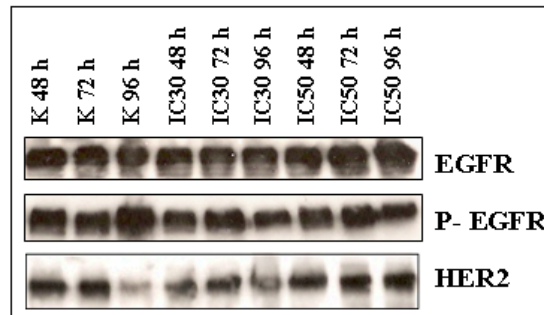


**Abb. 30:** Expression der nicht-aktivierten und aktivierten Form des IGF-Rezeptors nach einer Behandlung mit dem TKI NVP-AEW541 über 96 h am Beispiel der Kopf-Hals-Tumorzelllinie FaDu. K = Kontrolle, P = Phospho.

#### 4.4.3 GW572016 (Lapatinib, Tyverb®)

Eine Behandlung aller 4 Tumorzelllinien mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors GW572016 über 96 h konnte die EGFR-Expression nicht wesentlich beeinflussen. In Abhängigkeit von der verwendeten Western Blot-Methode konnte eine Inhibierung der Phosphorylierung bei keiner der getesteten Tumorzelllinien gezeigt werden (*Abb. 31, S. 50, Beispiel Zervixkarzinomzelllinie*). In den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 konnte, ähnlich wie bei dem TKI AEE788, keine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus des EGFR aufgezeigt werden (ohne Abbildung).

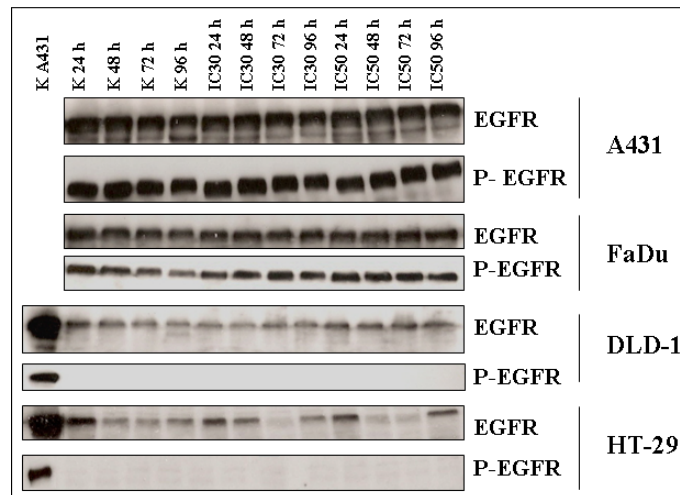
Eine Behandlung mit dem  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des TKI rief in allen humanen Tumorzelllinien keine Veränderung der HER2-Rezeptorexpression hervor. Die phosphorylierte Form des HER2-Rezeptors ließ sich in der Western Blot Methode in allen Zelllinien nicht signifikant detektieren.



**Abb. 31:** Expression der nicht-aktivierten und aktivierten Form des EGF-Rezeptors und der nicht-aktivierten Form des HER2-Rezeptors nach einer Behandlung mit dem TKI GW572016 über 96 h am Beispiel der Zervixkarzinomzelllinie A431. K = Kontrolle, P = Phospho.

#### 4.4.4 ZD6474 (Vandetanib, Zactima®)

Vergleichbar mit dem Wirksamkeitsprofil von AEE788 führte eine Exposition aller 4 Tumorzelllinien mit der  $IC_{30}$  und  $IC_{50}$  des Tyrosinkinase-Inhibitors ZD6474 über 96 h zu keiner wesentlichen Beeinflussung der EGF-Rezeptor-Expression (*Abb. 32, S. 51*). Die phosphorylierte Form des EGF-Rezeptors ließ sich in allen 4 Tumorzelllinien weder zeit- noch dosisabhängig downregulieren. Eine Expression des VEGF2- Rezeptors ließ sich zu keiner Zeit nachweisen (ohne Abbildung).



**Abb. 32:** Expression der nicht-aktivierten und aktivierten Form des EGF-Rezeptors nach einer Behandlung mit dem TKI ZD6474 über 96 h. Darstellung aller 4 humanen Tumorzelllinien. Für die Kolonkarzinomzelllinien wurde die A431 als Positivkontrolle mitgeführt. K = Kontrolle, P = Phospho.

## 5 Diskussion

In der Entwicklung neuer Tumormedikamente wurde in den letzten Jahren ein besonderes Augenmerk auf die Beeinflussung intrazellulärer Signalwege gerichtet. Als „*targeted drugs*“ spielen neben monoklonalen Antikörpern v.a. die sog. „*small molecules*“ eine immer größere Rolle in der Tumorthapie. Aufgrund ihres unterschiedlichen Nebenwirkungsprofils und Wirkmechanismus scheinen diese Substanzklassen in besonderem Maße für die Kombinationstherapie mit zahlreichen konventionellen Zytostatika geeignet zu sein.

Ein Schwerpunkt in der Entwicklung von „*small molecules*“ wird dabei auf die gezielte Inhibierung von Wachstumsfaktorrezeptortyrosinkinasen gerichtet. Die Rezeptortyrosinkinasen beeinflussen nach ihrer Aktivierung nachgeschaltete Signalwege und damit auch die Zellproliferation, Differenzierung, Angiogenese, Apoptose und den Zellzyklus (Pennel *et al.* 2009). Bereits in zahlreichen präklinischen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass diverse Tumorzelllinien z.B. Rezeptortyrosinkinasen des EGFR, HER2 und IGFR überexprimieren, zum anderen, dass man durch spezifische Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren in der Lage ist, die Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen reversibel zu inhibieren und damit zu einer Wachstumshemmung zu führen (Grünwald *et al.* 2003; Harari 2004). Des Weiteren konnte bereits in präklinischen und einigen klinischen Studien gezeigt werden, dass es durch eine Kombination von klassischen Zytostatika mit TKI zu einer teilweise synergistischen Verstärkung der Wirkung der Zytostatika kommen kann (Höpfner *et al.* 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten daher anhand von *in vitro* Versuchen die zytotoxische Aktivität von 5 verschiedenen inovativen Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788, NVP-AEW541, GW572016 (Lapatinib, Tyverb®), ZD6474 (Vandetanib, Zactima®) und ZD1839 (Gefitinib, Iressa®) alleine sowie in Kombination mit dem neuen Etoposid Derivat Sagopilon näher charakterisiert werden. Zur Erzielung eines möglichst maximalen Kombinationseffektes wurden neben der parallelen Kombination auch sequentielle Applikationsregime in der Zellkultur getestet. Weiterhin sollten zur Erklärung gefundener Interaktionen Wirkungsindikatoren der Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Änderungen im Zellzyklusprofil oder der Phosphorylierung von Wachstumsfaktorrezeptoren untersucht werden. Alle Versuche wurden dabei an der humanen Zervixkarzinomzelllinie A431, den humanen Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 sowie der humanen Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu durchgeführt.

## 5.1 Charakterisierung des zytotoxischen Potentials und zugrunde liegender Wirkmechanismen der einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren

### 5.1.1 AEE788

In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 das Wachstum von zahlreichen Tumorzelllinien vornehmlich durch Induktion von Apoptose effektiv inhibiert (Park *et al.* 2005; Meco *et al.* 2010; Barbarroja *et al.* 2010).

Entsprechend führte in der vorliegenden Arbeit eine Behandlung mit AEE788 in allen 4 getesteten humanen Tumorzelllinien zu einer Wachstumsinhibierung. Dabei war der antiproliferative Effekt bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu deutlich stärker ausgeprägt als bei den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29. Park *et al.* (2005) konnten bei *in vitro* Versuchen an verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien der Haut ähnliche Wirkdosen wie bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien in dieser Arbeit aufzeigen. Es wurden  $IC_{50}$ -Werte von 0,21 bis 0,96  $\mu$ M publiziert. Das hohe zytotoxische Potential von AEE788 bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien in dieser Arbeit sowie die Ergebnisse von Park *et al.* (2005) weisen zum einen auf eine mögliche besondere Eignung von AEE788 für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen hin und zum anderen unterstreichen sie die Bedeutung des EGF-Systems für diesen Karzinomtyp.

Der Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 inhibiert als Multi-TKI die Phosphorylierung der Wachstumsfaktorrezeptoren des EGF- und VEGF-Systems (Thaker *et al.* 2005; Meco *et al.* 2010). Damit greift der TKI AEE788 nicht nur in das Wachstum einer Tumorzelle ein, sondern er beeinflusst auch die Angiogenese. Basierend auf den Ergebnissen der Zytotoxizitätsmessungen in der vorliegenden Arbeit kann vermutet werden, dass die zur Hemmung der Zellproliferation bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu erforderlichen relativ niedrigen Wirkstoffkonzentrationen auf eine vermehrte Expression bzw. Aktivierung von Rezeptoren v.a. des EGF-Systems zurückzuführen sind. Auf der anderen Seite lassen angewendete höhere Konzentrationen zur Hemmung der Zellproliferation bei den Kolonkarzinomzelllinien auf eine verminderte EGFR- und HER2-Expression bzw. Aktivierung in dieser Tumorentität schließen. Diese Hypothese wird auch durch kürzliche Publikationen unterstützt, da Kolonkarzinomzelllinien v.a. durch eine vermehrte Expression von IGF-1R gekennzeichnet sind (Gao *et al.* 2012).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte eine ausgeprägte Expression der aktivierten und nicht-aktivierten Form des EGF-Rezeptors sowie eine moderate Expression des HER2-Rezeptors in den Tumorzelllinien A431 und FaDu aufgezeigt werden. Nach Behandlung der Zelllinie A431 mit dem TKI AEE788 wurde eine Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung

