



Evaluierung des *Antibody Directed Enzyme  
Prodrug Therapy*-Konzepts im  
Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Marta Zientkowska  
aus Bydgoszcz, Polen

Göttingen, 2007

D7

Referent: Prof. Dr. I. Feußner

Korreferent: Prof. Dr. Dr. L. F. Tietze

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2007

*Meinen Eltern  
Jolancie und Markowi Zientkowski*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1    Krebserkrankungen .....	6
1.2    Entwicklung von Tumorthapien .....	7
1.3    Therapiemöglichkeiten .....	8
1.3.1    Chemotherapie .....	9
1.3.2    Immuntherapie .....	11
1.3.3    Das ADEPT-Konzept .....	13
1.4    Tiermodelle zur präklinischen Evaluierung neuer Therapiekonzepte .....	15
1.5    Neue bildgebende Verfahren .....	16
1.6    Ziele der Arbeit .....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1    Material .....	18
2.1.1    Geräte .....	18
2.1.2    Chemikalien und Reagenzien .....	18
2.1.3    Verbrauchsmaterial .....	19
2.1.4    Monoklonale Antikörper, Immunglobuline und Enzyme .....	20
2.1.5    Lösungen und Puffer .....	21
2.1.6    Medien .....	22
2.1.7    Eukaryotische Zelllinien .....	22
2.1.8    Versuchstiere .....	23
2.1.9    Computerprogramme .....	23
2.2    Methoden .....	24
2.2.1    Kopplung der Antikörper .....	24
2.2.2    Zellbiologische Methoden .....	24
2.2.3 <i>In vivo</i> -Experimente .....	27
2.2.4    Histologische Untersuchungen an Tumorgewebe-Präparaten .....	31
2.2.5    Bildgebende Verfahren .....	32
2.2.6    Statistik .....	37
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1    Entwicklung eines ADEPT-Konzepts zur Behandlung von Mammakarzinomen .....	38

3.1.1	<i>In vitro</i> -Studien an Mammakarzinom-Zellen zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts .....	38
3.1.2	<i>In vivo</i> -Studien zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts am Mammakarzinom-Modell .....	45
3.1.3	<i>In vivo</i> -Studie zum therapeutischen Einsatz des ADEPT-Konzepts im Mammakarzinom-Mausmodell .....	66
3.2	Entwicklung des ADEPT-Konzepts zur Behandlung von Lymphomen .....	73
3.2.1	<i>In vitro</i> -Studien an Lymphom-Zellen zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts .....	73
3.2.2	<i>In vivo</i> -Studien zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts am Lymphom-Modell .....	79
3.2.3	<i>In vivo</i> -Studie zum therapeutischen Einsatz des ADEPT-Konzepts im Lymphom-Mausmodell.....	90
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
4.1	Das ADEPT-Konzept zur Behandlung von Tumoren .....	96
4.2	<i>In vitro</i> -Nachweis der Anwendbarkeit einzelner ADEPT-Komponenten am Mammakarzinom- und Lymphom- Modell.....	99
4.3	Vergleich der Langzeit-Bindung des anti-uPAR*Cy5.5 mit anti-uPAR* $\beta$ -D-Gal*Cy5.5 im orthotopen Mammakarzinom-Mausmodell .....	101
4.4	Vergleich der Langzeit-Bindung des anti-CD19*Cy5.5 mit anti-CD19* $\beta$ -D-Gal*Cy5.5 im Lymphom-Mausmodell .....	102
4.5	Aktivität des an anti-uPAR gekoppelten Enzyms $\beta$ -D-Galaktosidase.....	105
4.6	Quantitativer Nachweis von anti-uPAR und anti-CD19 im Serum von tumortragenden Mäusen im Zeitverlauf nach .....	107
4.7	Tumorprogression des orthotopen Mammakarzinoms .....	107
4.8	Detektion von Knochenmetastasen im Mammakarzinom-Modell mittels eXplore Optix und fpVCT .....	109
4.9	Planung des therapeutischen Einsatzes des ADEPT-Konzepts im Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell .....	110
4.10	Therapeutischer Einsatz des ADEPT-Konzepts im Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell.....	112
4.11	Ausblick auf weiterführende Arbeiten .....	115
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>117</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADEPT	<i>Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i> (ungefähr)
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>
cm	Zentimeter
Cy	Fluoreszenz Cyaninfarbstoff
CPG2	Enzym Carboxypeptidase G2
CT	Computer Tomographie
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DDAOG	9H>-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl) -D-galactopyranoside (DDAO galactoside)
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ED <sub>50</sub>	Effektive Dosis; Toxinkonzentration, bei der das Zellwachstum um 50% unterbunden wird
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> (und andere)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötales Kälberserum
fpVCT	<i>flat panel Volumetric Computed Tomograph</i>
FITC	Fluoreszein-isothiocyanat
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
Gal	Galaktosidase
GDEPT	<i>Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>

---

GFP	Grün fluoreszierendes Protein
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HU	<i>Hounsfeld Units</i>
i.c.	intrakardial
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
LacZ	Lactose-Operon
L <sub>L</sub>	Laser-Leistung
μ	Mikro- = 10 <sup>-6</sup>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
μW	Mikrowatt
m	milli- = 10 <sup>-3</sup>
M	Molar
mA	Milliampere
mAk	Monoklonale Antikörper
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MRI	Magnetresonanztomographie
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
n	Zahl der Wiederholungen
n	nano- =10 <sup>-9</sup>

---

NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
NIR	Nahes Infrarot
OPD	O-Phenylendiamin
p-Wert	Irrtumswahrscheinlichkeitswert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
SCID	severe combined immunodeficient
sec	Sekunde
sog.	so genannt
SPECT	<i>Single Photon Emission Computed Tomography</i>
Tab.	Tabelle
TPSF	<i>temporal point spread function</i>
TRITC	tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate
TI	Integrationszeit, die Messzeit pro Rasterposition
u.a.	unter anderem
uPAR	Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor
UV	Ultraviolett
V	Volt
VDEPT	<i>Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>
vergl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen

Bereits Hippokrates verwendete den Begriff „Krebs“ als Beschreibung von Veränderungen des Brustgewebes. Die Bezeichnung Krebs wird heutzutage für eine Vielzahl verwandter Krankheiten verwendet, bei denen Körperzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören können. Diese Veränderungen führen zu einer Neubildung von Körpergewebe. Krebs entsteht durch unterschiedliche Auslöser, die letztlich alle zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus und Zelltod führen. Beispielsweise führt eine Mutation des Tumor Suppressorgens *p53* (Brodeur, 1987; Stanbridge, 1989), welches eigentlich den Zelltod auslösen müsste, ebenso wie die Expression des Onkogens *ras* (Lehman *et al.*, 1991) dazu, dass die Zellen unsterblich werden (Koeffler *et al.*, 1991). Aus diesen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismen entstehen völlig neue Zelleigenschaften. Einzigartig für Tumorzellen ist - außer ihrer Unsterblichkeit - die Fähigkeit, Glykolyse als Energiegewinnungsprozess durchzuführen. Um den daraus entstehenden Sauerstoffmangel zu kompensieren, beginnt im Tumor der Aufbau einer eigenen Blutversorgung (Hickey und Simon, 2006). Charakteristisch für maligne Zellen ist ihre Fähigkeit, sich in andere Gewebe abzusiedeln, zu metastasieren. Bösartige Tumoren überschreiten die Gewebsgrenzen und wachsen infiltrierend und destruktiv in benachbartes Gewebe ein (Mareel und Leroy, 2003). 90% aller Patienten, bei denen eine Tumorerkrankung tödlich ausgeht, sterben nicht am Primärtumor, sondern an dessen Metastasen.

Krebs ist nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Eine neue Studie der *International Agency for Research on Cancer* für das Jahr 2006 zeigt, dass es 3,2 Millionen (Mio.) Neuerkrankungen gab, also 0,3 Mio. Fälle mehr im Vergleich zu 2004, und dass 1,7 Mio. Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückzuführen sind.

Von der Gesamtheit der aufgetretenen Krebserkrankungen betragen die Anteile der befallenen Organe bei Männern: Prostata 24,1%, Lunge 15,5%, Darm 13,0%, Blase 6,6%, Mund und Speiseröhre 4,4%, bei Frauen dagegen: Brust 30,9%, Darm 12,9%, Gebärmutter 8,0%, Lunge 6,9% und Ovarien 3,9%. Patienten, bei denen die Tumoren früh diagnostiziert und behandelt wurden, haben eine höhere Heilungsrate und Lebenserwartung. In der Onkologie wird ein Patient als geheilt bezeichnet, der

mindestens fünf Jahre ohne Rezidiv überlebt hat. Insgesamt sind mehr als hundert verschiedene Krebserkrankungen bekannt, die sich in den Differenzierungsgraden, Metastasierungsmustern sowie in der Herkunft der malignen Zellen und in den Überlebenschancen und Behandlungsmöglichkeiten unterscheiden.

Brustkrebs ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen bei Frauen, mit mehr als 1 Mio. neuen Fällen und 0,37 Mio. Todesfällen pro Jahr weltweit (Guarneri und Conte, 2004). Spät diagnostiziert führt er vor allem zu Knochenmetastasen und zum Tod. Eine Therapie beginnt zumeist mit der Entfernung des Primärtumors, die, falls keine Metastasierung stattgefunden hat, ohne weitere Behandlung zur Heilung ausreichend sein kann. Andernfalls sind weitere Maßnahmen, wie z.B. Chemotherapien oder Strahlentherapien notwendig.

Neoplasien der B-Lymphozyten gehören zu den häufigsten malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems. Bei einem Teil der Patienten mit B-Zell-Lymphomen, die eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen, sind durch chemotherapeutische Behandlungen langfristige Remissionen zu erzielen. Dies trifft sowohl für die akuten Leukämien der B-Zellreihe als auch für die nach der Kiel-Klassifikation als hochmaligne eingestufteten Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) zu. Erkrankungen der reiferen B-Lymphozyten wie beispielsweise niedrigmaligne NHL, chronisch-lymphatische Leukämien und Plasmozytome sind ebenfalls chemosensibel. Langfristige Remissionen sind bei diesen Erkrankungen mit konventionell dosierter Chemotherapie jedoch nicht zu erzielen.

## 1.2 Entwicklung von Tumorthapien

Die Wirksamkeit verfügbarer zytostatischer Therapieformen im inoperablen Stadium solider Tumore ist nach wie vor begrenzt. Neue therapeutische Perspektiven sind daher dringend erforderlich und eröffnen sich aus der Identifizierung von molekularen Mechanismen, die für die Entstehung und Progression von Krebs verantwortlich sind. Zwischen diesen Erkenntnissen, einer sich daraus entwickelnden Therapie und der Anwendung dieser neuen zielgerichteten Behandlungsstrategien am Menschen vergehen oft lange Zeiträume.

In der Mitte des 19. Jahrhunderts konnte der außergewöhnliche deutsche Pathologe Rudolf Virchow belegen, dass die Ursache einer Krankheit auf den Körperzellen beruht (Azar, 1997). Diese Definition führte zur invasiven chirurgischen Behandlung von Krankheiten. Edward Jenner entdeckte im 19. Jahrhundert als erster die aktive

Immunisierung (Willis, 1997), die durch Louis Pasteur später noch weiterentwickelt wurde (Pasteur *et al.*, 2002). In demselben Jahrhundert entdeckte Robert Koch mit Emil von Behring und Shibasabo Kitasato mikrobiologische Ursachen von Krankheiten, was zur Entwicklung der antibiotischen Behandlung und später zur Entdeckung der passiven Immunisierung gegen Diphtherie geführt hat (Schneeweiss, 1983). Somit entstanden die Grundlagen der Immuntherapie.

Bereits im Jahr 1908 erhielt der deutsche Wissenschaftler Paul Ehrlich den Medizin-Nobelpreis für seine Seitenkettentheorie, worin er postulierte, dass Moleküle, welche mit Tumoren reagieren und die heute als Antikörper bekannt sind, eine Schlüsselrolle in der Krebstherapie spielen könnten. Paul Ehrlich entdeckte das erste Chemotherapeutikum - ein Medikament gegen Syphilis, das Salvarsan. Mit seinem Ansatz der Antikörper-vermittelten passiven Immuntherapie gilt er als Vater der Antikörpertherapie und des ADEPT-Konzepts (*Antibody Directed Enzym Prodrug Therapy*), für welche er immer nach dem „Magic Bullet“ suchte, dem idealen Therapeutikum. Viel später entdeckten Ellermann und Bang das Virus, das Leukämie bei Hühnern verursacht, und Francis Peyton Rous (Rapp, 1989) erhielt im Jahre 1966 den Nobelpreis für die Entdeckung des Rous-Sarkom-Virus, woraus die neue Erkenntnis resultierte, dass Tumore durch Viren verursacht werden können.

### 1.3 Therapiemöglichkeiten

Die Wahl des Therapiekonzepts hängt vor allem von der Entität sowie von Lokalisation, Größe und Metastasierungsgrad des Tumors und auch vom Zustand des Patienten ab. Viele der heute verwendeten Tumortherapien stoßen an die Grenzen ihrer Wirksamkeit, nicht zuletzt wegen ihrer starken Nebenwirkungen. Die älteste Behandlungsmöglichkeit ist die operative Entfernung des Tumors und der benachbarten Lymphknoten. Diese Methode bringt nur dann positive Ergebnisse, wenn der Tumor nicht metastasiert ist und vollständig entfernt werden konnte, da einzelne verbliebene Krebszellen erneut zu einem Tumor heranwachsen können.

Das Wachstum einiger Krebserkrankungen wie Brust- und Prostatakrebs lässt sich mit der Gabe oder auch durch die Blockierung bestimmter Hormone hemmen (Klotz, 2000). Einige Brusttumoren exprimieren verstärkt Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren, so dass die *in vivo* Hemmung der Synthese dieser Hormone durch die Behandlung mit Aromatase-Inhibitoren oder die Hemmung der Aktivität durch die Behandlung mit Tamoxifen, die Entfernung der Eierstöcke oder eine Kombination

beider Verfahren häufig eine sinnvolle Ergänzung der Chemotherapie darstellt (Mouridsen *et al.*, 2003). Sie führt dazu, dass die Überlebenszeit der Patientinnen sich signifikant verlängert, die Symptome kontrolliert und die Lebensqualität erhalten werden kann. Für Brusttumoren, die unabhängig von Östrogen und Progesteron wachsen, ist es notwendig, neue wirksamere Therapien zu finden. Die Chemotherapie ist die Behandlung der Wahl für diese Steroidrezeptor-negativen Brusttumoren, die ein aggressives Wachstum auszeichnet. Symptomatische Behandlungen sind z.B. die Gabe von Bisphosphonaten, um Knochenmetastasen zu kontrollieren und die Strahlentherapie bei schmerzhaften Knochenläsionen oder lokalen Rezidiven (Guarneri und Conte, 2004).

Die Einführung der Hochdosistherapie mit anschließender Gabe autologer oder allogener Blutstammzellen bietet zwar neue Chancen bei Lymphomen in der Primär- und Rezidivtherapie dieser Erkrankungen, vielfach wird aber auch durch diese Maßnahme nur eine zeitlich begrenzte Remission erreicht (Zelenetz *et al.*, 2003).

Eine andere Behandlungsform von Tumoren ist die Strahlentherapie, die durch Anwendung von ionisierender Strahlung eine Schädigung der Zell-DNA verursacht. Sie wird vor allem für eine lokale Bekämpfung von Tumoren oder eine Linderung von Symptomen, die durch lokales Tumorstadium verursacht werden, eingesetzt. Die Wirkung dieser Therapie ist begrenzt. Je sauerstoffärmer die Zellen sind, desto resistenter verhalten sie sich gegenüber dieser Behandlung (Harris, 2002). Höhere Strahlendosen haben allerdings zum Teil gravierende Nebenwirkungen, sowohl primäre, wie bspw. Schwellungen, ggf. schwere Schäden der Oberflächenepithelien oder Unfruchtbarkeit, als auch sekundäre, die Monate oder Jahre nach der Therapie auftreten, wie z.B. Exsikkose des Körpers, Fibrose, Haarausfall oder die Entwicklung von Tumoren (Hall, 1991; Bastiaannet *et al.*, 2005).

### **1.3.1 Chemotherapie**

Eine Chemotherapie durch Zytostatika ist bis jetzt die erfolgreichste und am häufigsten verwendete medikamentöse Behandlung von fortgeschrittenen Krebserkrankungen. Ziel ist es, die entarteten Zellen mittels chemischer Substanzen zu zerstören. Zytostatika wirken in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus. Der Zellzyklus besteht aus zwei Phasen: der Mitose, in der die Teilung der Zellen erfolgt und der Interphase, welche in die Phasen G1, S und G2 unterteilt wird. G1 bezeichnet die Wachstumsphase nach der Mitose, S ist die Synthesephase, in der die DNA repliziert wird und in der G2-Phase wird durch eine erhöhte Proteinsynthese die Vorbereitung

der mitotischen Teilung eingeleitet. Zellen, die sich nicht mehr teilen können, wechseln direkt nach der G1 Phase in die G0 Phase. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, auf die Zellteilung einzuwirken, bspw. über eine Hemmung der DNA-Replikation oder der Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen.

Ca. 90% der Tumorzellen sind in einer Proliferationsphase und dadurch für Zytostatika gut zugänglich. Einige neuere Wirkstoffe richten sich spezifisch gegen im Tumor exprimierte Zielmoleküle. Ein Beispiel dafür ist der Tyrosinkinase-Hemmer Imatinib mesylate, dessen Wirkung auf der Hemmung der Aktivität des Fusionsproteins *bcr-abl* beruht und in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (Martinelli *et al.*, 2005) oder von gastrointestinalen Stroma-Tumoren (Croom und Perry, 2003) verwendet wird.

Alkylantien sind organische Wirkstoffe, die Alkylgruppen auf andere Moleküle übertragen. Sie reagieren mit N-, O- oder S-haltigen Nucleophilen in Proteinen und insbesondere in Nucleinsäuren. Die Folge davon können Quervernetzungen der DNA, abnormale Basenpaarungen sowie Strangbrüche sein, die zum Zelltod führen. Sie hemmen das Tumorstadium, indem sie z.B. an Guanidin-Nucleotide in der DNA-Doppelhelix binden. In der Folge können sich die DNA-Doppelstränge nicht mehr in die Einzelstränge trennen und eine Replikation, und damit eine Zellteilung, ist nicht mehr möglich. Dies führt zum Wachstumsstillstand oder zur Apoptose. Solche Wirkstoffe agieren Zellzyklus-unspezifisch. Manche Wirkstoffe erfordern eine Umwandlung in die aktive Form der Substanz *in vivo*, wie bspw. Cyclophosphamid, Ifosfamid (Zhang *et al.*, 2005) und Cisplatin (Coluccia und Natile, 2007).

Weiterhin werden Antimetabolite eingesetzt, die eine chemische Struktur ähnlich dem Purin oder Pyrimidin haben. Beispiele von Substanzen mit Purin-ähnlicher Struktur sind: Azathioprin, Mercaptopurin, Thioguanin, Fludarabin, Pentostatin und Cladribin, dem Pyrimidin ähnlich sind: 5-Fluorouracil, Floxuridin und Cytosinarabinosid (Peters *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 1995). Die Antimetabolite verhindern, dass die jeweiligen Nucleotide während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut werden. Eine weitere Entwicklung und Zellteilung kann dann nicht mehr ablaufen. Aufgrund ihrer Wirksamkeit stellen sie die am häufigsten eingesetzten Zytostatika dar.

Pflanzenalkaloide und Terpenoide werden aus Pflanzen gewonnen und blockieren die Zellteilung durch Funktionshemmung der Mikrotubuli in der M-Phase des Zellzyklus. Beispiele hierfür sind *Vinca*-Alkaloide und Taxane (Hadfield *et al.*, 2003), die aus dem *Catharanthus roseus* gewonnen werden (Noble, 1990). Die *Vinca*-Alkaloide umfassen Vincristin, Vinblastin, Vinorelbin, Vindesin und Podophyllotoxin. Diese Wirkstoffe

hindern die Zellen am Eintritt in die G1- und S-Phase. Die genauen Wirkungsmechanismen dieser Substanzen sind noch weitgehend unbekannt. Die Taxane, steigert die Stabilität der Mikrotubuli, so dass in der Anaphase der Zellteilung keine Trennung der Chromosomen erfolgen kann. Beispiele für Taxane sind Paclitaxel und Docetaxel (Zhao *et al.*, 2005).

Topoisomerasen sind essentielle Enzyme, die die Geometrie der DNA erhalten. Eine Inhibition der Typ I- oder Typ II-Topoisomerase verhindert sowohl die Transkription als auch die Replikation der DNA, indem keine korrekte Spiralbildung mehr stattfindet. Topoisomerase I-Inhibitoren sind *Camptothecine*, wie Irinotecan und Topotecan (Pommier, 2006). Zu den Topoisomerase II-Inhibitoren gehören Amsacrin, Etoposid, Etoposid-Phosphat und Teniposid (Hande, 1998). Letztere sind halbsynthetische Derivate des Epipodophyllotoxins, dessen natürliche Alkaloide in der Wurzel von *Podophyllum peltatum* und *Podophyllum emodi* vorkommen (Sinkule, 1984).

Unter den Medikamenten, die die Proliferation von Tumoren hemmen, sind Antibiotika eine weitere Klasse von Zytostatika. Einige inhibieren Topoisomerase I, wodurch sich die DNA nicht mehr entspannen kann und freie Radikale entstehen. Diese Antibiotika sind Produkte verschiedener Linien des Actinobakteriums *Streptomyces*. Hierzu gehören bspw. Actinomycine, repräsentiert durch Anthracycline, Doxorubicin oder Daunorubicin. Weitere zytotoxische Antibiotika sind bspw. Bleomycin, Plicamycin sowie Mitomycin.

Limitierend für den Einsatz von Zytostatika ist die Toxizität für gesunde, sich schnell teilende Zellen. Diese Behandlung stößt an ihre Grenzen, wenn starke Nebenwirkungen die Lebensqualität des Patienten senken und es dadurch unmöglich ist, die Dosierung zu erhöhen um positive Therapieeffekte zu erreichen. Beispiele solcher unerwünschter Nebenwirkungen sind vermehrte Infektionsraten, Blutungen, Übelkeit, Erbrechen, Konzentrationsschwierigkeiten oder sogar das Entstehen sekundärer Tumore. Diese Nebenwirkungen kombiniert mit der schlechten Selektivität der Chemotherapie, fordern neue, selektive Therapiekonzepte, um Krebs effektiver zu bekämpfen.

### **1.3.2 Immuntherapie**

Die Immuntherapie wirkt im Gegensatz zur Chemotherapie gezielt nur gegen Tumorzellen. Bei der Immuntherapie wird entweder das körpereigene Immunsystem angeregt, die Tumorzellen anzugreifen oder Antikörper werden als Boten für z.B. Zytostatika verwendet.

Um das erste Ziel zu erreichen, muss das Immunsystem die Tumorzellen als Angriffsziel identifizieren: hierzu dienen Zytokine, wie z.B. Interleukin-2, die das Wachstum von T-Zell-Klonen anregen, die wiederum eine Reaktion des Immunsystems regulieren (Pardoll, 2002; Geissler und Weth, 2002). Dem Patienten können zudem Antikörper, die sich gegen charakteristische Proteine an der Oberfläche der Tumorzellen richten, appliziert werden, mit deren Hilfe dann die Immunabwehr induziert wird. Es wurden Produkte von Kopplungen von Interleukinen und Zytokinen mit monoklonalen Antikörpern als Therapeutika verwendet oder Antigen-präsentierende Zellen, konjugiert mit Antikörpern, wie z.B. dem Haupthistokompatibilitätskomplex, der die zytotoxischen Lymphozyten im Körper aktiviert, um die Tumorzellen als Fremdkörper erkennen zu können.

Die antitumorale Wirkung wurde durch die Verwendung eines Komplexes von Antikörpern mit dendritischen Zellen, Tumorproteinen, Peptiden oder DNA erreicht. Monoklonale Antikörper wurden im Wesentlichen zu vier Antikörpertypen weiterentwickelt: murine, chimäre, bei denen nur Teile des Fab Fragmentes murin sind, humanisierte, bei denen nur die Bindungsstellen murin sind, und humane. Die humanen Antikörper binden schneller und spezifischer an humane Tumorzellen und die Eliminationszeit aus dem Blut ist im Vergleich zu murinen Antikörpern verkürzt. Dies führt insgesamt zu einer geringeren Immuntoxizität (Hudson und Souriau, 2003). Die Kopplung der Antikörper entweder an die T-Lymphozyten oder die natürlichen Killerzellen ermöglicht die Zytolyse der Tumorzellen.

Es gibt den biotechnologisch hergestellten chimären monoklonalen Antikörper anti-CD20, der therapeutisch genutzt wird. Das sog. Rituximab (Cheson, 2003; Cheson, 2006; Cvetkovic und Perry, 2006) wird vorwiegend in der Behandlung von Lymphknotenkrebs verwendet. Ein monoklonale Antikörper gegen den Tyrosinkinase-Rezeptor HER2/neu, der humanisierte anti-ErbB2, das so genannte Trastuzumab, dient seit 1998 zur Therapie von Brustkrebs (Braga *et al.*, 2006; Chowdhury *et al.*, 2006).

Antikörper wurden auch als Immunkonjugate mit Toxinen gekoppelt. So wird die Spezifität der Antikörper zu tumorassoziierten Antigenen genutzt, um eine Schädigung gesunder Zellen durch die verwendeten Toxine möglichst gering zu halten. Seit 1997 wird der monoklonale anti-CD20 Antikörper mit der zytotoxischen Wirkung des Betastrahlers Yttrium-90, dem so genannten Zevalin (Friedberg und Fisher, 2004; Cheson, 2005) als Therapeutikum in der Therapie von NHL (Gellrich *et al.*, 2005; Pohlman *et al.*, 2006) kombiniert. Der anti-CD33 Antikörper in Verbindung mit der

zytotoxischen Wirkung des Zytostatikum Calicheamicin-Derivats wird in der Leukämitherapie (Abutalib und Tallman, 2006) verwendet. Desweiteren hat man mittels Immunoliposomen die Immuntherapie gezielt gegen Tumorzellen anwenden können z.B. ein Antikörperfragment gegen den humanen Transferrin-Rezeptor. Diese Technik wurde erfolgreich bei Gehirntumoren (Boardo, 2005) und Brustkrebs angewandt (Krauss *et al.*, 2000). Die Diagnostik von Tumoren, die sogenannte Immunszintigraphie, bei der Antikörper mit radioaktiven Isotopen wie  $^{131}\text{I}$  gekoppelt werden, ist eine weitere Anwendung von monoklonalen Antikörpern (Boven und Pinedo, 1986).

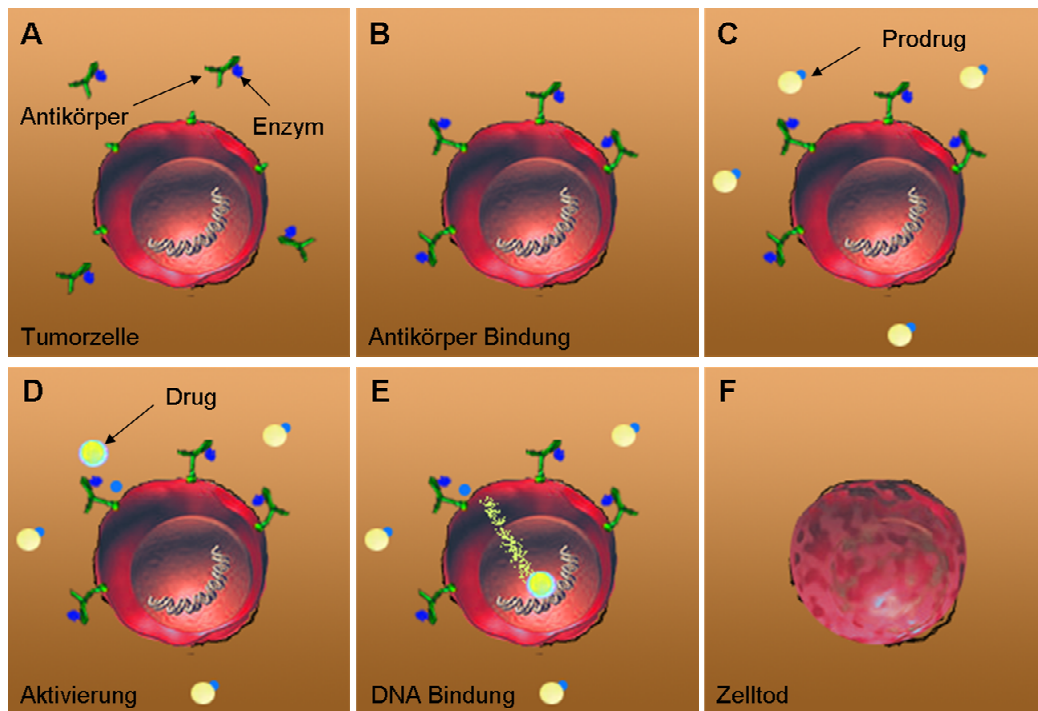
### 1.3.3 Das ADEPT-Konzept

Neueste Therapieansätze sind die GDEPT-, VDEPT- und ADEPT-Konzepte – *G(ene)-, V(irus)- oder A(ntibody) -directed enzyme prodrug therapy*. Die ursprüngliche Idee, Antikörper zu verwenden um Enzyme an Tumorzellen zu bringen, stammt von Philpott *et al.* (1973). Dieses Konzept wurde später als ADEPT-Konzept von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen weiterentwickelt (Bagshawe, 1987; Senter *et al.*, 1988). Dabei wurden monoklonale Antikörper verwendet, an die ein wirkstoff-aktivierendes Enzym gekoppelt wurde, um am Tumor eine untoxische systemisch gegebene Substanz, das sogenannte Prodrug, in eine toxische Substanz, das Drug zu verwandeln (Abb. 1.1). Bis jetzt sind die klinischen Erfolge der ADEPT noch begrenzt (Francis *et al.*, 2002). Das Konzept ist dennoch zukunftsweisend in der Onkologie als eine spezifische Therapie, die nicht dem ganzen Körper schadet, aber spezifisch auf alle Tumorzellen im Körper wirken kann.

Das erste ADEPT-Konzept wurde von Bagshawe 1987 mit dem Enzym Carboxypeptidase-G2 (CPG2) aus *Pseudomonas* getestet (Bagshawe, 1987; Bagshawe *et al.*, 1988). Das Enzym spaltet den deaktivierenden Glutamatrest ab (Springer *et al.*, 1990). Es ist das bis heute am besten charakterisierte Konzept und beinhaltet die folgenden Komponenten: ein  $\text{F(ab)}_2$ -Fragment des murinen monoklonalen Antikörpers CEA (A5B7), welches mit der Carboxypeptidase CPG2 gekoppelt ist und das Prodrug ein bis-iodo-phenol-mustard. Dieses Konzept wurde an Patienten mit Kolorektaltumoren in einer klinischen Phase I-Studie untersucht. Hier konnten keine klinischen Erfolge verzeichnet werden, jedoch bei drei Patienten ein stabiler Krankheitsverlauf über 56 Tage. Eine der häufigsten Nebenwirkungen, die die Patienten unter ADEPT entwickelten, waren Immunreaktionen auf die verabreichten



Antikörper oder Enzyme (Francis *et al.*, 2002).



**Abb. 1.1: Prinzip des ADEPT-Konzepts** (A) Anwendung spezifischer Antikörper-Enzym-Konjugate, die gegen tumorassoziierte Antigene gerichtet sind; (B) Bindung der Antikörper-Enzym-Konjugate an die Tumorzelloberfläche (C); Systemische Applikation des Prodrugs; (D) Enzymvermittelte Abspaltung des Zuckerrests vom Prodrug führt zur Entstehung des toxischen Drugs; (E) Diffusion des Drugs zum Nukleus, DNA-Bindung; (F) Drug-abhängiger Zelltod.

Die  $\alpha$ -Galaktosidase wurde bereits 1995 von Azoulay *et al.* eingesetzt. Bakina (1999) und Jung (2001) machten erste *in vitro* Versuche für eine Anwendung von  $\beta$ -Galaktosidase in Kombination mit einem Antracyclin-Galaktosid. Bis heute wurden verschiedene Prodrugs präklinisch untersucht, wie z.B. Etoposide-Phosphat und Mitomycin C-Phosphat bei Darmkrebs in Verbindung mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (Senter *et al.*, 1988; Senter *et al.*, 1989) oder Doxorubicin-Glucuronid, das durch das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase aktiviert wurde.

In dieser Arbeit wurde das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase verwendet. Die hier verwendete Substanz für das ADEPT-Konzept ist eine Weiterentwicklung des Antibiotikums CC-1065, welches von *Streptomyces zelensis* produziert wird (Li *et al.*, 1982; Swenson *et al.*, 1982). (+) CC-1065 ist hoch zytotoxisch, aber aufgrund letaler Hepatotoxizität in Mäusen für eine klinische Anwendung unbrauchbar. Es wurde daraufhin ein zur Stammsubstanz analoger Wirkstoff mit ähnlich hoher Zytotoxizität synthetisiert. Als

Basis wurde die Spirocyclopropylcyclohexadienon -Struktur des Cyclopropapyrroloindol des (+) CC-1065 verwendet. Durch Kopplung von  $\beta$ -D-Galaktose an Analoga dieses Antibiotikums, das sogenannte *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Secodrug, entsteht ein inaktives Prodrug, das durch  $\beta$ -D-Galaktosidase in das Drug umgewandelt wird (Tietze *et al.*, 2001; Tietze *et al.*, 2002). Die Struktur der CC-1065-Substanz setzt sich aus drei substituierten Pyrolo[2,3-e]-indol-Einheiten zusammen, die jeweils über Amidbindungen miteinander verknüpft sind. Dieses Zytostatikum gehört in die Klasse der Alkylantien. Seine zytotoxische Wirkung und die analoger Verbindungen basiert vermutlich auf einer sequenz-spezifischen DNA-Alkylierung durch eine Addition des Adenin-N-3 an das am niedrigsten substituierte Kohlenstoffatom der Cyclopropaneinheit (Tietze *et al.*, 2006). Zusätzlich behindern die Wirkstoffe durch ihre bevorzugte Wechselwirkung mit AT-reichen DNA-Regionen die Bindung von TATA-Box-bindenden Proteinen an die DNA und damit die Gentranskription. Das Prodrug ist bis zu 4800-mal weniger toxisch als das daraus gebildete Drug. Die Zytotoxizität des Prodrugs und des korrespondierenden Medikaments sollte für das ADEPT-Konzept generell um einen Faktor  $Q_{ED_{50}} > 1000$  differieren, wobei die  $ED_{50}$  eine Konzentration darstellt, bei der 50% der Zielzellen inhibiert sind und  $Q_{ED_{50}} = ED_{50\text{prodrug}}/ED_{50\text{drug}}$  ist. Zusätzlich sollte das Drug eine hohe biologische Aktivität aufweisen, die im Bereich von  $ED_{50} = 10$  nM liegt. So stellt das Antibiotikum CC-1065 ein ideales Substrat zum Einsatz im ADEPT-Konzept dar: Es besitzt eine äußerst hohe biologische Aktivität und darüber hinaus stehen leistungsfähige Synthesen zur Gewinnung zahlreicher Derivate und Analoga zur Verfügung, die als Prodrug verwendet werden können (Tietze *et al.*, 2002; Tietze und Feuerstein, 2003).

## 1.4 Tiermodelle zur präklinischen Evaluierung neuer Therapiekonzepte

Mit der Etablierung verschiedener Tumor-Tiermodelle stehen experimentelle Systeme zur präklinischen Evaluierung des ADEPT-Konzepts in der Behandlung solider Tumore zur Verfügung.

Ein Tumor-Modell ist das orthotope Mammakarzinom-Modell in weiblichen SCID-Mäusen, in die MDA-MB-231-Tumorzellen orthotop in den Mammarkomplex implantiert werden und sich innerhalb von 3 Wochen zu gut detektierbaren, soliden Tumoren entwickeln (Lacroix und Leclercq, 2004). Die humanen Tumorzellen MDA-MB-231 exprimieren auf der Zelloberfläche das zellspezifische Antigen uPAR, den Rezeptor für

den Urokinase Plasminogen Aktivator (Ma *et al.*, 2001). uPAR spielt in Mammatumoren eine Rolle bei der Invasion und der Metastasierung der Tumorzellen. Durch die Bindung von Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) an seinen Rezeptor uPAR, wird über RAS die extrazelluläre ERK-Signalkaskade aktiviert (Nquyen *et al.*, 1999). Vielfach zeichnen sich die humanen Mammakarzinome durch eine hohe Malignität aus, was mit einer Resistenz gegen viele Therapiekonzepte gekoppelt ist und so eine der häufigsten Todesursachen bei Frauen ist (Guarneri und Conte, 2004). Ein anderes Tumor-Modell ist ein syngenes Tiermodell für ein hochmalignes B-Zell NHL in Balb/c-Mäusen, in dem 3 Wochen nach intravenöser Injektion von murinen A20-Tumorzellen Lymphome in der Maus detektierbar sind (Erlach *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1979). Die murinen A20-Zellen exprimieren an der Zelloberfläche das spezifische CD19-Antigen. Es ist ein Typ I transmembranes Glykoprotein, welches auf der Zelloberfläche normaler B-Lymphozyten einschließlich pro-B-Lymphozyten und dendritischer Zellen vorkommt (Krop *et al.*, 1996a; Krop *et al.*, 1996b; Otero *et al.*, 1996). Während der Lymphozytenreifung wird die Expression von CD19 eingestellt, so dass es auf Plasmazellen nicht mehr nachweisbar ist (Krop *et al.*, 1996b). CD19 ist ein B-Zell-Korezeptor, der eine substantielle Funktion in der B-Lymphozyten-Entwicklung hinsichtlich Aktivierung, Homöostase und Differenzierung hat (Fearon, 1993).

## 1.5 Neue bildgebende Verfahren

Die Verwendung von nicht-invasiven diagnostischen Methoden, die eine beliebig oft wiederholbare Untersuchung erlauben, gibt die Möglichkeit einer genaueren Diagnostik der Tumorentwicklung *in vivo*.