bereits nach 24 h sichtbar; in der Zelllinie FaDu rief eine Behandlung keine nennenswerte Phosphorylierungsinhibierung hervor. Die gewonnenen Ergebnisse sprechen dafür, dass das hohe zytotoxische Potential des TKI AEE788 bei der Plattenepithelkarzinomzelllinie A431 auf ein spezifisches Eingreifen in intrazelluläre Signalkaskaden zurückgeführt werden kann. Bei der Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu ist mglw. die fehlende oder geringe Sensitivität der Western Blot-Methode als ursächlich für den fehlenden Nachweis der Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung anzusehen. Bei genauerer Betrachtung könnte aber auch die in den Versuchen eingesetzte Dosierung eine Rolle spielen. So konnte in ersten klinischen Phase-I-Studien von Reardon *et al.* (2012) gezeigt werden, dass klinisch relevante Dosierungen von AEE788 die Rezeptorphosphorylierung von EGFR nur marginal und von VEGFR nicht beeinflussen. Möglicherweise sind höhere Konzentrationen zur Inhibierung der EGF-Rezeptorphosphorylierung erforderlich. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass das zytotoxische Potenzial des TKI AEE788 bei der Tumorzelllinie FaDu ebenso durch eine hier nicht untersuchte Inhibierung der Phosphorylierung zahlreicher *downstream targets* verursacht sein kann. So zeigte Younes *et al.* (2005) an verschiedenen Schilddrüsenkarzinomzelllinien, dass AEE788 die Phosphorylierung der Akt- und auch MAP-Kinase downreguliert.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den Kolonkarzinomzelllinien eine relativ geringe Expression des EGF-Rezeptors; die phosphorylierte Form war kaum bzw. gar nicht nachweisbar. Dies erklärt wiederum, dass beispielsweise bei der DLD-1 17-fach höhere Konzentrationen zur Hemmung des Zellwachstums als bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien notwendig waren.

In der vorliegenden Arbeit gelang es nicht, die Inhibierung der Phosphorylierung des VEGF1- bzw. 2-Rezeptors nachzuweisen. Dabei spielt mglw. die Höhe der eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen eine Rolle. Die Arbeitsgruppe um Baselga (2012) konnte in ersten Phase-I-Studien aufzeigen, dass AEE788 bei Serumkonzentrationen von 0,05 bis 0,13  $\mu\text{M}$  (entspricht einer eingesetzten AEE788-Dosis von 150 bis 225 mg täglich) die Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors nicht beeinflusst. Vielmehr konnte in seiner Studie eine Modulation der Phosphorylierung des VEGFR nur durch Überschreiten der maximal tolerierten Dosis von AEE788 erzielt werden.

In zahlreichen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass der TKI AEE788 das Wachstum einer Tumorzelle nicht nur durch Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von Wachstumsfaktorrezeptoren und *downstream targets* inhibiert (Younes *et al.* 2005; Park *et al.* 2005); vielmehr ist AEE788 in der Lage, konzentrationsabhängig einen Zellzyklusarrest sowie durch Aktivierung der Caspase 3 und Inhibierung der Phosphorylierung des pro-apoptischen Proteins Bad Apoptose zu induzieren (Park *et al.* 2005; Younes *et al.* 2005; Barbarroja *et al.* 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit führte eine Behandlung mit dem TKI AEE788 in allen Tumorzelllinien zur Ausbildung eines G<sub>1</sub>-Arrestes im Zellzyklus. Als Hinweis auf

Auslösung des programmierten Zelltodes kam es bereits nach 24 h zu einem vermehrten Vorkommen flottierender Zellen und zu einer marginalen Anreicherung der Tumorzellen im SubG<sub>1</sub>-Bereich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 in Abhängigkeit von der Tumorentität durch Hemmung der Phosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen und durch Induktion eines spezifischen Arrestes in der G<sub>1</sub>-Phase in der Lage ist, die Zellproliferation signifikant zu inhibieren. Eine Behandlung der Kolonkarzinomzelllinien mit dem TKI AEE788 führte zu keiner nennenswerten Modulation der Wachstumsfaktorrezeptorphosphorylierung. Als Hinweis auf einen spezifischen Wirkmechanismus kam es ebenso zur Induktion eines spezifischen Zellzyklusarrestes in der G<sub>1</sub>-Phase.

### 5.1.2 NVP-AEW541

Das IGF-System spielt für die Entstehung und das Wachstum von Tumorentitäten wie kolorektalen, Prostata- und Ovarialkarzinomen eine besondere Rolle (Doepfner *et al.* 2007). Entsprechend ist das IGF-System als „Target“ für die zielgerichtete Therapie von großem Interesse und so konnte bereits in zahlreichen präklinischen Tumormodellen eine Wirksamkeit des gegen den IGF-IR gerichteten TKI NVP-AEW541 nachgewiesen werden (Gotlieb *et al.* 2005; Scotlandi *et al.* 2005). Zusätzlich befinden sich weitere gegen den IGF-1 Rezeptor gerichtete innovative Medikamente zurzeit in der präklinischen Testung sowie in klinischen Studien, u.a. Antikörper (z.B. CP-751, AVE1642/EM164, IMC-A12, AMG 479, MK0646, MEDI-573) und diverse Tyrosinkinase-Inhibitoren (BMS-536942, NVP-ADW742, AG1024) (Hewish *et al.* 2009; Gao *et al.* 2012). Aufgrund teilweiser schwerwiegender Toxizitäten und unzureichendem klinischen Ansprechen stehen klinische Zulassungen noch aus.

In der vorliegenden Arbeit zeigte NVP-AEW541 ein hohes zytotoxisches Potential in allen getesteten Tumorzelllinien im niedrigen mikromolaren Bereich. Die IC<sub>50</sub>-Werte erstrecken sich dabei von 0,25 bis 1 µM. Bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 zeigte sich eine den anderen Tumorzelllinien überlegene zytotoxische Wirkung von NVP-AEW541. Doepfner *et al.* (2007) konnte bei der Analyse verschiedener AML-Zellen teilweise ähnliche Ergebnisse aufzeigen. So fanden sich in ihrer Arbeit AML-Zellen (NB4 und Kasumi) mit hoher Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit NVP-AEW541; die IC<sub>50</sub>-Werte reichten von 0,4 bis 0,7 µM. Jedoch fanden sich auch mehrere resistente Tumorzellen mit IC<sub>50</sub>-Werten von 6,3 bis 9,7 µM.

Da NVP-AEW541 ausschließlich die Phosphorylierung des IGF-IR inhibiert, liegt die Vermutung nahe, dass v.a. bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eine vermehrte Expression des IGF1-Rezeptors und seiner aktiven Form vorliegen könnte. Diese Behauptung wird durch die Arbeiten von Höpfner *et al.* (2006) untermauert. Er beschrieb, dass in > 90 % der

kolorektalen Karzinome IGF-IR überexprimiert wird und dies mit einer schlechten Prognose und einem aggressiveren Tumorwachstum assoziiert ist. In seiner Arbeit untersuchte er auch die Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und HCT-116.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in allen 4 Tumorzelllinien eine Expression der nicht-aktivierten Form des IGF-IR, wobei die Tumorzelllinien FaDu und HT-29 die stärkste Expression zeigten. Allerdings ließ sich wahrscheinlich methodisch bedingt in keiner der Tumorzelllinien die phosphorylierte Form des IGF-1 Rezeptors und damit eine Inhibierung der Phosphorylierung durch NVP-AEW541 nachweisen. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass NVP-AEW541 die Phosphorylierung der *downstream targets* Akt und MAP-Kinase inhibiert und so mglw. seine zytotoxische Wirkung entfaltet (Doepfner *et al.* 2007). Die Arbeitsgruppen um Gao (2012), Ekyalongo (2012) und Doepfner (2007) postulierten, dass die gegen den IGF-IR gerichteten TKI und mAK aufgrund der ausgeprägten Homologie des IGF-IR und des Insulin-Rezeptors nicht ausschließlich nur den IGF-IR beeinflussen. Vielmehr muss berücksichtigt werden, dass in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen NVP-AEW541 mglw. sein zytotoxisches Potential durch eine vermehrte Inhibierung der Phosphorylierung des Insulinrezeptors erhält. Dies sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

In Hinblick auf die Hemmung der Rezeptorphosphorylierung kam die Arbeitsgruppe um Moser 2008 zu einem anderen Ergebnis. Er untersuchte den Phosphorylierungsstatus von IGF-IR bei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien und konnte nachweisen, dass es nach einer Behandlung mit NVP-AEW541 zu einer Inhibierung der Phosphorylierung kommt. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorzellen in mit 2 %-igem FKS versetzten Medium inkubiert und anschließend mit IGF-I stimuliert (Moser *et al.* 2008). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe um Tazzari (2007). Alle Versuche wurden dabei zum einen in 10 %-igem bzw. 2 %-igem Serum durchgeführt. Dabei resultierte die Verwendung von 10 %-igem Serum in einer Verminderung der Aktivität des Tyrosinkinase-Inhibitors NVP-AEW541. Tazzari postulierte, dass die in 10 %-igem FKS enthaltenen diversen Wachstumsfaktoren u.a. zu einer Stimulation von *survival pathways* führen und damit die zytotoxische Aktivität von NVP-AEW541 reduzieren. Dies könnte eine Erklärung für die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sein.

Möglicherweise besteht bei den einzelnen Tumorentitäten eine differente IGF-IR-Abhängigkeit; d.h. in einigen Tumorzellen reicht es scheinbar aus die Phosphorylierung partiell zu inhibieren, um eine Hemmung des Zellwachstums zu induzieren. Bei anderen Tumorentitäten führt mglw. erst eine komplette Inhibierung der Phosphorylierung durch höhere Konzentrationen von NVP-AEW541 zu einer Zellwachstumshemmung (Gotlieb *et al.* 2005).

Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen aus den Western Blot-Analysen ist mglw. davon auszugehen, dass NVP-AEW541 in den Tumorzelllinien A431, FaDu und DLD-1 eher in andere intrazelluläre Mechanismen eingreift. Höpfner *et al.* postulierten bereits 2005 bei der



Untersuchung von HCC-Zellen, dass die Hemmung des Zellwachstums unter einer Behandlung mit NVP-AEW541 durch einer vermehrte Apoptose-Induktion ausgelöst wird. Dabei kommt es zu einer Aktivierung der Caspasen 3 und 8 sowie zu einer Suppression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Survivin.

Die Ergebnisse von Höpfner *et al.* (2005) lassen sich auch durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse in der Zellzyklusanalyse bestätigen. Bei den Tumorzelllinien A431, FaDu und DLD-1 resultierte eine 72-stündige Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541 in einem direkten Übergang der Tumorzellen in die SubG<sub>1</sub>-Phase und damit einen ersten Hinweis auf direkte Apoptoseinduktion. Eine Ausnahme bildet die Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Unter einer Behandlung mit dem TKI NVP-AEW541 kam es zur Induktion eines G<sub>1</sub>-Arrestes. Als Ursache des Zellzyklusarrestes konnten Höpfner *et al.* (2006) bei der Untersuchung der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 und HCT-116 eine verminderte Cyclin D1-Expression sowie eine gesteigerte Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich alle Tumorzelllinien besonders sensibel gegenüber einer Behandlung mit dem TKI NVP-AEW541 zeigten, wobei die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 am empfindlichsten auf die Behandlung reagierte. Im Gegensatz zu den meisten Studien konnte eine Beeinflussung der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinase IGF-IR und durch sie initiierte Signalwege in keiner der Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Basierend auf den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse scheint in den Tumorzelllinien DLD-1, A431 und FaDu die direkte Apoptoseinduktion eine große Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu liefern die Ergebnisse der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 Hinweise auf ein spezifisches Eingreifen in intrazelluläre Signalkaskaden.

### 5.1.3 GW572016 (Lapatinib, Tyverb®)

In einigen klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Tumoren, die sowohl den EGFR als auch den HER2-Rezeptor überexprimieren, durch ein aggressiveres Wachstum gekennzeichnet und damit mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert sind (Bence *et al.* 2005). Der Tyrosinkinase-Inhibitor GW572016 ist in der Lage, reversibel sowohl die Phosphorylierung des EGF- als auch des HER2-Rezeptors zu inhibieren (Xia *et al.* 2002; Bence *et al.* 2005; Diaz *et al.* 2010). Bereits in zahlreichen präklinischen Analysen war GW572016 in der Lage, effektiv das Wachstum von Tumorzellen zu inhibieren, u.a. Kopf- und Hals, Lunge, Magen, Vulva und nicht zuletzt Mamma (Bence *et al.* 2005). Besonders in der Behandlung der etwa 20 % HER-positiven Mammakarzinome spielt GW572016 heutzutage eine bedeutende Rolle. Der erste Durchbruch in der Behandlung des HER2-positiven Mammakarzinoms war die Entwicklung des monoklonalen, gegen den HER2-Rezeptor gerichteten Antikörpers

Trastuzumab (Herceptin®). Jedoch zeigen 50 % der HER2-überexprimierenden Mammakarzinome eine zunehmende Trastuzumab-Resistenz bzw. ist Trastuzumab nicht in der Lage, bei Vorliegen von zerebralen Metastasen die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Moy *et al.* 2007). Lapatinib wird bereits seit Juni 2008 erfolgreich in der Behandlung des HER2-positiven Mammakarzinoms eingesetzt und in zahlreichen Tumormodellen, u.a. NSCLC, getestet. Im Unterschied zu Trastuzumab kann es aufgrund seiner geringen Molekülgröße die Blut-Hirn-Schranke überwinden und stellt so einen potentiellen Therapieansatz in der Behandlung des zerebral metastasierten Mammakarzinoms dar (Bachelot *et al.* 2011).

In der vorliegenden Arbeit führte GW572016 bei den untersuchten Tumorzelllinien A431 und FaDu bereits im niedrigen mikromolaren Bereich zu einer Hemmung der Zellproliferation. Vergleichbar mit den Daten zu AEE788 zeigten die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 eine 18- bzw. 10,6-fach geringere Empfindlichkeit im Vergleich zu den Plattenepithelkarzinomzelllinien. Die Ergebnisse einer deutlichen Hemmung des Zellwachstums bestätigen auch Daten anderer Arbeitsgruppen (Diaz *et al.* 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte in den Kolonkarzinomzelllinien sowohl die nicht-aktivierte als auch moderat die aktivierte Form des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch weder zeit- noch konzentrationsabhängig eine Inhibierung der Phosphorylierung. Dies erklärt, warum bei den Kolonkarzinomzelllinien eher höhere Konzentrationen zur Inhibierung des Zellwachstums eingesetzt werden mussten. Bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu fand sich eine ausgeprägte Expression des EGF-Rezeptors und seiner phosphorylierten Form. Eine Inhibierung der Phosphorylierung konnte jedoch zu keiner Zeit nachgewiesen werden. In allen Tumorzelllinien gelang es zu keinem Zeitpunkt die phosphorylierte Form des HER2-Rezeptors nachzuweisen. Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So konnten Xia *et al.* (2002) und Zhou *et al.* (2006) bei Versuchen an diversen EGFR- und HER2-überexprimierenden Tumorzelllinien eine Inhibierung der Phosphorylierung sowohl des EGFR als auch des HER2-Rezeptors aufzeigen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen in der vorliegenden Dissertation könnten, ähnlich wie in den anderen Analysen, mglw. auf eine fehlende bzw. zu geringe Sensitivität der verwendeten Western Blot-Methode oder auf die Verwendung von 10 %-igem Serum zurückzuführen sein. Ein großes Problem stellt auch die Dimerisierung zwischen verschiedenen Mitgliedern der EGF-Familie dar. Als Ursache für den fehlenden Nachweis der Inhibierung der Rezeptorphanosphorylierung sollte aber auch die Art der Rezeptordimerisierung näher betrachtet werden. So kann es nach Rezeptoraktivierung zur Dimerisierung zwischen dem EGFR und bspw. HER2-Rezeptor kommen. Derartige stabile Komplexe dissoziieren nur schwer und führen letztendlich zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptorsystems (Levitcki 2003).

In vielen präklinischen Untersuchungen konnte des Weiteren gezeigt werden, dass GW572016 in der Lage ist, einen G<sub>1</sub>-Phasenarrest zu induzieren (Diaz *et al.* 2010). In der vorliegenden

Arbeit führte eine Behandlung mit GW572016 in allen Tumorzelllinien zu einer Induktion eines G<sub>1</sub>-Phasenarrestes. Zu einem anderen Ergebnis kam Wenle Xia (2002) bei seinen *in vitro* Versuchen. Hier führte die Behandlung mit dem TKI GW572016 nach 72 h zu einer Anreicherung der Tumorzellen im SubG<sub>1</sub>-Bereich.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der TKI GW572016 in den Tumorzelllinien A431 und FaDu eine den Kolonkarzinomzelllinien überlegene Zytotoxizität zeigte. Basierend auf den Ergebnissen der Zellzyklusanalyse ist die Hemmung der Zellproliferation durch ein spezifisches Eingreifen des TKI GW572016 zu erklären. Aufgrund einer mglw. fehlenden Sensitivität der Western Blot-Methode konnte die Inhibierung der Wachstumsfaktorrezeptorphosphorylierung als Ursache der Wachstumshemmung nicht detektiert werden.

#### 5.1.4 ZD6474 (Vandetanib, Zactima®)

Der Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 (Zactima®) ist in der Lage, dass Tumorzellwachstum *in vitro* in verschiedenen Tumorentitäten zu inhibieren. Ähnlich wie der TKI AEE788 besitzt ZD6474 das Potential, 2 wesentliche *key pathways* im Wachstum einer Tumorzelle effektiv zu hemmen. Einerseits führt eine Beeinflussung des VEGF-2-Rezeptors zu einer Inhibierung der Angiogenese durch Verminderung der Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie zu einer Verminderung der Gefäßpermeabilität. Andererseits bewirkt die Inhibierung der EGFR-Phosphorylierung eine direkte Hemmung des Zellwachstums sowie eine Verstärkung der Apoptose (Ryan *et al.* 2005). Jedoch ist anzumerken, dass die Inhibierung des Zellwachstums durch eine Beeinflussung des EGFR zelltypspezifisch stattfindet (Xiao *et al.* 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 ein heterogenes Ansprechen aller 4 Tumorzelllinien. So führten bei der FaDu bereits Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich zu einer Hemmung des Zellwachstums. Hier lag der IC<sub>30</sub>-Wert bei 0,6 µM. Bei Vergleich der IC<sub>50</sub> zeigten die Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu sowie die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit dem TKI ZD6474. Die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 offenbarte demgegenüber eine um den Faktor 2 geringere Sensitivität. Im Vergleich zu den Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788, GW572016 (Tyverb®) und ZD1839 (Iressa®), die ebenfalls das EGF-Rezeptorsystem beeinflussen, waren in der Behandlung mit dem TKI ZD6474 höhere Konzentrationen zur Zellwachstumshemmung erforderlich. Wedge *et al.* zeigten bereits 2002 an 7 verschiedenen humanen Tumorzelllinien, dass Zactima® in der Lage ist, die Zellproliferation zu inhibieren. Dabei fanden sich ähnlich hohe IC<sub>50</sub>-Werte von 2,7 bis 13,5 µM. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse in den Zytotoxizitätsmessungen sowie die Ergebnisse von Wedge und Xiao *et al.* zeigen in Abhängigkeit von der Tumorentität ein unterschiedliches zytotoxisches Potential von ZD6474.

Im Vergleich mit den anderen gegen den EGFR-gerichteten TKI zeigt ZD6474 ein geringeres zytotoxisches Potential und lässt vermuten, dass die Beeinflussung des VEGFR2 durch eine Behandlung mit dem TKI ZD6474 eine größere Rolle spielt.

ZD6474 (Zactima®) ist ein Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Rezeptorphosphorylierung des EGFR, des HER2-Rezeptor und des VEGFR2 inhibiert. In zahlreichen präklinischen Tumormodellen konnte bereits die starke Inhibierung der Phosphorylierung der Rezeptortyrosinkinasen nachgewiesen werden (Azzariti *et al.* 2006; Ciardiello *et al.* 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression des EGF-Rezeptors und seiner aktivierten Form in den Tumorzelllinien A431 und FaDu nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde weder Zeit- noch dosisabhängig downreguliert. Bei den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 zeigte sich eine moderate Expression des EGF-Rezeptors; eine Inhibierung der Phosphorylierung konnte auch hier zu keiner Zeit nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der verwendeten Western-Blot-Methode konnte eine Expression des VEGFR2 nicht aufgezeigt werden.

Eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse bietet die Arbeit von Ryan *et al.* (2005). Dieser postulierte, dass für die Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung des EGFR höhere Konzentrationen eingesetzt werden müssen. Die in dieser Arbeit verwendeten  $IC_{30}$ - bzw.  $IC_{50}$ -Werte orientierten sich wegen der dann höheren klinischen Relevanz der Ergebnisse an den in ersten klinischen Testungen ermittelten Plasmaspiegel für die einzelnen TKI. Mglw. sind die verwendeten Konzentrationen zur Erzielung einer Rezeptorphosphorylierung des EGFR zu gering. Folglich konnte eine Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung nicht nachgewiesen werden.

Ähnlich wie in den Western Blotting-Analysen führte eine Behandlung mit dem TKI ZD6474 in den Zellzyklusuntersuchungen nur zu geringen Effekten. Nach einer 72-stündigen Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 kam es in allen Tumorzelllinien zu einer Arretierung des Zellzyklus in der  $G_1$ -Phase; dieser Effekt war jedoch bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu marginal ausgeprägt. Bei den Kolonkarzinomzelllinien fand sich keine nennenswerte Akkumulation in einer der Zellzykluskompartimente.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 in der Lage ist, die Zellproliferation zu inhibieren. Im Unterschied zu den Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788, GW572016 und ZD1839, die alle das EGF-Rezeptorsystem beeinflussen, waren in allen Tumorentitäten höhere Konzentrationen zur Hemmung des Zellwachstums erforderlich. In den Western Blot- und Zellzyklusanalysen konnten nur marginale Effekte bzgl. der Rezeptorphosphorylierung und der Zellzykluskompartimente nachgewiesen werden, was sich u.a. mit Hilfe der eingesetzten Konzentrationen erklären lässt. Allerdings muss hierbei auch berücksichtigt werden, dass der Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 die Hemmung des

Zellwachstums auch durch Beeinflussung sog. *downstream targets* wie die Akt- und MAP-Kinase hervorruft.

### 5.1.5 ZD1839 (Gefitinib, Iressa®)

ZD1839 (Iressa®) ist ein spezifischer Inhibitor der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase und kann in höheren Konzentrationen ebenfalls den HER2-Rezeptor inhibieren. In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien wurde gezeigt, dass ZD1839 (Iressa®) exponentiell wachsende Tumorzellen durch Hemmung der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors beeinflussen kann (Barnes *et al.* 2003; Voigt *et al.* 2005). Dabei scheint es jedoch keine Korrelation zwischen dem Expressionslevel des EGFR und der Sensitivität gegenüber ZD1839 (Iressa®) zu geben (Wakeling *et al.* 2002; Lynch *et al.* 2004). Dies konnte auch durch Arbeiten von Lee *et al.* (2008) und Mitsudomi *et al.* (2010) an Tumorproben von Patienten mit NSCLC gezeigt werden. In einer Subgruppenanalyse profitierten folgende Patientengruppen von einer Behandlung mit Iressa®: Asiaten, Frauen, Patienten mit Adenokarzinomen sowie Patienten, bei denen eine Mutation des EGFR nachgewiesen werden konnte (Okabe *et al.* 2007). Mittlerweile ist die Mutation des EGF-Rezeptors, die z.B. bei asiatischen Patienten mit NSCLC in 20-40 % der Fälle nachgewiesen werden kann, das Selektionskriterium für den Einsatz von Gefitinib (Mitsudomi *et al.* 2005; Okabe *et al.* 2007). Entsprechende Companion Diagnostik Gentests zur Patientenselektion sind etabliert.

In der vorliegenden Arbeit zeigte eine Behandlung mit dem TKI ZD1839 in Abhängigkeit von der Tumorentität eine unterschiedliche Wirksamkeit. Dabei waren die Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu im Vergleich zu den Kolonkarzinomzelllinien sensitiver. Die DLD-1 und HT-29 zeigten eine 42- und 23-fach geringere Empfindlichkeit gegenüber einer Behandlung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor ZD1839 als beide Plattenepithelkarzinomzelllinien. Diese Ergebnisse decken sich auch mit früheren Daten unserer bzw. anderer Arbeitsgruppen (Langer *et al.* 2004; Voigt *et al.* 2005).

Da Iressa® vorwiegend die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors inhibiert, ist davon auszugehen, dass die hohe Wirksamkeit von ZD1839 in den Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu auf eine vermehrte Expression des aktivierten EGFR zurückzuführen ist. Da die Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 v.a. den IGF-IR exprimieren, erklärt sich, warum für die Hemmung des Zellwachstums höhere Konzentrationen erforderlich waren (Höpfner *et al.* 2006). Geht man jedoch davon aus, dass es keine Korrelation zwischen der EGFR-Expression und dem Ansprechen auf eine Behandlung mit Iressa® zu geben scheint, so sollte das Vorliegen von aktivierenden Mutationen als Ursache eines unzureichenden Ansprechens in Betracht gezogen werden. In diversen NSCLC-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass v.a. Mutationen der Exons 19-21 der Tyrosinkinase-Domäne des EGFR für das

Ansprechen auf eine Gefitinib-Therapie eine entscheidende Rolle spielen (Okabe *et al.* 2007). Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit konnte Okabe (2007) in seinen Untersuchungen von 16 NSCLC-Zelllinien  $IC_{50}$ -Werte von 0,07 bis 12,46  $\mu\text{mol/l}$  aufzeigen. Dieses unterschiedliche Ansprechen konnte darauf zurückgeführt werden, dass v.a. Tumorzelllinien, die durch Mutationen in den Exonen 19 und 21 (L858R-Mutation) bzw. durch Amplifikationen des EGFR gekennzeichnet waren, sich besonders sensitiv gegenüber einer Behandlung mit dem TKI ZD1839 (Iressa®) zeigten. Wohingegen Tumorzelllinien, die eine T790M-Mutation hatten, gegenüber einer Behandlung mit dem TKI ZD1839 resistent waren. Dabei führten die Deletion im Exon 19 und die Punktmutation im Exon 21 des EGFR zu einer ligandenunabhängigen Dimerisierung. Weitere Arbeiten berichten bereits über das Auftreten von Mutationen im Exon 22 (E884K-Mutation), die NSCLC-Zellen sensibel gegenüber einer Therapie mit Iressa® und resistent gegenüber einer Behandlung mit Erlotinib machen (Sattler *et al.* 2008). Betrachtet man die gewonnenen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, so muss berücksichtigt werden, dass ein geringes zytotoxisches Potential mglw. auf das Vorliegen bzw. Fehlen derartiger Mutationen zurückgeführt werden muss.

Dass relevante Konzentrationen des TKI ZD1839 bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu das Zellwachstum inhibieren und damit einen spezifischen Effekt induzieren können, konnte auch durch die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse weiter untermauert werden. So führte eine Behandlung mit ZD1839 (Iressa®) in den Tumorzelllinien A431 und FaDu zu einem  $G_1$ -Arrest. Im Vergleich dazu konnte bei den Kolonkarzinomzelllinien DLD-1 und HT-29 keine nennenswerte Akkumulation in einer der Zellzykluskompartimente aufgezeigt werden. Damit scheint die Wirkung des TKI ZD1839 (Iressa®) bei den Kolonkarzinomzelllinien weniger auf ein Eingreifen des Tyrosinkinaseinhibitors in Signaltransduktionswege zurückzuführen sein.

## **5.2 Überwindung der Chemotherapieresistenz und Sequenzabhängigkeit einer Kombination von Sagopilon mit verschiedenen Tyrosinkinase-Inhibitoren**

Ein häufiges Problem in der Behandlung von hämato-onkologischen Neoplasien stellt die Ausbildung einer *multidrug resistance* dar, d.h. die Entwicklung einer Kreuzresistenz gegenüber vielen strukturell und funktionell nicht verwandten Zytostatika (Gottesmann *et al.* 2002). Am häufigsten sind Taxane, Vinca-Alkaloide, Anthracycline, Epipodophyllotoxine, Topotecan, Dactinomycin und Mitomycin C von einer Resistenzentwicklung betroffen.

Neben einer verminderten Zytostatika-Aufnahme in die Tumorzelle, fehlregulierter Apoptose-Signalwege wird die MDR v.a. durch einen gesteigerten Efflux der Zytostatika durch ATP-abhängige Membran-Transporter und damit einer Verminderung der intrazellulären Zytostatika-Konzentration hervorgerufen (Gottesmann *et al.* 2002).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Tyrosinkinase-Inhibitoren mit steigender Spezifität und Aktivität entwickelt (Özvegy-Laczka *et al.* 2005), die in der Lage sind, die MDR zu überwinden. Dabei inhibieren TKI vermutlich die Membran-Transporter und damit den Efflux der Zytostatika aus der Tumorzelle, wodurch es zu einer erhöhten Akkumulation der Zytostatika intrazellulär kommt. Durch die mgl. Inhibierung des Zytostatika-Effluxes aus der Tumorzelle kann so die Wirksamkeit zahlreicher Zytostatika potenziert werden. Damit stellen TKI einen interessanten und potenten Kombinationspartner für klassische Zytostatika dar.