Um das ADEPT-Konzept zu etablieren, stehen der *flat panel Volumetric Computed Tomograph* (fpVCT) (GE Global Research, Niskayuna USA) und das eXplore Optix (GE Medical Systems/ART Montreal Canada) zur Verfügung. Der fpVCT erlaubt, nicht-invasiv die anatomischen Strukturen bei murinen Tumormodellen zu visualisieren und Größe, Vaskularisierung und auch Morphologie der Tumoren zu untersuchen. Die zweite Technik ermöglicht die nicht-invasive Beobachtung von Antikörpern in lebenden Mäusen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen im Nahen Infrarot (NIR) Bereich gekoppelt sind. Die beiden Untersuchungsmethoden fpVCT und eXplore Optix sind wegen der unterschiedlichen Darstellungen, dem funktionellen in der fpVCT und dem morphologischen im eXplore Optix, eine gute Ergänzung zueinander.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es mittels eines neuen Therapiekonzepts, des ADEPT-Konzepts, eine höhere Spezifität und Selektivität in der Behandlung von Tumoren zu erreichen und das Konzept *in vivo* präklinisch zu etablieren. Diese innovative Therapie sollte mittels folgender Komponenten durchgeführt werden: einem neuen Zytostatikum, dem *anti-Methyl-seco-CBI-DMAI*-Prodrug, welches durch  $\beta$ -D-Galaktosidase aktiviert wird sowie den Antikörper-Enzym-Konjugaten anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase und anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase. Es sollten folgende Teilziele erreicht werden:

1. Untersuchung der einzelnen Komponenten der Therapie im orthotopen Mammakarzinom-Modell und im Lymphom-Modell:
  - A) Die Bindungskinetiken der anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase und der anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase Antikörper-Enzym-Konjugate sollte *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.
  - B) Die Zeit der Eliminierung der Antikörper, anti-uPAR und anti-CD19, aus dem Mäuse-Serum sollte bestimmt werden.
  - C) Die Enzymaktivität der an den anti-uPAR gekoppelten  $\beta$ -D-Galaktosidase sollte *in vitro* und *in vivo* analysiert werden.
  - D) Die Toxizität des Prodrugs und Drugs *in vivo* sollte untersucht werden.
  - E) Die Ergebnisse aus den Punkten A-D sollten als Grundlage für die Planung des ADEPT-Konzepts für das Mammakarzinom-Modell und für das Lymphom-Modell dienen.
2. Präklinische Evaluierung der Wirksamkeit des ADEPT-Konzepts *in vivo* im Mammakarzinom- und im Lymphom-Mausmodell.

Das Fernziel liegt darin, diese selektive Tumorthherapie ohne Nebenwirkungen im Patienten einzusetzen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Nachstehend sind alle regelmäßig verwendeten Geräte und deren Hersteller aufgeführt.

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Axioscope 2	Zeiss, Göttingen
Coulter Ac-T5diff (Blutbild)	Coulter- Beckmann
eXplore Optix	GE Medical Systems, USA/ART, Canada
FACS	BD Heidelberg
Faxitron 43855A Cabinet XRay System	Rohde und Schwarz, Köln
fpVCT	GE Global Research, Niskayuna NY, USA
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica, Bensheim
Konfokales Laser Scan Mikroskop DM IBRE	Leica, Bensheim
Kryotostat Jung CM3000	Leica, Bensheim
Lichtmikroskop Telaval 31 Modular – Systems	Zeiss, Göttingen Roche / Hitachi
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
NIR-Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, ORCA-ER Hamamatsu Digital-Kamera
Plattenreader	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
Rotationsmikrotom Nr. HM 330	Mikrom, Sandhausen
Zentrifuge 1-15K	Sigma, Osterode im Harz

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Avidin/HRP	Dako, Hamburg
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Pierce, Rockford
Ceristain Eosin G	Merck, Darmstadt
Cy5.5 Mono NHS Ester	Amersham Biosciences

DDAO-galactoside	Molecular Probes, Oregon USA
9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one-7-yl) $\beta$ -D-galactopyranoside	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Osterode
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fenestra LC	Fenestra, ART Canada
Fenestra LDH-LE 150 mg/ml	Fenestra, ART Canada
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötiales Kälberserum (FCS)	PAN Systems, Aidenbach
Hämatoxylin	Chroma, Köngen
Isofluran (Forene)	Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden
Isovist300	Schering, Berlin
Mayers Hämalaun	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
New Decal	Medite, Burgdorf
O-Phenylendiamin (OPD)	Dako, Hamburg
Paraffin	Süsse, Guxhagen
Pro Long	Molecular Probes Invitrogen, Oregon USA
Pro Long Gold mit DAPI	Molecular Probes Invitrogen, Oregon USA
Syto61	Molecular Probes, Oregon USA
Trypsin/EDTA in PBS	Seromed Biochrom KG, Berlin
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

### 2.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well-ELISA-Platten Maxi Sorb	Nunc, Wiesbaden
96-Well-Zellkultur-NIR-Platten	Schleicher & Schüll, Dassel
96-Well-Zellkultur-Platten	Greiner bio-one, Solingen
Chamber Slide, 8 Chamber Permanox	Lab-Tek, Stadtlohn
EDTA Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

Falkonröhrchen 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falkonröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Heparinröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Injektionsnadeln 26G	Braun, Emmenbrücke
Objektträger Superfrost Plus	Schütt, Göttingen
Objektträger Superfrost Plus	Menzel Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Greiner bio-one, Solingen
Röntgenfilme für Faxitron	Hellma, Mühlheim
Insulinspritzen	BD, Heidelberg
Tissue Tek Kassetten	Vogel, Giessen
Zellkulturflaschen	Greiner Nunc., Nürtingen

#### 2.1.4 Monoklonale Antikörper, Immunglobuline und Enzyme

Antikörper	Klasse	Her- kunft	Gegen	Klon	Gekoppelt mit:	Firma
anti-CD19	IgG2a	Ratte	Maus	1D3	- Cy5.5 - FITC - Cy5.5-β-D- Gal	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-uPAR	IgG1	Maus	Human	1.H2.10A3	- FITC-β-D- Gal - β-D-Gal	Roche Diagnostic, Penzberg Kopplung Squarix,Marl
CD45	IgG2a	Ratte	Maus	30-F11	R(PE) Phyco- erythrin	BD Pharmingen, Heidelberg

Tab. 2.1: Monoklonale Antikörper

Immun- globuline	Klasse	Her- kunft	Gegen	Klon	Gekoppelt mit:	Firma
IgG1	IgG1	Ziege	Maus	MOPC-		BD

Isotype Kontrolle				21BD		Pharmingen, Heidelberg
IgG1 Isotype Kontrolle	IgG1	Ziege	Maus	MOPC-21BD	- Cy5.5 - FITC	BD, Heidelberg /Squarix, Marl
IgG1	IgG1	Ziege	Maus	STAR81P	HRP	Serotec, UK
IgG2a Isotype Kontrolle	IgG2a	Ratte		R35-95		BD Pharmingen, Heidelberg
IgG2a Isotype Kontrolle	IgG2a	Ratte		R35-95	- FITC - Cy5.5	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG2a Isotype Kontrolle	IgG2a		Ratte		-Biotinyliert	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG2b	IgG2b	Ratte		A95-1	-PE	BD Pharmingen, Heidelberg

Tab. 2.2: Immunglobuline

Enzym	Firma
β- Galactosidase 629 Units/mg Protein G-4155	Sigma-Aldrich, München

Tab. 2.3: Enzyme

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

Lösungen für den routinemäßigen Gebrauch wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäß in bidestilliertem oder DEPC- behandeltem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

Puffer und Stammlösungen	Zusammensetzung
Beschichtungspuffer	0,01 M Phosphatpuffer NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,145 M NaCl - pH 7,2



Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	1,37 M NaCl 81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 27 mM KCl 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Wasch- und Verdünnungspuffer	0,01 M Phosphatpuffer NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 M NaCl 0,1% Tween20 (PBS) - pH 7,2

**Tab. 2.4: Puffer und Stammlösungen**

### 2.1.6 Medien

Die zur Kultur eukaryotischer Zellen verwendeten Medien wurden käuflich erworben (PAN, Nürnberg) und vor Gebrauch mit FCS (PAN, Aidenbach) versetzt und sterilfiltriert. Für die Zellkultur wurden folgende Medien verwendet:

Zelllinie	Medium	Zusammensetzung
A20 BT474	RPMI 1640	1,0% L-Glutamin 200mM 10,0% FCS 1,0% MEM
MDA-MB-321	DMEM	10% FCS 1% L-Glutamin
A20 BT474 MDA-MB-321	Einfriermedium	50% FCS 40% RPMI-1640 10% DMSO

**Tab. 2.5: Zellkultumeditien**

### 2.1.7 Eukaryotische Zelllinien

**A20** B-Zell Lymphoma Zelllinie

**MDA-MB-231** Humane Mammakarzinomzelllinie, Östrogenrezeptor-negative Zellen (Cailleau *et al.*, 1974)

**BT474** Humane Mammakarzinomzelllinie

Alle Zellen wurden von American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA bezogen.

### 2.1.8 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse der Stämme Balb/cAnNCrl, SCID C.B.-17/ Icr-Prkdc.scid/Crl und Athymic Nude CD1-Foxn1<sup>nu</sup> wurden von der Fa. Winkelmann (Borchen) bezogen. Die SCID-Mäuse des Stammes C.B-17/*Ztm-scid* wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Georg August Universität gezüchtet. Im Alter von fünf bis sechs Wochen wurde das Blut jeder SCID-Maus mittels ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) daraufhin überprüft, ob die SCID-Maus tatsächlich keine Immunglobuline produzieren kann, oder ob es sich um eine „leaky“ SCID (*Ig+*)-Maus handelt. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit dem pelletierten Extrudatfutter 1439 (Altromin, Lage) und autoklaviertem Wasser. Den Tieren, die mittels eXplore Optix untersucht wurden, wurde das Futter GLP Nafag 890 (Provimi Kliba AG, Kaiseraugst) bereitgestellt. Die Nacktmäuse erhielten mit HCl auf pH 2,5 angesäuertes Wasser. Die Tiere wurden je nach Gruppengröße in Macrolonkäfigen Typ 2 und 3, die mit Filterhauben versehen waren, auf staubfreier Einstreu S 8/15 (Fa. Sniff, Soest) gehalten. Das Wasser und die Einstreu wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Die Temperatur in den Tierräumen betrug  $21 \pm 2^\circ\text{C}$  bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 15\%$ . Während der gesamten Versuchsdauer unterlagen die Mäuse einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus.

### 2.1.9 Computerprogramme

Bildverarbeitung	Corel Photopaint
ELISA	Microplate Manager 5.2, Biorad, München
eXplore Optix	Analysis Workstation
FACS-Analyse	CELLquest Software, Becton Dickinson, Heidelberg
Konfokales Laser Scan	TCS NT Version 1.6.587
Mikroskop	
NIR-Mikroskop	Software AxioVs40 (Version 4.4.1.0) der Fa. Zeiss
fpVCT	advantage workstation 4.2 woxtools 3.0.2
	Volume Viewer Voxtool 3.0.64u (GE Global Research
	fpVCT-Histo-Programm (C. Dullin, Göttingen)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kopplung der Antikörper

Die Kopplung der Antikörper wurde von der Firma Squarix GmbH (Marl) durchgeführt. Monoklonale Antikörper wurden mit mono-reaktivem NHS-Cy5.5 Ester (GE Healthcare) und/oder  $\beta$ -D-Galaktosidase (Sigma) mittels Thioether-Kopplung durch heterobifunktionellen SMCC Crosslinker gekoppelt. Zur Reinigung wurde eine Gelchromatographie mit anschließender präparativer Gelfiltration durchgeführt. Das Kopplungsverhältnis der Antikörper zum Enzym betrug 1:4 Gewichtseinheiten, was einem molekularen Verhältnis von 1:1 entspricht.

### 2.2.2 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.2.1 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl und Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden diese mit Trypanblau (nur tote Zellen nehmen den Farbstoff auf) 1:10 verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Durch ein inverses Mikroskop (Telaval 31, Zeiss) wurden die ungefärbten Zellen in den vier Feldern der Kammer gezählt und der Durchschnittswert ermittelt. Dieser Wert, multipliziert mit dem Verdünnungs- und Kammerfaktor, ergab wiederum die Zellkonzentration pro ml.

#### 2.2.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Die routinemäßige Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht) in einem Heraeus (Hanau) BBD 6220-Brutschrank mit Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt. Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank (Tecnoflow, Integra Biosciences, Fernwald) durchgeführt und die Medien und Zusätze vor Verwendung in einem Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hänigsen) auf 37°C erwärmt. Der Mediumwechsel wurde bei allen Zelllinien im Abstand von zwei bis drei Tagen durchgeführt. Bei Konfluenz der adhärennten Zellen in der Kulturflasche wurde eine Subkultivierung vorgenommen.

MDA-MB-231-Zellen und BT474-Zellen wurden in oberflächenbehandelten Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden mit einer 5 mM EDTA - Lösung (Gibco, Karlsruhe) so lange inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche

gelöst hatten. Nach dem Ablösen der Zellen wurden 1:2 bis 1:5 Verdünnungen der Zellsuspension in frischem Medium hergestellt und weiter kultiviert.

A20-Zellen wurden 5 min bei 380 x g zentrifugiert, nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) in Gewebekulturflaschen kultiviert. In Abhängigkeit von der Proliferationsrate wurden die Zellen ein- bis zweimal pro Woche aufgeteilt.

### **2.2.2.3 Präparation von Zellen für tierexperimentelle Arbeiten**

Einen Tag vor der Implantation wurden die erforderlichen Zellen wie in 2.2.2.2 kultiviert und adhärenente Zellen trypsinisiert und verdünnt ausgesät und nicht nicht-adhärenente bei 1000 x g zentrifugiert und erneut ausgesät, um ein exponentielles Wachstum bei Implantation der Zellen zu gewährleisten. Am Versuchstag wurden die adhärenente Zellen erneut trypsinisiert, mehrfach mit Vollmedium gewaschen und die Zellzahl - wie unter 2.2.2.1 beschrieben - bestimmt. Dann wurde das Suspensionsvolumen, welches die erforderliche Zellzahl beinhaltete, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 1000 x g zentrifugiert und pelletiert. Die Medienüberstände wurden abgenommen und die Zellen wurden mit den erforderlichen Volumina sterilen PBS überschichtet.

### **2.2.2.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zentrifugiert bei 380 x g, 5 min und anschließend in eiskaltem, sterilfiltriertem Einfriermedium so resuspendiert, dass eine Zelldichte von  $4 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml resultierte. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und in einer Einfrierbox bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach einem Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Die Rekultivierung der Zellen erfolgte durch rasches Auftauen in einem  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad. Die aufgetaute Zellsuspension wurde sodann in ein 15 ml Falconröhrchen mit PBS überführt, die Zellen zentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtem Komplettmedium aufgenommen und in einen Zellinkubator überführt.

### **2.2.2.5 Inkubation der Zellen mit den Antikörpern**

Adhärenente MDA-MB-231-Zellen wurden auf einem Objektträger mit 8 Kammern (Lab-Tek, Stadtlöh) mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro well mit 200  $\mu\text{l}$  DMEM Medium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und 100  $\mu\text{l}$

frisches Medium zugegeben. Nach Zugabe von 5 µg/ml anti-uPAR\*FITC oder anti-uPAR\*FITC\*β-D-Galactosidase erfolgte die Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen. Die nicht adhärenen A20-Zellen wurden in einer 96-Well-Platte mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro well mit 100 µl RPMI Medium kultiviert. Nach Zugabe von 20 µg/ml anti-CD19\*FITC oder anti-CD19\*FITC\*β-D-Galactosidase wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde 1 µl SYTO61 (Molecular Probes, Oregon USA; 0,5 mM) zugegeben und im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C für weitere 10 min inkubiert. Die A20-Zellen wurden bei 860 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Die A20-Zellen wurden in 10 µl PBS resuspendiert, auf einen Objektträger pipetiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Proben wurden im Konfokalen Laser Scan Mikroskop im FITC/TRITC Kanal fotografiert.

#### **2.2.2.6 Bestimmung der Aktivität von β-D-Galaktosidase *in vitro***

MDA-MB-231 Zellen wurden in 96-Well-Platten mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well in 200 µl DMEM Medium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und 100 µl frisches Medium zugegeben. Die Inkubation mit 5 µg/ml anti-uPAR\*β-D-Galactosidase erfolgte im Brutschrank. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden 5 mg/ml DDAOG-Galaktosid Substrat (Molecular Probes, Oregon USA) hinzugefügt und die Proben sofort im eXplore Optix bei 670 nm gemessen. Nach enzymatischer Spaltung des Galaktosides durch β-D-Galaktosidase entsteht fluoreszierendes DDAOG, dessen Intensität im eXplore Optix bestimmt wurde.

#### **2.2.2.7 Durchflußzytometrie (FACS)**

Vor der Durchflußzytometrie wurden  $1 \times 10^6$  A20-Zellen zunächst in FACS-Puffer (2% FCS + 0,02% NaN<sub>3</sub> in PBS) gewaschen und anschließend bei 4°C für 30 min mit je 0,5 mg/ml IgG1\*FITC oder 0,2 mg/ml CD45\*PE oder IgG2b\*PE 20 µg/ml anti-CD19\*FITC direkt markiertem Antikörper in FACS-Puffer inkubiert. Nach zwei finalen Waschschritten wurden die Zellen auf einem FACSCalibur Durchflußzytometer unter Verwendung der CELLquest Software (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte über eine nichtgefärbte Probe (Autofluoreszenz). Die Bestimmung der unspezifischen Färbung der Zellen erfolgte über Immunglobuline aus der gleicher Antikörperklasse. Dies ist die sog. Isotyp-Kontrolle, da diese

Immunglobuline über keine spezifischen Bindungstellen verfügen. Die Proben wurden direkt im Anschluss an die Färbung gemessen.

### **2.2.3 *In vivo*-Experimente**

Bei diesen Experimenten handelt es sich um einen Tierversuch nach §7 des Tierschutzgesetzes in der Fassung von 1998, der mit der Tierversuchsnummer 509.42502/01-05.04 und 509.42502/01-41.03 bei der Bezirksregierung Braunschweig registriert ist.

#### **2.2.3.1 Orthotope Implantation von MDA-MB-231-Zellen**

Für die orthotope Transplantation in weibliche SCID-Mäuse wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 25  $\mu$ l in PBS suspendiert und in eine sterile Insulinspritze (BD, Heidelberg) aufgezogen. Die Operation der Mäuse erfolgte unter einer intraperitoneal applizierten Ketamin/Xylazin-Narkose in einer Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 75 mg/kg Körpergewicht Ketamin. Zur besseren Dosierung wurde das Ketamin/Xylazin-Gemisch mit steriler Kochsalzlösung 1:1 verdünnt. Die narkotisierten Mäuse wurden unter einer Sterilbank in Rückenlage mittels Leukosilk fixiert, die Oberhaut im Bereich des rechten Oberschenkels eröffnet und der Mammakomplex zur besseren Sichtkontrolle vorgelagert, einschließlich die Zellen wurden in den rechten, vierten Mammakomplex mittels Insulin Spritze langsam injiziert. Um ein Herauslaufen der Tumorzellen zu verhindern, wurde die Spritze erst nach ca. 30 sec entfernt. Nach Zurückverlagerung des Mammakomplexes wurde die Oberhaut in einer Schicht mit drei bis vier Einzelheften mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl 4-0, Firma Ethicon, Norderstedt) verschlossen. Am Anfang der Narkose wurden die Augen der Mäuse mit Augen- und Nasensalbe (Roche Pharma, Mannheim) bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die Käfige wurden nach der Operation für circa 30 min auf eine Wärmeplatte gestellt. In Abständen von jeweils drei Tagen wurden Gewicht und Allgemeinzustand der Tiere dokumentiert.

#### **2.2.3.2 Intrakardiale Implantation von MDA-MB-231-Zellen**

Die Tumorzellen und Tiere wurde wie im Punkt 2.2.3.1 für die Implantation vorbereitet.  $5 \times 10^5$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert. Die Maus wurde in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Links im dritten Inercostalraum wurde neben dem Sternum

ein kleiner Hautschnitt angelegt. Durch diesen wurde mit einer 26G-Nadel das Herz punktiert (im Konus der Kanüle war Blut sichtbar) und die Zellen wurden appliziert. Zum Zeitpunkt der Implantation waren die Mäuse 6-8 Wochen alt.

### **2.2.3.3 Intravenöse Implantation von A20-Zellen**

Bei diesem Versuch wurden weibliche 6-8 Wochen alt Balb/c-Mäuse verwendet. Einen Tag vor der Implantation wurden die Zellen mit neuem Medium gesplittet, um ein exponentielles Wachstum zu gewährleisten. Am Versuchstag wurden die Zellen zunächst mit EDTA inkubiert und mehrfach mit Vollmedium gewaschen und die Suspensionsvolumina, welche die erforderliche Zellzahl beinhalteten, in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 800 x g zentrifugiert und pelletiert. Der Medienüberstand wurde abgenommen und  $5 \times 10^5$  Zellen in 150  $\mu$ l sterilen PBS kurz vor der Implantation aufgenommen. Die Zellen wurden mit einer 26G-Nadel in die Schwanzvene der Maus injiziert.

### **2.2.3.4 Gabe von Substanzen**

Antikörper, Immunglobuline, Prodrug, Drug, Puffer, DDAOG und auch Kontrastmedium wurden den Mäusen intravenös (i.v.) in die Schwanzvene unter 1-2% Isofluranbetäubung verabreicht.

### **2.2.3.5 Bestimmung der Konzentration des Antikörpers im Serum mittels ELISA**

Nach i.v. Injektion von 50  $\mu$ g Antikörper wurde ein Mal täglich durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und in heparinisierte Gefäße überführt. Das Blut wurde für 30 min bei 4°C gehalten, bevor es für 30 min bei 390 x g zentrifugiert. Das Serum wurde entnommen und bei -20°C eingefroren.

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration im Mäuseserum nach i.v. Gabe von 50  $\mu$ g Antikörper erfolgte mittels ELISA. Die zu bestimmende Substanz bindet zunächst an einen spezifischen Antikörper, der an einer Kunststoffoberfläche immobilisiert vorliegt. Im zweiten Schritt reagiert die gebundene Substanz mit einem sekundären Enzym-markierten Antikörper. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats zum Reaktionsansatz können die Immunkomplexe sichtbar gemacht und photometrisch anhand einer Standarddeichkurve quantifiziert werden.

### **2.2.3.5.1 Bestimmung der anti-CD19 Antikörper im Mäuseserum**

Maxi Sorb 96-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden mit 100 µl/Well Maus anti-Ratte IgG2a (Becton Dickinson, Heidelberg) 1:200 verdünnt in PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Mal mit PBS/Tween 0,05% 200 µl/Well gewaschen und anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA in 200 µl PBS pro Well für 30 min bei 37°C geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05%-igem PBS/Tween wurden 100 µl 1:100 verdünntes Mäuseserum in jedes Well pipettiert und für 90 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Es wurde mit dem Ratte-anti-CD19 Antikörper eine Eichkurve, 50 µg/ml, 1:90 in 1% Mäuseserum verdünnt erstellt. Verwendet wurden Konzentrationen von 555 ng/ml bis zu 34 ng/ml. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit PBS/Tween gewaschen. Es wurde ein Sekundärantikörper anti-Ratte IgG2a/biotinyliert (Becton Dickinson, Heidelberg), in einer Verdünnung von 1:200 in PBS, 100 µl/Well hinzugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit PBS/Tween gewaschen. Eine Farbkopplung wurde durch Zugabe und 90-minütige Inkubation mit 100 µl 1:2000 Avidin/Horseradish Peroxidase (Dako, Hamburg) pro Well erreicht. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurden 100 µl OPD-Substrat pro Well (OPD Tabletten (Dako, Hamburg; 1 Tablette in 4 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst)) und 1 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliziert und abhängig von der Farbentwicklung bis zu 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl/Well gestoppt und die Platte anschließend im ELISA-Reader (Mikrotek, Overath) bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

### **2.2.3.5.2 Bestimmung der anti-uPAR im Mäuseserum**

Maxi Sorb 96-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden mit 100 µl/Well Maus IgG1 (aus Ziegenserum) (Serotec, UK), in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS, beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Mal mit 200 µl/Well 0,05% PBS/Tween gewaschen und anschließend mit 200 µl 1% BSA in PBS für 30 min bei 37°C blockiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 0,05% PBS/Tween wurden 100 µl 1:500 verdünntes Mäuseserum hinzugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Als Standard wurde der monoklonale humane Antikörper anti-uPAR, 869 µg/ml 1:10000 in PBS verdünnt und in einer Standardreihe von 86,9 ng/ml bis zu 2,5 ng/ml eingesetzt. Nach 90 min wurden die Wells drei Mal mit PBS/Tween 200 µl/Well gewaschen. Es wurde ein Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus IgG1/



Horseradish Peroxidase (Serotec, UK), in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS, 100 µl/Well hinzugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurde die ELISA-Platte drei Mal mit 200 µl/Well PBS/Tween gewaschen. Nach der Zugabe von 100 µl/Well OPD-Substrat (1 OPD Tablette, Dako, Hamburg, in 4 ml bidestilliertem Wasser gelöst) plus 1 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, erfolgte eine Inkubation von bis zu 30 min, je nach Farbentwicklung. Die Reaktion wurde mit 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µl/Well beendet. Die Auswertung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm.

### **2.2.3.6 Klinische Chemie**

Alle Parameter wurden in der Abteilung für klinische Chemie des Universitätsklinikums der Georg August Universität Göttingen bestimmt. Die Parameter: Alkalische Leukozyten Phosphatase, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Kreatinin, Harnsäure, Laktat-Dehydrogenase, Bilirubin und Harnstoff wurden im Modular-Systems Roche/Hitachi gemessen. Das Blutbild wurde im Coulter Ac-T5 (Beckmann) gemessen.

### **2.2.3.7 Sektion**

Zum Versuchsende wurden die Mäuse mit hoch konzentriertem Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Zur Blutgewinnung wurde den tief betäubten Tieren durch intrakardiale Punktion Blut entnommen. Sofort nach der Entnahme wurde das Blut in Röhrchen gefüllt, die mit Heparin oder EDTA beschichtet waren. Jede Sektion wurde ausführlich protokolliert und zusätzlich photographisch festgehalten. Alle Tiere wurden makroskopisch auf das Vorhandensein von Tumoren untersucht, anschließend wurde die Bauchhöhle median eröffnet und Leber, Milz und Nieren mit den assoziierten Nebennieren entnommen. Nach Eröffnung der Brusthöhle wurden alle veränderten Gewebe entnommen, protokolliert und histologisch aufgearbeitet. Leber und Milz wurden gewogen. Die Tumorgrößen wurden mit Hilfe einer Schieblehre und der Formel Tumorumfang  $V = 1/2 \times \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe}$  ermittelt. Von allen weiteren Organen wurden Proben genommen und asserviert. Die Milz wurde gewogen. In die Lunge wurde über die Trachea mittels Kanüle 4%-iges Formalin in PBS gefüllt und diese anschließend entnommen.

### **2.2.3.8 Organpräparation**

Die bei der Sektion entnommenen Tumoren wurden halbiert und eine Hälfte wurde über Nacht formalinfixiert (4% Formalin in PBS), die andere Hälfte wurde in ein Einfriergefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt. Alle anderen Gewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme über Nacht formalinfixiert. Die Tumoren, Lymphknoten, Lunge nach Entfernung des Herzens, Leber und Milz wurden in Gänze eingebettet. Von der linken Niere wurde ein Längsschnitt, von der rechten Niere ein Querschnitt angefertigt und eingebettet. Die Gewebestücke wurden für eine halbe Stunde gründlich unter fließendem Leitungswasser gewässert und über Nacht in einem Entwässerungsgerät dehydriert. Knochen wurden wie im Abschnitt 2.2.3.8 vorbereitet, mit dem Unterschied, dass sie nach Formalinfixierung 3 h in New Deal Lösung (Mediate, Burgdorf) entkalkt wurden.

drei Mal	1 h	75% Ethanol
zwei Mal	1,5 h	96% Ethanol
drei Mal	1,25 h	100% Ethanol
zwei Mal	2 h	Xylol
zwei Mal	1 h	Paraffin, Schmelzpunkt 60°C

**Tab. 2.6: Maschinelle Entwässerung.**

## 2.2.4 Histologische Untersuchungen an Tumorgewebe-Präparaten

### 2.2.4.1 Herstellung von Paraffin und Kryoschnitten aus Tumorgeweben und Knochen

Aus den tiefgefrorenen Gewebestücken wurden 5 µm Tumorgewebeschnitte angefertigt (Mikrotom, Mikrom; Sandhausen).

Die Paraffinschnitte wurden auf einem Rotationsmikrotom (Mikrom, Sandhausen) in einer Dicke von 2,5 µm angefertigt und auf Objektträger (Superfrostplus, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen.

### 2.2.4.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung von Paraffin-fixierten Gewebeschnitten

Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Zellkerne färben sich hierbei blau. Alle anderen Zellstrukturen werden durch Eosin rötlich gefärbt. Vor jeder Färbung wurden die Paraffinschnitte über Nacht bei 37°C im Brutschrank erwärmt, um ein besseres Haften der Objekte am

Objektträger zu gewährleisten. Die Gewebeschnitte wurden zunächst für zwei Mal 10 min in Xylol-Ersatz entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe für jeweils 2 min rehydriert. Die Färbung erfolgte zunächst für 5-10 min in Hämalaun. Anschließend wurde gründlich mit H<sub>2</sub>O gespült und 5-10 min mit Eosin-Färbelösung (Eosin-Stammlösung 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt) gegengefärbt. Die Gewebeschnitte wurden in H<sub>2</sub>O gespült, dehydriert (50%, 70%, 90%, 100% Ethanol) und nass mit Eukit eingedeckt.

### **2.2.4.3 NIR- mikroskopische Analyse von Tumorgewebepräparaten**

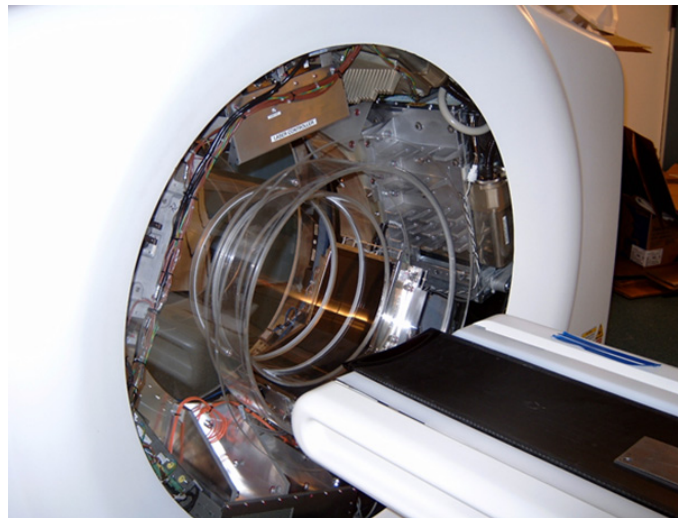
Für die Untersuchungen der Kryoschnitte wurde ein NIR Mikroskop verwendet. Die Kryoschnitte wurden mit Deckmedium mit DAPI eingedeckt, das die Zellkerne blau färbt. Das NIR-Mikroskop Axiovert 200M der Fa. Zeiss ist mit einer ORCA-ER Hamamatsu Digital-Kamera ausgestattet und ermöglicht Aufnahmen im Absorptions- und Emissionswellenlängen-Bereich von Cy5.5. Die Aufnahme und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit der Software AxioVs40 (Version 4.4.1.0) der Firma Zeiss.

### **2.2.5 Bildgebende Verfahren**

#### **2.2.5.1 Untersuchungen mit dem Flächendetektor Volumen Computer Tomographen (fpVCT)**

Alle Untersuchungen wurden an einem fpVCT durchgeführt. Das hier verwendete fpVCT der Firma GE (General Electric Global Research Centers, Niskayuna, NY, USA) ist ein nichtklinischer Prototyp eines CT's, das im Gegensatz zu den klinisch eingesetzten Multi-Slice-Systemen statt mit mehreren Liniendetektoren mit einem bzw. zwei Flächendetektoren ausgestattet ist. Diese Flächendetektoren bestehen aus 1024 x 1024 Detektorelementen hinter einer gemeinsamen Szintillationsschicht. Die Größe eines solchen Detektorelementes beträgt 200 x 200 µm<sup>2</sup>. Das System besitzt eine Standard-Gantry und einen kegelförmigen Strahlengang. Das fpVCT wird im Axial-Mode betrieben, d.h. es wird bei stehendem Untersuchungstisch ein 4,2 cm langer und 12,8 x 12,8 cm breiter Bereich abgebildet. Bei den hier vorgestellten Untersuchungen wurden die Mäuse orthogonal zur Z-Achse des Systems innerhalb eines solchen 4,2 cm Abschnitt platziert und konnten somit mit einer Rotation untersucht werden (Abb. 2.1). Zur Durchführung der Untersuchungen wurden die Mäuse unter 1 - 2% Isofluran Anästhesie auf dem Objektlagerungstisch fixiert. Bei Aufnahmen mit Kontrastmittel

wurden exakt 20 Sekunden vor Beginn der Datenaufnahme 150 µl Isovist300 (Schering, Berlin) i.v. in die Schwanzvene der Maus appliziert. Folgende Scan-Parameter wurden standardisiert verwendet: Röhrenspannung von 80 kV und Röhrenstrom von 100 mA bei 1000 Projektionsbildern pro Rotation. Die Rekonstruktion der aufgenommenen Daten erfolgte mit einem angepassten Feldkamp – Algorithmus der auf einem Parallelrechner implementiert war. Die erzielten dreidimensionalen Datensätze hatten folgende Eigenschaften: Bildmatrix 512 x 512, Schichtanzahl (abhängig vom gewählten „field of view“) und eine isotrope Auflösung (in Abhängigkeit vom gewählten „field of view“) im Bereich von 150 µm. Mit Hilfe einer advantage workstation 4.2 woxtools 3.0.2 (GE Global Research) wurden dann entweder dreidimensionale Darstellungen oder zweidimensionale Schichtdarstellungen generiert, die in allen Ebenen und Winkeln beurteilt werden konnten. Die Segmentierung des Tumors wurde mit Hilfe des Volume Viewer Voxtool 3.0.64u (GE Global Research) durchgeführt. Das Tumolvolumen wurde ebenfalls mit dem Voxtool Programm dreidimensional für den segmentierten Tumor bestimmt.



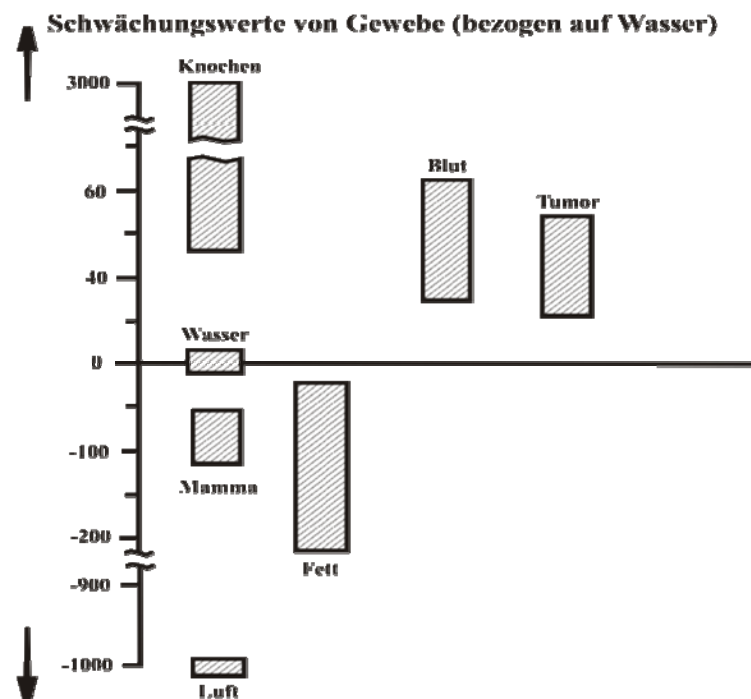
**Abb. 2.1: Fächendetektor Volumen Computer Tomograph.** Bild von Missbach-Güntner (2007).

Die Daten des so segmentierten Tumors wurden dann wieder in Schichtdaten umgewandelt um diese für weitere Auswertungen in das fpVCT-Histo-Programm von C. Dullin (Universitätsklinikum Göttingen, Abt. Radiologie) zu übertragen. Dieses Programm errechnet aus fpVCT-Daten die Histogramme für die Tumoren. Die Hounsfield-Skala ist eine in der Computertomographie verwendete Einheit, die von Godfrey Hounsfield erhoben wurde (1967). Dabei wird die Schwächung der Röntgenstrahlung in bestimmten Geweben bestimmt. So können die pathologischen

Abweichungen von gesunde Geweben determiniert werden (Abb. 2.2). Die Hounsfield-Einheit wird nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{CT-Zahl in Hounsfield-Einheit}] (\mu_{\text{Gewebe}}) := \frac{\mu_{\text{Gewebe}} - \mu_{\text{Wasser}}}{\mu_{\text{Wasser}} - \mu_{\text{Luft}}} \cdot 1000$$

Dabei beschreibt der Adsorptionskoeffizient  $\mu$  die Abschwächung der monochromatischen Röntgenstrahlung beim Durchdringen von Materie entlang des durchstrahlten Weges.



**Abb. 2.2: Relative Schwächungskoeffizienten bezüglich Wasser (Hounsfield-Einheiten) für einige typische Gewebearten.** Wasser hat dabei die Hounsfield-Einheit 0 während die vitalen Tumoren etwa 20-50 Hounsfield-Einheiten besitzen. Bei den fpVCT Messungen wurden die Messbereiche auf -200 bis 200 Hounsfield-Einheiten beschränkt. Kang (2007).

### 2.2.5.2 Molekulare Bildgebung mittels eXplore Optix-Systems

Das eXplore Optix-System (GE Medical Systems, USA; Abb. 2.2) wurde zur Charakterisierung, Quantifizierung und bildlichen Darstellung von NIR-Fluoreszenzmarkierten Antikörpern in lebenden Tieren verwendet. Die molekulare *in vivo*-Bildgebung mittels eXplore Optix ermöglicht die Durchführung von Langzeitstudien in ein und demselben Tier, wodurch präzise Daten zu operativen Eingriffen, Tumor-Wachstumsverläufen und Behandlungsergebnissen erhoben werden können.

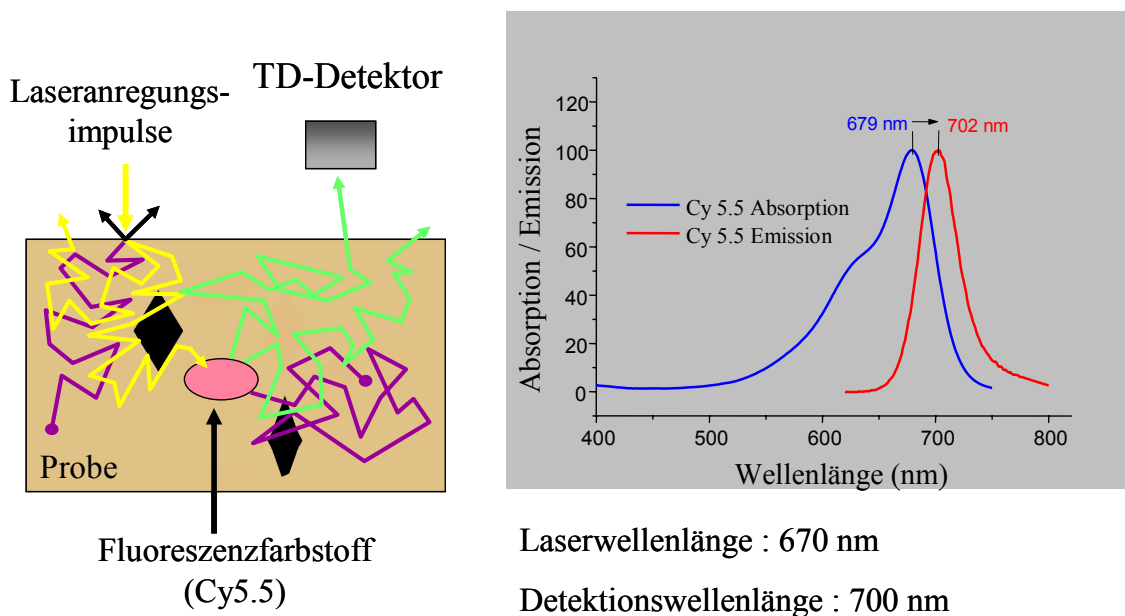


**Abb. 2.3: Das eXplore Optix-System.** Bildquelle: ART, Canada.

Das System arbeitet in einem Raster-Modus, wobei der kleinste Rasterabstand 0,5 mm beträgt. Jeder Rasterpunkt wird dabei mit einer Vielzahl kurzer Laserimpulse bestrahlt und die Zeit zwischen Einstrahlung und Detektion eines Fluoreszenzphotons mit Hilfe eines zeitaufgelösten Einzelphotonenzählers gemessen. Aus dem dabei entstehende Fluoreszenzphotonen-Laufzeithistogramm (TPSF, *temporal point spread function*) können dann die Intensität der Fluoreszenzstrahlung, Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes bezogen auf die mittlere Tiefe der Farbstoffverteilung und die Lebensdauer des Fluoreszenzübergangs bestimmt werden. Die Durchdringung der Anregungs- bzw. Fluoreszenzstrahlung liegt dabei im Bereich von ca. 1 bis 2 cm, so dass orthotope Tumormodelle in Mäusen ohne weiteres untersucht werden können. Die Untersuchungszeit im Gegensatz zum fpVCT bewegt sich eher im Bereich von 10 bis 20 min je nach gewähltem Messfeld. Zur Durchführung der Untersuchungen wurden die Mäuse zunächst mittels 1 - 2% Isofluran Anästhesie narkotisiert und auf dem Untersuchungstisch fixiert. Um die Körpertemperatur der Mäuse konstant zu halten, wurde der Untersuchungstisch auf ca. 39°C geheizt. Die für die Untersuchung verwendete Laserwellenlänge betrug 670 nm, wobei die Detektionswellenlänge bei 700 nm lag. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5, der an die Antikörper gekoppelt wurde, besitzt ein Absorptionsmaximum von 679 nm und ein Emissionsmaximum von 702 nm (Abb. 2.4). Beim Messvorgang wird durch das eXplore Optix-System die sog. *time-correlated single photon counting*-Technik mit zeitkorrelierter Zählung einzelner Photonen zur Messung von Fluoreszenz und Absorption verwendet. Mit Hilfe dieser Technik wurde die Photonenmigration kurzer Lichtimpulse bei spezifischen

Wellenlängen detektiert. Die Verteilung der Ankunftszeiten der Impulse können gemessen und anschließend zur Quantifizierung des Fluoreszenzemitters sowie zur Angabe der Fluoreszenzlebensdauer verwendet werden.

Fluoreszenzlebensdauer: Fluoreszenz ist der Übergang eines metastabilen angeregten Zustandes eines Atoms in den Grundzustand unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons. So ist nicht nur die Wellenlänge des Photons sondern auch die mittlere Lebensdauer dieses Niveaus eine charakteristische Größe des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Messung der Lebensdauer durch das System ermöglicht es, das Fluoreszenzsignal des Cy5.5 von der Autofluoreszenz z.B. des Futterpellets zu unterscheiden.



**Abb. 2.4: Fluoreszenzfarbstoffmessung mit Hilfe des eXplore Optix-Systems.** Bildquelle: GE Healthcare, modifiziert.

Bei der eXplore Optix-Messung sind die Auflösung des Rasters, die Messzeit pro Rasterposition (Integrationszeit  $T_I$ ) und die Laser-Leistung ( $L_L$ ) wählbar. Es wurde folgendes Scanprotokoll verwendet: Für alle Tiere wurde, zur Bestimmung der Maximalen Fluoreszenzsignalausbeute, zuerst ein schneller Übersichtsscan mit einer geringen Laser-Leistung von ca.  $L_L = 10 \mu\text{W}$ , einer Rasterauflösung von 2 mm und einem  $T_I = 0,2$  sek durchgeführt. Anschließend wurde jeweils das Tumorareal hochauflösend mit angepasster Laserleistung untersucht, so dass die Fluoreszenzausbeute in den optimalen Dynamikbereich des Detektorsystems fällt. Die

mittleren Parameter für diese Scans waren Rasterauflösung von 1 mm,  $T_1 = 1$  sek und  $L_L = 50 - 100 \mu\text{W}$ .

Die gemittelte Konzentration (*Average Concentration*) stellt die Intensität als totale Anzahl der gemessenen Fluoreszenzphotonen dar. Durch Auswertung der Peak-Position der TPSF-Kurve kann die mittlere Tiefe, aus der das Fluoreszenzsignal kommt, bestimmt werden. Da die Tiefe bei der gemessenen Intensität berücksichtigt wurde, kann weiterhin auch eine relative Konzentration des Farbstoffes in dieser Tiefe errechnet werden. Um Fehler bei den Konzentrationsmessungen zu unterdrücken, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Konzentration immer in einem bestimmten Messfeld bestimmt und somit über mehrere Messpunkte gemittelt. Die gemittelte Konzentration ist somit eine relative Konzentrationsmessung, gemittelt über das gewählte Messfeld und geteilt durch die dort vorhandene Messpunktanzahl.

### **2.2.6 Statistik**

Die in dieser Arbeit realisierte statistische Auswertung wurde mittels Microsoft Excel durchgeführt. Box Plot-Graphiken wurden mit dem Programm *Past* Version 1.44 durchgeführt. Die Signifikanz des Unterschiedes der Mittelwerte zwischen jeweils zwei Gruppen wurde mit Hilfe eines ungepaarten Student's t-Test unter Annahme einer normalen Verteilung mittels <http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test.html> berechnet. Als signifikant wurde ein p-Wert von  $p < 0,05$  angenommen.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung eines ADEPT-Konzepts zur Behandlung von Mammakarzinomen

Das ADEPT-Konzept bildet die Grundlage für eine selektive Krebstherapie. Dabei wird der nicht toxische Wirkstoff, das so genannte Prodrug, zu dem toxischen Wirkstoff, dem so genannten Drug, enzymatisch aktiviert. Die Aktivierung erfolgt an der Zelloberfläche der Tumorzellen durch ein Antikörper-Enzym-Konjugat. Monoklonale Antikörper, die an tumorassoziierte Antigene binden, befördern die Enzyme spezifisch an die Tumorzellen. Zur präklinischen Evaluierung des ADEPT-Konzepts wurden Mammakarzinome ausgewählt, da sie eine große Bedeutung hinsichtlich der Krankheitshäufigkeit beim Menschen haben. In dem hier verwendeten orthotopen Mammakarzinom-Modell diente der gegen humanen Urokinase Plasminogen Aktivator Rezeptor gerichtete Antikörper (anti-uPAR) als Bote, um das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase an den Tumor zu bringen. Als Prodrug wurde das *anti-methyl-seco-CBI-DMAI*-Prodrug verwendet, welches auf Basis des biologisch hochaktiven Zytostatikums CC-1065 synthetisiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst einzelne Komponenten des ADEPT-Konzepts *in vitro* und *in vivo* untersucht, sowie die Wirksamkeit dieses Konzepts auf das Tumorwachstum im Mammakarzinom-Tiermodell evaluiert.

#### 3.1.1 *In vitro*-Studien an Mammakarzinom-Zellen zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts

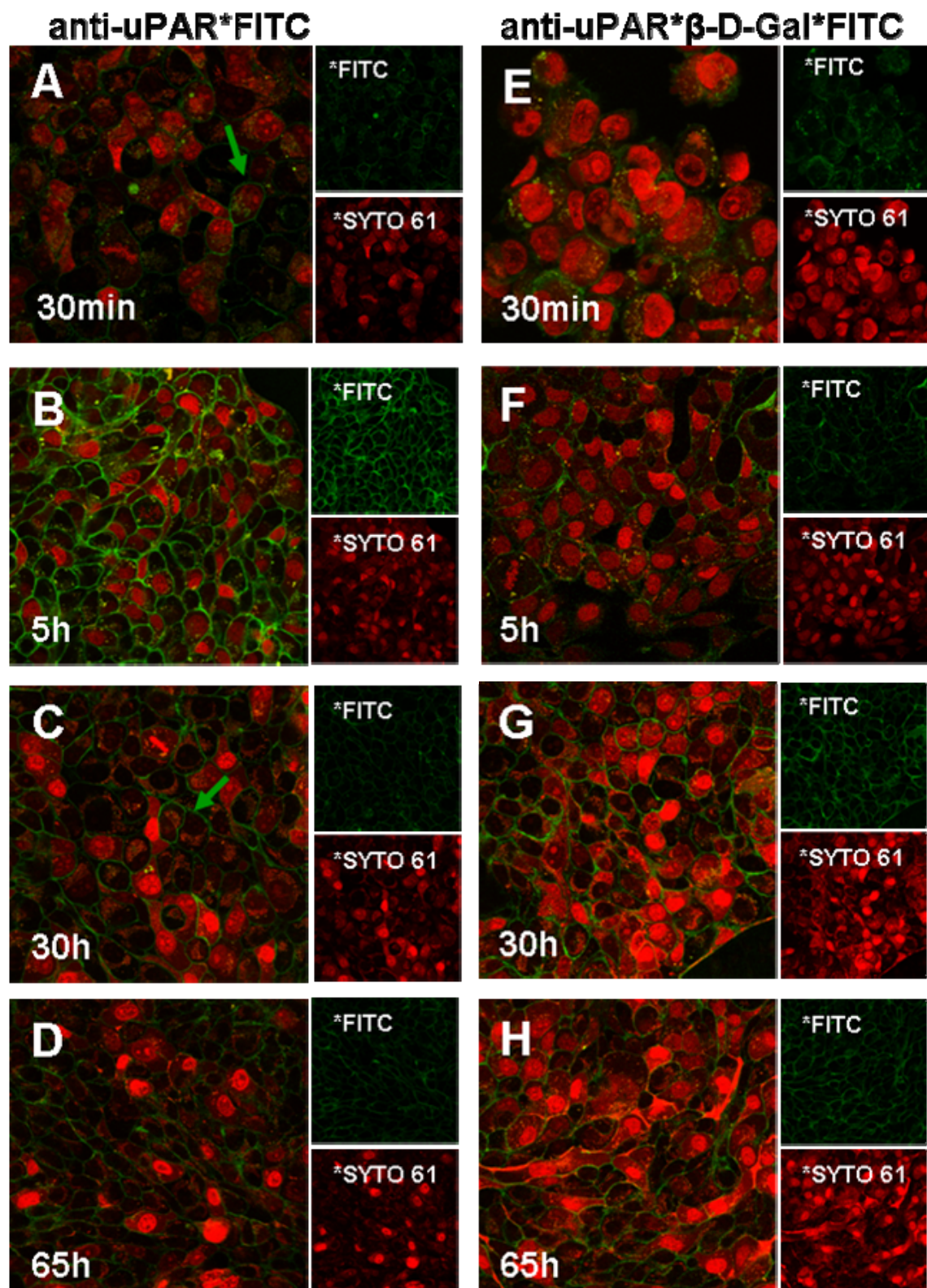
Für die Etablierung des Tumor-Tiermodells wurden humane Brusttumorzellen orthotop in die Brustdrüsen weiblicher SCID-Mäuse implantiert. Die dabei verwendeten MDA-MB-231-Zellen exprimieren an der Zellmembranoberfläche das spezifische Antigen CD87, den sogenannten uPAR, der eine Rolle bei Invasion und Metastasierung spielt. Der spezifische, gegen den humanen uPAR gerichtete, monoklonale Antikörper anti-uPAR wurde für den Einsatz im ADEPT-Konzept mit dem Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase gekoppelt. Der anti-uPAR, der nur gegen humanen uPAR gerichtet ist, kann *in vivo* in der Maus spezifisch nur an humane Tumorzellen binden.

Bevor anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase in dem ADEPT-Konzept *in vivo* eingesetzt werden konnte, wurde *in vitro* die Spezifität, die Dauer der Bindung und die Internalisierung

dieses Antikörpers im Vergleich zu dem anti-uPAR ohne Enzym untersucht. Ebenso wurde die Aktivität der  $\beta$ -D-Galaktosidase in dem Antikörper-Enzym-Konjugat in der Zellkultur mit den Tumorzellen geprüft.

### **3.1.1.1 Bindungsstudien des monoklonalen Antikörpers anti-uPAR\*FITC im Vergleich zu anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*FITC an MDA-MB-231-Zellen**

Um die Bindung von anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase und anti-uPAR an die MDA-MB-231-Zellen *in vitro* zu untersuchen und zu vergleichen, wurden beide Antikörper mit dem Farbstoff FITC markiert. Die Tumorzellen wurden mit 5  $\mu$ g/ml anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*FITC bzw. mit der gleichen Menge anti-uPAR\*FITC in 100  $\mu$ l Zellkulturmedium bei 37°C inkubiert. Schon nach 30 min wurde mittels konfokaler Laser Scan Mikroskopie eine Bindung von anti-uPAR\*FITC und anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*FITC an die Zellmembranen deutlich (Abb. 3.1 A, E). Eine Zunahme der Bindung an die Tumorzellen wurde nach 5 h vor allem für den anti-uPAR\*FITC beobachtet (Abb. 3.1 B, F). Die Bindung des anti-uPAR\*FITC an die Zellen war nach 30 h Inkubation geringer, ist aber bis zu 65 h zu detektieren (Abb. 3.1 C, D). Dagegen nimmt die Bindung des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*FITC zwischen 5 h und 30 h zu und ist bis zu 65 h stabil (Abb. 3.1 F-H). Die Zellmembranen aller Zellen auf den Objektträgern waren ab 5 h Inkubation gleichmäßig mit dem anti-uPAR\*FITC bzw. anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*FITC gefärbt. Eine Internalisierung konnte mit beiden Antikörpern nicht nachgewiesen werden (Tab. 3.7). Die Färbung der Zellkerne mit SYTO61 zeigte, dass die Tumorzellen intakte Zellkerne hatten. Die Bindungsstudien wurden nur bis zu 65 h durchgeführt, da nur bis zu dieser Zeit die Zellen ohne Mediumwechsel gehalten werden können. Die Bindungsstudien wurden für jeden Antikörper insgesamt drei Mal wiederholt.



**Abb. 3.1: Bindung der Antikörper anti-uPAR\*FITC und anti-uPAR\*β-D-Gal\*FITC an die Zellmembranen von MDA-MB-231-Zellen.** Beide monoklonalen anti-uPAR sind mit FITC markiert (grün) und die Zellkerne wurden mit Syto61 (rot) angefärbt. Die Objektträger wurden

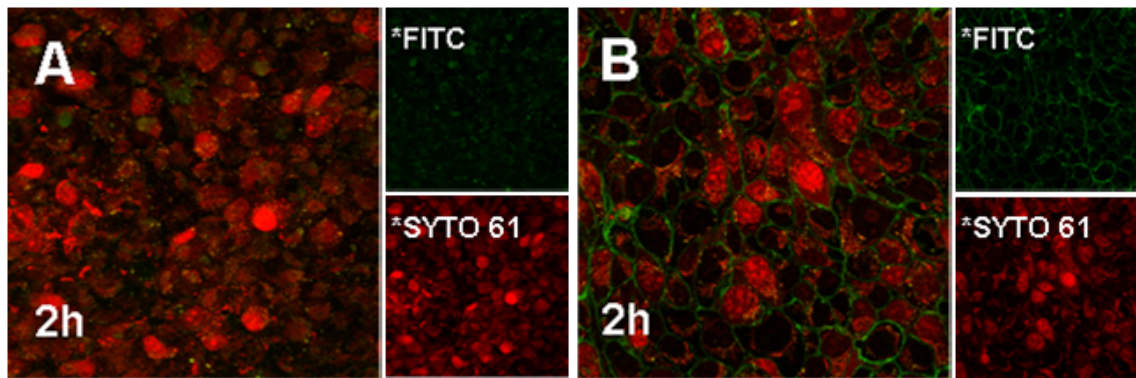
unter einem konfokalen Laser Scan Mikroskop (Leica) mit 40-facher Vergrößerung untersucht. Die Zellen wurden bei 37°C entweder mit 5 µg/ml anti-uPAR\*FITC: (A) 30 min, (B) 5 h, (C) 30 h, (D) 65 h oder mit 5 µg/ml anti-uPAR\*β-D-Gal\*FITC: (E) 30 min, (F) 5 h, (G) 30 h, (H) oder 65 h inkubiert. Die FITC-markierten Antikörper wurden bereits nach 30 min an den Zellmembranen detektiert. Die Bindung von anti-uPAR\*FITC (grüner Pfeil) an die Tumorzellen war nach 5 h am stärksten, nahm nach 30 h ab und blieb bis zu 65 h stabil. Die Bindung von anti-uPAR\*β-D-Gal\*FITC nahm von 5 h bis 30 h zu und blieb dann auch bis zu 65 h stabil. Die Zellen blieben bis zu 65 h vital und es fand keine Internalisierung der Antikörper statt. (n=3).

Inkubationszeit	Bindung		Internalisierung	
	anti-uPAR*FITC	anti-uPAR*β-D-Gal*FITC	anti-uPAR*FITC	anti-uPAR*β-D-Gal*FITC
30 min	+	+	-	-
5 h	+++	++	-	-
30 h	++	+++	-	-
65 h	++	+++	-	-

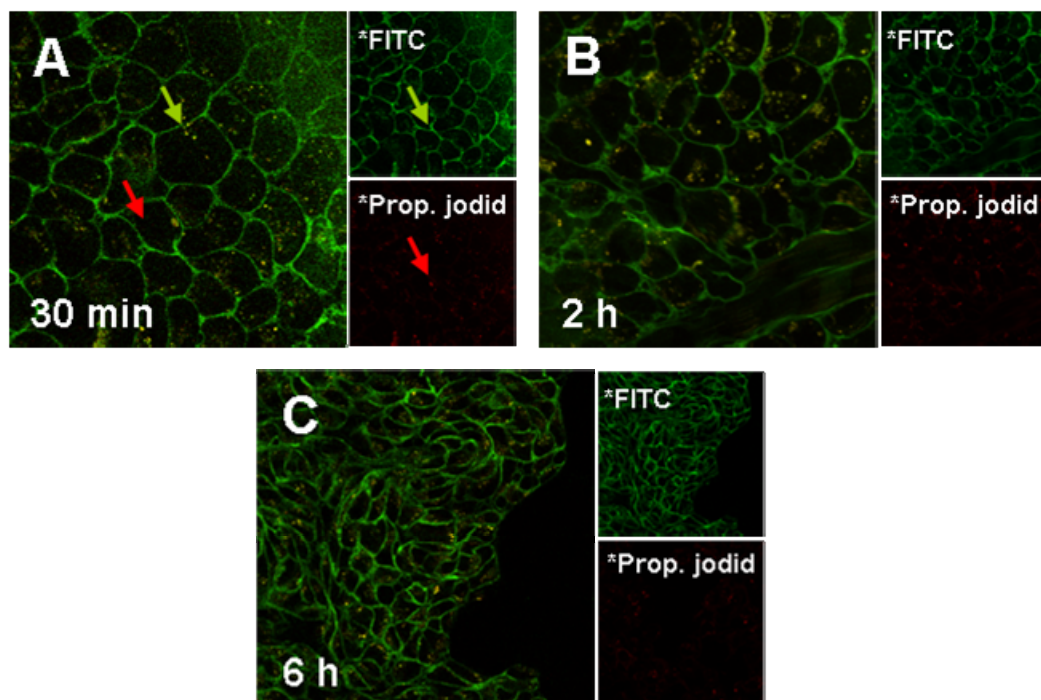
**Tab. 3.7: Bindung und Internalisierung des anti-uPAR\*FITC und anti-uPAR\*β-D-Gal\*FITC in MDA-MB-231-Tumorzellen *in vitro*.** Die Stärke der Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper an die Zellmembranen wurde mittels eines Scores dargestellt: +=Bindung, ++=stärkere Bindung, +++=die stärkste Bindung.

Um die Spezifität der Antikörperbindung zu untersuchen, wurde die Bindung einer Isotyp-Kontrolle des Immunglobulins derselben Klasse wie der anti-uPAR an den Tumorzellen analysiert. Dabei wurde das Immunglobulin IgG1 mit FITC markiert und in einer Konzentration von 5 µg/ml in 100 µl Zellkulturmedium bei 37°C eingesetzt. Im Vergleich zu dem anti-uPAR\*FITC zeigte die Isotyp-Kontrolle nach 2 h keine Bindung an die Membranen von Tumorzellen. Die schwachen Fluoreszenzsignale, die im Zytoplasma zu detektieren waren, deuten auf eine geringe unspezifische Aufnahme des Immunglobulins IgG1\*FITC in die MDA-MB-231-Tumorzellen hin. Diese Ergebnisse zeigen, dass die starke Bindung des anti-uPAR\*FITC nach 2 h an die Zellmembran spezifisch ist (Abb. 3.2 A, B).

Um zu prüfen, ob der anti-uPAR toxisch ist, wurde eine Propidiumjodid-Färbung durchgeführt (Abb. 3.3). Dafür wurde anti-uPAR\*FITC mit MDA-MB-231-Zellen 30 min, 2 h und 6 h inkubiert. In der anschließenden Färbung mit Propidiumjodid konnten nicht mehr tote Zellen nachgewiesen werden, was zeigt, dass das anti-uPAR\*FITC für die Tumorzellen nicht toxisch ist (Abb. 3.3 A, B, C).



**Abb. 3.2: Bindung der Isotyp-Kontrolle, Immunglobulin IgG1\*FITC im Vergleich zu anti-uPAR\*FITC an die Zellmembranen von MDA-MB-231-Zellen.** Der monoklonale anti-uPAR und die Isotyp-Kontrolle wurden mit FITC markiert (grün) und die Zellkerne wurden mit Syto61 (rot) angefärbt. Die Proben wurden unter einem konfokalen Laser Scan Mikroskop (Leica) mit 40-facher Vergrößerung untersucht. (A) Die Zellen wurden bei 37°C 2 h mit IgG1\*FITC (B) und mit anti-uPAR\*FITC bei einer Konzentration von jeweils 5 µg/ml inkubiert. (A) Die Isotyp-Kontrolle zeigt eine schwache unspezifische Anfärbung im Zytoplasma der MDA-MB-231-Zellen, während (B) anti-uPAR\*FITC eine spezifische Bindung an die Zellmembran zeigt.



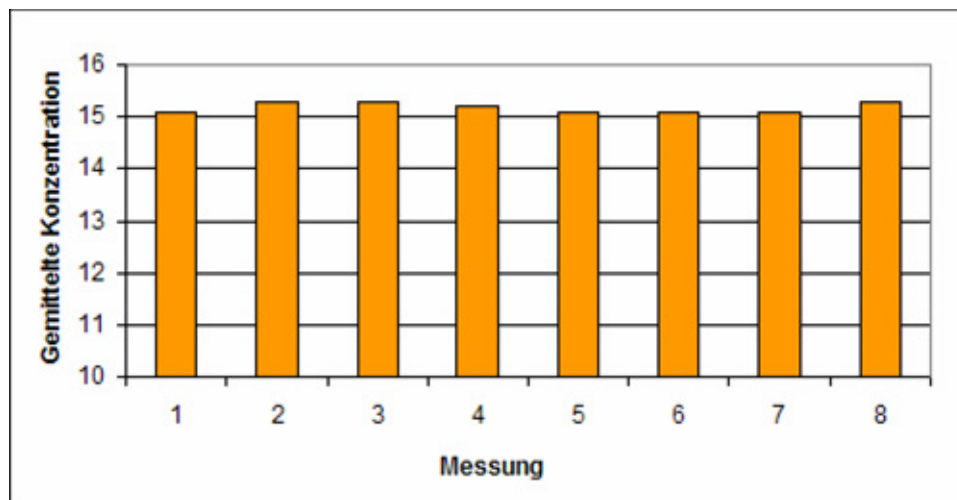
**Abb. 3.3: Untersuchung des toxischen Effektes von anti-uPAR\*FITC auf die MDA-MB-231-Zellen.** Der anti-uPAR wurde mit FITC markiert (grün). Propidiumjodid färbt die abgestorbenen Zellen rot (roter Pfeil). Die Proben wurden unter einem konfokalen Laser Scan Mikroskop (Leica) mit einer 62-fachen Vergrößerung untersucht. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5 µg/ml

anti-uPAR\*FITC: (A) 30 min, (B) 2 h und (C) 6 h inkubiert und anschließend mit Propidiumjodid (Verdünnung 1:100) 10 min lang inkubiert. Anti-uPAR\*FITC bindet an die Zellmembranen, (grüner Pfeil).

### **3.1.1.2 *In vitro*-Nachweis der Enzymaktivität der $\beta$ -D-Galaktosidase in dem mit $\beta$ -D-Galaktosidase gekoppelten Antikörper anti-uPAR mittels optischer Bildgebung**

Der Nachweis der Enzymaktivität der mit dem Antikörper anti-uPAR gekoppelten  $\beta$ -D-Galaktosidase wurde mittels des neuen optischen Bildgebungsverfahrens eXplore Optix durchgeführt. Das eXplore Optix-System (vgl. (2.2.5.2)) wurde für die folgenden Messungen verwendet. Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer durch das System ermöglicht eine Unterscheidung des spezifischen Fluoreszenzsignals des Cy5.5 von der Autofluoreszenz, die bspw. durch das Chlorophyll im Futter bedingt wird. Um die Fluoreszenzsignalstärke darzustellen, wurde als Maß die gemittelte Konzentration verwendet. Diese ist eine relative Konzentration des Fluoreszenzsignals, welche über das gewählte Messfeld gemittelt und durch die dort vorhandene Messpunktanzahl geteilt wird. Sie besitzt keine Maßeinheiten.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der eXplore Optix-Messungen wurde mehrfach ein Kalibrierphantom analysiert. Bei dem Kalibrierphantom handelt es sich um einen Polyethylenblock, in den der Farbstoff Cy5.5 eingeschlossen ist. Dieser Farbstoffeinschluss wurde während eines Tages in zwei Serien jeweils viermal in 10 min Abständen gemessen. Die gemittelte Konzentrationen für diese Messungen wurden im Mittel mit  $15,19 \pm 0,1$  mit einer nur geringen Standardabweichung bestimmt, dargestellt im Abb. 3.4. Dies zeigt, dass die Messungen im Zeitverlauf reproduzierbare Werte ergeben.



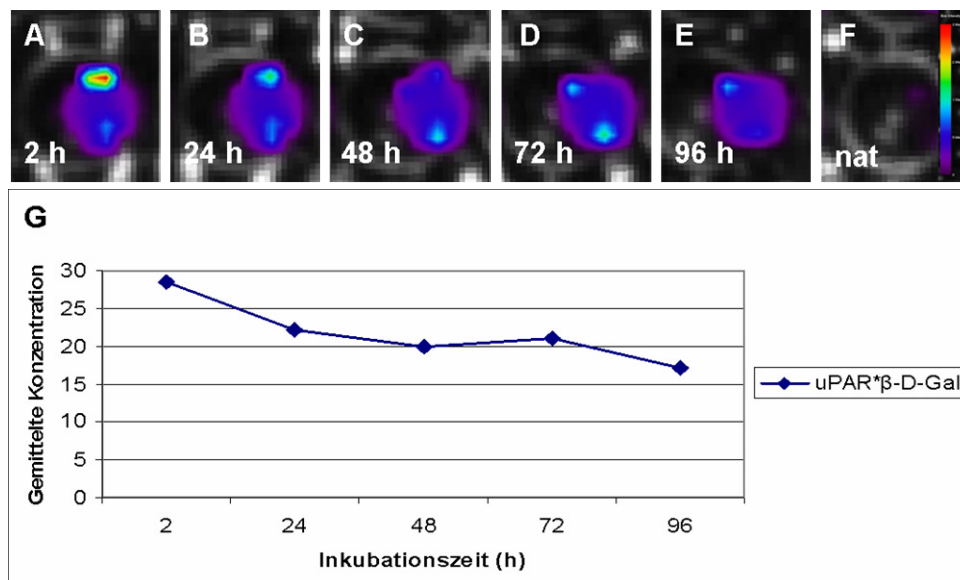
**Abb. 3.4: Überprüfung der Reproduzierbarkeit der eXplore Optix-Messung.** Der Polyethylenblock mit eingeschlossenem Farbstoff Cy5.5 wurde während eines Tages in zwei Serien mittels eXplore Optix gemessen, jeweils viermal in 10minütigen Abständen: Die gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale für diese Messungen wurden im Mittelwert mit  $15,19 \pm 0,1$  bestimmt. Mehrfache Messungen derselben Fluoreszenzquelle gaben reproduzierbare Ergebnisse.

Das eXplore Optix-System misst die Enzymaktivität von  $\beta$ -D-Galaktosidase über eine quantitative Messung von 7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one), das sogenannte DDAO, mittels gepulster Laserdiode bei 670 nm Wellenlänge. Das für dieses Experiment verwendete Enzymsubstrat DDAOG, welches ein Konjugat zwischen  $\beta$ -Galaktose and DDAO darstellt, emittiert auf Grund der Entstehung von freiem DDAO nach der Abspaltung des Zuckerrestes ein Fluoreszenzsignal im NIR Bereich. Je aktiver die  $\beta$ -D-Galaktosidase, desto stärker wird die emittierte Fluoreszenz.

Für die Untersuchung wurden  $2,5 \times 10^4$  MDA-MB-231-Tumorzellen je Well in einer 96-Well-Platte mit 200  $\mu$ l Zellkulturmedium bei 37°C mit 20  $\mu$ g/ml anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und mit 100  $\mu$ l PBS versehen. Anschließend wurde das DDAOG, in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml hinzugegeben und bei 37°C 1 h lang inkubiert. Als spezifische Fluoreszenzlebensdauer für DDAO wurde ein Bereich von  $2,5 \pm 0,2$  ns bestimmt.

Die an den anti-uPAR gekoppelte  $\beta$ -D-Galaktosidase zeigte die höchste Enzymaktivität nach 2 h Inkubation mit MDA-MB-231-Tumorzellen und einen kontinuierlichen Aktivitätsverlust bis 96 h. Nach 96 h wurde eine 1,6 Mal geringere Enzymaktivität gemessen (Abb. 3.5 A-E, G). Die Zellen, die ohne Antikörper-Enzym-Konjugat inkubiert

wurden, aktivierten das DDAOG nicht. Hier konnten keine Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abb. 3.5 F). Dies zeigt, dass die mit anti-uPAR gekoppelte  $\beta$ -D-Galaktosidase auch im Zellkulturmedium an der Tumorzelloberfläche aktiv ist und dass dieses Antikörper-Enzym-Konjugat somit für *in vivo*-Versuche im Rahmen des ADEPT-Konzepts geeignet ist.



**Abb. 3.5:** *In vitro*-Nachweis der Enzymaktivität der mit anti-uPAR gekoppelten  $\beta$ -D-Galaktosidase mittels eXplore Optix. Die MDA-MB-231-Tumorzellen wurden bei 37°C mit 20  $\mu$ g/ml anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal für: (A) 2 h, (B) 24 h, (C) 48 h, (D) 72 h, und (E) 96 h inkubiert. (F) Die ohne Antikörper inkubierten MDA-MB-231-Zellen dienten hierbei als Negativkontrolle. Alle Proben wurden über 1 h bei 37°C mit 5  $\mu$ g/ml DDAOG Substrat inkubiert. Fluoreszenzsignale von DDAO in den Zellen wurden mittels eXplore Optix bei einer Wellenlänge von 670 nm gemessen, um die Aktivität des Enzyms nachzuweisen. Die spezifische Fluoreszenzlebensdauer von DDAO lag im Bereich von  $2,5 \pm 0,2$  ns. (G) Die Enzymaktivitäten wurden als gemittelte Konzentration des DDAO Fluoreszenzsignals gegen die Zeit dargestellt.

### 3.1.2 *In vivo*-Studien zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts am Mammakarzinom-Modell

Um das ADEPT-Konzept *in vivo* als Therapie anzuwenden, mussten folgende Experimente durchgeführt werden. Es wurden hierbei die Tumorzellen MDA-MB-231 verwendet, für die *in vitro* gezeigt werden konnte, dass sie spezifisch anti-uPAR binden. Die humanen Brusttumorzellen MDA-MB-231 wurden orthotop in die Brustdrüse von immundefizienten Mäusen implantiert. Die Beobachtung des



Tumorwachstums diene dazu, den Zeitpunkt zu wählen an dem die Therapie begonnen werden konnte. Die Tumoren sollten schon mittels fpVCT nachweisbar, aber noch nicht zu groß sein, damit auch die unbehandelten Kontrollmäuse die Therapiedauer überlebten.

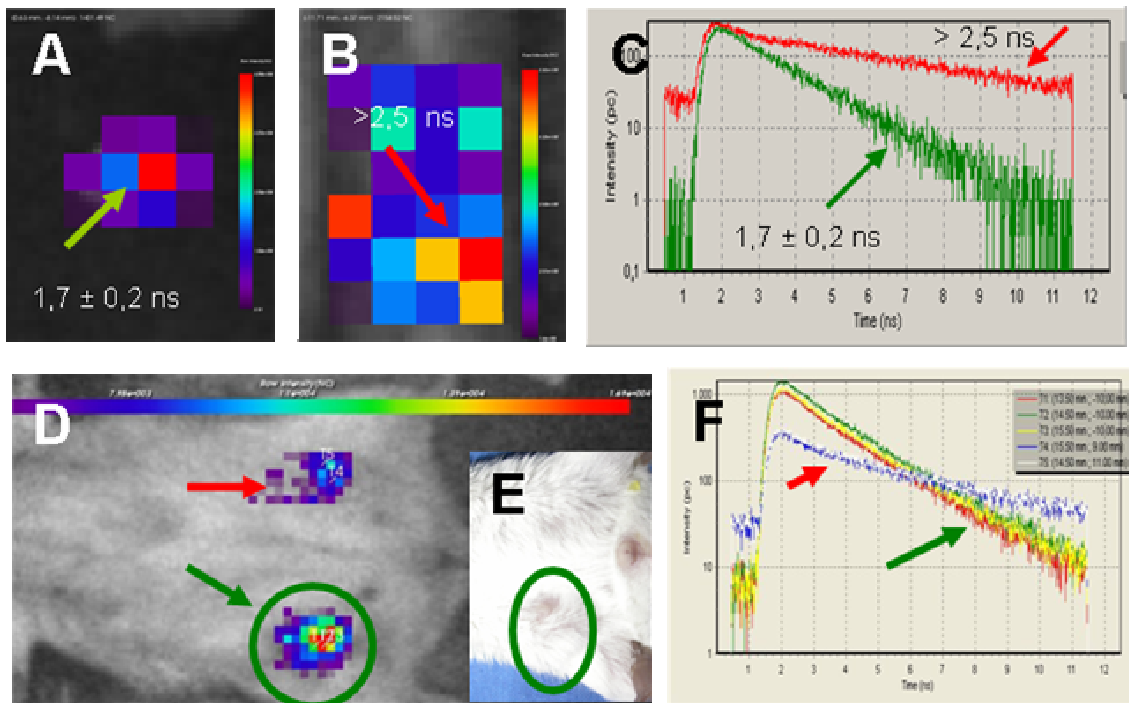
Da für die Anwendung des ADEPT-Konzepts im Tierversuch Informationen über die Bindungsstellen und die Bindungsdauer der eingesetzten Antikörper, sowie der Antikörper-Enzym-Konjugate fehlten, wurden entsprechende Bindungsanalysen *in vivo* durchgeführt.