Neben der Beeinflussung sog. Membran-Transporter und Überwindung der MDR eignen sich Tyrosinkinase-Inhibitoren auch aufgrund ihres differenten Wirkmechanismus und Nebenwirkungsprofils besonders für die Kombination mit klassischen Zytostatika. Einerseits kann durch die unterschiedlichen Angriffspunkte eine Kreuzresistenz vermieden werden. Andererseits weiß man, dass die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren mit einer verminderten Sensitivität gegenüber einer Hormon-, Strahlen- und Chemotherapie vergesellschaftet ist und damit eine Kombination von TKI mit klassischen Zytostatika die Sensitivität der Tumorzellen für die genannten Therapien erhöhen kann (Morelli *et al.* 2005; Mendelsohn *et al.* 1997). Zahlreiche präklinische und klinische Studien haben in den vergangenen Jahren die Wirkungsweise der Kombination von Zytostatika mit v.a. Tyrosinkinase-Inhibitoren des EGF-Rezeptors untersucht. In einigen präklinischen Arbeiten zeigte sich, dass die Kombination von TKI und Zytostatika die Zellen irreversibel schädigen und so die Apoptose induzieren kann. So zeigten Ciardiello *et al.* (2003) anhand verschiedener Kolonkarzinomzelllinien, dass eine Kombination von Zactima® mit Paclitaxel oder Docetaxel die Inhibierung der Zellproliferation verstärken kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, insbesondere bei der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1. So konnte für die DLD-1 bei allen Kombinationsversuchen von Sagopilon mit den verschiedenen TKI und unabhängig von der Applikationssequenz ein größtenteils signifikanter synergistischer Effekt der Kombinationstherapie nachgewiesen werden. Anders verhielt es sich bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Hier erbrachte die Kombination von Sagopilon mit allen Tyrosinkinase-Inhibitoren unabhängig von der Applikationssequenz überwiegend additive Effekte mit teilweiser synergistischer Tendenz (ZD6474 und ZD1839).

Melisi *et al.* postulierten in ihrer 2004 veröffentlichten Arbeit, dass Iressa® in Kombination mit Zytostatika den durch Zytostatika induzierten programmierten Zelltod 2- bis 3,5-fach potenzieren kann. In Versuchen mit Xenograftmodellen erfolgte die Applikation von Iressa® über 4 Wochen in Kombination mit einer alle 4 Wochen stattfindenden Applikation von Paclitaxel, Topotecan oder Raltitrexed. Die Kombinationstherapien induzierten einen stark synergistischen Effekt (Melisi *et al.* 2004). Weiterhin konnten Ciardiello *et al.* 2002 zeigen, dass Iressa® die Sensitivität für eine Behandlung mit Taxanen bei der hormonunabhängigen und multiresistenten Mammakarzinomzelllinie MCF-7 ADR bcl-2 steigern kann. Ebenso zeigte

Hartog (2012) in seiner Arbeit, dass eine Kombination von NVP-AEW541 mit Trastuzumab in der Mammakarzinomzelllinie T47D zu einem starken Synergismus führen kann.

Basierend auf derartigen Daten erfolgte die Umsetzung im klinischen Alltag mit unterschiedlichem, teilweise enttäuschendem Ergebnis. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination von Standard-Chemotherapieregimes mit Iressa® sowie Zactima® in der Behandlung des fortgeschrittenen NSCLC (Morelli *et al.* 2005; Giaccone *et al.* 2004; Herbst *et al.* 2004). Die Ursachen für ein solches Versagen können vielfältig sein. Wie die genannten Beispiele zeigen, müssen Patientengruppen vor Einleitung einer Therapie genau definiert werden. Neben der Tumorentität und der Entschlüsselung molekularer Marker müssen v.a. aktivierende Mutationen bei der Auswahl eines geeigneten Therapieregimes mitberücksichtigt werden. Mitsudomi *et al.* (2010) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Patienten mit NSCLC und Mutationen im EGF-Rezeptor von einer Therapie mit Gefitinib profitieren.

Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Tumorentitäten so kann man feststellen, dass die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 fast ausschließlich synergistische Effekte in der Kombinationstherapie und die HT-29 überwiegend additive Effekte zeigte. Bei der Zervixkarzinomzelllinie A431 offenbarten sich in den Kombinationsversuchen von Sagopilon mit AEE788, NVP-AEW541 und ZD6474 überwiegend additive Effekte mit synergistischer Tendenz; in der Kombination mit den TKI GW572016 und ZD1839 zeigte sich ausschließlich ein additiver Effekt. Bei der Kopf-Halstumorzelllinie FaDu offenbarte sich für die TKI AEE788, GW572016, ZD6474 und ZD1839 ein zunehmender Antagonismus, der durch Applikation des TKI vor Sagopilon noch verstärkt werden konnte. Die Kombination von Sagopilon und NVP-AEW541 führte zu einem synergistischen Effekt.

Eine wichtige Rolle in der Kombination von TKI mit Zytostatika könnte aber auch die Applikationssequenz spielen. Morelli *et al.* (2005) untersuchten bspw. die Sequenzabhängigkeit in der Kombination von Zactima® mit verschiedenen Zytostatika. Die Applikation des TKI vor der Chemotherapie führte dabei zu einem antagonistischen Effekt, während die Gabe des TKI nach der Chemotherapie einen starken Synergismus induzierte. Eine Arbeit von Troiani *et al.* untersuchte 2006 an 2 humanen Kolonkarzinomzelllinien die Sequenzabhängigkeit einer Kombination von Oxaliplatin mit Zactima®. Die Applikation von Oxaliplatin vor Zactima® induzierte einen stark synergistischen Effekt, wohingegen die umgekehrte Sequenz in einem antagonistischen Effekt resultierte. Diese Ergebnisse von Morelli und Troiani *et al.* decken sich auch teilweise mit den Ergebnissen dieser Arbeit. So führte die Applikation der einzelnen TKI vor Sagopilon v.a. bei den Tumorzelllinien HT-29 und FaDu zu einer überwiegenden Verstärkung des Antagonismus, während die parallele Applikation von Sagopilon mit den verschiedenen TKI überwiegend zu synergistischen Effekten führte.

Im Hinblick auf die Applikationssequenz lassen sich aufgrund der gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit gewisse Trends in Richtung Synergismus und Antagonismus ableiten. Prinzipiell



müssen bei der Kombination von TKI mit konventionellen Zytostatika neben der Applikationssequenz, dem Vorliegen gewisser genetischer Marker v.a. die Tumorentität berücksichtigt werden. Demzufolge sollten weitere Versuche an einem größeren Panel von Tumorzelllinien folgen. Andererseits sollten bei Versuchen bezüglich der Applikationssequenz andere Zeitintervalle gewählt werden. Neben der Applikationssequenz müssen auch die unterschiedlichen Angriffspunkte der einzelnen Substanzen berücksichtigt werden. So zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass alle verwendeten Tyrosinkinase-Inhibitoren im Zellzyklus überwiegend einen G<sub>1</sub>-Phasenarrest oder eine Akkumulation der Tumorzellen im SubG<sub>1</sub>-Bereich hervorrufen. In der Folge kam es zu einer Abnahme der Tumorzellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase, dem Angriffspunkt für das Zytostatikum Sagopilon. Dies erklärt mglw. den zunehmenden Antagonismus bei der Applikation des TKI vor Sagopilon.

## 6 Zusammenfassung

Die Arbeiten der vorliegenden Dissertation dienten der Zielsetzung, die Wirksamkeit der Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788 (EGFR, HER2-Rezeptor, VEGFR1/2), NVP-AEW541 (IGF-IR), GW572016 (Lapatinib, Tyverb®; EGFR, HER2), ZD6474 (Vandetanib, Zactima®; EGFR, VEGFR2/3) und ZD1839 (Gefitinib, Iressa®; EGFR) *in vitro* alleine sowie in Kombination mit dem neuen Etoposid-Derivat Sagopidon an 4 verschiedenen humanen Tumorzelllinien näher zu untersuchen. Neben den antiproliferativen Effekten im Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay) wurde der Einfluss der TKI auf die Zellzykluskompartimentverteilung sowie auf die Signaltransduktion über die Wachstumsfaktorrezeptoren getestet.

In den Zytotoxizitätsanalysen mittels SRB-Assay zeigten die Plattenepithelkarzinomzelllinien A431 und FaDu eine hohe Empfindlichkeit bei allen Tyrosinkinase-Inhibitoren, die v.a. gegen das EGF-Rezeptorsystem gerichtet waren, wie AEE788, ZD1839 (Gefitinib, Iressa®) und GW572016 (Lapatinib, Tyverb®). Der Tyrosinkinase-Inhibitor NVP-AEW541 zeigte eine gute Wirksamkeit bei allen Tumorzelllinien, wobei bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eine besonders hohe Empfindlichkeit aufgezeigt werden konnte. Im Vergleich zu den vorwiegend gegen das EGF-System-gerichteten Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788, GW572016 (Lapatinib, Tyverb®) und ZD1839 (Gefitinib, Iressa®) wies der Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474 (Vandetanib, Zactima®) insgesamt ein geringeres zytotoxisches Potential in den getesteten Tumorzelllinien auf.

Das zytotoxische Potential der einzelnen Tyrosinkinase-Inhibitoren korrelierte zum großen Teil mit den Ergebnissen in der Zellzyklusanalyse. Hier fand sich unter dem Einsatz klinisch relevanter Konzentrationen eine spezifische G<sub>1</sub>-Arrest-induzierende Wirkung bei den Tyrosinkinase-Inhibitoren AEE788, GW572016 (Lapatinib, Tyverb®) und ZD1839 (Gefitinib, Iressa®); bei dem TKI ZD6474 (Vandetanib, Zactima®) zeigte sich nur eine moderate G<sub>1</sub>-Arrest-induzierende Wirkung. Im Gegensatz zu den gegen das EGF-System gerichteten TKI ist der Einfluss von NVP-AEW541 auf die Zellzykluskompartimentverteilung eher gering und scheint zu einer direkten Auslösung von Apoptose zu führen, was durch einen sofortigen Übergang der Tumorzellen in den SubG<sub>1</sub>-Bereich gekennzeichnet ist. Eine Ausnahme bildete die Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Hier führte eine Behandlung mit dem TKI NVP-AEW541 zu einem G<sub>1</sub>-Arrest.

Möglicherweise methodenbedingt konnte in den getesteten Tumorzelllinien nur selten eine Inhibierung der Rezeptorphosphorylierung nachgewiesen werden. Einzig unter der Behandlung der Zervixkarzinomzelllinie A431 mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor AEE788 zeigte sich eine Inhibierung der EGFR-Phosphorylierung.

Die Kombination von Sagopilon mit allen getesteten Tyrosinkinase-Inhibitoren zeigte Synergismen bei der Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 und additive Effekte bei der Kolonkarzinomzelllinie HT-29. Bei der Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu konnten in den Kombinationsversuchen von Sagopilon mit allen TKI überwiegend antagonistische Effekte nachgewiesen werden, während sich bei der Zervixkarzinomzelllinie A431 sowohl synergistische als auch additive Effekte zeigten. Unter Berücksichtigung der Applikationssequenz führte die parallele Applikation überwiegend zu synergistischen Effekten und die Applikation aller getesteten Tyrosinkinase-Inhibitoren vor Sagopilon überwiegend zu antagonistischen Effekten.