### **3.1.2.1 Kontrollstudien zum Bindungsverhalten des anti-uPAR\*Cy5.5 im orthotopen Mammakarzinom- Mausmodell**

Die Bindungskinetiken des anti-uPAR\*Cy5.5 und des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 wurden *in vivo* mittels optischer Bildgebung untersucht. Es wurde dabei auch untersucht, ob die Antikörper nicht unspezifisch an gesunde Zellen binden. So wird verhindert, dass toxische Effekte durch Umsetzung des Prodrugs an gesundem Gewebe stattfinden. Den SCID-Mäusen wurden orthotop  $1 \times 10^6$  MDA-MB-231-Zellen in die rechte abdominale Milchdrüse implantiert.

Das eXplore Optix-System wurde für die Darstellung der Intensität und der Bindung von anti-uPAR\*Cy5.5 und anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 an Tumorzellen in lebenden Tieren verwendet. Für alle Messungen wurde ein Laser mit der Wellenlänge 670 nm verwendet. Die Fluoreszenzsignalbilder, die mittels eXplore Optix gewonnen werden, sind immer als Skala der Spektralfarben dargestellt, wobei Rot der stärksten und Blau der niedrigsten Fluoreszenzintensität entspricht (Abb. 3.6). Spezifische Fluoreszenzsignalmerkmale von anti-uPAR\*Cy5.5 wurden zunächst *ex vivo* gescannt (Abb. 3.6 A) und hatten eine Lebensdauer von  $1,5 \pm 0,2$  ns, die in der TPSF Kurve dargestellt wurde (Abb. 3.6 C). Die Fluoreszenz im Magen-Darm-Trakt der Maus wurde über die Messung von trockenen Futterpellets ermittelt. Die Fluoreszenzsignale hatten eine Lebensdauer zwischen 2,5 - 4 ns (Abb. 3.6 B). Diese unspezifische Autofluoreszenz wurde in der TPSF Kurve dargestellt (Abb. 3.6 C). Nur durch diese Kontrollmessungen war es möglich, bei Ganztieruntersuchungen zwischen Signalen, die durch den anti-uPAR\*Cy5.5 bedingt sind und der Autofluoreszenz von Futter zu unterscheiden. Abb. 3.6 D zeigt exemplarisch das Untersuchungsergebnis einer SCID-Maus, die drei Wochen nach orthotoper Implantation einen Tumor in der rechten Milchdrüse entwickelt hatte (Abb. 3.6 E). 24 h nach i.v. Injektion von 50  $\mu$ g anti-uPAR\*Cy5.5 Antikörper wurden Signale auf beiden Seiten des Tieres gemessen (Abb.

3.6 D). Erst die TPSF Kurven (Abb. 3.6 F), die die Lebensdauer von Fluoreszenzfarbstoffen ermitteln, zeigen, dass die Signale aus der linken Mausflanke, welche der weißen und blauen TPSF Kurven in Abb. 3.6 F entsprechen, eine durch Futter bedingte, unspezifische Autofluoreszenz darstellen. Diese unspezifischen Signale werden im Weiteren als Hintergrundsignale bezeichnet. In der rechten Flanke wurde über dem Tumor eine starke Fluoreszenz gemessen, die der roten, gelben, bzw. grünen Linie in den TPSF Kurven entspricht. Drei unterschiedliche Punkte in der Tumorregion wurden gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Signal identisch mit dem Signal von dem *ex vivo* analysierten anti-uPAR\*Cy5.5 (Abb. 3.6 A) ist. Auf diese Weise wurde der gesamte Tierkörper analysiert.

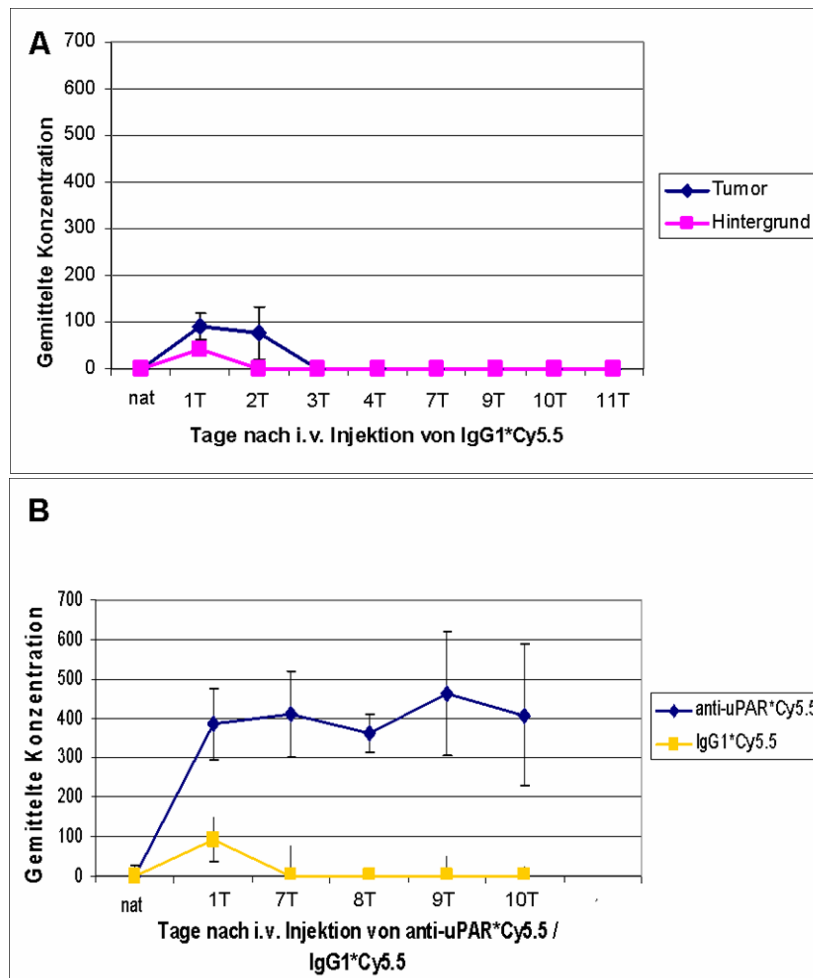


**Abb. 3.6: Spezifität der Messung von Cy5.5 basierten Fluoreszenzsignalen durch Analyse der Fluoreszenzlebensdauer.** *In vivo* Messung der Fluoreszenzsignale mittels eXplore Optix im 670 nm Wellenlängenbereich. (A) anti-uPAR\*Cy5.5 hat eine spezifische Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von  $1,7 \pm 0,2$  ns. (B) Das Futterpellet hat eine unspezifische Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von  $> 2,5$  ns. (C) TPSF Kurven der beiden Fluoreszenzsignale der Quellen (A) und (B) graphisch dargestellt, wobei spezifische Signale (anti-uPAR\*Cy5.5) in grün und unspezifische (Futterpellet) in rot dargestellt sind. (D) zeigt exemplarisch eine SCID-Maus mit Brusttumor im rechten Mammakomplex, 24 h nach i.v. Injektion von anti-uPAR\*Cy5.5. Spezifische Signale von dem anti-uPAR\*Cy5.5 im Tumorbereich sind grün, unspezifische sind mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. (E) Exemplarisches Bild der SCID-Maus mit orthotopem

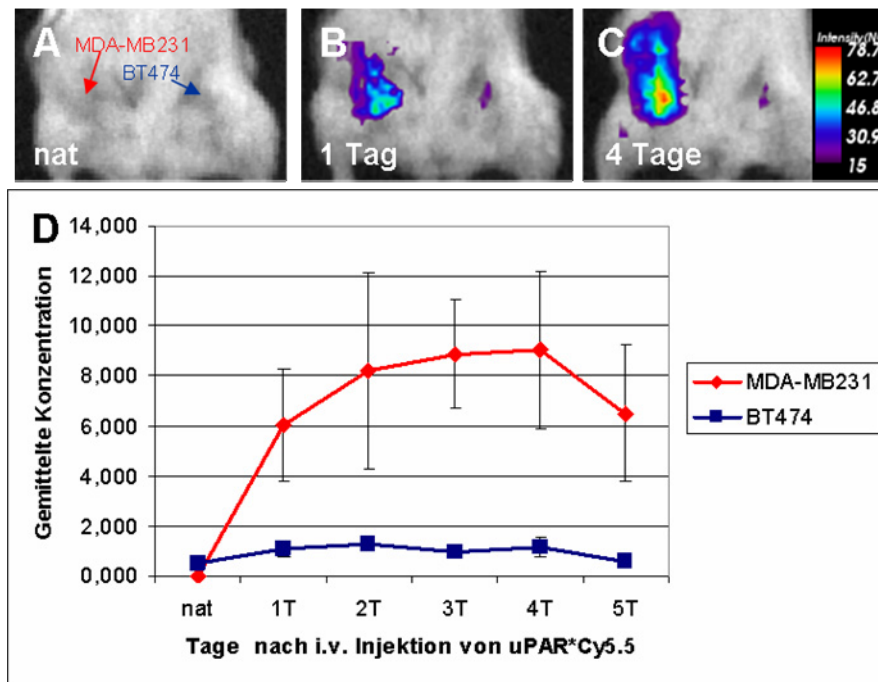
Mammakarzinom in der rechten Brustdrüse, das mit einem grünen Kreis markiert ist. (F) TPSF Kurven der beiden Fluoreszenzsignale aus *in vivo* Untersuchungen, wobei die spezifischen Fluoreszenzsignale mit grünen und die unspezifischen mit roten Pfeilen markiert sind.

Um unspezifische Bindungen des verwendeten anti-uPAR\*Cy5.5, die durch das Immunglobulin entstehen, an den Tumorzellen zu untersuchen, wurde zwei Mäusen drei Wochen nach orthotoper Implantation von MDA-MB-231-Tumorzellen 50 µg der Immunglobulin Isotyp-Kontrolle IgG1\*Cy5.5 i.v. verabreicht. 24 und 48 h nach der i.v. Injektion des IgG1\*Cy5.5 zeigte sich ein schwaches Fluoreszenzsignal im spezifischen Fluoreszenzlebensdauerbereich nicht nur im Tumorbereich, sondern in beiden Flanken. Schon drei Tage nach i.v. Injektion, wie in Abb. 3.7 A dargestellt, war kein spezifisches Signal in beiden Flanken mehr messbar. Im Vergleich dazu war die Bindung von anti-uPAR\*Cy5.5 spezifisch und bis zu 10 Tage war das Fluoreszenzsignal stark im Tumor detektierbar (Abb. 3.7 B). Dies zeigt, dass anti-uPAR\*Cy5.5 spezifisch an MDA-MB-231-Tumorzellen *in vivo* bindet.

Desweiteren wurde überprüft, ob der anti-uPAR\*Cy5.5 an Tumorzellen bindet, die kein uPAR an der Zellmembran exprimieren. Humane Brustkrebszellen BT474 exprimieren kein uPAR und sind so als Negativkontrolle geeignet. Zwei SCID-Mäusen wurden orthotop in die rechte Milchdrüse uPAR-positive MDA-MB-231-Zellen und in die linke Milchdrüse uPAR-negative BT474-Zellen implantiert. Im nativen Scan der Mäuse vor der anti-uPAR\*Cy5.5 Applikation wurden keine spezifischen Fluoreszenzsignale im Körper detektiert (Abb. 3.8 A). Schon 24 h nach der i.v. Injektion von 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 war ein starkes spezifisches Fluoreszenzsignal in der rechten Flanke im Bereich des Tumors sichtbar. Ein sehr schwaches Signal wurde in der linken Seite über dem Kontrolltumor detektiert (Abb. 3.8 B). Die Signalintensität des spezifischen Fluoreszenzsignals erreichte nach 4 Tagen im Tumorbereich der MDA-MB-231-Zellen in der rechten Flanke sein Maximum, während zu demselben Zeitpunkt nur ein sehr schwaches, spezifisches Fluoreszenzsignal im Bereich der BT474-Tumore in der linken Flanke gemessen wurde (Abb. 3.8 C). Die Fluoreszenzsignale waren bis zu fünf Tage detektierbar (Abb. 3.8 D). Es wurde gezeigt, dass die anti-uPAR Bindung *in vivo* spezifisch an Zellen mit uPAR-Expression erfolgt.



**Abb. 3.7: Bindungskinetik der Isotyp-Kontrolle IgG1\*Cy5.5 im Vergleich mit anti-uPAR\*Cy5.5 an MDA-MB-231-Tumorzellen in SCID-Mäusen.** Die Mäuse wurden drei Wochen nach der orthotopen Implantation von MDA-MB-231-Zellen mittels eXplore Optix bei einer Wellenlänge von 670 nm untersucht. Die Fluoreszenzsignale der IgG1\*Cy5.5 wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der i.v. Injektion von 50 µg Immunglobulin IgG1\*Cy5.5 pro Maus gemessen: (A) Graphische Darstellung der gemittelten Konzentration, ohne Einheiten, der Fluoreszenzsignale des IgG1\*Cy5.5 im Tumorbereich (blau) im Vergleich zu dem Hintergrundsignal im Milchdrüsenbereich im Zeitverlauf (rosa). Die Isotyp-Kontrolle IgG1\*Cy5.5 zeigte nur ein schwaches Fluoreszenzsignal im Tumorbereich und war nach drei Tagen nicht mehr detektierbar (n=2). (B) Graphische Darstellung der gemittelten Konzentration des Fluoreszenzsignals des anti-uPAR\*Cy5.5 im Tumorbereich (n=7) im Vergleich mit IgG1\*Cy5.5 im Tumorbereich im Zeitverlauf. Die Fluoreszenzsignale der Isotyp-Kontrolle waren vierfach schwächer als die des anti-uAR\*Cy5.5 Antikörpers und blieben nur während der ersten 48 h messbar. Die spezifischen Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 in Tumorbereich blieben im Gegensatz dazu über zehn Tage stabil.

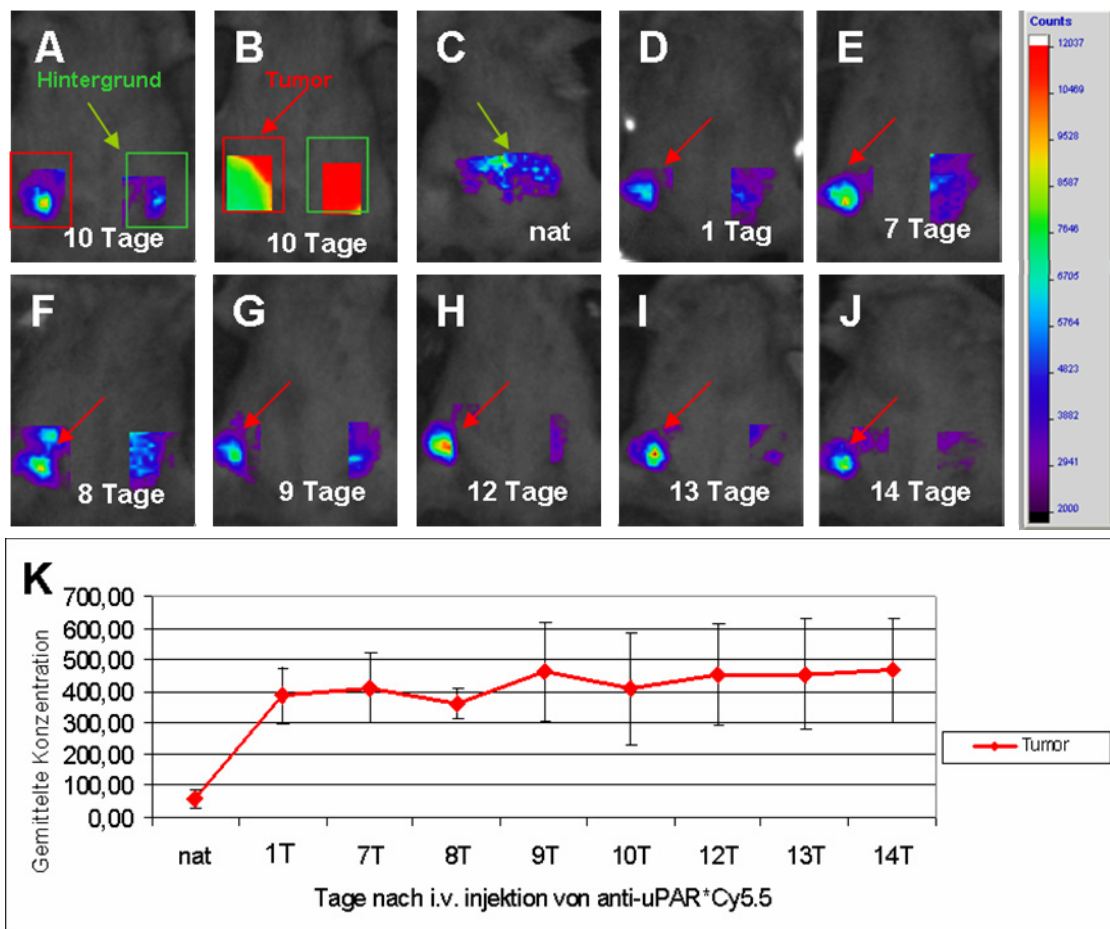


**Abb. 3.8: Bindungskinetik der anti-uPAR\*Cy5.5 an uPAR-positive MDA-MB-231-Tumoren im Vergleich zu uPAR-negativen BT474-Tumoren in SCID-Mäusen.** Die Mäuse wurden drei Wochen nach orthotoper Implantation von uPAR-positiven MDA-MB-231-Zellen in die rechte Milchdrüse und uPAR-negativen BT474-Zellen in die linke Milchdrüse mittels eXplore Optix bei 670 nm untersucht. Die Fluoreszenzsignale von anti-uPAR\*Cy5.5 wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der i.v. Injektion von 50 µg Antikörper pro Maus gemessen. Exemplarisch: (A) Nativer Scan ohne Fluoreszenz; (B) 24 h, und (C) 4 Tage nach Injektion. (D) Graphische Darstellung der gemittelten Konzentration der Fluoreszenzsignale des Antikörpers anti-uPAR\*Cy5.5 im Zeitverlauf im Bereich von BT474 und MDA-MB-231 Tumoren (n=2). Der anti-uPAR\*Cy5.5 bindet bereits 24 h nach i.v. Injektion an die MDA-MB-231-Zellen und bleibt für 5 Tage stabil, während keine Bindung an die BT474-Tumorzellen *in vivo* nachweisbar ist.

### 3.1.2.2 Langzeit-Bindungsstudien des anti-uPAR\*Cy5.5 im Vergleich mit dem $\beta$ -D-Galaktosidase gekoppelten anti-uPAR\*Cy5.5 im orthotopen Mammakarzinom-Mausmodell

Vier Wochen nach orthotoper Implantation von MDA-MD-231-Tumorzellen waren Tumoren in der rechten Milchdrüse der SCID-Mäuse erkennbar. Alle Tiere wurden vor der Injektion von jeweils 50 µg der anti-uPAR\*Cy5.5 (n=7) (Abb. 3.9) oder der anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 (n=6) (Abb. 3.10) gescannt, um Hintergrundsignale in diesen Negativkontrollen zu ermitteln (Abb. 3.9 C und Abb. 3.10 A). 24 h nach der Injektion wurden starke, spezifische Fluoreszenzsignale ausschließlich im Tumorbereich

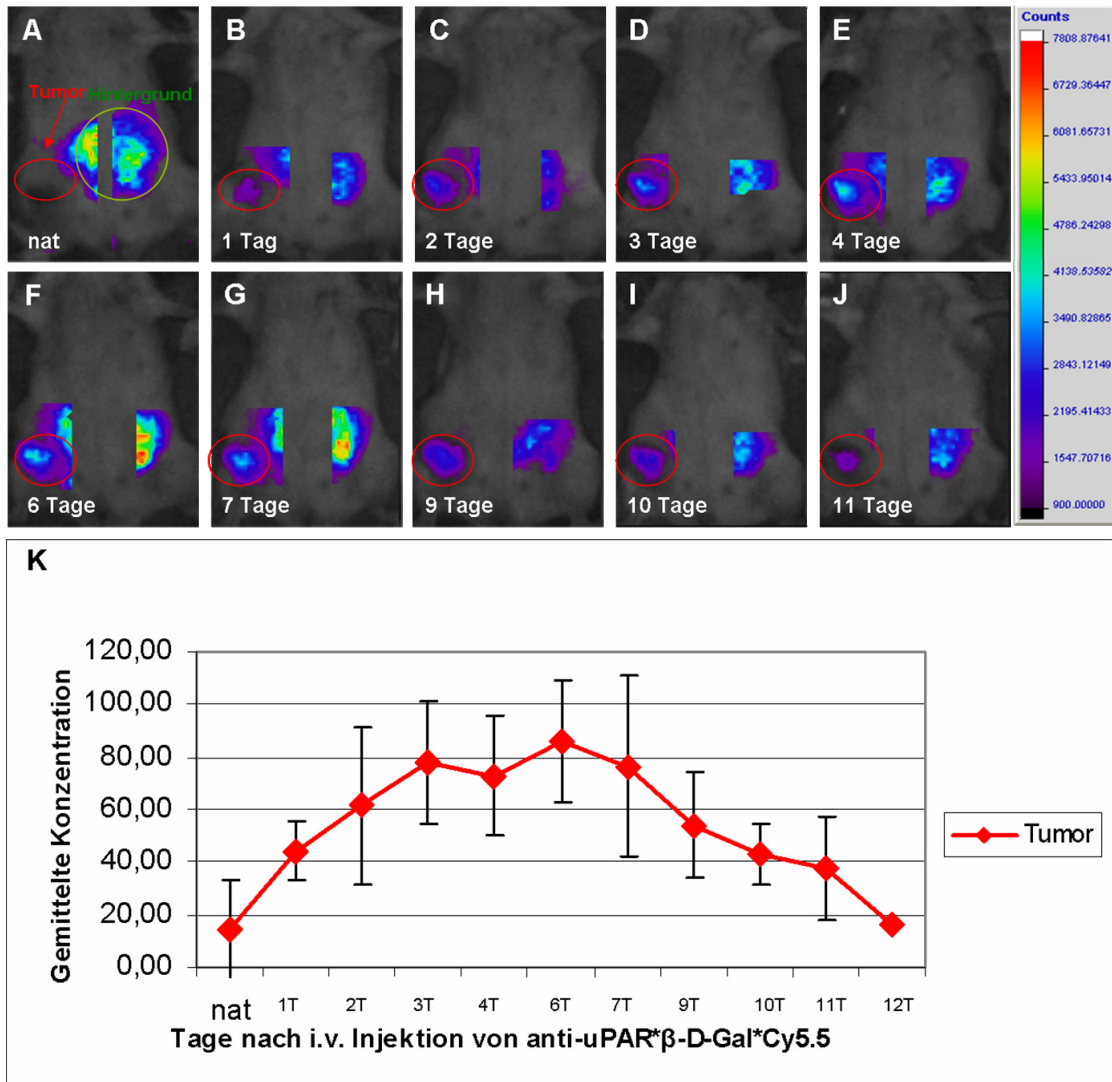
gemessen (Abb. 3.9 D). Anschließend wurden die Tiere für zwei Wochen jeden Tag im eXplore Optix gemessen. Während dieser Zeit waren nur spezifische Signale im Bereich des Tumors nachweisbar, die bis zu 14 Tagen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.9 A, B, D-J).



**Abb. 3.9: Bindungskinetik des anti-uPAR\*Cy5.5 an die MDA-MB-231-Tumorzellen in SCID-Mäusen über die Zeit.** Die Mäuse wurden vier Wochen nach der orthotopen Implantation von MDA-MB-231-Zellen in die rechte Milchdrüse mittels eXplore Optix zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der i.v. Injektion von 50 µg Antikörper pro Maus untersucht. Die Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 wurden gemessen: Repräsentativer Scan: (A) Signalintensitätsmessung und (B) Fluoreszenzlebensdauermessung 10 Tage nach Injektion. Spezifische Fluoreszenzsignale sind grün, unspezifische Signale rot dargestellt. (C) Nativer Scan. Über der Maus sind die Hintergrundsignale zu sehen; Scans nach der Injektion des anti-uPAR\*Cy5.5: (D) 1 Tag, (E) 7 Tage, (F) 8 Tage, (G) 9 Tage, (H) 12 Tage, (I) 13 Tage, (J) und 14 Tage. (K) Graphische Darstellung der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 im Zeitverlauf im Tumorbereich. Die Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 sind im Tumorbereich bereits 24 h nach der i.v. Injektion detektierbar und bleiben im Tumorbereich bis zu 14 Tage stabil (n=7).

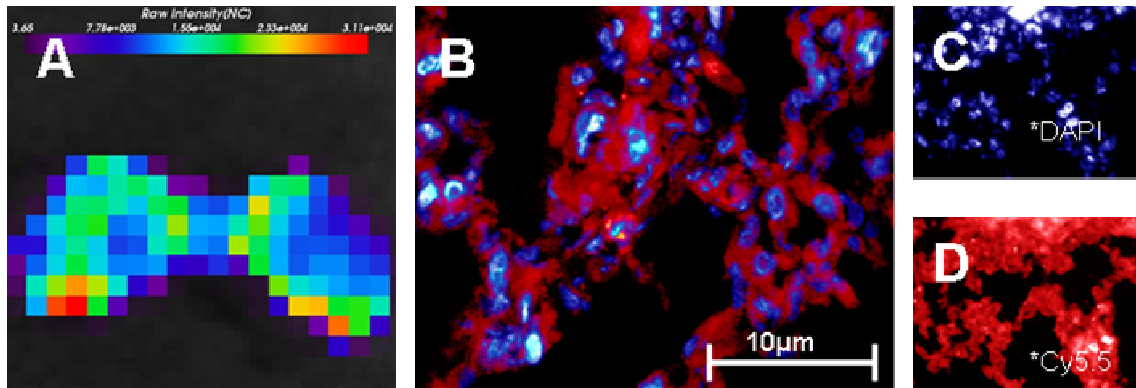
Die Bindungskinetik des Antikörpers anti-uPAR\*Cy5.5 ist graphisch in Abb. 3.9 K dargestellt, wo schon nach 24 h die Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 im Tumorbereich sehr stark waren und für bis zu 14 Tage stabil blieben. Die Bindung des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 fand nur in der Tumorregion statt und im Gegensatz zu dem anti-uPAR\*Cy5.5 wurde die maximale Bindungsstärke erst nach 3-7 Tagen erreicht (Abb. 3.10 D-G). Die Fluoreszenzsignale nahmen hier bis zum 12. Tag (Abb. 3.10 K) kontinuierlich wieder ab und waren dann nicht mehr von Hintergrundsignalen zu unterscheiden. Die beiden Antikörper binden *in vivo* an MDA-MB-231-Tumorzellen und bleiben stabil gebunden, anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 jedoch nur bis zum siebten Tag. Dadurch zeigt sich, dass eine Gabe des Prodrugs in einem Zeitrahmen von sieben Tagen in der ADEPT möglich ist.

Als weitere Untersuchungsform der Bindung von anti-uPAR\*Cy5.5 an Tumorzellen wurden Tumoren *ex vivo* mittels eXplore Optix (Abb. 3.11 A) und histologische Tumorschnitte mittels NIR Mikroskopie untersucht (Abb. 3.11 B-D). Hier wurden die Tumore 6 Wochen nach der Implantation mit den MDA-MB-231-Zellen und 48 h nach i.v. Injektion von 50  $\mu$ g anti-uPAR\*Cy5.5 entnommen und gescannt. Es konnten *ex vivo* starke, spezifische Fluoreszenzsignale in dem Tumorbereich detektiert werden (Abb. 3.11 A). Von demselben Tumor wurden Kryoschnitte angefertigt und mittels NIR-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.11 B-D). Es wurde eine Färbung mit DAPI durchgeführt, um die Kerne der Tumorzellen zu färben. Abb. 3.11 D zeigt, dass die *in vivo* über dem Tumorbereich gemessenen Fluoreszenzsignale von dem am Tumor gebundenen anti-uPAR\*Cy5.5 kommen, der *in vivo* an die Tumorzellen gebunden hat.



**Abb. 3.10: Bindungskinetik des anti-uPAR\*β-D-Gal\*Cy5.5 an die MDA-MB-231-Tumorzellen in SCID-Mäusen.** Die Mäuse wurden drei Wochen nach der orthotopen Implantation von MDA-MB-231-Zellen in die rechte Milchdrüse mittels eXplore Optix zu unterschiedlichen Zeiten nach i.v. Injektion von 50 µg anti-uPAR\*β-D-Gal\*Cy5.5 pro Maus untersucht: Repräsentative Scans nach anti-uPAR\*β-D-Gal\*Cy5.5 Injektion: (A) nativer Scan. Über der Maus im Darmbereich sind Hintergrundsignale zu sehen. (B) 24 h, (C) 2 Tage, (D) 3 Tage, (E) 4 Tage, (F) 6 Tage, (G) 7 Tage, (H) 9 Tage, (I) 10 Tage, (J) und 11 Tage. (K) Graphische Darstellung der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*β-D-Gal\*Cy5.5 im Zeitverlauf im Tumorbereich. Die Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*β-D-Gal\*Cy5.5 waren im Tumorbereich bereits 24 h nach der i.v. Injektion detektierbar und erreichten die höchsten Werte zwischen dem 3. und 7. Tag nach Applikation. Die Fluoreszenzsignale über dem Tumorbereich sanken anschließend bis zum 12. Tag kontinuierlich bis auf das Ausgangsniveau ab (n=6).

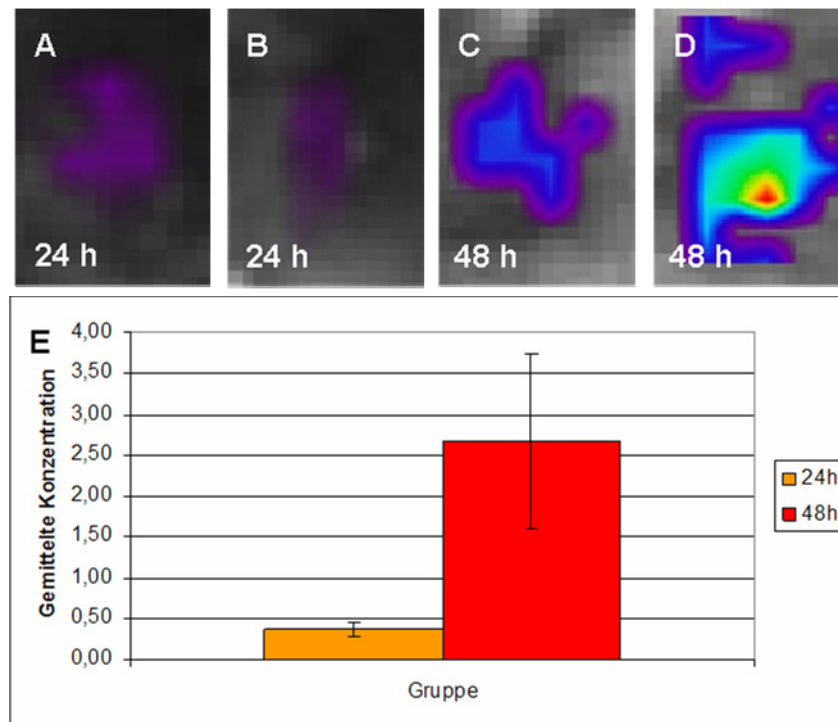




**Abb. 3.11: Nachweis der anti-uPAR\*Cy5.5-Bindung an die Tumorzellen mittels eXplore Optix und mittels histologischer Untersuchungen unter Verwendung von NIR-Mikroskopie.** (A) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten eines isolierten Brusttumors 6 Wochen nach orthotoper Implantation von MDA-MB-231-Zellen und 48 h nach der i.v. Injektion von 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 mittels eXplore Optix. (B) Überlagerte Fluoreszenzbilder in 63-facher Vergrößerung eines Kryoschnittes desselben Brusttumors. (C) Die Zellkerne sind mittels DAPI gefärbt und blau dargestellt. (D) Anti-uPAR\*Cy5.5 gebunden an Tumorzellen ist rot dargestellt. Es wird deutlich, dass die *in vivo* über dem Tumorbereich gemessenen Fluoreszenzsignale von den an Tumorzellen gebundenen anti-uPAR\*Cy5.5 stammen.

### 3.1.2.3 *In vivo*-Nachweis der Enzymaktivität der $\beta$ -D-Galaktosidase in dem mit $\beta$ -D-Galaktosidase gekoppelten Antikörper anti-uPAR mittels optischer Bildgebung

Um die Aktivität von  $\beta$ -D-Galaktosidase, die an den anti-uPAR Antikörper gekoppelt ist, in der Maus nachzuweisen, wurde das DDAOG als Substrat verwendet, das durch das aktive Enzym Galaktosidase in fluoreszierendes DDAO gespalten wird (vergl. Abb. 3.5). Den SCID-Mäusen wurde drei Wochen nach Implantation der Tumorzellen 50 µg des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal i.v. verabreicht. 24 h hat das Antikörper-Enzym-Konjugat an die Tumorzellen gebunden. 24 h (n=2) und 48 h (n=2) nach der Antikörper-Injektion wurde das Substrat DDAOG in einer Menge von 0,5 mg/Maus in 50%-iger DMSO Lösung i.v. gespritzt. Die Tiere wurden anschließend mittels eXplore Optix lebend gescannt, sezirt und die Organe mittels eXplore Optix *ex vivo* untersucht. Darm und Urin waren durch das DDAOG gelb bzw. dunkelbraun gefärbt. In allen Tumoren wurden spezifische Fluoreszenzsignale detektiert (Abb. 3.12 A-D). Die Fluoreszenzsignale waren über dem Tumor 48 h nach Applikation des Antikörper-Enzym-Konjugates stärker als nach 24 h. (Abb. 3.12 E). Darm und Urin emittierten keine spezifischen Fluoreszenzsignale. Dies bestätigt, dass die  $\beta$ -D-Galaktosidase auch *in vivo* im Antikörper-Enzym-Konjugat aktiv ist und für ADEPT verwendet werden kann.



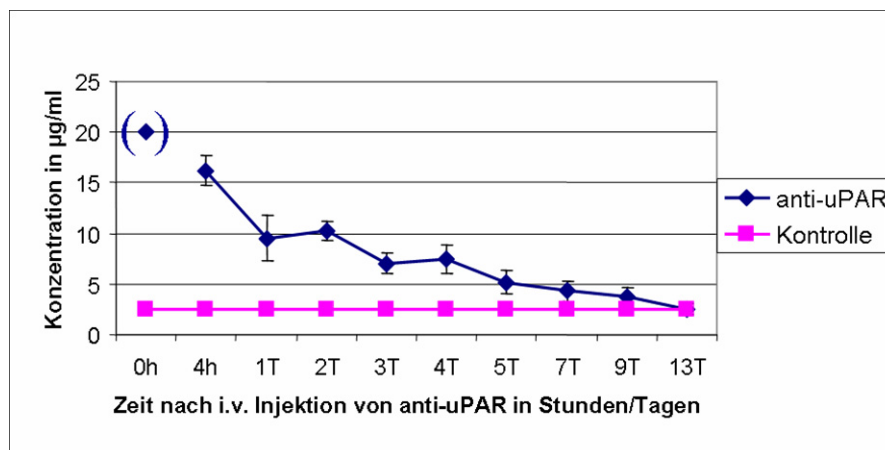
**Abb. 3.12: Nachweis der Enzymaktivität der an anti-uPAR gekoppelten  $\beta$ -D-Galaktosidase *in vivo*.** Die Mäuse wurden drei Wochen nach der orthotopen Implantation von MDA-MB-231-Zellen in die rechte Milchdrüse mittels eXplore Optix bei 670 nm untersucht. Den Tieren wurde 50  $\mu$ g anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal i.v. appliziert. Die Fluoreszenzsignale des von  $\beta$ -D-Galaktosidase abgespaltenen und damit aktivierten DDAO wurden 2 h nach i.v. Injektion von 0,5 mg des Substrats DDAOG pro Maus gemessen. Repräsentative Scans: (A, B) 24 h (n=2) bzw. (C, D) 48 h (n=2) nach anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal Applikation. Die  $\beta$ -D-Galaktosidase ist *in vivo* aktiv, wobei 48 h nach anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal Applikation das stärkere Fluoreszenzsignal im Tumor detektiert wurde, was (E) die graphische Darstellung der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale über den Tumorbereichen *ex vivo* zeigt.

### 3.1.2.4 Nachweis des anti-uPAR im Serum im Zeitverlauf nach i.v. Applikation

Für die spezifische Wirksamkeit des ADEPT ist eine wesentliche Voraussetzung, dass das Prodrug ausschließlich an Tumorzellen zu dem toxischen Drug aktiviert wird, um so möglichst keine gesunden Zellen des Körpers zu beschädigen. Dies könnte jedoch passieren, falls sich ungebundener anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal im Serum befände und das Prodrug somit systemisch aktiviert würde. Deshalb wurde untersucht, wie lange der freie anti-uPAR, der nicht an die Tumorzellen im Körper gebunden ist, im Blut zirkuliert. Ziel war es, den Zeitpunkt zu finden, wo sich möglichst wenig anti-uPAR im Blut befindet und gleichzeitig möglichst viel anti-uPAR an den Tumorzellen, bei noch hoher

Enzymaktivität, gebunden ist. Dazu wurde ein ELISA zur Bestimmung von freiem anti-uPAR im Serum durchgeführt.

Hierbei wurde die Konzentration des anti-uPAR im Serum von tumortragenden Mäusen im Zeitverlauf nach i.v. Applikation von 50 µg anti-uPAR gemessen. Dazu wurde in Zeitintervallen bis zu 13 Tagen nach Injektion des anti-uPAR durch retroorbitale Punktionen den Tieren Blut abgenommen. Als Kontrolle diente Serum von Mäusen, die kein anti-uPAR bekommen hatten. Im ELISA-Test (Abb. 3.13) war bereits 4 h nach der Injektion die Antikörper-Konzentration um ein Drittel reduziert. Nach 24 h, bzw. 48 h war die Konzentration des Antikörpers im Blut um 52,5% verringert im Vergleich zu der anfänglich zu erwartenden Antikörpermenge (Theoretische Menge: 50 µg Antikörper/mittleres Gesamtblutvolumen der Maus) und nahm dann kontinuierlich ab. Nach 13 Tagen war der anti-uPAR im Serum der Mäuse nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass 48 h nach Injektion des anti-uPAR der optimale Zeitpunkt für die Verabreichung des Prodrugs ist.



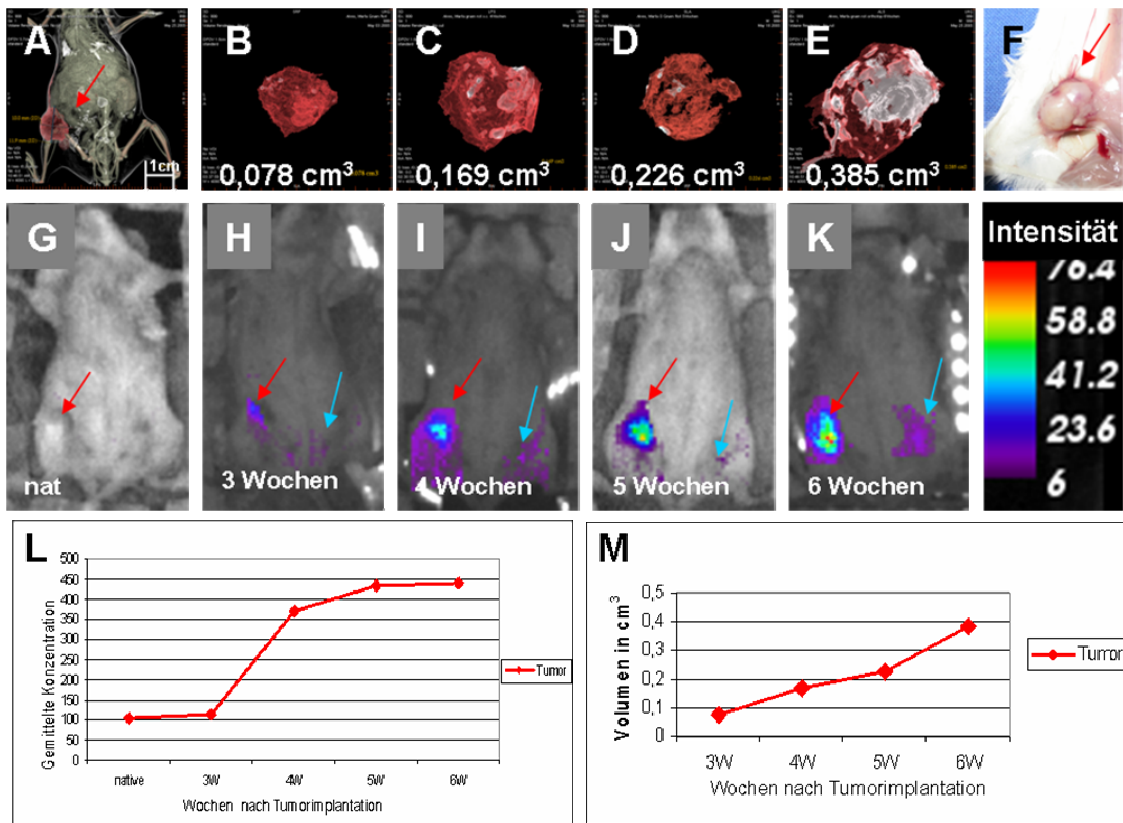
**Abb. 3.13: Quantitativer Nachweis des anti-uPAR im Serum von tumortragenden Mäusen mittels ELISA.** Ab drei Wochen nach orthotoper Implantation von  $1 \times 10^6$  MDA-MB-231-Zellen in die rechte Milchdrüse und nach Applikation von 50 µg anti-uPAR i.v. wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Menge des anti-uPAR in µg/ml im Serum untersucht und als blaue Linie angezeigt (n=10). Als Kontrolle diente der ELISA von Serum von Mäusen, die kein anti-uPAR bekommen hatten (n=2). Diese ist als rosafarbene Linie dargestellt. Schon 24 h nach i.v. Injektion von anti-uPAR sank die Menge des ungebundenen Antikörpers im Serum um die Hälfte und war nach 13 Tagen auf Kontrollniveau. Der 0 h Wert ist aus der verabreichten Menge anti-uPAR und dem mittleren Blutvolumen der Maus berechnet.

### 3.1.2.5 Nachweis des Wachstums der orthotopen Mammakarzinome mittels eXplore Optix und fpVCT

Um gleichzeitig das Tumorwachstum und die Bindung des anti-uPAR\*Cy5.5 an den wachsenden Tumor zu analysieren, wurden Mäuse (n=7) mittels eXplore Optix und dem *flat panel Volumetric Computed Tomograph* (fpVCT) untersucht.

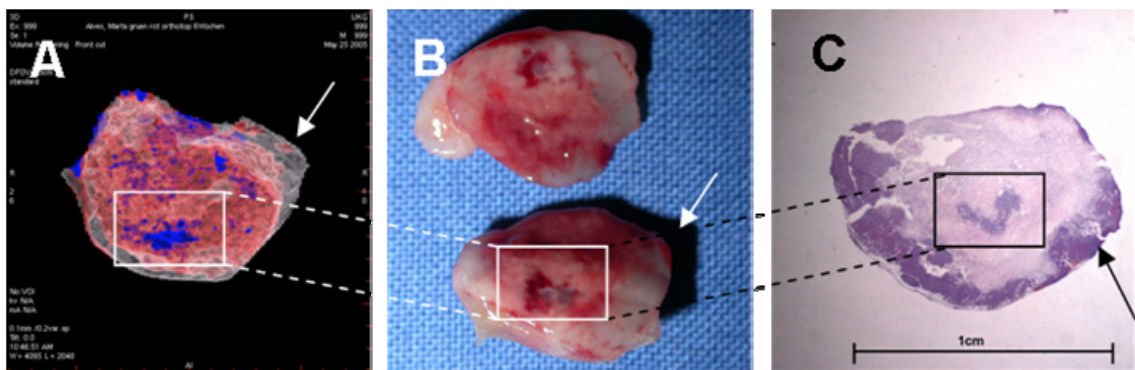
Die Mammakarzinome sind durch eine vaskularisierte Kapsel abgegrenzt und so über fpVCT gut darzustellen und zu vermessen. Auf diesem Wege wurden die Tiere nach i.v. Kontrastmittelgabe von Isovist300 ab der dritten Woche nach der Tumorimplantation einmal wöchentlich untersucht und das Tumolvolumen über die Zeit bestimmt. Dies wurde exemplarisch in der Abb. 3.14 A-E, F, M dargestellt. So wird deutlich, dass die Tumoren über die Zeit kontinuierlich an Volumen zunehmen.

Die Bindung des anti-uPAR\*Cy5.5 an wachsende Tumoren *in vivo* wurde mittels eXplore Optix ab der dritten Woche nach Tumorimplantation einmal wöchentlich parallel zur fpVCT Messung untersucht. Jeweils 24 h nach i.v. Applikation von 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 wurden Fluoreszenzsignale im Tumorbereich gemessen (Abb. 3.14 G-K und L). Es wurde damit überprüft, ob die eingesetzten 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 eine ausreichende Menge auch für große Tumoren sind. Es konnten schwache Fluoreszenzsignale im Bereich des Tumors drei Wochen nach Tumorimplantation beobachtet werden (Abb. 3.14 H). Von diesem Zeitpunkt an wurden wöchentlich zunehmend bis zur 6. Woche immer stärkere, spezifische Fluoreszenzsignale über dem Bereich des wachsenden Tumors gemessen. Die zunehmende Intensität der Fluoreszenzsignale bei einer gleichbleibenden Konzentration des applizierten Antikörpers weist darauf hin, dass die verwendete Konzentration von anti-uPAR auch bei großen Tumoren ausreichend ist, um zwischen 3 und 5 Wochen nach Tumorimplantation möglichst viel  $\beta$ -D-Galaktosidase an die Tumorzellen zu bringen.



**Abb. 3.14: Vergleichende Untersuchung der Tumorentwicklung mittels eXplore Optix über die Bindungsintensität des anti-uPAR\*Cy5.5 an die MDA-MB-231-Tumorzellen mit der fpVCT Darstellung der Tumoren.** Die Darstellung der Tumorumfänge mittels fpVCT über einen Zeitraum von 3 - 6 Wochen nach orthotoper Implantation von  $1 \times 10^6$  MDA-MB-231-Zellen in die rechte Milchdrüse: Exemplarisch: (A) Komplette Darstellung der Maus 4 Wochen nach der Tumorimplantation. Segmentierte Tumoren im fpVCT-Scan nach Tumorimplantation rot dargestellt; Segmentierte Tumoren: (B) 3 Wochen, (C) 4 Wochen, (D) 5 Wochen, und (E) 6 Wochen nach Tumorimplantation; (F) Darstellung des Tumors *in situ*. (G-K) eXplore Optix Untersuchungen exemplarisch: Auf den Scans wurde das Hintergrundsignal nicht ausgeblendet, sondern mit blauen Pfeilen markiert. Die Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 über dem Tumorbereich wurden 24 h nach i.v. Injektion von 50  $\mu$ g anti-uPAR\*Cy5.5 pro Maus jede Woche nach Tumorimplantation gemessen: Exemplarisch: (G) nativer Scan, (H) nach 3 Wochen, (I) 4 Wochen, (J) 5 Wochen, und (K) nach 6 Wochen. Fluoreszenzsignale im Tumorbereich und damit die Bindung von anti-uPAR\*Cy5.5 wurden bereits 24 h nach i.v. Injektion von anti-uPAR\*Cy5.5 detektiert und wurden jede Woche stärker, bis sie zwischen der 5. und 6. Woche auf einem stabilen Niveau blieben. (L) exemplarische graphische Darstellung der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale über dem Tumorbereich im Zeitverlauf. In (M) ist das Tumorstadium als Tumorumfang im Zeitverlauf dargestellt.

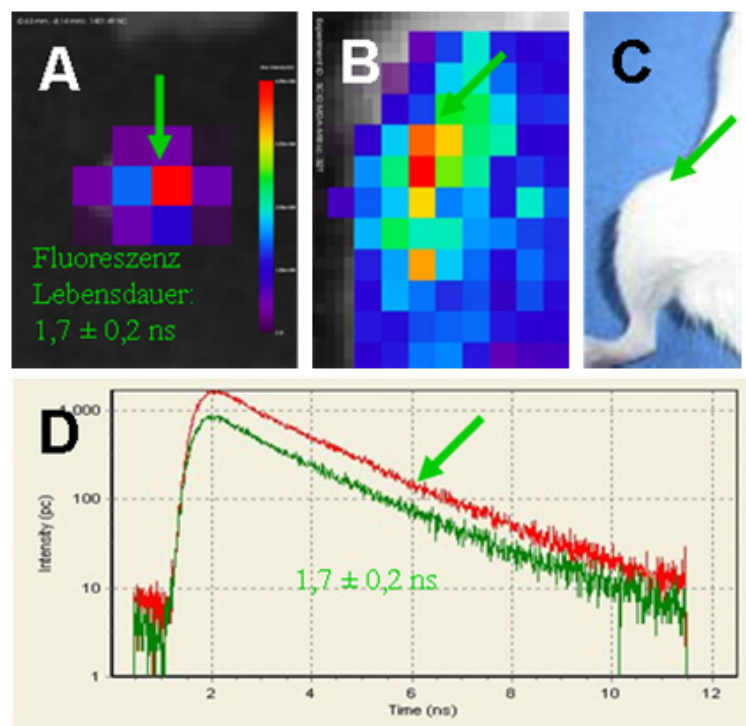
Zur Überprüfung der oben beschriebenen Ergebnisse wurden histologische Untersuchungen des Tumorgewebes durchgeführt. Die fpVCT Messung ermöglicht eine virtuelle Analyse des Tumorgewebes, ohne dass das Tier dazu seziert werden muss (Abb. 3.15 A). Der isolierte Tumor wurde in drei Regionen mit unterschiedlichen Dichten geteilt, die durch Hounsfield-Units definiert sind. Die Tumorregionen mit den geringsten Dichten wurden blau dargestellt und entsprechen dem gelockerten Tumorgewebe in der Mitte von Tumornekrosen. Die mittlere Dichte in diesem Tumor stellt nekrotisches Gewebe dar, die höchste Dichte entspricht vitalem Tumorgewebe des durch die Mitte *ex vivo* halbierten Tumors (Abb. 3.15 B). In der Mitte des Tumors findet sich eine ausgeprägte Nekrose, vitales Tumorgewebe ist nur am Rand des Tumors sichtbar. Diese Bilder wurden mit dem histologischen Präparat des Tumors in einer Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung des Paraffinschnitts verglichen (Abb. 3.15 C). Dies diente dem Nachweis, dass die virtuelle Analyse mittels fpVCT mit den histologischen Analysen übereinstimmt und als verlässliche Untersuchungsmethode verwendet werden kann.



**Abb. 3.15: Vergleichende Analysen von fpVCT und histologischer Untersuchung.** Repräsentative Bilder eines Mammakarzinoms, das 6 Wochen nach orthotoper Implantation von MDA-MB-231-Zellen in die Milchdrüse entnommen wurde. (A) fpVCT Darstellung des Tumors 30 s nach i.v. Gabe von 150  $\mu$ l Kontrastmittel. Die verschiedenen Gewebedichten wurden farblich unterschiedlich dargestellt: Die geringste Gewebedichte, am ehesten nekrotisiertem Gewebe entsprechend, ist in blau, mittlere Gewebedichte, nekrotischem Gewebe entsprechend, ist in rot und die höchste Gewebedichte, die vitalem Tumorgewebe entspricht, ist in weiß dargestellt. (B) In der Mitte geteilter Tumor *ex vivo* und (C) korrespondierende HE Färbung des Tumorparaffinschnitts, Pfeile kennzeichnen vitales Tumorgewebe.

### 3.1.2.6 Detektion von Knochenmetastasen im metastasierenden Mammakarzinom-Modell mittels eXplore Optix und fpVCT

Der mit Cy5.5 markierte anti-uPAR wurde *ex vivo* gescannt (Abb. 3.16 A) und zeigte eine spezifische Fluoreszenzlebensdauer von  $1,7 \pm 0,2$  ns. Abb. 3.16 C zeigt exemplarisch das Bild der spezifischen Fluoreszenzsignale über dem Knie einer SCID-Maus (Abb. 3.16 B) drei Wochen nach intrakardialer (i.c.) Implantation von  $5 \times 10^5$  MDA-MB-231-Zellen. Die gemessenen Fluoreszenzsignale in der Maus deuten auf eine Bindung des anti-uPAR\*Cy5.5 an die metastatischen MDA-MB-231-Zellen im Knochen hin.



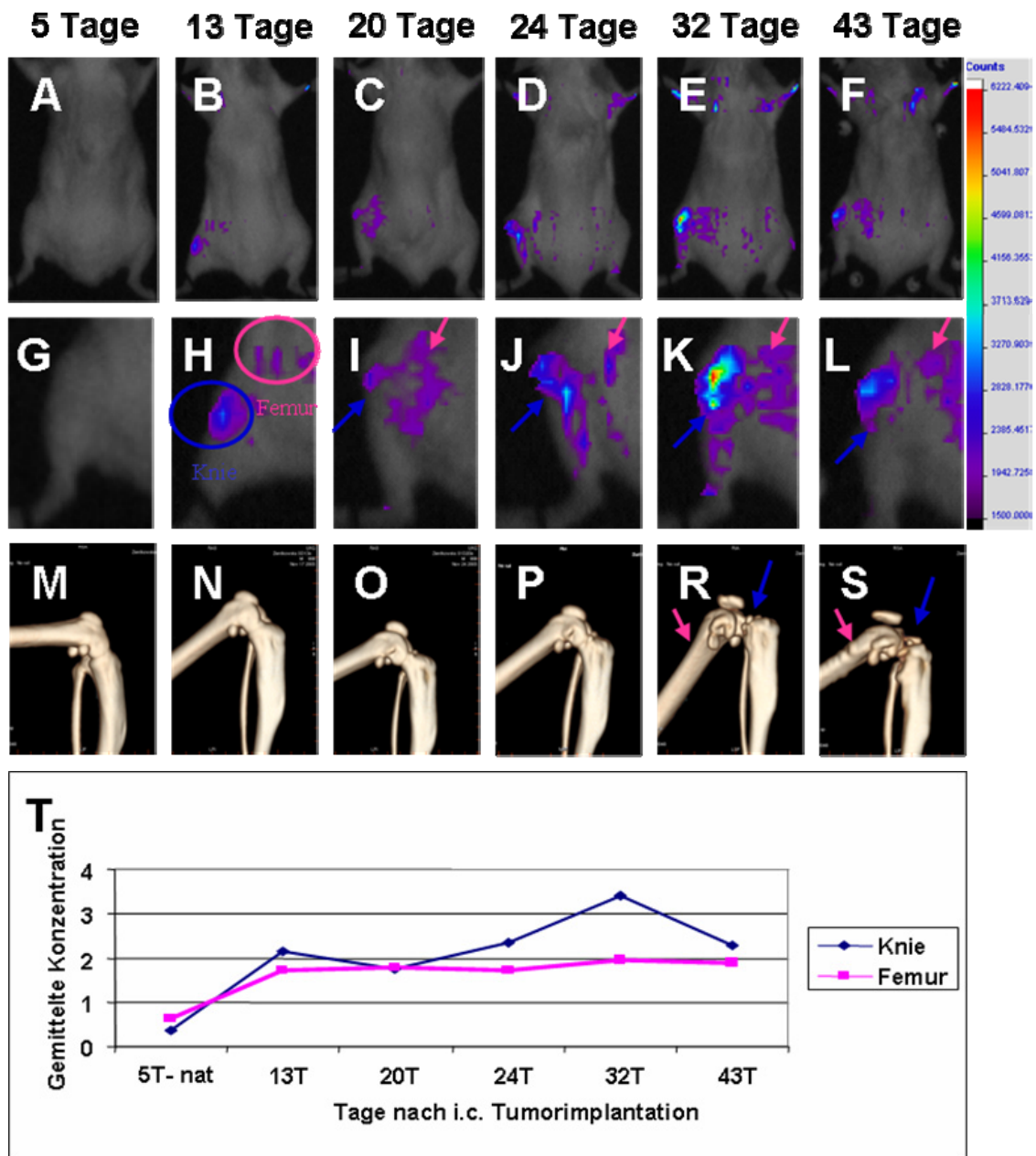
**Abb. 3.16: Spezifität der Messung von Cy5.5-basierten Fluoreszenzsignalen durch Analyse der Fluoreszenzlebensdauer.** Messung der Fluoreszenzsignale mittels eXplore Optix im 670 nm Wellenlänge-Bereich von: (A) anti-uPAR\*Cy5.5 mit spezifischer Fluoreszenz mit einer Lebensdauer von  $1,7 \pm 0,2$  ns. (B) Abbildung der Fluoreszenzsignale von anti-uPAR\*Cy5.5 aus dem Metastasenbereich im linken Knie einer SCID-Maus 32 Tage nach i.c. Implantation von MDA-MB-231-Tumorzellen. (C) Bild des linken Beines derselben Maus. (D) TPSF Kurven der spezifischen Signale *in vivo* und *in vitro*. Spezifische Fluoreszenzsignale von dem an Tumorzellen gebundenen anti-uPAR\*Cy5.5 sind mit grünem Pfeil gekennzeichnet.

Die Knochenmetastasen und Knochenläsionen wurden mittels fpVCT und eXplore Optix detektiert. Mittels fpVCT ist es möglich, Knochenstrukturen und damit den

Schaden am Knochen darzustellen, der durch die Osteolyse von den Tumorzellen verursacht wurde, während eXplore Optix die Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 im Metastasenbereich darstellt und damit die Bindung von anti-uPAR\*Cy5.5 an die Tumorzellen sichtbar macht. Um zu zeigen, dass beide Methoden sich bei der Detektion von Knochenmetastasen bzw. Knochenläsionen ergänzen, wurde den Tieren wöchentlich nach i.c. Implantation von MDA-MB-231-Tumorzellen 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 pro Maus i.v. appliziert. Jeweils 24 h später wurden die Tiere im eXplore Optix und gleichzeitig mittels fpVCT gescannt. Als Negativkontrolle wurden Mäuse verwendet, die keinen anti-uPAR\*Cy5.5 bekommen hatten. Hier wurden im ganzen Mäusekörper keine spezifischen Fluoreszenzsignale festgestellt (Abb. 3.17 A, G). Dagegen wurden 13 Tage nach der Tumorimplantation und 24 h nach der i.v. Injektion des anti-uPAR\*Cy5.5 bei einer Maus deutliche spezifische Fluoreszenzsignale im Bereich des linken Knies und des Femurs detektiert (Abb. 3.17 B, H). Auch 20 und 24 Tage nach Tumorimplantation wurden die Fluoreszenzsignale bei dieser Maus im selben Bereich nachgewiesen (Abb. 3.17 C, I, D, J). Maximale Fluoreszenzsignalintensitäten wurden 32 und 43 Tage nach der Tumorimplantation gemessen (Abb. 3.17 E, K, F, L). Es wurden neben den Fluoreszenzsignalen aus dem Kniebereich auch Fluoreszenzsignale im Bereich des Femurs detektiert (Abb. 3.17 B-F, H-L und T).

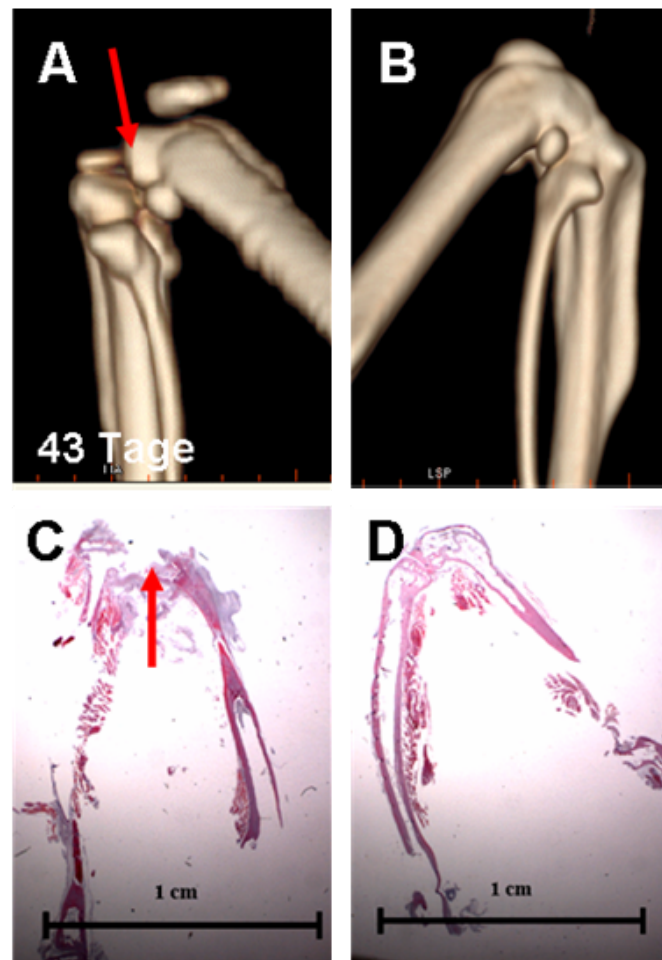
Mittels fpVCT-Untersuchung wurden die Knochen dreidimensional visualisiert (Abb. 3.17 M-S). Mit dieser Methode wurde erst 32 Tagen nach i.c. Implantation der MDA-MB-231-Zellen eine Knochenläsion im Bereich des proximalen Endstücks der linken Tibia gefunden (Abb. 3.17 R), die nach 43 Tagendeutlich zunahm. Ebenfalls waren Veränderungen im distalen Femur zu erkennen. Die Läsionen des Knies und des Femurs wurden genau dort detektiert, wo Fluoreszenzsignale von anti-uPAR\*Cy5.5 mittels eXplore Optix bereits an Tag 13 nach Tumorzellen-Implantation gemessen wurden. Histologisch konnte belegt werden (Abb. 3.18 A, C), dass das Kniegelenk und die Knochenstruktur des Femurs fast vollständig zerstört waren, im Vergleich zu der unveränderten Knochenstruktur des rechten Hinterbeins (Abb. 3.18 B, D). Diese Ergebnisse zeigten, dass die beiden bildgebenden Methoden, eXplore Optix und das fpVCT sich gut ergänzen. Das eXplore Optix in Verbindung mit anti-uPAR\*Cy5.5 erlaubt die Detektion der Tumorzellen in der Medulla des Knochens *in vivo*, bevor eine Läsion im Knochen mittels fpVCT zu sehen ist. So können Knochenmetastasen mittels eXplore Optix durch die Detektion von Tumorzellen in Knochen fast drei Wochen früher lokalisiert werden, als die Läsionen im Knochen zu detektieren sind.





**Abb. 3.17: Exemplarische Darstellung der Entwicklung von Metastasen und Läsionen im linken Knie und Femur einer SCID-Maus nach i.c. Implantation von MDA-MB-231-Zellen.** Die Maus wurde am selben Tag sowohl mit eXplore Optix als auch per fpVCT gescannt. Die Messungen mit eXplore Optix wurden jeweils 24 h nach i.v. Injektion von 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 durchgeführt: Zeit nach der i.c. Tumorumplantation: (A, G) 5 Tage, (B, H) 13 Tage, Darstellung der Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 über dem Knie und Femurbereich. (C, I) 20 Tage, Darstellung der Fluoreszenzsignale im Bereich des Femur, die stärker als am Tag 13 sind. (D, J) 24 Tage, Darstellung der Fluoreszenzsignale im Kniebereich, die weiter zugenommen haben. (E, K) 32 Tage, Darstellung der Fluoreszenzsignale im Kniebereich, maximale Intensität, und (F, L) 43 Tage nach der Implantation von Tumorzellen. Entwicklung

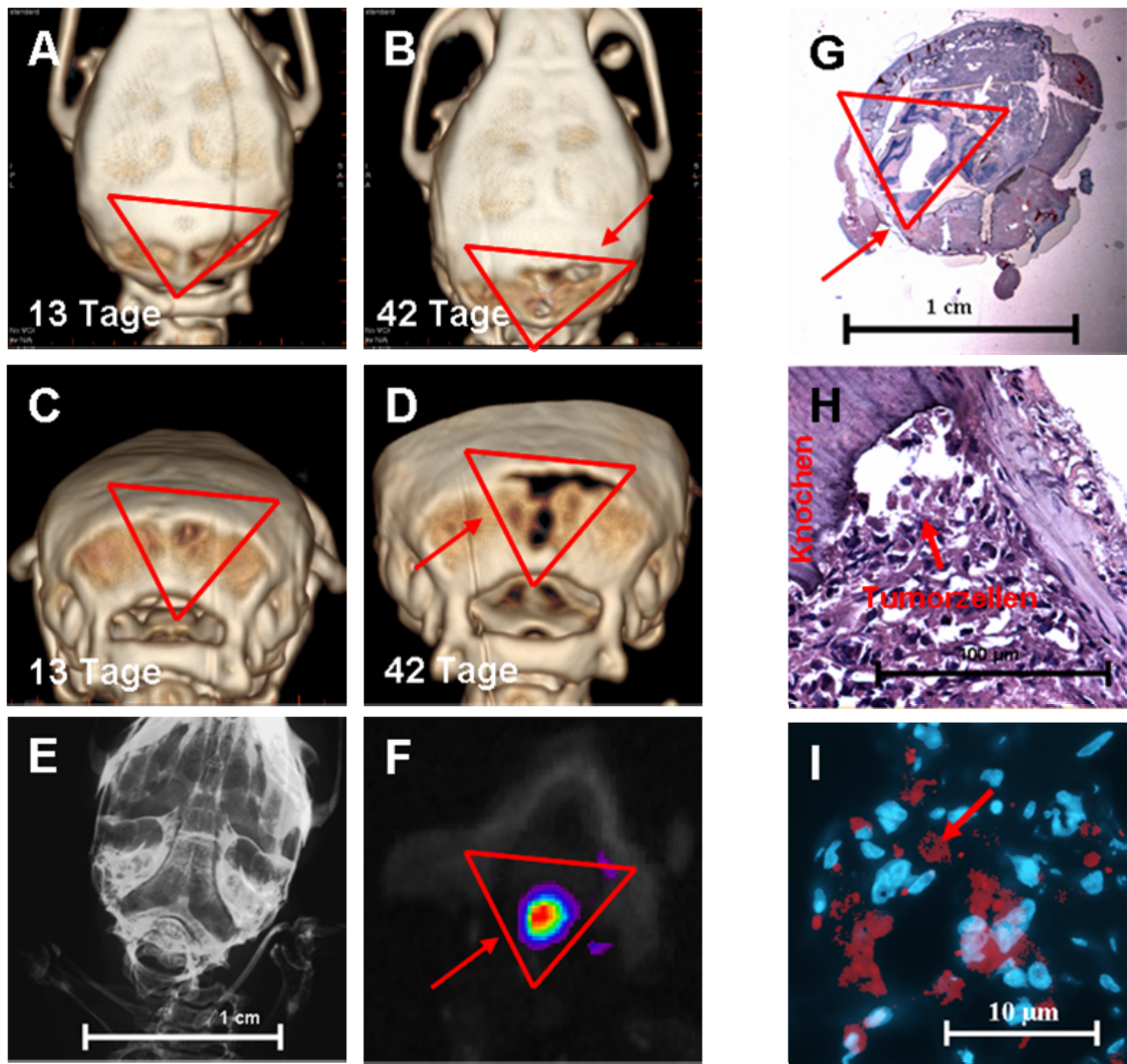
von Knochenläsionen im Knie- und Femurbereich wurden mittels fpVCT im Zeitverlauf nach i.c. Tumorzellen-Implantation untersucht: (M) 5 Tage, (N) 13 Tage, (O) 20 Tage, (P) 24 Tage. Es waren keine Knochenstrukturveränderungen sichtbar, (R) 32 Tage, erst jetzt wird die Knieläsion mittels fpVCT sichtbar, und (S) 43 Tage nach der Implantation wird auch die Läsion der Femuroberfläche deutlich, wobei das Kniegelenk schon vollständig lysiert war. (T) Graphische Darstellung der spezifischen Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 im Kniebereich, blaue Kurve, und im Femurbereich, rosa Kurve, als gemittelte Konzentration ohne Einheit dargestellt.



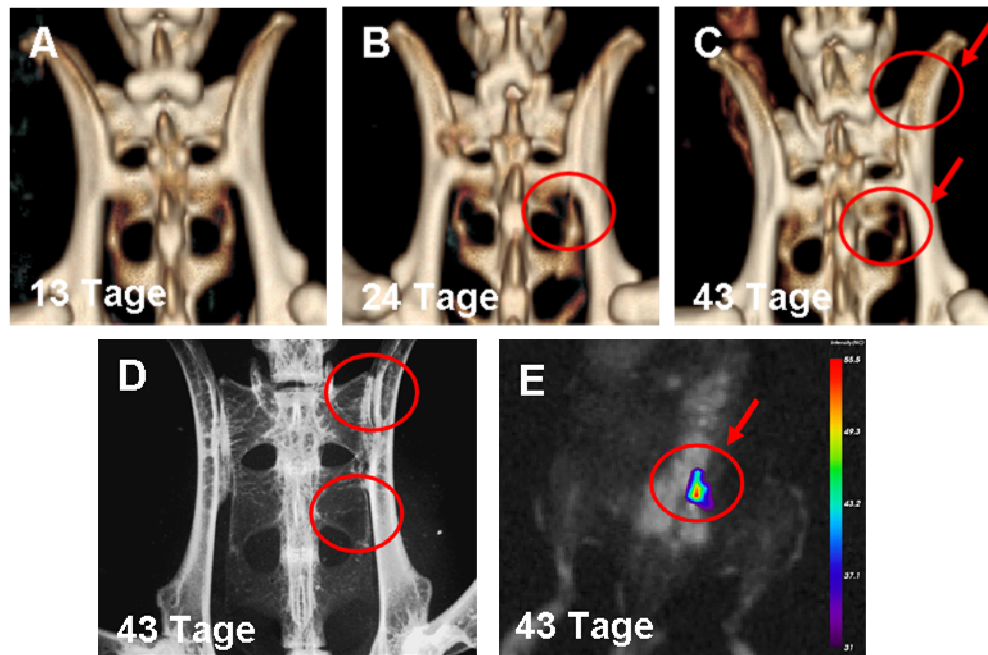
**Abb. 3 .18: Repräsentative, vergleichende Darstellung von fpVCT und Histologie der Knochen aus dem linken und rechten Bein einer SCID-Maus.** Die Maus wurde mittels fpVCT 43 Tage nach i.c. MDA-MB-231-Tumorzellen-Implantation gemessen. (A) fpVCT-Bild der Knochen des linken Beins in ventraler Ansicht 43 Tage nach i.c. Implantation von  $1 \times 10^6$  MDA-MB-231-Zellen, die roten Pfeile zeigen osteolytische Destruktionen im Bereich des Knies. (B) Im Vergleich dazu ein fpVCT-Bild der Knochen des gesunden rechten Beins in ventraler Ansicht derselben Maus zur selben Zeit. (C) HE Färbung des Paraffinschnittes der Knochen des linken Beins, im Vergleich mit (D) HE Färbung des Paraffinschnittes der Knochen des gesunden Beins. Diese zeigen eine ausgeprägte Zerstörung der *Corticalis* im Bereich des linken Knies.

Bei einem weiteren Tier aus dieser Versuchsreihe konnte eine Osteolyse am distalen *Os occipitale* 42 Tage nach i.c. Tumorzellen-Implantation mittels fpVCT detektiert werden (Abb. 3.19 B, D). Die fpVCT-Untersuchung zeigt, dass am Tag 13 die Knochenstruktur des Schädels noch nicht beschädigt war (Abb. 3.19 A, C). Die Läsion konnte am Tag 42 mittels der Faxitron-Untersuchung nicht nachgewiesen werden, weil es hier eine Überlagerung der Knochenstrukturen gibt (Abb. 3.19 E). Die Läsion ist am HE gefärbten Paraffinschnitt des Schädels sichtbar, wo bei starker Vergrößerung auch die Invasionsfront der Tumorzellen sichtbar ist (Abb. 3.19 G, H). Dies zeigt die Genauigkeit und Sensitivität des fpVCT in der Detektion von Veränderungen in der Knochenstruktur. Abb. 3.19 F zeigt *post mortal* dieselbe Maus 24 h nach i.v. Applikation von anti-uPAR\*Cy5.5 in einer Untersuchung mittels eXplore Optix. Spezifische Fluoreszenzsignale sind an der Läsionsstelle erkennbar, was belegt, dass sich in der Läsion im *Os occipitale* MDA-MB-231-Tumorzellen befinden, die die Osteolyse verursacht haben. Durch eine mikroskopische NIR Untersuchung des entsprechenden Kryoschnittes (Abb. 3.19 I) wird bewiesen, dass die beobachteten Signale von einer Bindung des anti-uPAR\*Cy5.5 an den Tumorzellen herrühren.

Bei einer dritten Maus wurden 24 Tage nach i.c. Tumorzellen-Implantation an der Lendenwirbelsäule Metastasen entdeckt (Abb. 3.20 B), die 13 Tage nach i.c. Tumorzellen-Implantation im fpVCT-Bild noch nicht sichtbar waren (Abb. 3.20 A). Am Tag 43 nach der i.c. Tumorzellen-Implantation sind die Läsionen im Bereich der Lendenwirbelsäule und an der rechten Seite des Kreuzbeins sichtbar (Abb. 3.20 C), was im Faxitronbild desselben Tages aufgrund der geringen Größe und Dichteänderung nicht erkennbar war (Abb. 3.20 D). Dies zeigt, wie im vorher beschriebenen Beispiel, dass mittels fpVCT die Knochenläsionen gut visualisiert werden können. Abb. 3.20 E zeigt dieselbe Maus *post mortal* 24 h nach i.v. Applikation von anti-uPAR\*Cy5.5, welches in der Region des letzten Lendenwirbels detektierbar war. Dadurch wurde der Nachweis erbracht, dass sich in dieser Region MDA-MB-231-Tumorzellen befanden.



**Abb. 3.19: Repräsentative Darstellung der Entwicklung einer Osteolyse im Schädel einer SCID-Maus nach i.c. Implantation von MDA-MB-231-Zellen.** Das Tier wurde sowohl mittels eXplore Optix 24 h nach der i.v. Injektion von 50 µg anti-uPAR\*Cy5.5 durchgeführt als auch mittels fpVCT gescannt. Mit einem roten Dreieck ist die Läsion markiert. FpVCT Darstellungen des Schädelknochens nach Tumorimplantation, dorsal: (A) 13 Tage, ohne Läsion. (B) 42 Tage, mit Läsion im *Os occipitale*; Caudal: (C) 13 Tage, ohne Läsionen. (D) 42 Tage, mit Läsionen im *Os occipitale*. (E) Faxitrondarstellung des Schädels am 42. Tag nach der Tumorimplantation zeigt den Schädel, dargestellt mit der Überlagerung verschiedener Knochenstrukturen. (F) eXplore Optix Scan 43 Tage nach der i.c. Implantation der Tumorzellen (Dorsalansicht) mit deutlichem Fluoreszenzsignal an der Läsionsstelle. (G) HE Färbung eines Paraffinschnittes des Schädels, sichtbare Läsion im distalen *Os occipitale*. (H) 20-fach vergrößert. (I) NIR-Mikroskopisches Bild des Knochenparaffinschnitts in 63-facher Vergrößerung, die Zellkerne sind mittels DAPI blau gefärbt, rote Signale entsprechen anti-uPAR\*Cy5.5 und zeigen, dass der anti-uPAR\*Cy5.5 an die Tumorzellen im Schädelknochen gebunden hat.