Zusammenfassend stellen die Tyrosinkinase-Inhibitoren aufgrund ihres teilweise ausgeprägten zytotoxischen Potentials eine vielversprechende Grundlage für weitere präklinische und klinische Testungen dar. In Bezug auf den Wirkmechanismus der TKI bleiben jedoch einige Fragen ungeklärt. So sollten weitere Untersuchungen bzgl. der Beeinflussung der *downstream targets*, der Zellzyklusproteine und mgl. Mutationen der Wachstumsfaktorrezeptoren sowie deren Einfluss auf die Therapiesensibilität folgen. Aufgrund ihrer differenten Angriffspunkte, Nebenwirkungsprofils und ihrer Fähigkeit zur Überwindung der *multi drug resistance* eignen sich Tyrosinkinase-Inhibitoren hervorragend für die Kombination mit konventionellen Zytostatika. Die Resultate der Kombinationsversuche legen nahe, dass neben der Applikationssequenz weitere Kofaktoren zur Erzielung eines maximalen Kombinationseffektes von TKI mit klassischen Zytostatika eine Rolle spielen. In weiteren präklinischen bzw. klinischen Untersuchungen sollte der Einfluss der Tumorentität, von aktivierenden Mutationen sowie der ethnischen Zugehörigkeit näher betrachtet werden. Bezüglich der unterschiedlichen Angriffspunkte von TKI und konventionellen Zytostatika sollten die Zeitintervalle in den einzelnen Applikationsregimen weiter variiert werden, um einen maximalen Effekt zu erzielen.

## 7 Literaturverzeichnis

**Altmann** KH, Wartmann M, O` Reilly T (2000) Epothilones and related structures-a new class of microtubule inhibitors with potent in vivo antitumor activity. *Biochim Biophys Acta* 1470(3) M79-91.

**Azzariti** A, Porcelli L, Xu JM, Simone GM, Paradiso A (2006) Prolonged exposure of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib (Iressa<sup>TM</sup>) and to the antiangiogenic agent ZD6474: Cytotoxic and biomolecular effects. *World J Gastroenterol* 12(32):5140-47.

**Bachelot** TD et al. (2011) An FNCLCC phase II study with lapatinib (L) and capecitabine (C) in patients with brain metastases (BM) from HER2-positive (+) metastatic breast cancer (MBC) before whole-brain radiotherapy (WBR). *J Clin Oncol* 29: 2011 (suppl; abstr 509).

**Barbarroja** N, Torres LA, Rodriguez-Ariza A, Valverde-Esteba A, Lopez-Sanchez LM, Ruiz-Limon P, Perez-Sanchez C, Carretero RM, Velasco F, López-Pedreira C (2010) AEE788 is a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antiproliferative and proapoptotic effects in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 38(8):641-652.

**Barnes** CJ, Bagheri-Yarmand R, Mandal M, Yang Z, Clayman GL, Hong WK, Kumar R (2003) Suppression of Epidermal Growth Factor Receptor, Mitogen-activated Protein Kinase, and Pak1 Pathways and Invasiveness of Human Cutaneous Squamous Cancer Cells by the Tyrosine Kinase Inhibitor ZD1839 (Iressa). *Mol Cancer Ther* 2:345-51.

**Baselga** J, Mita AC, Schöffski P, Dumez H, Rojo F, Tabernero J, DiLea C, Mietlowski W, Low C, Huang J, Dugan M, Parker K, Walk E, van Oosterom A, Martinelli E, Takimoto CH (2012) Using Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data in Decision Making Regarding Drug Development: A Phase I Clinical Trial Evaluating Tyrosine Kinase Inhibitor, AEE788. *Clin Cancer Res* 18(22):6364-72.

**Bence** AK, Anderson EB, Halepota MA, Doukas MA, DeSimone PA, Davis GA, Smith DA, Koch KM, Stead AG, Mangum S, Bowen CJ, Spector NL, Hsieh S, Adams VR (2005) Phase I pharmacokinetic studies evaluating single and multiple doses of oral GW572016, a dual EGFR-ErbB2 inhibitor, in healthy subjects. *Invest New Drugs* 23(1):39-49.

**Bennasroune A**, Gardin A, Aunis D, Crémel G, Hubert P (2004) Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 50(1):23-38.

**Bonomi P** (2003) Clinical studies with non- iressa EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer* 41, Suppl 1:S43-8.

**Carmeliet P** (2005) VEGF as a Key Mediator of Angiogenesis in Cancer. *Oncology* 69 Suppl 3:4-10.

**Ciardello F**, Caputo R, Damiano V, Caputo R, Troiani T, Vitagliano D, Carlomagno F, Veneziani BM, Fontanini G, Bianco AR, Tortora G (2003) Antitumor Effects of ZD6474, a Small Molecule Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, with Additional Activity against Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Clin Cancer Res* 9(4):1546-56.

**Cohen MH**, Williams GA, Sridhara R, Chen G, Pazdur R (2003) United States Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) Tablets. *Clin Cancer Res* 8(4):303-6.

**Cortes J** and Baselga J (2007) Targeting the Microtubules in Breast Cancer Beyond Taxanes: The Epothilones. *Oncologist* 12:271-80.

**De Boer R**, Arrieta O, Gottfried M, Yang CH, Raats R, Blackhall FH, Langmuir P, Milenkova T, Read J, Vansteenkiste JF (2009) Vandetanib plus pemetrexed versus pemetrexed as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A randomized, double-blind phase III trial (ZEAL). *J Clin Oncol* 27:15s.

**Deshpande H**, Marler V, Sosa JA (2011) Clinical utility of vandetanib in the treatment of patients with advanced medullary thyroid cancer. *Onco Targets Ther* 4: 209-15.

**Diaz R**, Nguewa PA, Parrondo R, Perez-Stable C, Manrique I, Redrado M, Catena R, Collantes M, Peñuelas I, Díaz-González JA, Calvo A (2010) Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC Cancer* 2010, 10:188.

**Doepfner** KT, Spertini O and Arcaro A (2007) Autocrine insuline-like growth factor-I signalling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3- kinase/Akt pathway. *Leukemia* 21:1921-1930.

**Drewinko** B, Dipasquale MA, Yang LY, Barlogie B, Trujillo JM (1985) The synergistic lethal interaction of cis-diamminedichloroplatinum and natural nucleosides is related to increased DNA cross-links. *Chem Biol Interact* 55(1-2):1-12.

**Ekyalongo** RC, Mukohara T, Kataoka Y, Funakoshi Y, Tomioka H, Kiyota N, Fujiwara Y, Minami H (2012) Mechanisms of acquired resistance to insulin-like growth factor 1 receptor inhibitor in MCF-7 breast cancer cell line. *Invest New Drugs* 31(2):293-303.

**Favoni** RE and Cupis AD (2000) The Role of Polypeptide Growth Factors in Human Carcinomas: New Targets for a Novel Pharmacological Approach. *Pharmacol Rev* 52(2):179-206.

**Fojo** T, Menefee M (2007) Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule- stabilizing agents. *Ann Oncol* 18 Suppl 5:v3- v8.

**Fumoleau** P, Coudert B, Isambert N and Ferrant E (2007) Novel tubulin- targeting agents: anticancer activity and pharmacologic profile of epothilones and related analogues. *Ann Oncol* 18 Suppl 5:v9-v15.

**Gao** J, Chang YS, Jallal B, Viner J (2012) Targeting the Insulin-like Growth Factor Axis for the Development of Novel Therapeutics in Oncology. *Cancer Res* 72(1):3-12.

**Giaccone** G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH (2004) Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 1. *J Clin Oncol* 22(5):777-84.

**Goodin** S, Kane MP and Rubin EH (2004) Epothilones: Mechanism of action and biologic activity. *J Clin Oncol* 22:2015-25.

**Gotlieb** WH, Bruchim I, Gu J, Shi Y, Camirand A, Blouin MJ, Zhao Y, Pollak MN (2005) Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 100(2):389-96.

**Gottesmann MM**, Fojo Tito and Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2(1):48-58.

**Grünwald V**, Hidalgo M (2003) Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 95(12):851-67.

**Harari PM** (2004) Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11(4):689-708.

**Hartog H**, Van Der Graaf WT, Boezen HM, Wesseling J (2012) Treatment of breast cancer cells by IGF1R tyrosine kinase inhibitor combined with conventional systemic drugs. *Anticancer Res* 32(4):1309-18.

**Herbst RS**, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH (2004) Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial – INTACT 2. *J Clin Oncol* 22(5):785-94.

**Herbst RS**, Heymach JV, O'Reilly MS, Onn A, Ryan AJ (2007) Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 16(2):239-49.

**Herbst RS**, Sun Y, Eberhardt WE, Germonpré P, Saijo N, Zhou C, Wang J, Li L, Kabbinar F, Ichinose Y, Qin S, Zhang L, Biesma B, Heymach JV, Langmuir P, Kennedy SJ, Tada H, Johnson BE (2010) Vandetanib plus docetaxel versus docetaxel as second-line treatment for patients with advanced non-small-cell lung cancer (ZODIAC): a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11(7):619-26.

**Hewish M**, Chau I, Cunningham D (2009) Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4(1):54-72.

**Heymach JV** (2005) ZD6474-clinical experience to date. *Br J Cancer* 92 (Suppl 1):S14-20.

**Heymach JV**, Nilsson M, Blumenschein G, et al. (2006) Epidermal growth factor receptor inhibitors in development for treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12 (14 Suppl):4441s-4445s.

**Hofmann F** and Garcia-Echeverria C (2005) Blocking insulin-like growth factor-I receptor as a strategy for targeting cancer. *Drug Discov Today* 10(15):1041-7.

**Holden SN**, Eckhardt SG, Basser R, de Boer R, Rischin D, Green M, Rosenthal MA, Wheeler C, Barge A, Hurwitz HI (2005) Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF and EGF receptor signalling, in patients with solid, malignant tumors. *Ann Oncol* 16(8):1391-7.