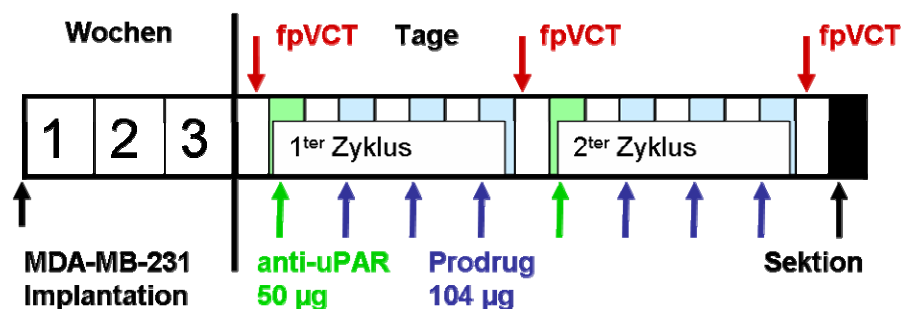


**Abb. 3.20: Exemplarische Darstellung der Knochenläsionen im Bereich der Lendenwirbelsäule einer SCID-Maus nach der i.c. Implantation von MDA-MB-231-Zellen.** (A-C) Darstellung der Lendenwirbelsäule per fpVCT in dorsaler Ansicht nach Tumorimplantation: (A) 13 Tage, keine Läsion war sichtbar; (B) 24 Tage, erste Veränderung im Bereich des Querfortsatzes des letzten Lendenwirbels war erkennbar, und (C) 43 Tage, zwei Läsionen im Wirbelbereich und am rechten Beckenkamm waren nachweisbar. (D) Faxitrondarstellung der Lendenwirbelsäule am 43. Tag. Die Veränderungen sind aufgrund geringer Größe und Dichteunterschiede nicht erkennbar. (E) Die Messung erfolgte mittels eXplore Optix 24 h nach i.v. Injektion von 50 µg des anti-uPAR\*Cy5.5 und 43 Tage nach der i.c. Implantation der Tumorzellen. Im Bereich der Läsionen waren deutliche, spezifische Fluoreszenzsignale von uPAR\*Cy5.5 messbar.

### 3.1.3 *In vivo*-Studie zum therapeutischen Einsatz des ADEPT-Konzepts im Mammakarzinom-Mausmodell

Die Wirksamkeit des ADEPT-Konzepts wurde präklinisch in einem orthotopen SCID-Mausmodell für den menschlichen Brustkrebs mittels des Antikörper-Enzym-Konjugats anti-uPAR\*β-D-Galaktosidase und des *anti*-Methyl-*seco*-CBI-DMAI-Prodrugs untersucht. Die orthotope Implantation von MDA-MB-231-Zellen in die Milchdrüse der SCID-Mäuse führte bei allen Tieren zu einem lokalen Wachstum von einem Tumor in diesem Bereich, der nach drei Wochen detektierbar war.

Aus den Ergebnissen der *in vitro*- und *in vivo*-Analysen wurde folgendes Therapieschema für die ADEPT entwickelt: Die Therapie wurde drei Wochen nach Tumorimplantation begonnen. 50 µg des Antikörper-Enzym-Konjugats anti-uPAR\*β-D-Gal wurde in PBS i.v. appliziert. Da der Antikörper nach 48 h im Serumspiegel deutlich sank, wurde nach dieser Zeit begonnen, 104 µg Prodrug in 1%-igem DMSO/NaCl i.v. jeden zweiten Tag zu verabreichen. Die Gabe erfolgte dreimal. Der ganze Zyklus, d.h. die Gabe von anti-uPAR\*β-D-Gal und Prodrug wurde einmal wiederholt (Abb. 3.21). Die Tumorumfänge wurden mittels fpVCT bei Therapiebeginn, 24 h nach dem ersten Zyklus und 24 h nach dem zweiten Zyklus gemessen. Den Kontrollmäusen wurde PBS anstelle der Antikörper-Enzym-Konjugat-Lösung und 1%-ige DMSO/NaCl anstelle des Prodrugs-Lösung verabreicht.



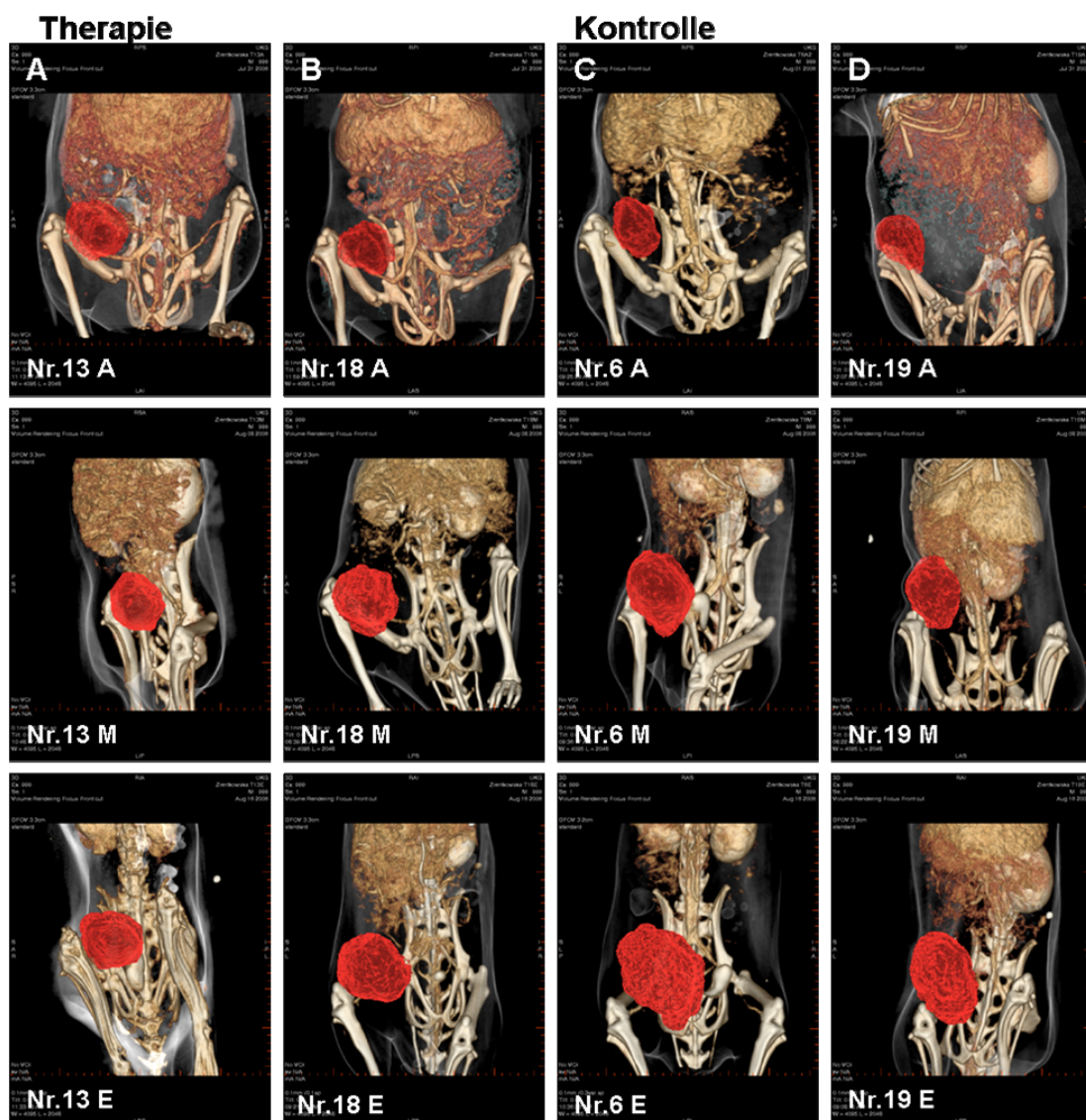
**Abb. 3.21: Behandlungsplan**

Um zu prüfen, ob anti-uPAR\*β-D-Gal oder das Prodrug alleine eine inhibitorische Wirkung auf das Tumorstadium haben, wurden Kontrollen durchgeführt. Bei diesen wurde entweder anti-uPAR\*β-D-Gal, das Prodrug oder nur Pufferlösungen wie im normalen Therapieschema (Abb. 3.21) appliziert. Es wurden je Gruppe fünf Mäuse untersucht. Die ADEPT wurde von allen Tieren gut vertragen. Dies zeigte sich auch in den Blutwerten, die sich nicht zwischen therapierten Mäusen und den Kontrollmäusen unterschieden.

Abb. 3.22 zeigt exemplarisch fpVCT-Bilder der Entwicklung der Mammakarzinome von zwei therapierten (Abb. 3.22 A-C) im Vergleich zu zwei Kontroll-SCID-Mäusen (Abb. 3.22 D-F). Am Therapieanfang hatten die Tumoren vergleichbare Volumina von  $0,12 \pm 0,10 \text{ cm}^3$  in den therapierten Mäusen ( $n=11$ ) und  $0,11 \pm 0,06 \text{ cm}^3$  in den Kontrollmäusen ( $n=8$ ). Die Tumoren der therapierten Mäuse hatten bei ähnlichen Ausgangsgrößen kleinere Volumina erreicht als die Tumoren der Kontrollmäuse.

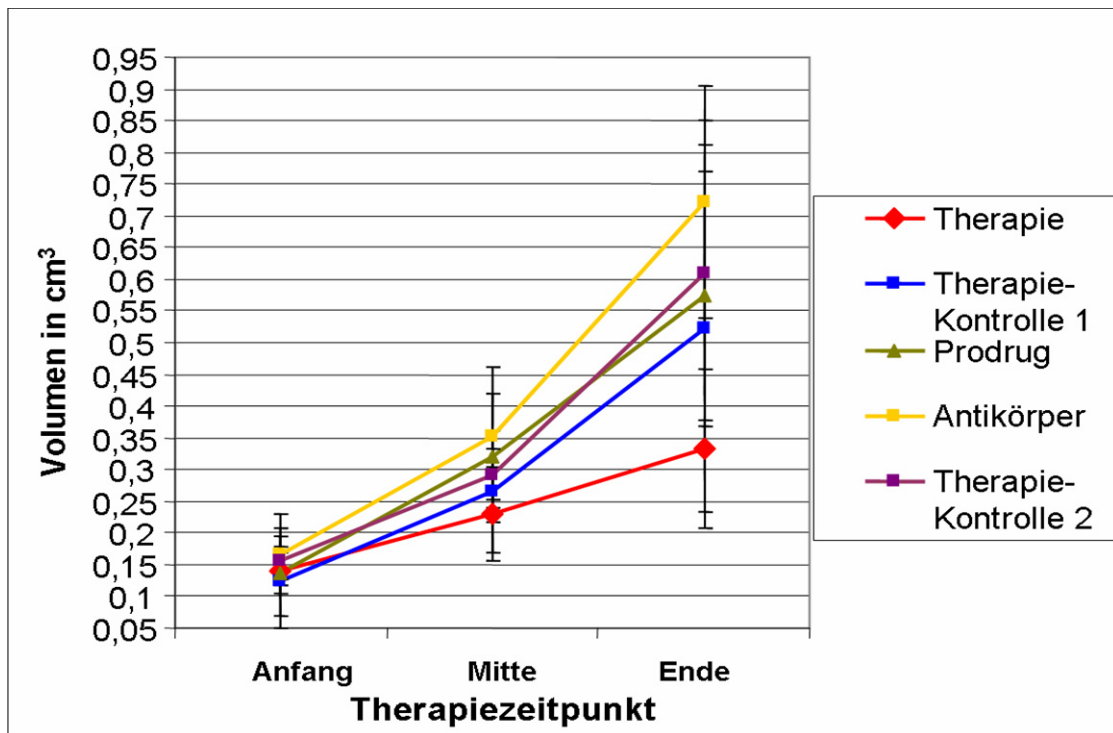
Dieser Unterschied wird besonders deutlich an den Bildern aus der letzten fpVCT-Untersuchung direkt nach der Therapie.

Die Primärtumore nach dem ersten Therapiezyklus erreichten in den therapierten Mäusen Volumina von  $0,20 \pm 0,10 \text{ cm}^3$  und in den Kontrollmäusen Volumina von  $0,24 \pm 0,11 \text{ cm}^3$ . Dieser Unterschied war nicht so stark wie nach dem zweiten Therapiezyklus, bei dem die Tumorumfänge der therapierten Mäuse mit  $0,28 \pm 0,16 \text{ cm}^3$  sich von denen der Kontrollmäuse mit  $0,49 \pm 0,28 \text{ cm}^3$  deutlich unterschieden. Die Applikation der einzelnen Komponenten des ADEPT hatte keinen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum der behandelten Tiere. Dies gilt sowohl für anti-uPAR $\beta$ -D-Gal, Prodrug als auch für den Puffer (Abb. 3.23).



**Abb. 3.22:** Exemplarische fpVCT-Bilder der Mammakarzinom-Entwicklung von zwei therapierten und zwei Kontroll-SCID-Mäusen. Die Tiere wurden drei Wochen nach der orthotopen Implantation von MDA-MB-231-Tumorzellen mittels fpVCT ein erstes Mal und dem

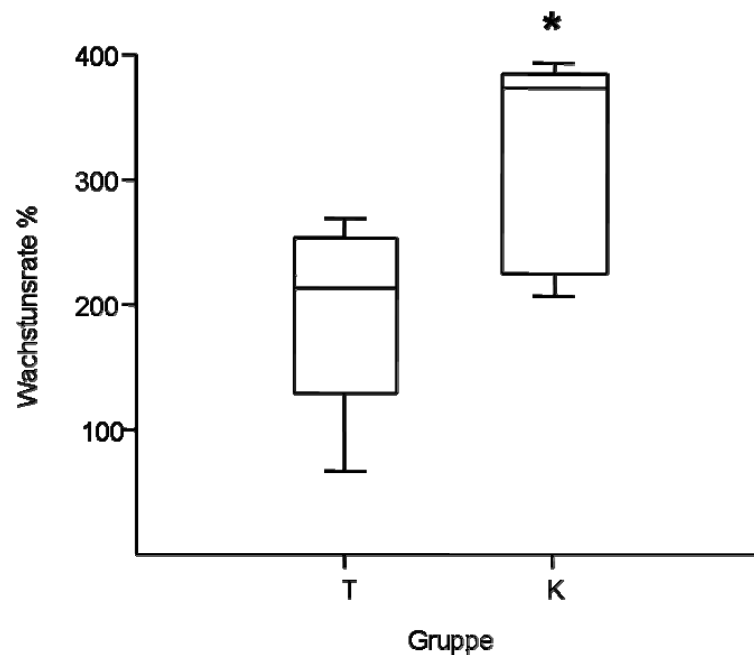
ersten und zweiten Therapiezyklus untersucht. Mit Buchstabe A wurde der Therapiebeginn, mit M der Scan nach dem ersten Therapiezyklus und mit E der am Ende der Therapie bezeichnet. fpVCT Rekonstruktionen der Körper von: (A, B) therapierten Tieren, und (C, D) Kontrollmäusen. Die Tumoren wurden rot dargestellt. Die Tumoren in den therapierten Mäusen erreichten bei ähnlichen Ausgangsgrößen kleinere Volumina im Vergleich zu Tumoren in den Kontrollmäusen.



**Abb. 3.23: Tumorwachstum der Tumoren in Gruppen von therapierten Mäusen im Vergleich zu den einzelnen Kontrollgruppen.** Das Wachstum der Tumoren wird als Tumolvolumen in  $\text{cm}^3$  zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt: bei Therapiebeginn, nach dem ersten (Mitte) und nach dem zweiten (Ende) Therapiezyklus. Es wurden folgende Gruppengrößen verwendet:  $n=11$  für Therapiegruppe,  $n=8$  für Therapiekontrolle 1,  $n=5$  für Prodrug,  $n=5$  für anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal und  $n=5$  für Therapiekontrolle 2. Die Behandlung mit dem anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal oder dem Prodrug alleine zeigte keinen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum. In der therapierten Gruppe zeigte sich eine Hemmung des Tumorwachstums, dieser Effekt war nach dem zweiten Zyklus stärker als nach dem ersten Therapiezyklus.

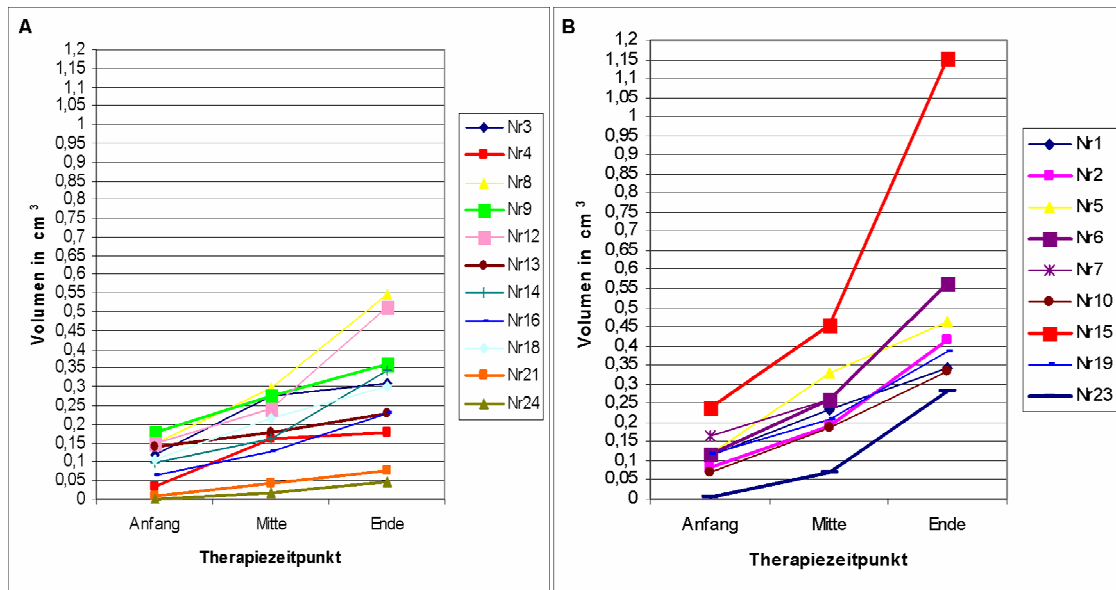
Für die Mittelwerte der therapierten Gruppe lag die prozentuale Tumorwachstumsrate 132% niedriger (um Faktor 1,7) als bei der Kontrollgruppe (Abb. 3.24), wobei Tumoren mit Ausgangsvolumina  $< 0,009 \text{ cm}^3$  nicht ausgewertet wurden. Der inhibitorische Effekt des ADEPT auf die prozentuale Tumorwachstumsrate während der Gesamttherapie war deutlich und statistisch signifikant.





**Abb. 3 .24: Analyse der Wachstumsraten während der Gesamttherapie von MDA-MB-231 Brusttumoren in % in therapierten SCID-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen.** Die prozentualen Tumorwachstumsraten in Mäusen während beider Behandlungszyklen: therapierte Mäuse (T) n=8, Kontrollmäuse (K) n=7; die prozentuale Tumorwachstumsrate in therapierten Tieren ist signifikant geringer als in der Kontrollgruppe;  $p=0,044$ . Als statistisch signifikant wurde  $p<0,05$  angenommen. Der Mittelwert der Tumorwachstumsraten therapierter Mäuse ist 132% niedriger als in den Kontrollmäusen. Die Tumoren deren Ausgangsvolumina  $< 0,009 \text{ cm}^3$  waren, wurden nicht mit ausgewertet.

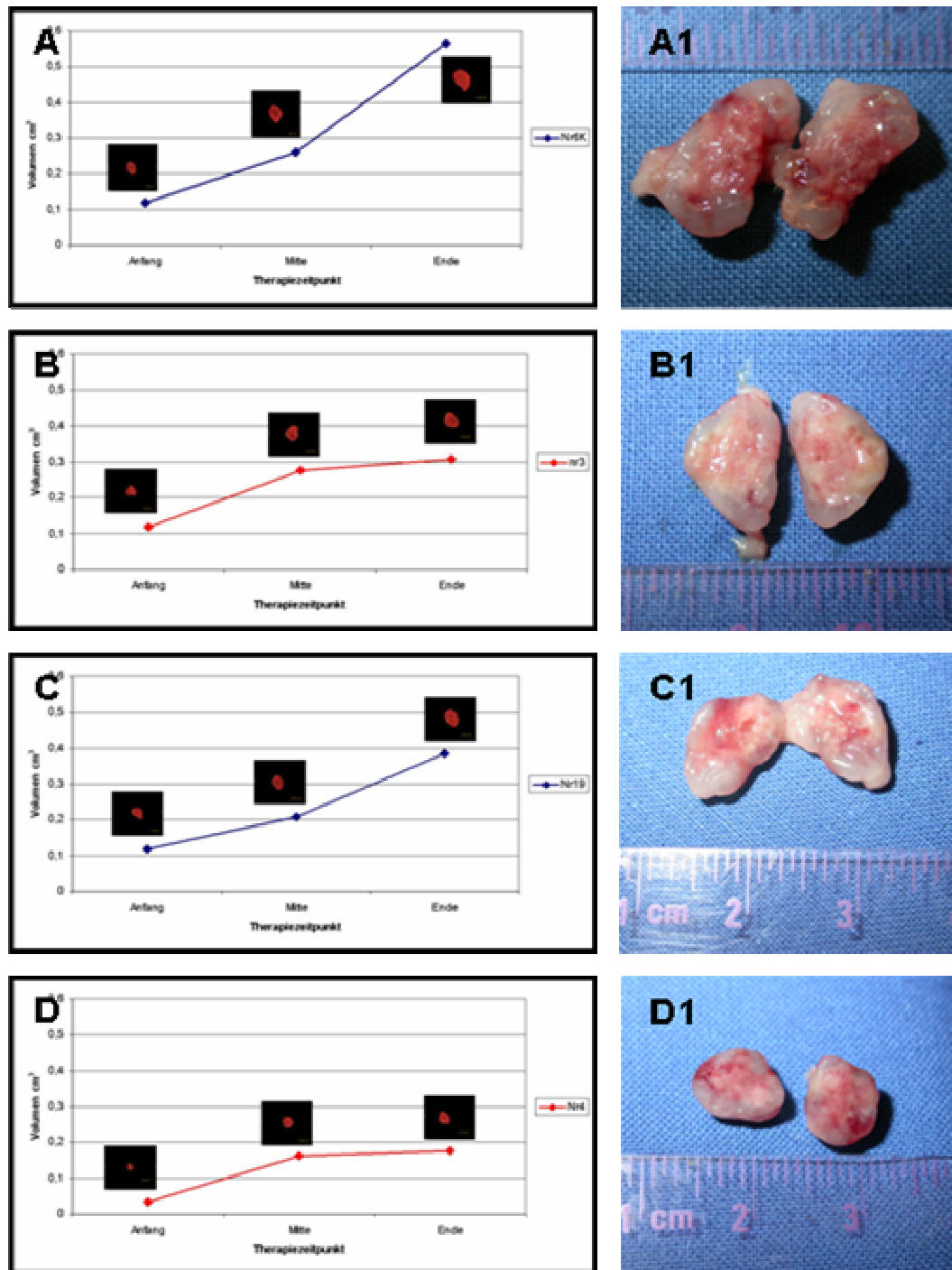
Die Abb. 3.25 zeigt bei allen therapierten (A) und allen Kontrollmäusen (B), das Wachstum der Tumorumfängen in  $\text{cm}^3$  während des Therapieverlaufs. Die Tumoren der therapierten Tiere erreichen kleinere Volumina, als die Tumoren mit entsprechenden Ausgangsvolumina in den Kontrolltieren. Die hier ermittelten Daten (Abb. 3.25) deuten darauf hin, dass beim Mammakarzinom der Therapieeffekt vom Tumorausgangsvolumen abhängt, wobei kleinere Tumoren besser auf die Therapie ansprechen.



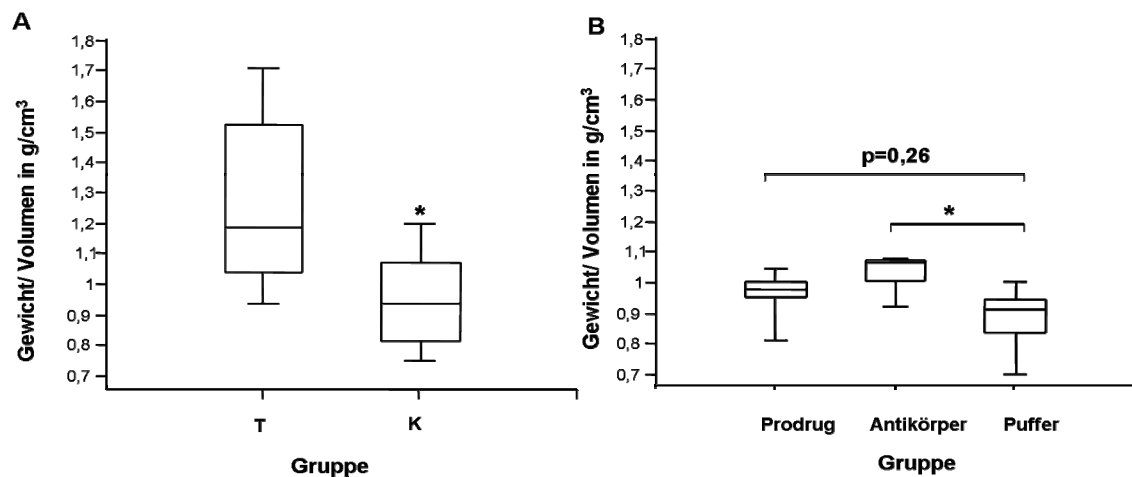
**Abb. 3.25: Volumina einzelner Tumoren von therapierten und Kontrollmäusen zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der ADEPT.** (A) Die Tumolvolumina einzelner therapiertener Mäuse; (B) die Tumolvolumina einzelner Kontrollmäuse. Die Tumoren therapiertener Mäuse zeigen langsames Wachstum als die der Kontrollmäuse. Der inhibitorische Effekt der Therapie auf das Tumorwachstum ist bei kleineren Tumoren stärker, wie am Kurvenverlauf z.B. (A) Nr. 24 und Nr. 21 im Vergleich zu Nr. 12 sichtbar wird.

Abb. 3.26 stellt das exemplarisch für jeweils zwei Tumoren der Kontrollmäuse (Abb. 3.26 A und C) und der therapierten Mäuse (Abb. 3.26 B und D). Um die Tumoren zu zeigen, wurden die entsprechenden Tumoren *ex vivo* halbiert dargestellt (Abb. 3.26 A1-D1).

Weiterhin wurden die Tumordichten der Mammakarzinome nach dem zweiten Therapiezyklus untersucht. Die Tumoren wurden *ex vivo* gewogen. Die Tumordichten wurden berechnet, indem das Tumorgewicht durch das Tumolvolumen aus der fpVCT Messung am Versuchsende dividiert wurde (Abb. 3.27 A). Die Tumoren aus den therapierten Mäusen hatten eine statistisch signifikant ( $p=0,0062$ ) höhere Dichte als die Tumoren der Kontrolltiere. Innerhalb der Kontrollgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,26$ ) zwischen der Gruppe, der nur Prodrug, und derjenigen, der nur Puffer appliziert wurde. Die Tumordichte in der Gruppe, der nur Antikörper appliziert wurde, lag jedoch signifikant höher als in der Gruppe der nur Puffer appliziert wurde ( $p=0,037$ ; Abb. 3.27 A).



**Abb. 3.26: Exemplarische Darstellung der Volumina einzelner Tumoren von therapierten und Kontrollmäusen zu drei verschiedenen Zeitpunkten während der ADEPT und deren Morphologie nach der Therapie.** Dargestellt sind die Tumolvolumina einzelner Tumoren im Therapieverlauf: (A und C) Kontrollmäuse und (B und D) therapierte Mäuse. Die Bilder der durchgeschnittenen Tumoren nach der ADEPT *ex vivo*: (A1 und C1) aus Kontrollen und (B1 und D1) aus therapierten Mäusen. Die Tumoren der therapierten Mäuse zeigten ein langsames Wachstum als die aus den Kontrollmäusen.



**Abb. 3.27: Tumordichten der Mammakarzinome bei der Sektion.** Die Tumoren wurden *ex vivo* gewogen und die Tumordichte berechnet. (A) Die Tumoren der therapierten Mäuse (n=11) hatten statistisch signifikant ( $p=0,0062$ ) höhere Dichten als die der Kontrolltiere (n=8). (B) Die Tumoren aus der Kontrollgruppe (n=5), die nur mit Prodrug behandelt wurden unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe, die nur Pufferlösung bekommen hatte (n=5,  $p=0,26$ ). Die Kontrollgruppe, die nur Antikörper bekommen hatte (n=5), wies statistisch signifikant höhere Tumordichten auf, als die Kontrollgruppe, die nur die Pufferlösung bekommen hatte ( $p=0,037$ ).

## 3.2 Entwicklung des ADEPT-Konzepts zur Behandlung von Lymphomen

In den folgenden Abschnitten wird das ADEPT-Konzept zur Behandlung von Lymphomen im Tiermodell beschrieben. Für das syngene Mausmodell eines hochmalignen B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom wurden A20-Tumorzellen verwendet, die an der Oberfläche der Zellmembran das anti-CD19 exprimieren, welches in dieser Arbeit für die ADEPT als Bote des Enzyms  $\beta$ -D-Galaktosidase verwendet wurde, um das Prodrug im Tumorbereich zu aktivieren.

### 3.2.1 *In vitro*-Studien an Lymphom-Zellen zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts

Bevor das Antikörper-Enzym-Konjugat anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase in der ADEPT *in vivo* eingesetzt werden konnte, wurde *in vitro* die Spezifität, die Dauer der Bindung und die Internalisierung des Antikörpers, sowie des Antikörper-Enzym-Konjugates an Tumorzellen untersucht.

### 3.2.1.1 Vergleichende Bindungsstudien des anti-CD19\*FITC und anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC an A20-Zellen

Analog zu den Bindungsstudien des anti-uPAR und anti-uPAR\*β-D-Gal an den MDA-MB-231-Zellen wurde eine *in vitro*-Untersuchung mit dem monoklonalen, murinen FITC-markierten anti-CD19 und anti-CD19\*β-D-Gal an A20-Zellen durchgeführt. Die A20-Zellen wurden mit 20 µg/ml anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC und als Kontrolle mit dem anti-CD19\*FITC in 100 µl Zellkulturmedium bei 37°C inkubiert. Wegen der schwächeren FITC-Markierung wurde eine höhere Konzentration des Antikörpers anti-CD19 im Vergleich zu anti-uPAR\*FITC eingesetzt.

Die Bindung des anti-CD19\*FITC und anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC an A20-Zellen wurde mittels eines konfokalen Laser Scan Mikroskops untersucht. Nach 2 h Inkubation konnte der anti-CD19\*FITC punktuell an der Membran der Zellen detektiert werden (Abb. 3.28 A, E). Nach 5 h nahm die Bindungsintensität zu, wobei ab diesem Zeitpunkt die Bindung von anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC stabil blieb (Abb. 3.28 B, F). Eine Internalisierung des anti-CD19\*FITC konnte nach 24 h beobachtet werden (Abb. 3.28 C). Der anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC wurde zu diesem Zeitpunkt noch nicht im Zytoplasma detektiert (Abb. 3.28 G), was nach 48 h jedoch möglich war (Abb. 3.28 D). Der anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC wurde weniger internalisiert als der anti-CD19\*FITC (Abb. 3.28 H, Tab. 3.8). Mittels SYTO61-Färbung der Zellkerne wurde gezeigt, dass die Mehrzahl der Zellen 48 h nach Antikörper-Gabe nicht beschädigt war. Abgestorbene Zellen internalisierten den Antikörper (Abb. 3.28 D). Der Versuch wurde zweimal wiederholt.

Inkubationszeit	Bindung		Internalisierung	
	anti-CD19*FITC	anti-CD19*β-D-Gal*FITC	anti-CD19*FITC	anti-CD19*β-D-Gal*FITC
2 h	+	++	-	-
5 h	+++	+++	-	-
24 h	++	+++	+	-
48 h	++	+++	++	+

**Tab. 3.8: Internalisierung des anti-CD19\*FITC und anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC in A20-Tumorzellen *in vitro*.** Zeichen + und - beschreiben qualitative, subjektive Bindungsintensität.

Um die Spezifität der anti-CD19\*FITC-Bindung an die Zellmembranen zu untersuchen, wurde eine Bindungsstudie mit der Isotyp-Kontrolle IgG2a\*FITC durchgeführt. Bei der Isotyp-Kontrolle handelt es sich um das Immunglobulin IgG2a, das dieselbe

Immunoglobulinklasse darstellt wie die des anti-CD19, aber keine Bindungsspezifität zu den A20-Zellen besitzt. Bei der Isotyp-Kontrolle findet nach 4 h Inkubation bei 37°C mit den A20-Zellen weder eine Bindung noch eine Internalisierung statt (Abb. 3.29 A). Im Gegensatz dazu bindet anti-CD19\*FITC in der selben Zeit stark an die Zellmembran (Abb. 3.29 B).

Der Prozentsatz der A20-Zellen, an den anti-CD19\*FITC bindet, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich mit der Isotyp-Kontrolle IgG2a\*FITC mittels FACS-Analyse untersucht. Da alle B-Zellen das CD45 Antigen exprimieren, dient der Nachweis der Bindung des anti-CD45\*PE an die A20-Zellen als Kontrolle, dass die Zellen nicht ausdifferenziert sind. Die A20-Zellen wurden mit den Antikörpern, in einer Konzentration von je 20 µg/ml, anti-CD19\*FITC (Abb. 3.30 E), IgG2a\*FITC (Abb. 3.30 B), IgG2a\*PE (Abb. 3.30 A) oder anti-CD45\*PE (Abb. 3.30 D) inkubiert. Als Negativkontrolle wurden A20-Zellen ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert (Abb. 3.30 C). Anschließend wurden die A20-Zellen mit anti-CD19\*FITC und anti-CD45\*PE für 30 min, 1 h, 2 h, 3 h und 4 h inkubiert, gewaschen und einer fluoreszenzaktivierten Zellsortierungsanalyse (FACS) unterzogen (Abb. 3.30 F). Es wurden einfach positive, doppelt positive und doppelt negative Zellen gemessen. Die doppelt positiven Zellen mit gebundenem anti-CD45\*PE und anti-CD19\*FITC sind A20-Zellen die das CD19 Antigen exprimierten. Der genaue prozentuale Anteil der doppelt positiv gebundenen Zellen ist in Tab. 3.9 dargestellt. Bereits nach 30 min wurden annähernd 100% der Zellen als doppelt positiv gebundene identifiziert. Dieser prozentuale Anteil doppelt positiv gebundener Zellen blieb bis zu 4 h stabil. Es wurden hingegen nur 1,18% positive Zellen für IgG2a\*PE und 0,36% für IgG2a\*FITC gemessen, was auf die Spezifität der anti-CD19\*FITC CD19 Antigen Erkennung zurückgeführt werden kann.