**Holm M**, Lehmann F, Laufer S (2008) Medizinische Chemie und molekulare Hemmmechanismen der Tyrosinkinase-Inhibitoren. *Pharmazie in unserer Zeit*, Volume 37, Issue 5.

**Höpfner M**, Sutter AP, Huether A, Baradari V, Scherübl H (2006) Tyrosine kinase of insulin-like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 12(35):5635-43.

**Iqbal S**, Goldman B, Fenoglio-Preiser CM, Lenz HJ, Zhang W, Danenberg KD, Shibata SI, Blanke CD (2011) Southwest Oncology Group study S0413: a phase II trial of lapatinib (GW572016) as first-line therapy in patients with advanced or metastatic gastric cancer. *Ann Oncol* 22(12):2610-5.

**Johnston S**, Pippin J Jr, Pivot X, Lichinitser M, Sadeghi S, Dieras V, Gomez HL, Romieu G, Manikhas A, Kennedy MJ, Press MF, Maltzman J, Florance A, O'Rourke L, Oliva C, Stein S, Pegram M. (2009) Lapatinib combined with letrozole versus letrozole and placebo as first-line therapy for postmenopausal hormone receptor-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 27(33):5538-46.

**Kavallaris M**, Verrilis NM., Hill BT (2001) Anticancer therapy with novel tubulin-interacting drugs. *Drug Resist Updat* 4(6): 392-401.

**Kim S**, Schiff BA, Yigitbasi OG, Doan D, Jasser SA, Bekele BN, Mandal M, Myers JN (2005) Targeted molecular therapy of anaplastic thyroid carcinoma with AEE788. *Mol Cancer Ther* 4(4):632-40.

**Kingston DGI** (2009) Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J Nat Prod* 72(3): 507-15.



**Klar U, Hoffmann J and Giurescu M (2008)** Sagopilone (ZK-EPO): from a natural product to a fully synthetic clinical development candidate. *Expert Opin Investig Drugs* 17(11):1735-48.

Krebs in Deutschland 2007/2008, 8. Ausgabe 2012, Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012.

**Kroep JR, Linn SC, Boven E, Bloemendal HJ, Baas J, Mandjes IA, van den Bosch J, Smit WM, de Graaf H, Schröder CP, Vermeulen GJ, Hop WC, Nortier JW (2010)** Lapatinib: clinical benefit in patients with HER2-positive advanced breast cancer. *Neth J Med.* 68(9):371-6.

**Langer CJ (2004)** Emerging role of epidermal growth factor receptor inhibition in therapy for advanced malignancy: focus on NSCLC. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(3):991-1002.

**Larkin JMG and Kaye SB (2006)** Etoposides in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 15(6): 691-702.

**Larkin JMG and Kaye SB (2007)** Potential clinical applications of etoposides: a review of phase II studies. *Ann Oncol* 18 Suppl 5: v28- 34.

**Lee DH, Park K, Kim JH, Lee JS, Shin SW, Kang JH, Ahn MJ, Ahn JS, Suh C, Kim SW (2008)** Randomized Phase III Trial of Gefitinib versus Docetaxel in Non-Small Cell Lung Cancer Patients who have previously received platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 16(4):1307-14.

**Lee JJ and Swain SM (2008)** The Etoposides: Translating from the Laboratory to the Clinic. *Clin Cancer Res* 14(6):1618-24.

**Lemmon MA and Schlessinger J (2010)** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141(7):1117-34.

**Levitzi A (2003)** EGF receptor as a therapeutic target. *Lung Cancer* 41 (Suppl 1):S9-14.

**Lin NU, Dieras V, Paul D, Lossignol D, Christodoulou C, Stemmler HJ, Roché H, Liu MC, Greil R, Ciruelos E, Loibl S, Gori S, Wardley A, Yardley D, Brufsky A, Blum JL, Rubin SD, Dharan B, Steplewski K, Zembryki D, Oliva C, Roychowdhury D, Paoletti P, Winer EP (2009)** Multicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 15(4):1452-9.

- Lurje G, Lenz HJ** (2009) EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77(6):400-10.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA** (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350(21):2129-39.
- Maiso P, Ocio EM, Garayoa M, Montero JC, Hofmann F, García-Echeverría C, Zimmermann J, Pandiella A, San Miguel JF** (2007) The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 141(4):470-82.
- Maki RG** (2010) Small is beautiful: insulin-like growth factors and their role in growth, development, and cancer. *J Clin Oncol* 28(33):4985-95.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y** (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58(3):903-13.
- Meco D, Servidei T, Zannoni GF, Martinelli E, Prisco MG, de Waure C, Riccardi R** (2010) Dual inhibitor AEE788 reduces tumor growth in preclinical models of medulloblastoma. *Transl Oncol* 3(5):326-335.
- Melisi D, Troiani T, Damiano V, Tortora G, Ciardiello F** (2004) Therapeutic integration of signal transduction targeting agents and conventional anti-cancer treatments. *Endocr Relat Cancer* 11(1):51- 68.
- Mendelsohn J, Fan Zhen** (1997) Epidermal growth factor receptor family and chemosensitization. *J Natl Cancer Inst* Volume 89, Issue 5, Pp. 341-343
- Meyer S, Hafner V, Vogt T** (2002) Die Rolle der Rezeptortyrosinkinasen in der Angiogenese. *Der Hautarzt*, S. 629- 643.
- Mitsiades CS, Kotoula V, Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, Poulaki V, Sozopoulos E, Negri J, Charalambous E, Fanourakis G, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Mitsiades N** (2006) Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in human thyroid carcinoma: mutational and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 91(9):3662-6.

**Mitsudomi T**, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, Hatooka S, Shinoda M, Takahashi T, Yatabe Y (2005) Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *J Clin Oncol* 23(11):2513-20.

**Mitsudomi T**, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M (2010) Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11(2):121-8.

**Morabito A**, Maio ED, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F (2006) Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist* 11(7):753-64.

**Morelli MP**, Cascone T, Troiani T, De Vita F, Orditura M, Laus G, Eckhardt SG, Pepe S, Tortora G, Ciardiello F (2005) Sequence-dependent antiproliferative effects of cytotoxic drugs and epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol* 16 Suppl 4:iv61- 68.

**Morelli MP**, Cascone T, Troiani T, Tuccillo C, Bianco R, Normanno N, Romano M, Veneziani BM, Fontanini G, Eckhardt SG, De Pacido S, Tortora G, Ciardiello F (2006) Anti-tumor activity of the combination of cetuximab, an anti-EGFR blocking monoclonal antibody and ZD6474, an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. *J Cell Physiol* 208(2):344-53.

**Morris PG** and Fornier MN (2008) Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res* 14(22):7167-72.

**Moser C**, Schachtschneider P, Lang SA, Gaumann A, Mori A, Zimmermann J, Schlitt HJ, Geissler EK, Stoeltzing O (2008) Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) using NVP-AEW541, a small molecule kinase inhibitor, reduces orthotopic pancreatic cancer growth and angiogenesis. *Eur J Cancer* 44(11) :1577-86.

**Moy B**, Kirkpatrick P, Kar S, Goss P (2007) Lapatinib. *Nat Rev Drug Discov* 6(6):431-2.

**Murray S**, Bobos M, Angouridakis N, Nikolaou A, Linardou H, Razis E, Fountzilias G (2010) Screening for EGFR mutations in patients with head and neck cancer treated with gefitinib on a compassionate-use Program: a hellenic Cooperative Oncology Group Study. *J Oncol Article ID 709678*, 10 pages.

**Natale RB**, et al. (2009) Vandetanib versus erlotinib in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) after failure of at least one prior cytotoxic chemotherapy: A randomized , double-blind phase III trial (ZEST). *J Clin Oncol 27*, 15s.

**Oakman C**, Marta Pestrin, Elena Zafarana, Egidia Cantisani, Angelo Di Leo (2010) Role of lapatinib in the first-line treatment of patients with metastatic breast cancer. *Cancer Manag Res 2*:13-25.

**Okabe T**, Okamoto I, Tamura K, Terashima M, Yoshida T, Satoh T, Takada M, Fukuoka M, Nakagawa K (2007) Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer Res 67*(5):2046-53.

**Özvegy-Laczka C**, Cserepes J, Elkind NB, Sarkadi B (2005) Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resist Updat 8*(1-2):15-26.

**Park YW**, Younes MN, Jasser SA, Yigitbasi OG, Zhou G, Bucana CD, Bekele BN, Myers JN (2005) AEE788, a dual tyrosine kinase receptor inhibitor, induces endothelial cell apoptosis in human cutaneous squamous cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res 11*(5):1963-73.

**Pennell NA**, Lynch TJ (2009) Combined inhibition of the VEGFR and EGFR signaling pathways in the treatment of NSCLC. *The Oncologist 14*:399-411.

**Perez EA** (2009) Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther 8*:2086- 95.

**Pradeep CR**, Sunila ES, and Kuttan G (2005) Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and VEGF Receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther 4*(4):315-21.

**Reardon** DA, Conrad CA, Cloughesy T, Prados MD, Friedman HS, Aldape KD, Mischel P, Xia J, DiLea C, Huang J, Mietlowski W, Dugan M, Chen W, Yung WK (2012) Phase I study of AEE788, a novel multitarget inhibitor of ErbB- and VEGF-receptor-family tyrosine kinases, in recurrent glioblastoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 69(6):1507-18.

**Risinger** AL, Giles FJ and Mooberry SL (2009) Microtubule dynamics as a target in Oncology. *Cancer Treat Rev* 35(3):255-61.

**Ryan** AJ and Wedge SR (2005) ZD6474-a novel inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinase activity. *Br J Cancer* 92 Suppl 1:S6-13.

**Sattler** M, Abidoye O and Salgia R (2008) EGFR-targeted therapeutics: focus on SCCHN and NSCLC. *ScientificWorldJournal* 8:909–19.

**Schlessinger** J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2):211-25.

**Schmoll** HJ, Höffken K, Possinger K (Hrsg.): *Kompendium Internistische Onkologie*. 4. Auflage. S 847- 862.

**Shibuya** M, Claesson-Welsh L (2005) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 312(5):549-60.

**Skehan** P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13):1107-12.

**Sridhar** SS, Lesley Seymour, and Shepherd FA (2003) Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 4(7):397-406.