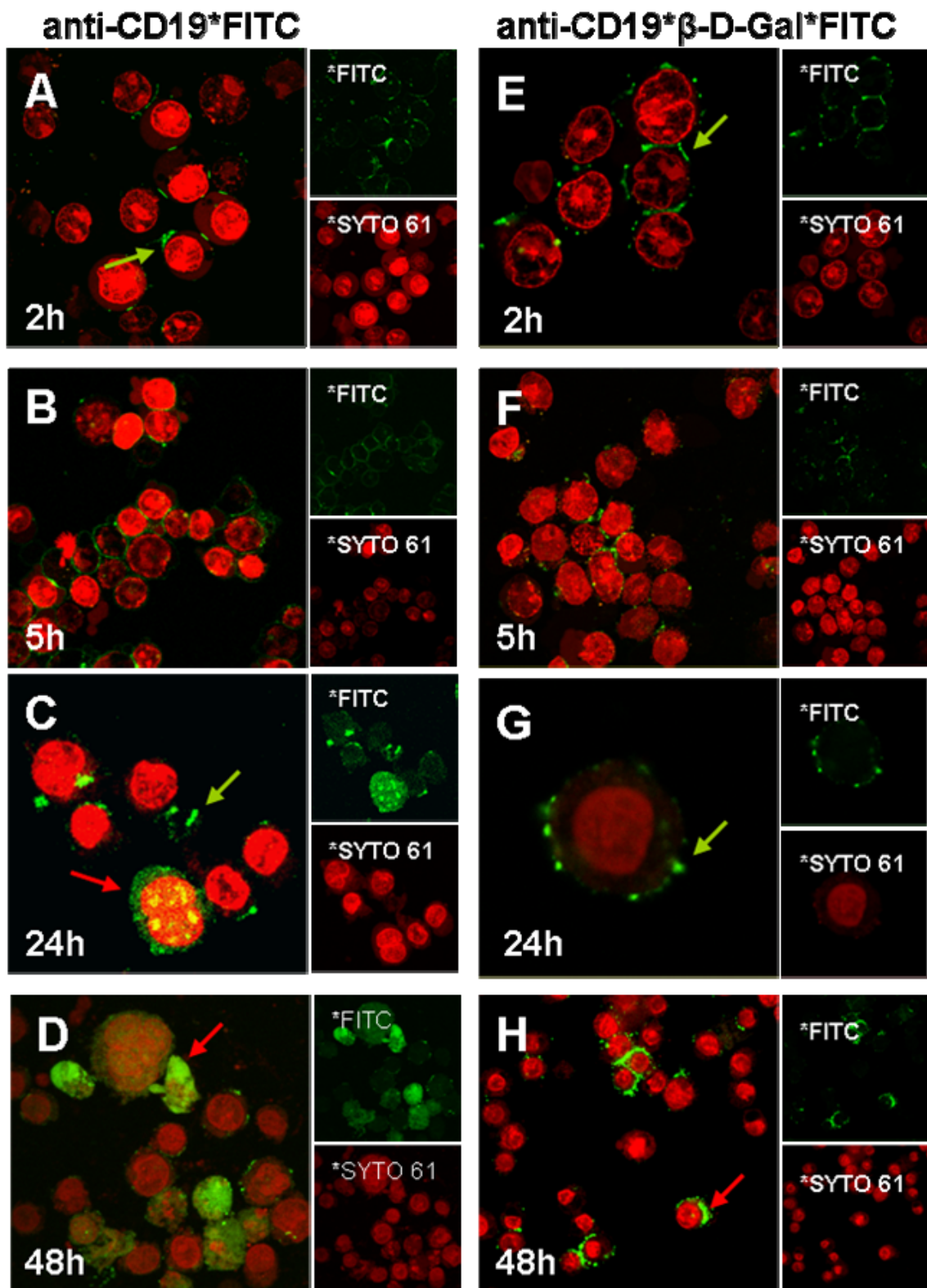
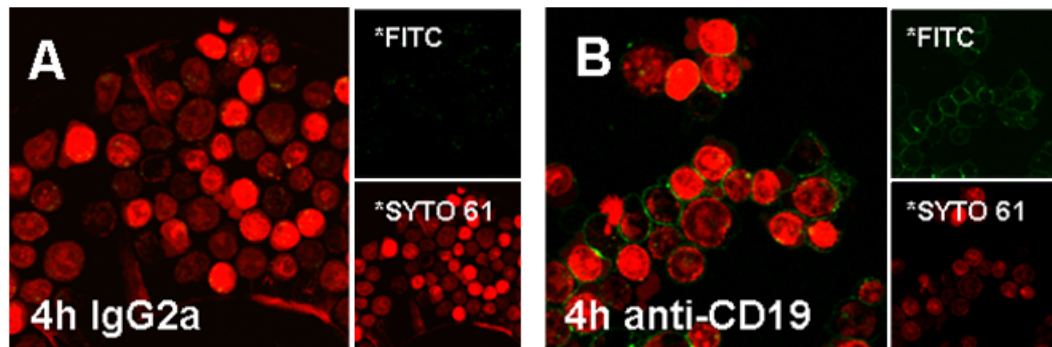


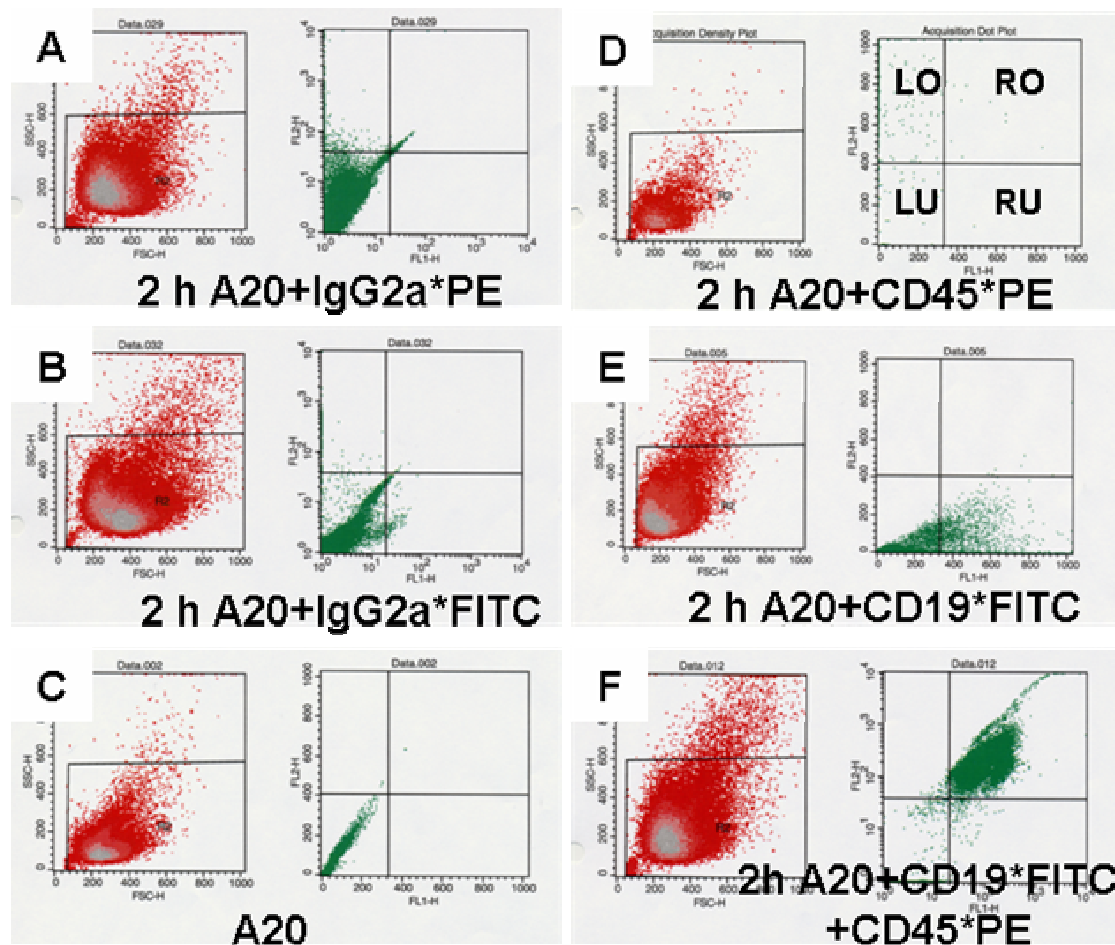
Abb. 3.28: Bindung der anti-CD19\*FITC und anti-CD19\*β-D-Gal\*FITC an die Zellmembranen von A20-Zellen. Die Antikörper wurden mit FITC markiert (grün), der Zellkern mit SYTO61 rot gefärbt. A20-Zellen wurden mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop

(Leica) mit 40-facher Vergrößerung dargestellt. Die Zellen wurden mit anti-CD19\*FITC: (A) 2 h, (B) 5 h, (C) 28 h, (D) 48 h oder mit anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*FITC: (E) 2 h, (F) 5 h, (G) 28 h, (H) 48 h inkubiert. Für die beiden Antikörper anti-CD19\*FITC und anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*FITC, wurden nach 2 h Inkubation eine ungleichmäßige Bindungen an die Zellmembranen sichtbar (mit grünen Pfeilen markiert), die bis 24 h zu beobachten war. Es wurde eine Internalisierung der anti-CD19\*FITC nach 24 h beobachtet, wobei das anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*FITC-Konjugat erst nach 48 h im Zytoplasma zu detektieren war (H, rote Pfeile). Die Zellen blieben bis zu 48 h vital.



**Abb. 3.29: Bindung der Isotyp-Kontrolle Immunoglobulin IgG2a\*FITC im Vergleich zu anti-CD19\*FITC an die Zellmembranen von A20-Zellen.** Anti-CD19\*FITC und Isotyp-Kontrolle IgG2a\*FITC wurden mit einem konfokalen Laser Scan Mikroskop (Leica) mit 40-facher Vergrößerung dargestellt. Die Zellkerne sind mit SYTO61 rot gefärbt. Die Zellen wurden 4 h inkubiert mit: (A) Immunoglobulin IgG2a\*FITC und (B) anti-CD19\*FITC. Im Gegensatz zum anti-CD19\*FITC konnte keine Bindung der Isotyp-Kontrolle an die Zellmembranen beobachtet werden.





**Abb. 3.30: FACS-Analysen der Bindung von anti-CD19\*FITC und anti-CD45\*PE an A20-Zellen.** Die rot dargestellten Punkte zeigen die zu messende gesamte Zellpopulation an, wobei die grün dargestellten das Ergebnis der Fluoreszenz-Messung sind. Jeder rote Punkt entspricht einer einzelnen gemessenen Zelle und jeder grüne Punkt entspricht dem Fluoreszenzsignal einer mit Antikörpern oder Immunglobulinen gebundenen Zelle. Die Isotyp-Kontrollen (A) IgG2a\*PE und (B) IgG2a\*FITC, die mit den Zellen 2 h inkubiert wurden, wurden in beiden Fällen nicht gebunden und sind als negatives Resultat im linken unteren Bereich (LU) dargestellt. (C) Die nicht markierten A20-Zellen befinden sich ebenfalls im linken unteren Bereich. Hier werden die doppeltnegativen Zellen angezeigt. (D) Die mit anti-CD45\*PE markierten Zellen sind im linken oberen Bereich (LO) dargestellt. (E) Die mit anti-CD19\*FITC markierten Zellen sind im rechten unteren Bereich (RU) dargestellt. (F) Exemplarische Darstellung der FACS Analyse von A20-Zellen nach 2 h Inkubation mit anti-CD45\*PE und anti-CD19\*FITC. Die doppeltpositivmarkierten Zellen sind im oberen rechten Bereich (RO) dargestellt. Die anti-CD19\*FITC und anti-CD45\*PE binden spezifisch an die A20-Zellen die somit nachweislich in der Zellkultur undifferenziert blieben (F).

A20-Zellen inkubiert mit:	Zeit	% positive Zellen
IgG2a*PE	2 h	1,18
IgG2a*FITC	2 h	0,36
anti-CD19*FITC und anti-CD45*PE	Zeit	% doppelpositive Zellen
	30 min	98,93
	1 h	99,27
	2 h	99,95
	3 h	98,97
	4 h	99,90

**Tab. 3.9: Prozentuale Darstellung der FACS-Bindungsanalyse des anti-CD19\*FITC anti-CD45\*PE und der Isotyp-Kontrolle an A20-Zellen.** Die undifferenzierten A20-Zellen exprimieren das CD45 Antigen, das als Kontrolle der Zelldifferenzierung verwendet wurde. Die A20-Zellen wurden mit anti-CD45\*PE und anti-CD19\*FITC von 30 min bis 4 h inkubiert. Bereits nach 30 min sind fast 100% der Zellen doppelt positiv markiert, dieser prozentuale Anteil doppelpositiver Zellen bleibt bis 4 h konstant. Die Isotyp-Kontrolle bindet nicht an A20-Tumorzellen, was zeigt, dass keine unspezifische Bindung stattfindet.

### 3.2.2 *In vivo*-Studien zur Überprüfung einzelner Komponenten des ADEPT-Konzepts am Lymphom-Modell

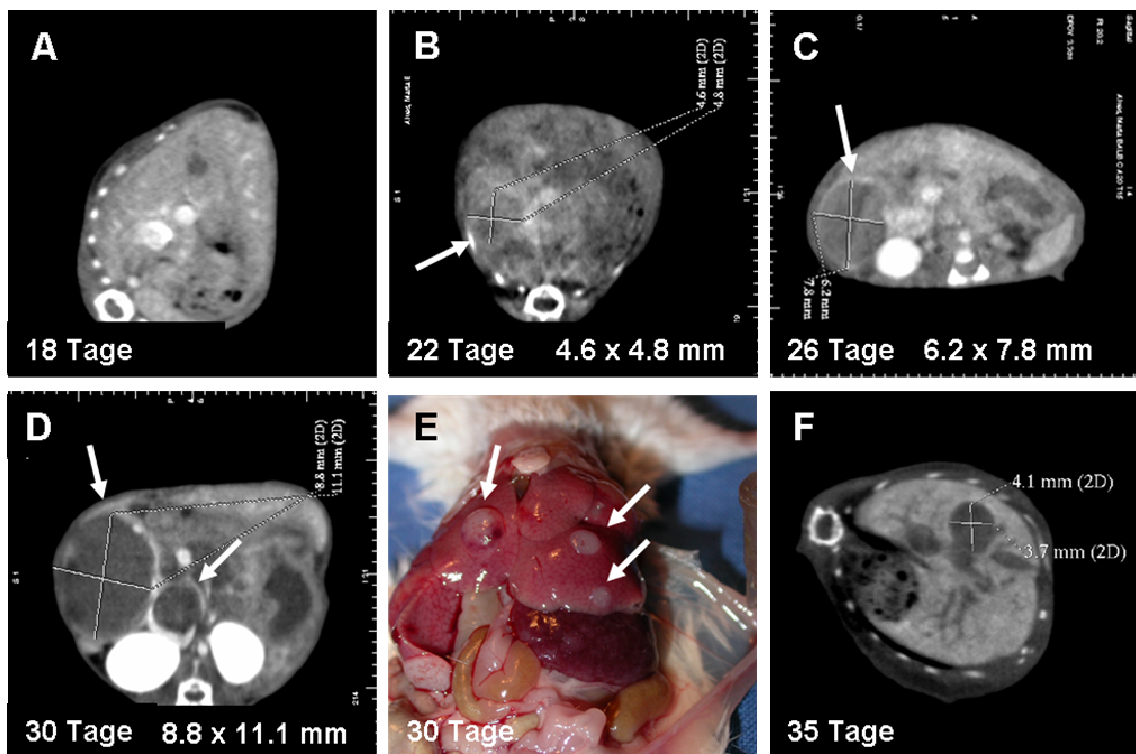
Um das ADEPT-Konzept *in vivo* anzuwenden, wurde das syngene Balb/c-Maus-Modell für das hochmaligne B-Zelllymphom etabliert. In diesem Modell entwickeln sich vier Wochen nach der i.v. Injektion von murinen A20-Tumorzellen Lymphome. Die Lokalisation der Lymphome ist vor allem in der Leber. Der Zeitpunkt zu dem die Therapie begonnen werden sollte, wurde so gewählt, dass die Tumore mittels fpVCT nachweisbar aber noch nicht zu groß waren, so dass gewährleistet werden konnte das auch die Kontrollmäuse, die wahrscheinlich das stärkere Tumorstadium zeigen würden, überlebensfähig bleiben.

Für die präklinische Anwendung des ADEPT-Konzepts wurde die Bindungskinetik der anti-CD19\*β-D-Galaktosidase an die Lymphome *in vivo* untersucht.

#### 3.2.2.1 *In vivo*-Analyse des Lymphomwachstums mittels fpVCT

Um das Lymphomwachstum in Balb/c-Mäusen im Zeitverlauf genau zu zeigen, wurden die Mäuse regelmäßig alle vier Tage nach der Tumorimplantation mittels fpVCT untersucht. Repräsentativ wurde die Lymphomentwicklung in der Leber einer Maus in

Abb. 3.31 A-D dargestellt. Die Lymphome in der Leber sind nicht vaskularisiert und deswegen für das Kontrastmittel nicht zugänglich. Dadurch sind sie in der mit Kontrastmittel gefüllten Leber aufgrund des negativen Kontrastes sichtbar und es ist möglich sie zu vermessen. 18 Tage nach der i.v. Implantation von A20-Tumorzellen wurden keine Lymphome im Leberbereich detektiert (Abb. 3.31 A). Das exemplarische zweidimensionale fpVCT-Bild am Tag 22 zeigt ein Lymphom mit der Größe von 4,6 x 4,8 mm (Abb. 3.31 B). Vier Tage später hatte dasselbe Lymphom bereits ein Ausmaß von 6,2 x 7,8 mm (Abb. 3.31 C) und nach weiteren vier Tagen, am Tag 30 nach Tumorimplantation, betrug die Größe 8,8 x 11,1 mm. Zusätzlich entwickelten sich neue Lymphome in anderen Leberbereichen (Abb. 3.31 D, E). Abb. 3.31 E zeigt *in vivo post mortal* bei derselben Maus am 30. Tag nach der Tumorimplantation die festgestellten Lokalisationen der Lymphome in der Leber. Um eine bessere Abgrenzung der Tumore vom Lebergewebe zu erreichen, wurde ein experimentelles Kontrastmittel (Fenestra) verwendet (Abb. 3.31 F), das spezifisch in die Leber aufgenommen wird, wodurch die Lymphome besser darstellbar sind, als durch das Standard-Kontrastmittel Isovist300.



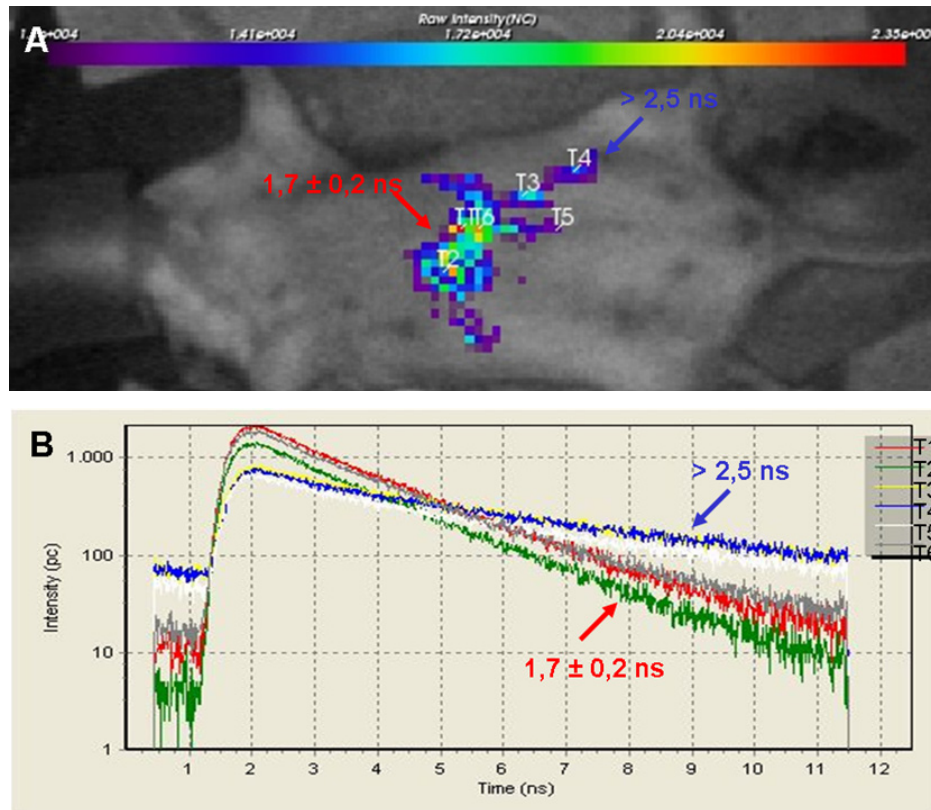
**Abb. 3.31: Repräsentative Darstellung der Entwicklung der Lymphome in der Leber mittels fpVCT.** Die volumetrische Messung der Lymphome wurde in fpVCT Datensätzen, die mit dem Kontrastmittel Isovist300 innerhalb des Zeitraums von 18 bis 30 Tage nach der i.v. Implantation von A20-Zellen aufgenommen wurden, durchgeführt. Ein repräsentatives

Lymphom ist mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. FpVCT Daten der Maus im axialen Schnitt durch den Leberbereich im Zeitverlauf nach der Tumorimplantation: (A) 18 Tage, kein sichtbares Lymphom, (B) 22 Tage, kleines einzelnes Lymphom in der Leber sichtbar, (C) 26 Tage, weitere Entwicklung dieses Lymphoms, (D) 30 Tage, mehrere Lymphome in der Leber, das vermessene Lymphom ist mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. (E) Sektionsbild der Leber derselben Maus am 30. Tag nach der i.v. Tumorimplantation. Die Lymphome sind als weiße Strukturen sichtbar (Pfeile). (F) Zur besseren Darstellung der Lymphome mittels fpVCT wurde ein anderes Kontrastmittel (Fenestra) verwendet was hier exemplarisch in einer Maus 35 Tage nach i.v. Implantation von A20-Zellen abgebildet ist. Das Kontrastmittel Fenestra wurde spezifisch in die Leber aufgenommen, wodurch die Lymphome besser darstellbar sind, als mittels Standard-Kontrastmittels Isovist300.

### **3.2.2.2 Langzeit-Bindungsstudien des anti-CD19\*Cy5.5 im Vergleich mit anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 im Lymphom der Maus**

Die Bindung von anti-CD19\*Cy5.5 und anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 an Tumorzellen wurde *in vivo* mittels optischer Bildgebung mit dem eXplore Optix bei einer Wellenlänge von 670 nm untersucht, um den Zeitpunkt der ersten Prodrug-Gabe zu bestimmen. Um zu untersuchen, ob toxische Effekte des umgesetzten Prodrugs an gesundem Gewebe zu erwarten sind und um zu prüfen, ob eine spezifische Bindung ausschließlich an die Tumorzellen stattfindet, wurden Fluoreszenzsignale im ganzen Tier untersucht.

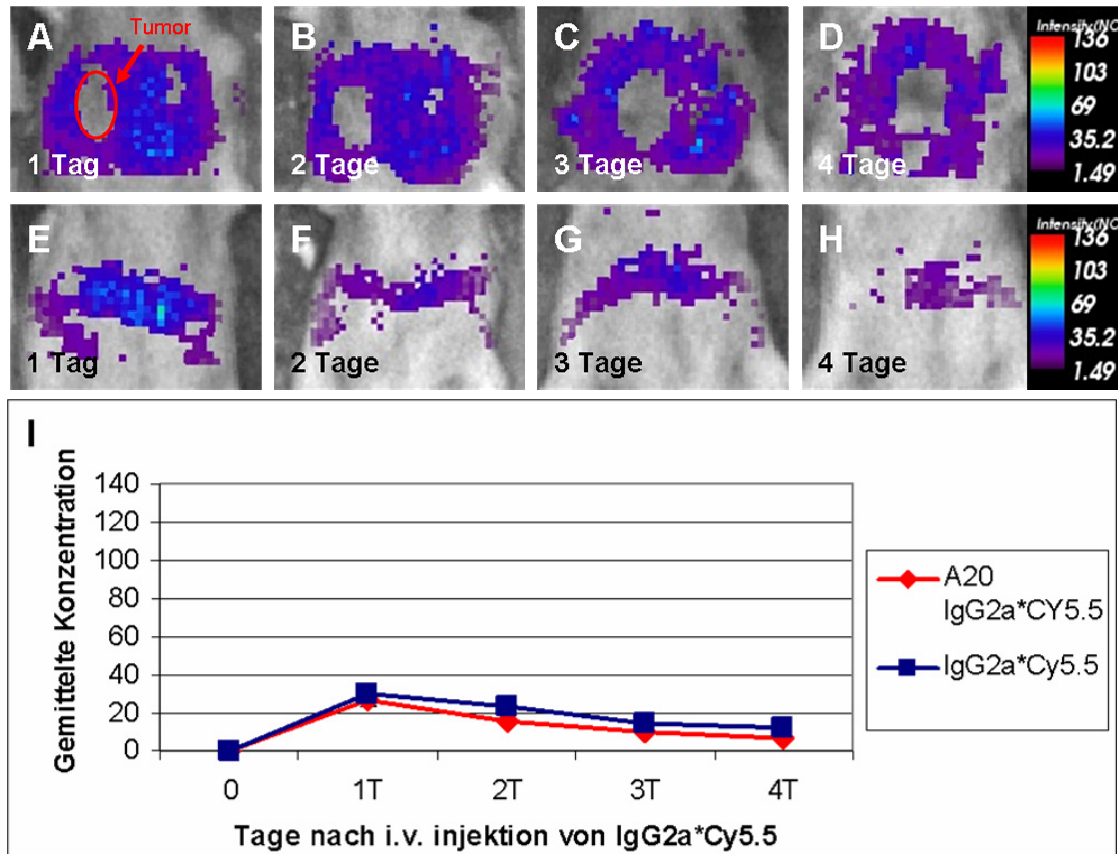
Die Bindung von 50 µg des anti-CD19\*Cy5.5 bzw. anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 an Lymphomen in lebenden Mäusen wurde vier Wochen nach Tumorimplantation untersucht. Abb. 3.32 A zeigt exemplarisch das Untersuchungsergebnis einer Balb/c-Maus 24 h nach i.v. Applikation von anti-CD19\*Cy5.5. Die spezifischen Fluoreszenzsignale mit einer Fluoreszenzlebensdauer von  $1,7 \pm 0,2$  ns wurden im Bereich der Leber (Abb. 3.32 A) detektiert und die TPSF-Kurven (Abb. 3.32 B) der Messpunkte dargestellt. Die Autofluoreszenz des Futters wurde im Magen-Darm-Trakt der Maus detektiert und es konnte eine Fluoreszenzlebensdauer von  $> 2,5$  ns (Abb. 3.32 A, B) festgestellt werden. Bei der Untersuchung des gesamten Tierkörpers wurde festgestellt, dass der murine anti-CD19\*Cy5.5 *in vivo* ausschließlich an die Lymphomzellen in der Leber bindet (Abb. 3.32 A).



**Abb. 3.32: Spezifität der Messung von Cy5.5-basierten Fluoreszenzsignalen durch Analyse der Fluoreszenzlebensdauer.** *In vivo*-Messung der Fluoreszenzsignale mittels eXplore Optix bei einer Wellenlänge von 670 nm (exemplarisch): (A) A20 tumortragende Balb/c-Maus 24 h nach i.v. Injektion von anti-CD19\*Cy5.5. Spezifische Signale des anti-CD19\*Cy5.5 im Leberbereich wurden mit einem roten Pfeil und unspezifische Fluoreszenzsignale bedingt durch Futter im Darm wurden mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet. (B) TPSF Kurven beider Fluoreszenzsignal-Quellen. Mit dem roten Pfeil wurde das spezifische Fluoreszenzsignal und mit dem blauen Pfeil das unspezifische Signal markiert.

Um unspezifische Bindungen des verwendeten anti-CD19\*Cy5.5 an Tumorzellen zu untersuchen, wurden zwei Kontrollen durchgeführt. Vier Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Tumorzellen wurden tumortragenden Mäusen und einer gesunder Maus 50 µg der IgG2a\*Cy5.5 Isotyp-Kontrolle i.v. verabreicht. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abb. 3.33 dargestellt. 24 h nach i.v. Injektion des IgG2a\*Cy5.5 wurde ein schwaches, spezifisches Fluoreszenzsignal in den tumortragenden Tieren und den gesunden Kontrolltieren im Bereich der Leber messbar (Abb. 3.33 A und E). Die Fluoreszenzsignale im Leberbereich ließen dabei in beiden Fällen vom zweiten bis vierten Tag nach (Abb. 3.33 B-D, F-H), was als Kurve der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale in Abb. 3.33 I dargestellt wurde.

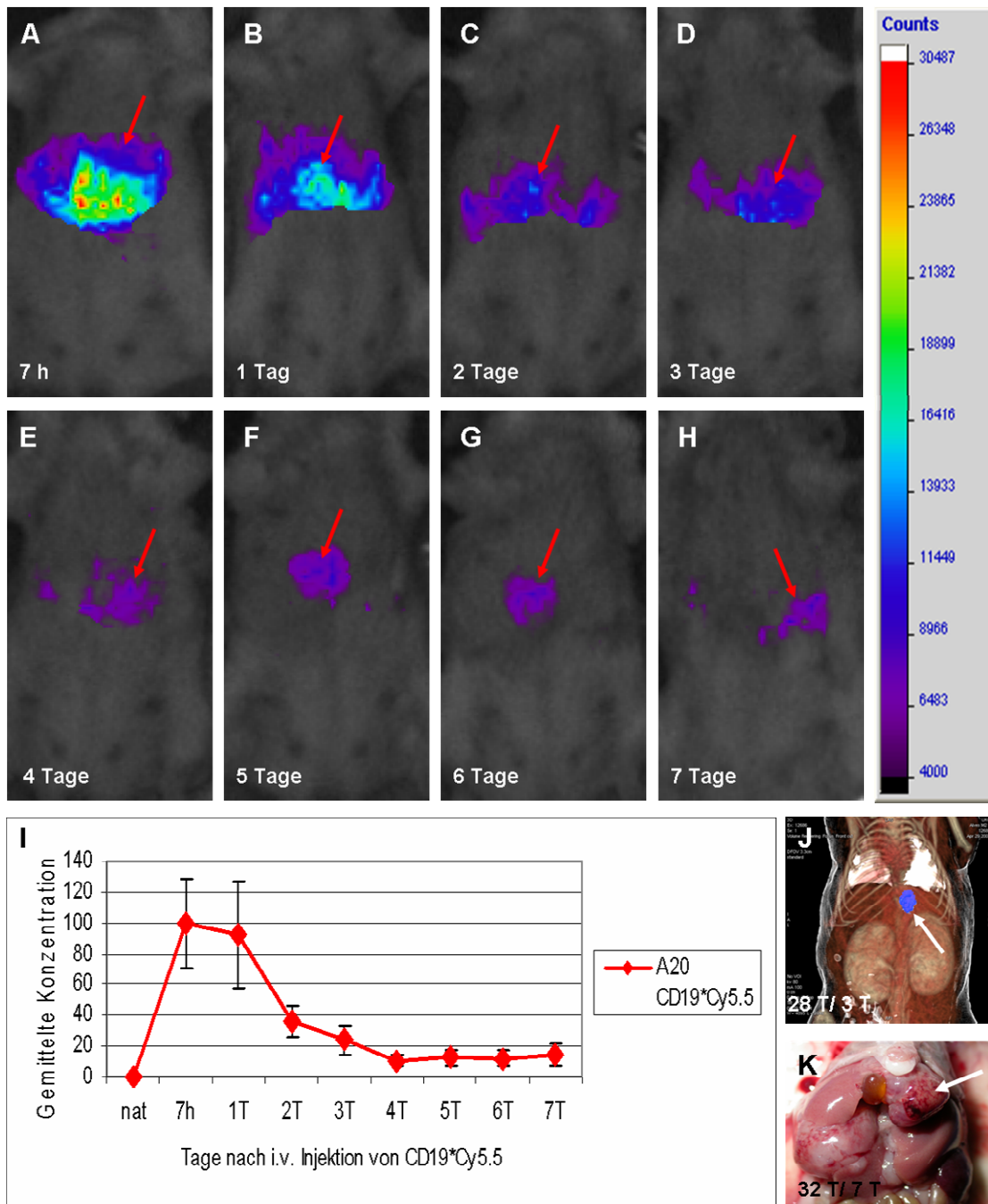
Diese Fluoreszenzsignale wurden in beiden Fällen gleichmäßig verteilt in der gesamten Leber detektiert, während der Bereich des eigentlichen Lymphoms kein Signal zeigte (Abb. 3.33).



**Abb. 3.33: Bindungskinetik der Isotyp-Kontrolle (IgG2a\*Cy5.5) in tumortragenden und einer gesunden Balb/c-Mäusen.** Die Mäuse wurden vier Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Zellen mittels eXplore Optix untersucht. Das Lymphom wurde mit einem roten Kreis markiert. Die Fluoreszenzsignale der IgG1\*Cy5.5 wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der i.v. Injektion bei tumortragenden Tieren gemessen (n=3): nach (A) 1 Tag, (B) 2 Tagen, (C) 3 Tagen, (D) 4 Tagen, bzw. bei einer gesunden Maus: nach (E) 1 Tag, (F) 2 Tagen, (G) 3 Tagen, (H) 4 Tagen. (I) Darstellung der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale der IgG2a\*Cy5.5 im Leberbereich im Zeitverlauf. Die IgG2a\*Cy5.5 wurde *in vivo* schwach und gleichmäßig im Lebergewebe, sowohl bei den Lymphomtragenden als auch bei der gesunden Maus, detektiert. Die maximalen Fluoreszenzsignale wurden 24 h nach der Injektion der Isotyp-Kontrolle gemessen und das Nativniveau wurde innerhalb von vier Tagen erreicht.

Um den Einfluss der Enzymkopplung an den Antikörper auf die Bindungseigenschaften zu prüfen wurde die Bindungskinetik des anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 an Lymphomen im

Vergleich zu anti-CD19\*Cy5.5 *in vivo* untersucht. Die tumortragenden Mäuse (n=4) wurden vier Wochen nach Tumorimplantation vor der anti-CD19\*Cy5.5 Applikation nativ mittels eXplore Optix untersucht. Diese Bildgebung diente als Negativkontrolle für unspezifische Fluoreszenzsignale im Bereich der Leber (Abb. 3.34 A und Abb. 3.35 A). Anschließend wurde den Mäusen anti-CD19\*Cy5.5 (Abb. 3.34) oder anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 (Abb. 3.35) i.v. appliziert und die Fluoreszenz *in vivo* gemessen. Schon 7 h nach der anti-CD19\*Cy5.5 Applikation wurden starke Fluoreszenzsignale nur im Bereich der Lymphome in der Leber detektiert (Abb. 3.34 A), welche nach 24 h schwächer wurden (Abb. 3.34 B) und bis zum vierten Tag kontinuierlich abnahmen. Die spezifischen Fluoreszenzsignale waren dabei immer nur in den Tumorbereichen der Leber nachweisbar (Abb. 3.34 C-E) und blieben in ihrer Intensität auf stabilem, niedrigem Intensitätsniveau für bis zu sieben Tage nach der Applikation (Abb. 3.34 F-H). Die Kurve der gemittelten Konzentrationen im Lymphombereich zeigt, dass sich die größte Menge anti-CD19\*Cy5.5 zwischen 7 bis zu 24 h nach i.v. Applikation im Lymphombereich in der Leber befand und dann bis zu Tag 4 abnahm (Abb. 3.34 I). Die dargestellte Lokalisierung der Lymphome in der Leber mittels fpVCT 28 Tage nach Zellimplantation (Abb. 3.34 J) entspricht genau der Lokalisierung der Fluoreszenzsignale des anti-CD19\*Cy5.5 aus der korrelierenden eXplore Optix Untersuchung (Abb. 3.34 D), was auch durch den Sektionbefund am 32. Tag nach Tumorimplantation (Abb. 3.34 K) bestätigt wurde. Es wurden in diesem Zeitraum nur Fluoreszenzsignale im Bereich der Lymphome in der Leber gemessen, was darauf hindeutet, dass sich in den anderen Organen und in den Lymphknoten die A20-Zellen noch nicht entwickelten.

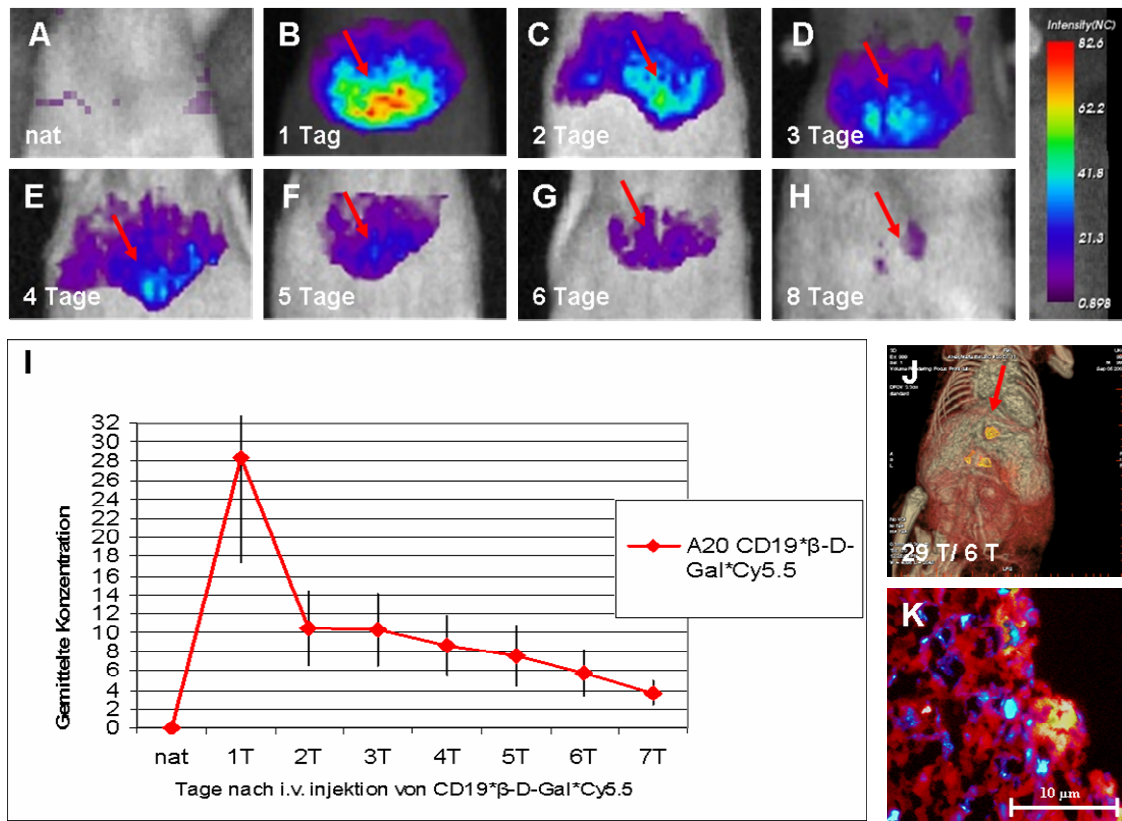


**Abb. 3.34: Untersuchung der Bindungskinetik des anti-CD19\*Cy5.5 an A20-Tumorzellen in Balb/c-Mäusen.** Die Mäuse wurden vier Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Zellen mittels eXplore Optix bei 670 nm Wellenlänge untersucht. Die Fluoreszenzsignale des anti-CD19\*Cy5.5 wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der i.v. Injektion von 50 µg Antikörper pro Maus gemessen. Darstellung eines repräsentativen Tieres: Nach (A) 7 Stunden, (B) 1 Tag, (C) 2 Tagen, (D) 3 Tagen, (E) 4 Tagen, (F) 5 Tagen, (G) 6 Tagen, (H) 7 Tagen. (I) Die Bindung des anti-CD19\*Cy5.5 wurde im Zeitverlauf als gemittelte Konzentration der spezifischen Fluoreszenzsignale dargestellt (ohne Einheiten). Der anti-CD19\*Cy5.5 bindet im



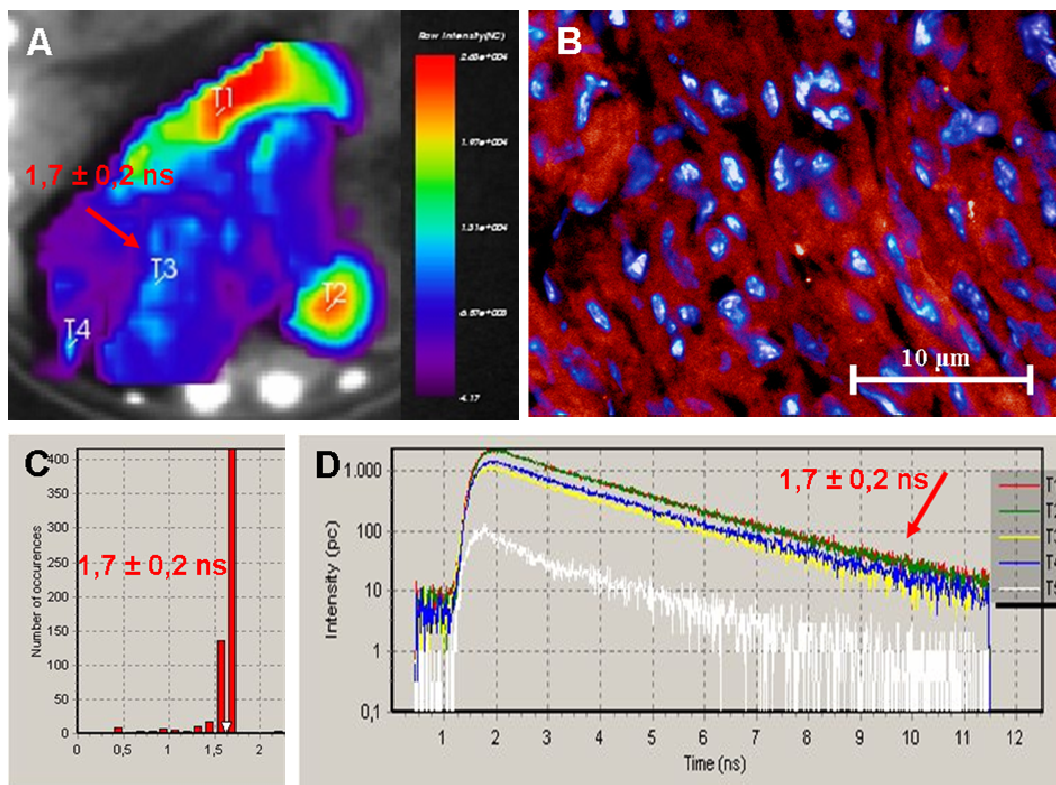
Lymphombereich in der Leber bereits 7 Stunden nach der i.v. Injektion und bleibt bis zu 24 Stunden stabil. Vom zweiten bis vierten Tag nahmen die Signalintensität ab und blieb dann bis zu sieben Tage auf stabil niedrigem Niveau (n=4). (J) fpVCT Darstellung des blau gefärbten Lymphoms in der Leber 28 Tage nach der Tumorimplantation. Die Lokalisation entspricht den Fluoreszenzsignalen des anti-CD19\*Cy5.5. (K) Der Sektionsbefund des Lymphoms in der Leber derselben Maus 32 Tage nach der Implantation von A20-Zellen zeigt exemplarisch ein Lymphom in demselben Leberbereich wie im fpVCT-Bild (weißer Pfeil). Dieses zeigt, dass die mittels eXplore Optix detektierten Fluoreszenzsignale aus den Bereichen der Leber stammten wo sich Lymphome befanden.