**Tazzari** PL, Tabellini G, Bortul R, Papa V, Evangelisti C, Grafone T, Martinelli G, McCubrey JA, Martelli AM (2007) The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-AEW541 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells exhibiting autocrine insulin-like growth factor-I secretion. *Leukemia* 21(5):886-96.

**Trarbach T**, Reinacher-Schick A, Hegewisch-Becker S, Vanhoefer U, Frieling T, Lehnert L, Schmiegel W, Graeven U (2010) Gefitinib in combination with capecitabine as second-line therapy in patients with advanced colorectal cancer (aCRC): a phase I/II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Onkologie* 33(3):89-93.

**Traxler P**, Allegrini PR, Brandt R, Brueggen J, Cozens R, Fabbro D, Grosios K, Lane HA, McSheehy P, Mestan J, Meyer T, Tang C, Wartmann M, Wood J, Caravatti G (2004) AEE788: A dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* 64(14):4931-41.

**Troiani T**, Lockerbie O, Morrow M, Ciardiello F, Eckhardt SG (2006) Sequence-dependent inhibition of human colon cancer cell growth and of prosurvival pathways by oxaliplatin in combination with ZD6474 (Zactima), an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases. *Mol Cancer Ther* 5(7):1883-94.

**Voigt W**, Pickan V, Pfeiffer C, Mueller T, Simon H, Arnold D (2005) Preclinical evaluation of ZD1839 alone or in combination with Oxaliplatin in a panel of human tumor cell lines-implications for clinical use. *Onkologie* 28(10):482-88.

**Wedge SR**, Ogilvie DJ, Dukes M, Kendrew J, Chester R, Jackson JA, Boffey SJ, Valentine PJ, Curwen JO, Musgrove HL, Graham GA, Hughes GD, Thomas AP, Stokes ES, Curry B, Richmond GH, Wadsworth PF, Bigley AL, Hennequin LF (2002) ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration. *Cancer Res* 62(16):4645-55.

**Weiss JN** (1997) The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 11(11):835-41.

**Wells SA Jr.**, Gosnell JE, Gagel RF, Moley J, Pfister D, Sosa JA, Skinner M, Krebs A, Vasselli J, Schlumberger M (2010) Vandetanib for the Treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 28(5):776-72.

**Xia W**, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, Owens G, Alligood KJ, Spector NL (2002) Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and Akt pathways. *Oncogene* 21(41):6255-63.

**Xiao X**, Wu J, Zhu X, Zhao P, Zhou J, Liu QQ, Zheng L, Zeng M, Liu R, Huang W (2007) Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells by ZD6474, an inhibitor of VEGFR tyrosine kinase with additional activity against EGFR tyrosine kinase. *Int J Cancer* 121(9):2095-2104.

**Xu JM**, Azzariti A, Colucci G, Paradiso A (2003) The effect of gefitinib (Iressa, ZD1839) in combination with oxaliplatin is schedule-dependent in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 52(6):442-48.

**Yarden Y** (2005) Grundlagen der Signaltransduktion. *Onkologie* 28 suppl 4:14-17.

**Younes MN**, Park YW, Yazici YD, Gu M, Santillan AA, Nong X, Kim S, Jasser SA, El-Naggar AK, Myers JN (2006) Concomitant inhibition of epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases reduces growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Mol Cancer Ther* 5(11):2696-705.

**Yue Q-X**, Liu X, Guo DA (2010) Microtubule-binding natural products for cancer therapy *Planta Med.* 76:1037-43.

**Zakarija A** and Soff Gerald (2005) Update on angiogenesis inhibitors. *Curr Opin Oncol* 17(6):578-83.

**Zander T**, Hallek M (2011) Tyrosinkinaseinhibitoren in der Onkologie. *Der Internist* 5/2011.

**Zhou Y**, Li S, Hu YP, Wang J, Hauser J, Conway AN, Vinci MA, Humphrey L, Zborowska E, Willson JK, Brattain MG (2006) Blockade of EGFR and ErbB2 by the novel dual EGFR and ErbB2 tyrosine kinase inhibitor GW572016 sensitizes human colon carcinoma GEO cells to apoptosis. *Cancer Res* 66(1):404-11.

**Zwick E**, Bange J and Ullrich A (2001) Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer* 8(3):161-73.

## 8 Thesen

1. In Deutschland ist seit 1980 eine deutliche Zunahme neu aufgetretener Krebserkrankungen sowohl bei Frauen als auch bei Männern zu verzeichnen.
2. Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Inhibierung spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung neuer Tumormedikamente.
3. Aufgrund des differenten Wirkmechanismus und ihrer Fähigkeit zur Modulation der *multidrug resistance* werden TKI zunehmend mit klassischen Zytostatika kombiniert.
4. Für die Wirkung einer Kombination aus TKI und Zytostatika spielt die Applikationssequenz eine wichtige Rolle.
5. AEE788, NVP-AEW541, ZD6474 (Zactima®), GW572016 (Tyverb®) und ZD1839 (Iressa®) zeigen *in vitro* in Abhängigkeit von der Tumorentität ein unterschiedliches zytotoxisches Potential.
6. AEE788, GW572016 (Tyverb®), ZD6474 (Zactima®) und ZD1839 (Iressa®) induzieren *in vitro* zeit- und konzentrationsabhängig einen G<sub>1</sub>-Arrest, während eine Behandlung mit NVP-AEW541 überwiegend zu einem direkten Übergang der Zellen in den SubG<sub>1</sub>-Bereich führt.
7. Die Tyrosinkinase-Inhibitoren inhibieren methodenabhängig die Phosphorylierung der untersuchten Targets der Signaltransduktion nur vereinzelt.
8. Die Kolonkarzinomzelllinie DLD-1 zeigte in den Kombinationsversuchen ausschließlich einen Synergismus.
9. Bei der Kopf-Halskarzinomzelllinie FaDu zeigten sich in den Kombinationsversuchen überwiegend antagonistische Effekte, wobei der Antagonismus teilweise durch Applikation des TKI vor Sagopilon noch verstärkt werden konnte.
10. In den Kombinationsversuchen mit der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und der Zervixkarzinomzelllinie A431 zeigten sich überwiegend additive Effekte.



## **Lebenslauf**

### Persönliche Angaben

Name: Sandra Paul  
Geburtsdatum/-ort: 18.08.1982 in Halle  
Familienstand: ledig

### Ausbildung und Qualifikationen

1989- 2002            Grundschule und Gymnasium  
2002                    Abitur am Hanns-Eisler-Gymnasium in Halle  
10/2002                Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-  
                              Universität Halle-Wittenberg  
08/07- 06/08         Praktisches Jahr  
  
                              Innere Medizin  
                              UKH, Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin IV,  
                              Prof. Dr. med. H.- J. Schmoll  
  
                              Chirurgie  
                              Städtisches Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau bei  
                              Dr. med. Lindemann-Sperfeld  
  
                              Wahlfach: Urologie  
                              Städtisches Krankenhaus Martha-Maria Halle-Dörlau bei  
                              Prof. Dr. med. Seseke  
  
2008                    Staatsexamen und Approbation

Beruflicher Werdegang

- 12/08-03/11            Assistenzärztin  
Station 10, Klinik für Innere Medizin IV-Hämatologie und Onkologie  
des Universitätsklinikums Halle, Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll
- 04/11-09/11            Internistische Intensivstation  
Klinik für Innere Medizin III-Kardiologie des Universitätsklinikums  
Halle, Prof. Dr. med. K. Werdan
- 10/11- 03/12            Internistische Wachstation  
Klinik für Innere Medizin III-Kardiologie des Universitätsklinikums  
Halle, Prof. Dr. med. K. Werdan
- 04/12-09/12            Assistenzärztin  
Station 10, Klinik für Innere Medizin IV-Hämatologie und Onkologie  
des Universitätsklinikums Halle, Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll
- Seit 10/12                Stationsärztin  
Station 12 (allogene Station), Klinik für Innere Medizin IV-  
Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Halle,  
Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll

Halle (S.) im Mai 2013

\_\_\_\_\_  
Sandra Paul

## **Erklärung**

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Arbeit wurden in den Jahren 2006 bis 2012 an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Hämatologisch-onkologischen Forschungslabor der Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin IV durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe erstellt und geschrieben habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachte Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Halle (S.) im Mai 2013

\_\_\_\_\_  
Sandra Paul

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Arbeit an keiner anderen Universität oder Hochschule vorgelegt habe. Des Weiteren habe ich keine früheren Promotionsversuche unternommen.

Halle (S.) im Mai 2013

\_\_\_\_\_  
Sandra Paul

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schmoll, Universitäts- und Poliklinik für Innere Medizin IV, für die Bereitstellung dieses Themas.

Besonders danken möchte ich Herrn PD Dr. med. Wieland Voigt für seine Geduld und Unterstützung im Fortgang meiner Dissertation sowie für die vielen fachlichen Hinweise bei der Korrektur. Danken möchte ich des weiteren Herrn Dr. rer. nat. Thomas Müller, Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin IV in Halle, für seine Unterstützung und hilfreichen Anregungen bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten. Dank gilt ihm auch für die Beantwortung meiner Fragen in theoretischen und praktischen Belangen. Ein herzlicher Dank gilt Frau Katrin Nerger, Frau Dr. rer. nat. Jana Lützkendorf und Frau Miriam Widder für die Hilfsbereitschaft in der Ausführung der experimentellen Arbeiten. Ein besonderer Dank gilt dabei Frau Franziska Reipsch für ihre Unterstützung und Mithilfe bei der Durchführung der Proteinisolierung und Western Blot-Analysen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern von Herzen danken, dass sie mich in meiner Entscheidung, Medizin zu studieren und diese Dissertation zu beginnen stets unterstützt haben. Sie haben immer an mich geglaubt und mich in schwierigen Zeiten moralisch aufgebaut. Ohne Sie hätte ich diese Arbeit nie vollendet. Ihnen widme ich diese Arbeit und danke für ihre Geduld und ihr Vertrauen in mein Können.