Abb. 3.35 B-H zeigt exemplarisch, dass auch die Bindung des anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 an A20-Zellen *in vivo* nur im Bereich der Lymphome in der Leber stattfand. Ähnlich wie bei dem anti-CD19\*Cy5.5 wurde die maximale Bindungsstärke nach 24 Stunden gemessen (Abb. 3.35 B) und danach nahmen die Fluoreszenzsignale kontinuierlich ab. Bis zu sieben Tage nach der Antikörper-Enzym-Konjugat-Applikation waren sie detektierbar (Abb. 3.35 C-G). Am achten Tag waren Fluoreszenzsignale in den Lymphombereichen der Leber fast nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.35 H), was als Kurve der gemittelten Konzentrationen der spezifischen Fluoreszenzsignale dargestellt ist (Abb. 3.35 I). Die Kopplung des Antikörpers mit  $\beta$ -D-Galaktosidase beeinflusste die Bindungskinetik des Antikörpers an die Lymphome *in vivo* nicht. Die fpVCT-Bildgebung zeigt die Lokalisation der Lymphome in der Leber, 29 Tage nach Tumorimplantation. Die Lokalisation entspricht der mittels eXplore Optix gemessenen Fluoreszenzsignale des anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 Konjugates (Abb. 3.35 J). Dieser fpVCT-Untersuchungszeitpunkt entspricht dem 6. Tag nach i.v. anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 (Abb. 3.35 G). Die mikroskopische NIR-Analyse des Lymphom-Kryoschnitts (Abb. 3.35 K) zeigt, dass im Lymphom anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 gebunden ist. Somit ist gezeigt worden, dass die *in vivo* detektierten Fluoreszenzsignale aus den Lymphomen in der Leber stammten.



**Abb. 3.35: Untersuchung der Bindungskinetik des anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 an die A20-Tumorzellen in Balb/c-Mäusen.** Die Mäuse wurden vier Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Zellen mittels eXplore Optix bei 670 nm Wellenlänge untersucht. Die spezifischen Fluoreszenzsignale des anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach der i.v. Injektion von 50 μg Antikörper pro Maus gemessen. Exemplarisch: (A) nativer Scan ohne Antikörper, Messung nach: (B) 1 Tag, (C) 2 Tagen, (D) 3 Tagen, (E) 4 Tagen, (F) 5 Tagen, (G) 6 Tagen, (H) 8 Tagen. (I) die Stärke der Bindung des anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 wurde im Zeitverlauf als gemittelte Konzentration der spezifischen Fluoreszenzsignale (ohne Einheiten) dargestellt. Die Fluoreszenzsignale im Bereich der Lymphome in der Leber sind mit roten Pfeilen markiert. Das Antikörper-Enzym-Konjugat bindet an die Tumorzellen bereits am Tag 1 nach der i.v. Injektion (B). Die Intensität des Fluoreszenzsignals steigt am 1. Tag nach der i.v. Injektion deutlich an und sinkt danach kontinuierlich ab (C-H) (n=6). (J) fpVCT Darstellung, Lymphome in der Leber 29 Tage nach der Tumorimplantation sind orange gefärbt. Der Zeitpunkt entspricht 6 Tage nach i.v. anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 Injektion (G). (K) Mikroskopisches NIR-Bild des Kryoschnittes eines der hier dargestellten Lymphome aus der Leber in 63-facher Vergrößerung. Mit DAPI sind die Zellkerne blau gefärbt, der anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 gebunden an Lymphomzellen ist in rot zu erkennen. Der anti-CD19\*β-D-Gal\*Cy5.5 bindet spezifisch an Lymphomzellen in der Leber.

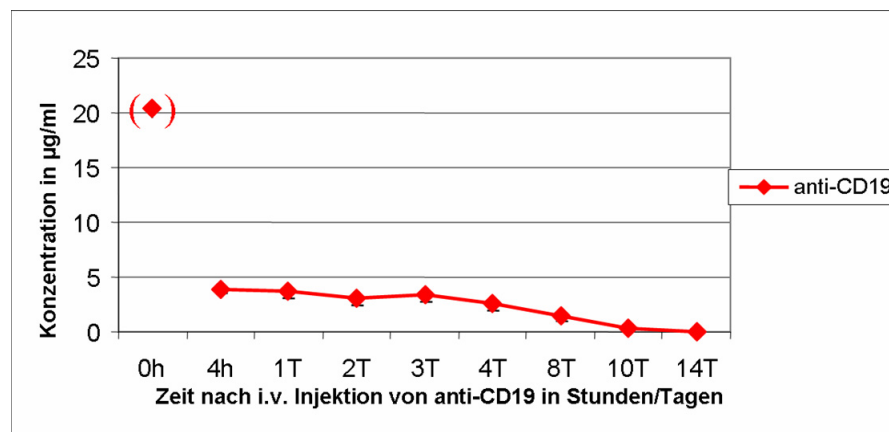
Die Leber und die Milz wurden fünf Wochen nach der A20-Zellen-Implantation und sieben Tage nach der i.v. Applikation von anti-CD19\*Cy5.5 entnommen und *ex vivo* mittels eXplore Optix untersucht (Abb. 3.36). Es wurden starke spezifische Fluoreszenzsignale im Bereichen der Leber detektiert, die den Lymphomen entsprechen (Abb. 3.36 A, C, D). Von einer Leber die Lymphome enthielt, wurden Kryoschnitte angefertigt und mittels NIR-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.36 B). Damit wurde histologisch die Bindung des anti-CD19\*Cy5.5 an die Lymphomzellen belegt.



**Abb. 3.36: Nachweis der anti-CD19\*Cy5.5 Bindung an die Lymphome in der Leber mittels eXplore Optix und histologischer Untersuchungen mittels NIR-Mikroskopie.** Die Fluoreszenzsignale wurden mittels eXplore Optix bei einer Wellenlänge von 670 nm gemessen. Exemplarische Darstellung der Fluoreszenzsignale *ex vivo*: (A) eines Lymphoms in der Leber 32 Tage nach der i.v. Implantation von A20-Zellen und 7 Tage nach der i.v. Injektion von anti-CD19\*Cy5.5. (B) NIR-Mikroskopie eines Kryoschnitts des Lymphoms aus der Leber in 63-facher Vergrößerung. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau gefärbt und anti-CD19\*Cy5.5 ist rot dargestellt. (C) Im Histogramm ist die spezifische Fluoreszenzlebensdauer von  $1,7 \pm 0,2$  ns des anti-CD19\*Cy5.5 dargestellt. (D) TPSF Kurven der spezifischen Fluoreszenzsignale aus den Lymphomen aus der Leber, mit rotem Pfeil markiert. Die Fluoreszenzsignale im Bereich der Lymphome in der Leber waren stark und ungleichmäßig.

### 3.2.2.3 Quantitativer Nachweis des anti-CD19 im Zeitverlauf im Serum nach i.v. Applikation

Um den Zeitpunkt zu analysieren, an dem anti-CD19 aus dem Serum nach der i.v. Applikation eliminiert wird, wurde ein ELISA zur Bestimmung von freiem anti-CD19 im Serum durchgeführt. Dazu wurde in Zeitintervallen bis zu 14 Tagen nach Applikation des anti-CD19/Maus, durch retroorbitale Punktion Blut entnommen. Als theoretisch zu erwartende Antikörperkonzentration im Serum zum Zeitpunkt 0 h wurde 20 µg/ml berechnet (verabreichten Antikörpergesamtmenge/Gesamtblutvolumen der Maus). Schon 4 h nach der Gabe konnte mit dem ELISA-Test (Abb. 3.37) lediglich 5 µg/ml bestimmt werden. Was einer 75%-igen Reduktion der Antikörperkonzentration entspricht. Die anti-CD19 Konzentration im Serum nahm kontinuierlich ab und war nach 10 Tagen nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass 24 Stunden nach der Antikörper-Applikation die Verabreichung des Prodrugs möglich ist.



**Abb. 3.37: Quantitativer Nachweis des anti-CD19 im Serum von tumortragenden Mäusen mittels ELISA.** Den Mäusen wurde drei Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Zellen und nach der i.v. Applikation von anti-CD19 Blut entnommen und die Menge des anti-CD19 im Serum untersucht. Bereits vier Stunden nach der i.v. Applikation des anti-CD19 sank die Menge des ungebundenen Antikörpers im Serum um 75% und war nach 10 Tagen nicht mehr detektierbar (n=10). Der 0 h Wert wurde aus der verabreichten Menge Antikörper und dem mittleren Blutvolumen der Maus berechnet.

### 3.2.2.4 Toxikologische Studien des Prodrugs und Drugs in Mäusen

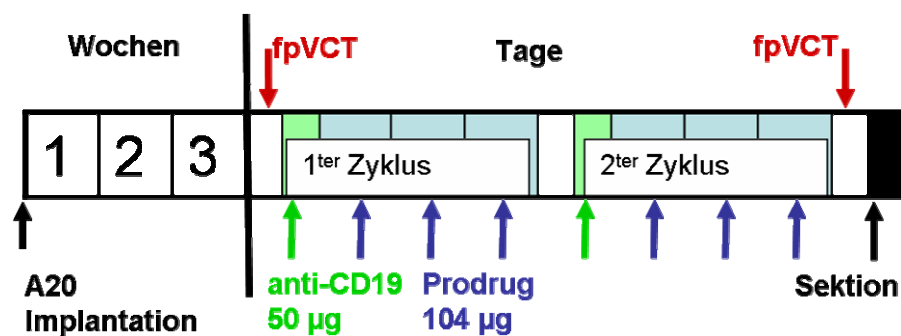
Um eine ADEPT sicher und unschädlich für das Tier zu evaluieren, war es notwendig die Verträglichkeit des *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrugs und -Drugs nachzuweisen. Dafür wurden je drei Dosen, hoch, mittel und niedrig in entsprechenden Mengen in 1%-iger DMSO/NaCl-Lösung *in vivo* in Balb/c-Mäusen getestet. Die jeweils zu testende Substanz wurde mindestens je 10 weiblichen und 10 männlichen Balb/c-Tieren einmalig verabreicht. Die Tiere wurden 10 Tage lang beobachtet, danach wurde das Blut entnommen und auf Veränderungen untersucht. 104 µg Prodrug waren die maximal lösliche Dosis, die Mäusen in 1% DMSO appliziert werden konnte. Als niedrige Dosis wurden 25 µg, als mittlere Dosis 67 µg und als hohe Dosis 104 µg *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrug pro Maus verwendet. Da das Molekulargewicht des Drugs ohne β-D-Galaktose niedriger als das des Prodrugs ist, wurden dieselben molaren Mengen entsprechend jeweils 20 µg, 54 µg und 84 µg Drug pro Maus appliziert. Die beiden Substanzen verursachten bei den Mäusen keinerlei Symptome wie Gewichtsabnahme von mehr als 10%, Schmerzen, Unruhe, struppiges Fell, Apathie, Appetitlosigkeit oder Atemnot. Auch in den Organen wurden bei der Sektion makroskopisch keine Veränderungen festgestellt. Innerhalb der zwei Gruppen führten die drei verschiedenen Konzentrationen von Drug und Prodrug zu keinen nennenswerten Veränderungen der Blutwerte. Auch eine dreimalige Applikation (1. 2. 3. Tag) der hohen Dosis von Prodrug verursachte keine Änderungen der Blutparameter der Tiere mit Ausnahme des Hämatokrits, welches bei der Gruppe, die mit dem Drug behandelt wurde, um 12% höher als bei der Prodrug Gruppe war. Die Erhöhung des Hämatokrit-Wertes deutet darauf hin, dass bei der Verwendung von größeren Mengen besser löslichen Prodrugs bzw. äquivalenten Mengen des Drugs gesundheitliche Beeinträchtigungen auftreten könnten.

### 3.2.3 *In vivo*-Studie zum therapeutischen Einsatz des ADEPT-Konzepts im Lymphom-Mausmodell

Mittels anti-CD19\*β-D-Galaktosidase und *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrug wurde das ADEPT-Konzept präklinisch bei dem syngenem Lymphom-Modell in Balb/c-Mäusen evaluiert. Aus den Ergebnissen der *in vitro* und *in vivo* Analysen wurde folgendes Therapiekonzept entwickelt (Abb. 3.38):

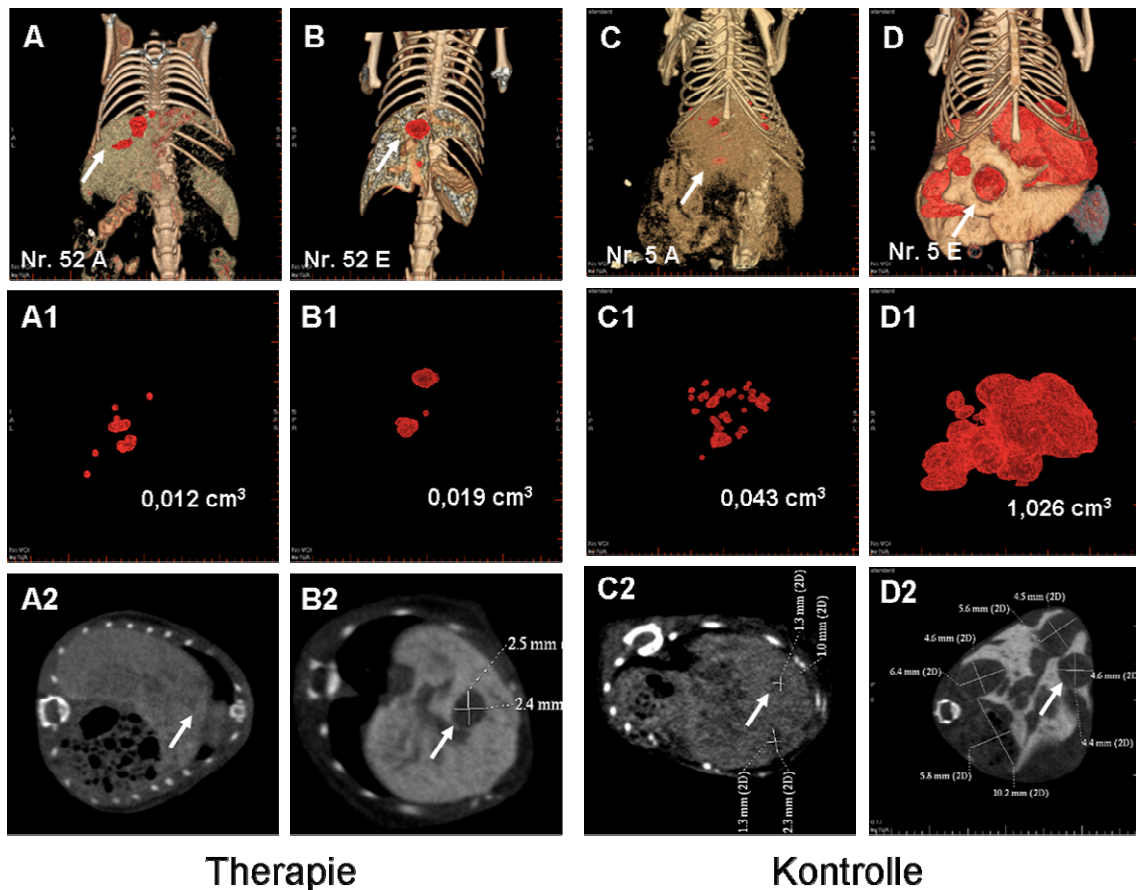
Die Therapie begann drei Wochen nach der i.v. Tumorimplantation zu einem Zeitpunkt, an dem die Lymphome ein mittels fpVCT nachweisbares Volumen erreicht hatten. Dies

betrug in der therapierten Gruppe  $0,025 \pm 0,017 \text{ cm}^3$  und in der Kontrollgruppe  $0,030 \pm 0,019 \text{ cm}^3$ . Das Volumen wurde durch Addition der Volumina der Lymphome innerhalb der Leber berechnet. Der anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal wurde i.v. in einer Menge von 50  $\mu\text{g}$ , und 24 Stunden später das Prodrug in einer Menge von 104  $\mu\text{g}$  i.v. appliziert. Das Prodrug wurde einmal täglich drei Tage lang verabreicht. Der gesamte Behandlungszyklus wurde nach einer 24-stündigen Pause wiederholt. Die Tumorumfänge wurden und 24 h nach der Therapie gemessen. Bei den Kontrollmäusen wurde PBS statt Antikörper-Enzym-Konjugat und 1%-ige DMSO/NaCl Lösung statt Prodrug verabreicht (Abb. 3.38).



**Abb. 3.38: Behandlungsplan**

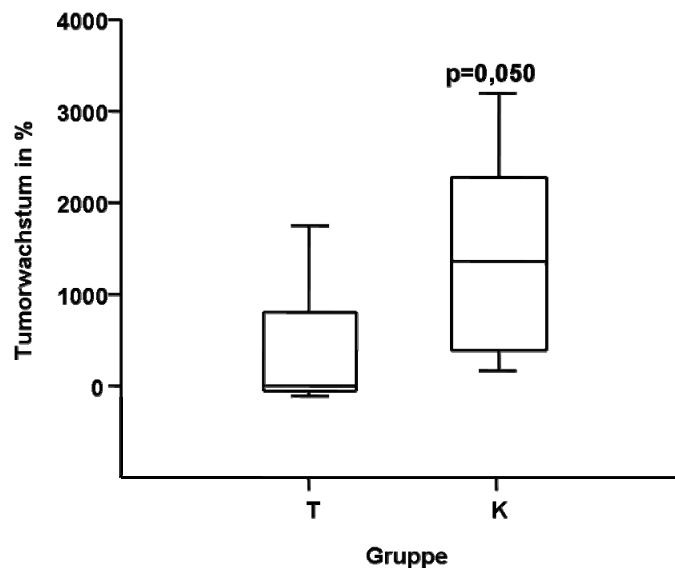
Um die Therapieeffekte am Lymphomwachstum zu untersuchen, wurden die Mäuse im fpVCT drei Wochen nach der Tumorimplantation, 24 Stunden vor Therapiebeginn (Abb. 3.39 A und C) und 24 Stunden nach dem Therapieende (Abb. 3.39 B und D) gescannt. Die Therapiewirkung ist exemplarisch in Abb. 3.39 dargestellt, welche repräsentative fpVCT-Lymphomvolumina und -Lokalisationen vor und nach ADEPT in der Leber einer therapierten (Abb. 3.39 A, B) und einer Kontroll Balb/c-Maus zeigt (Abb. 3.39 C, D). Die Lymphome wurden sowohl *in vivo* in der Leber (Abb. 3.39 A-D) als auch virtuell aus der Leber extrahiert und volumetriert (Abb. 3.39 A1-D1) gezeigt. Außerdem wurde jeweils ein repräsentativer axialer Schnitt durch den Leberbereich der Tiere als Beispiel gezeigt für die Abbildungen, die für die dreidimensionale Darstellung der Lymphome als Basis verwendet wurden (Abb. 3.39 A2-D2). Diese Abbildungen zeigen, dass während der Therapie das Lymphomvolumen der therapierten Maus fast unverändert bei  $0,019 \text{ cm}^3$  blieb, wobei bei der Kontrollmaus die Lymphome ein Gesamtvolumen von  $1,026 \text{ cm}^3$  erreichten und fast die ganze Leber durchsetzten.



**Abb. 3.39: Exemplarische fpVCT-Untersuchung zur Darstellung der Entwicklung der Lymphome einer therapierten und einer Kontrollmaus über die Therapiezeit.** Die Tiere wurden drei Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Tumorzellen mittels fpVCT nach i.v. Applikation von Kontrastmittel Fenestra untersucht. Als A (Anfang) wurde der Beginn der Therapie bezeichnet, mit E das Ende. Rot dargestellt sind die Lymphome in der Leber vor Therapiebeginn *in vivo*: (A) therapierte Maus und (C) Kontrollmaus, und nach Therapieende: (B) therapierte Maus und (D) Kontrollmaus. Die virtuell extrahierten Lymphome entsprechend vor Therapiebeginn *in vivo*: (A1) therapierte Maus und (C1) Kontrollmaus, und nach Therapieende: (B1) therapierte Maus und (D1) Kontrollmaus. Axialer Schnitt durch den Leberbereich dieser Mäuse vor Therapiebeginn *in vivo*: (A2) therapierte Maus und (C2) Kontrollmaus, und nach Therapieende: (B2) therapierte Maus und (D2) Kontrollmaus. Nach der Therapie blieb das gesamte Lymphomvolumen der therapierten Maus fast unverändert ( $0,019 \text{ cm}^3$ ) und bei der Kontrollmaus durchsetzten die Lymphome ( $1,026 \text{ cm}^3$ ) fast die ganze Leber. Die Ausgangsvolumina der Lymphome beider Mäuse waren  $< 0,05 \text{ cm}^3$ .

Die gesamten Lymphomvolumina in der Leber erreichten zu Beginn der Therapie bei beiden Gruppen vergleichbare Größen von  $0,025 \pm 0,017 \text{ cm}^3$  in den therapierten Mäusen ( $n=8$ ) und  $0,030 \pm 0,019 \text{ cm}^3$  in den Kontrollmäusen ( $n=8$ ). Nach der Therapie

hatten die Lymphome in der Leber ein Gesamtvolumen von  $0,168 \pm 0,293 \text{ cm}^3$  bei therapierten Mäusen im Gegensatz zu deutlich größeren Volumina von  $0,570 \pm 0,583 \text{ cm}^3$  in den Kontrolltieren. Der Mittelwert der prozentualen Tumorwachstumsrate während der ADEPT in therapierten Mäusen ist 1034% niedriger (um Faktor 3,6) als in den Kontrollmäusen (Abb. 3.40). Das Experiment zeigt eindeutig den inhibitorischen Einfluss auf das Tumorwachstum *in vivo*. Alle Tiere der Kontrollgruppe hatten ein ähnlich hohes prozentuales Tumorwachstum während der Zeit der ADEPT. Im Gegensatz dazu wuchsen die Lymphome in den Mäusen der therapierten Gruppe sehr unterschiedlich aber langsamer als bei den Kontrollmäusen. In 4 von 8 Fällen verringerten sich sogar die Tumervolumina.



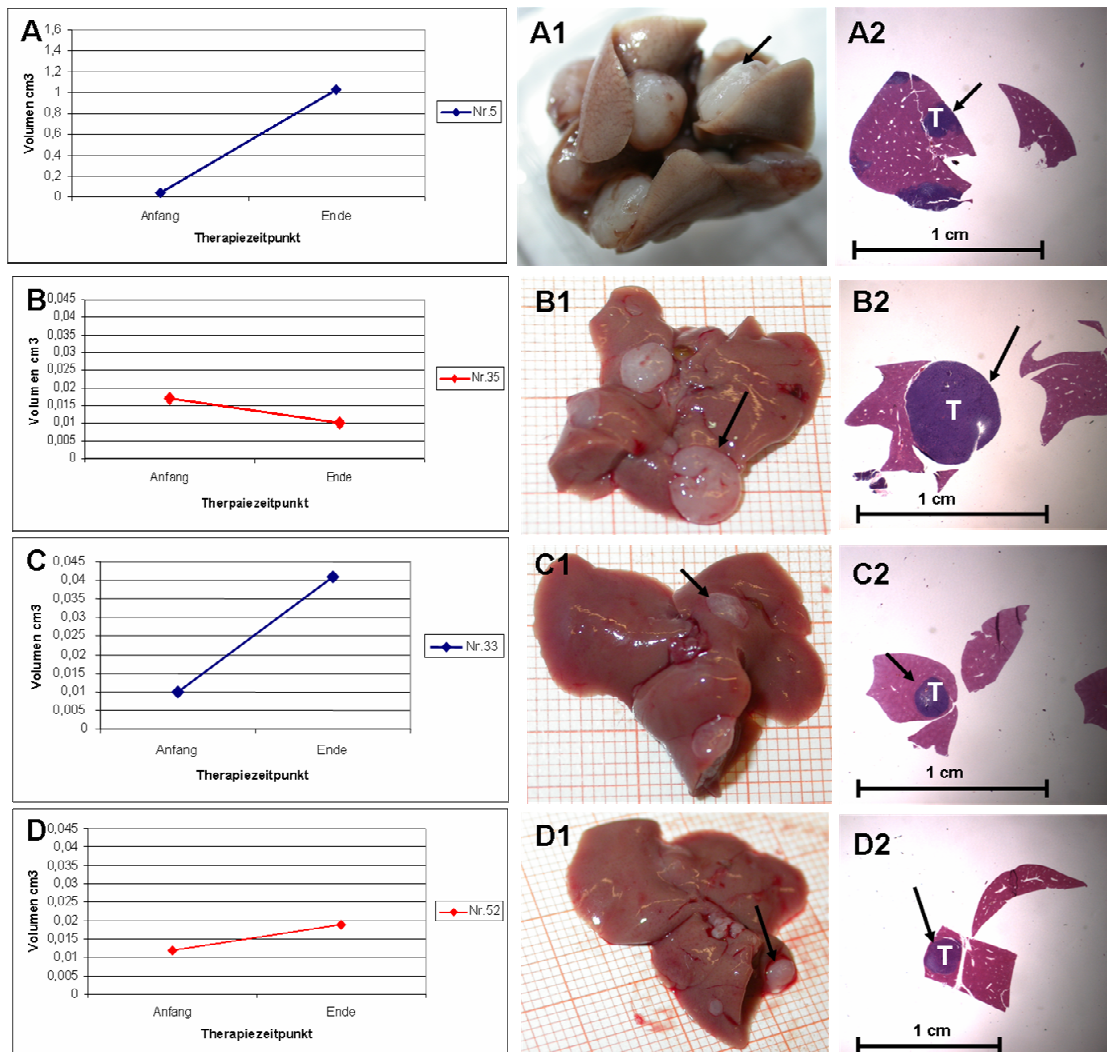
**Abb. 3.40: Box-Plot-Analyse der Wachstumsraten in % von Lymphomen in der Leber bei therapierten Mäusen und Kontrollmäusen während der ADEPT.** Die prozentuale Tumorwachstumsrate der therapierten Mäuse (n=8) war 1034% geringer als bei der Kontrollgruppe (n=8) während der Therapie. Dies zeigt den inhibitorischen Einfluss der Therapie auf das Lymphomwachstum *in vivo*. Der Unterschied lag dabei mit dem Wert  $p=0,050$  über der statistischen Signifikanzgrenze von  $p<0,050$ .

Abb. 3.41 zeigt exemplarisch, dass in den therapierten Mäusen die Lymphome entweder kleiner wurden, von  $0,017 \text{ cm}^3$  auf  $0,010 \text{ cm}^3$ , oder ein langsames Wachstum, von  $0,012 \text{ cm}^3$  auf  $0,019 \text{ cm}^3$ , als die Kontrollen hatten (Abb. 3.41 B, D). In den Kontrollmäusen stiegen die Volumina während der Therapiezeit sehr stark von  $0,043 \text{ cm}^3$  auf  $1,026 \text{ cm}^3$  bzw. von  $0,01 \text{ cm}^3$  auf  $0,041 \text{ cm}^3$  an (Abb. 3.41 A, C). Es wurden keine histologischen Unterschiede in den Lymphomen oder in der Leber



zwischen beiden Gruppen festgestellt, was exemplarisch in Abb. 3.41 A1-D1 bei den Lymphomen in der Leber *ex vivo* und deren HE gefärbten Paraffinschnitte (Abb. 3.41 A2-D2) dargestellt ist. Es wurden zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Größe und dem gewicht der Milz nach der Therapie festgestellt. Sowohl die therapierten als auch die Kontroll-Mäuse haben während der Therapie Gewicht verloren, und zwar 4,3% bei den Kontrolltieren und 4,8% bei den therapierten Mäusen. Daher war anzunehmen, dass dies durch das Lymphom bedingt und nicht auf die Therapie zurückzuführen war. Die Blutwerte der Alkalischen Phosphatase, Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase, Kreatinin, Harnsäure, Hämoglobin, Laktat-Dehydrogenase, Bilirubin, Harnstoff, Erythrozyten, Leukozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten nach der Therapie belegten, dass die Therapie keinen Einfluss auf das Blutbild hatte.

Die ADEPT mittels anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal und dem *anti-methyl-seco-CBI-DMAI*-Prodrug hatte eine inhibitorische Wirkung auf die Entwicklung der Lymphome in der Leber von Balb/c-Mäusen.



**Abb. 3.41: Exemplarische Darstellung des Tumorvolumenwachstums und der Morphologie der Lymphome.** Es wurde das Wachstum der Lymphome drei Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Tumorzellen und nach der Therapie dargestellt: (A, C) bei Kontrollmäusen, (B, D) bei therapierten Mäusen. Leber mit Lymphomen *ex vivo*: (A1, C1) aus Kontrollmäusen und (B1, D1) aus therapierten Mäusen, mit schwarzem Pfeil. Dies zeigt das unterschiedliche Lymphomwachstum für beide Gruppen, wobei die Lymphome in den Kontrollmäusen schneller wuchsen. HE Färbungen von Paraffinschnitten dieser Lymphome: (A2, C2) von Kontrollmäusen und (B2, D2) von therapierten Mäusen. Die Lymphome sind mit „T“ markiert. Es wurden keine histologischen Unterschiede in den Lymphomen und in der Leber zwischen beiden Gruppen sichtbar.

Die präklinischen Studien zur Wirksamkeit der ADEPT haben gezeigt, dass diese Therapie in beiden Tumormodellen, sowohl im xenograften Mammakarzinom als auch im syngenem Lymphom, das Tumorwachstum inhibiert.

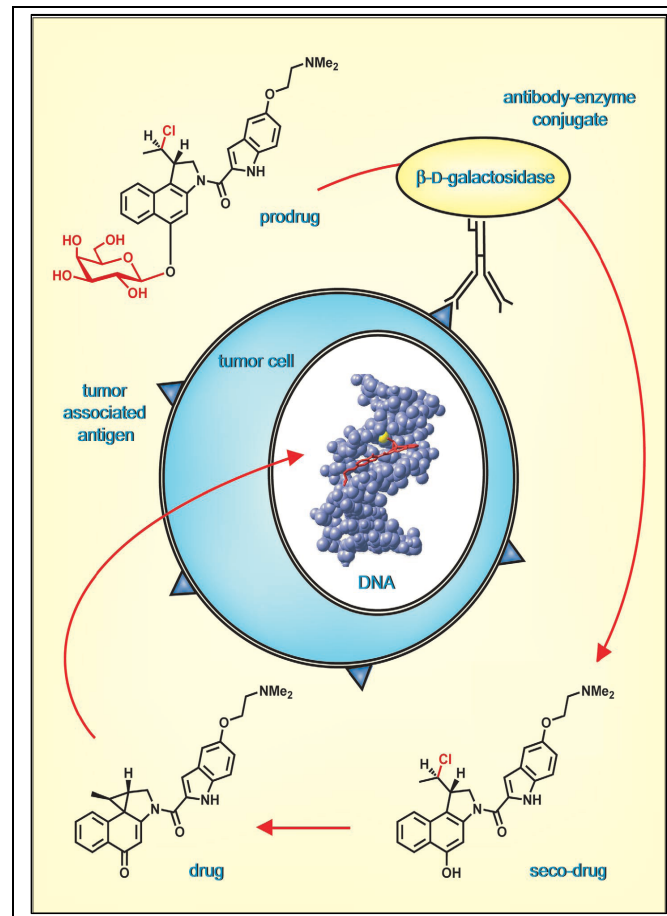
## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine Tumorthherapie, das ADEPT-Konzept, mit hoher Selektivität, welche das normale Gewebe weitgehend unbeeinträchtigt lässt, *in vivo* präklinisch etabliert. Diese Therapie wurde mittels eines neuen Zytostatikums, des *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrugs, welches durch  $\beta$ -D-Galaktosidase aktiviert wird, durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden anhand des Mammakarzinom- und Lymphom-Tiermodells einzelne Komponenten und die Wirksamkeit dieses Konzepts in der Tumorthherapie evaluiert.

### 4.1 Das ADEPT-Konzept zur Behandlung von Tumoren

Die Grundlagen für dieses ADEPT-Konzept basieren auf der Arbeit der Gruppe von Prof. Dr. Dr. L. F. Tietze (Göttingen). Für die Therapie wurde ein *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrug verwendet, welches ein Analogon des Antibiotikums CC-1065 ist, und mittels  $\beta$ -D-Galaktosidase zu einem toxischen Drug aktiviert wird. Das Drug ist *in vitro* 4800-fach toxischer als das Prodrug (Tietze *et al.*, 2006). Dadurch kann die Konzentration des Prodrugs im Verhältnis zum Drug bei der Therapie verringert werden.

In der ADEPT besteht die Möglichkeit, durch ein sogenanntes „Targeting“ die Krebszellen gezielt zu zerstören, ohne die Normalzellpopulation zu schädigen. Bei dem „Targeting“ werden unter Nutzung monoklonaler Antikörper-Enzym-Konjugate, die an tumorassoziierte Antigene binden, Prodrug-aktivierende Enzyme an die Oberfläche der Tumorzellen gebracht. Durch die Abspaltung der Galaktose vom *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrug am Tumor wird eine selektive Toxifizierung ausschließlich auf den Tumorzellen erreicht, wodurch die Nebenwirkungen im gesunden Gewebe vermindert oder sogar gänzlich ausgeschaltet werden (Abb. 4.1; Tietze *et al.*, 2007). Somit stellt das ADEPT-Konzept eine Therapieform dar, die die Selektivität bei der Behandlung von Tumoren erhöht.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung des ADEPT-Konzepts.** Das  $\beta$ -D-Galaktosidase-Prodrug, welches ein Analogon des zytotoxischen Antibiotikums CC-1065 darstellt, wurde mittels Glykosidisierung der Hydroxylgruppe detoxifiziert. Durch ein Antikörper-Enzym-Konjugat kann das Prodrug an der Oberfläche der Tumorzellen enzymatisch zum zytotoxischen Drug aktiviert werden. Dies ermöglicht eine selektive Zerstörung der Tumorzellen. (Bild aus Tietze *et al.*, 2007)

Im Mammakarzinom-Modell entwickeln sich drei Wochen nach der MDA-MB-231-Zellen-Implantation solide, nicht invasive Tumoren, die gut vaskularisiert und kompakt sind. Die MDA-MB-231-Zellen gehören zu einer häufig verwendeten Brustkrebs-Zelllinie in xenograften Tumormodellen und stammen ursprünglich aus dem humanen duktalem Brustkarzinom (Callieau *et al.*, 1974). Jenkins *et al.* (2005) beobachteten nach der orthotopen Implantation von MDA-MB-231-Zellen spontane Metastasen in Lymphknoten und in der Lunge, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet wurden. Die MDA-MB-231-Tumorzellen exprimieren an der Zelloberfläche das Protease Urokinase Plasminogen Activator Receptor (uPAR; Holst-Hansen *et al.*, 1996). Der uPAR ist ein Membranprotein, welches für die Plasminogen-Aktivierung an

der Zelloberfläche verantwortlich ist. Diese führt zur Erhöhung der zellulären Migration, die für die Tumorzellinvasion, Chemotaxis und zelluläre Adhäsion notwendig ist (Moller und le Maire, 1993; Cantero *et al.*, 1997). Die uPAR-Expression in Tumoren wird mit ungünstigen Prognosen verbunden und korreliert mit starker Invasivität und Metastasierung des Tumors (Giannopoulou *et al.*, 2007). uPAR ist als Target für die ADEPT auch in Glioblastomen gut geeignet, da auf Grund einer Überexpression des Rezeptors viel anti-uPAR- $\beta$ -D-Galaktosidase gebunden werden kann (Yamamoto *et al.*, 1994; Gladson *et al.*, 1995). Die Expression von uPAR ist in den meisten normalen Geweben nur wenig oder nicht nachweisbar (Huai *et al.*, 2006). uPAR konnte aber in hämatopoetischen Zellen wie Monozyten, Eosinophilen, dendritischen Zellen sowie aktivierten T-Lymphozyten nachgewiesen werden. In nicht-hämatopoetische Zellen wie Endothelialzellen, Hepatozyten, Fibroblasten sowie plazentale Trophoblasten konnte ebenfalls geringe uPAR-Expression nachgewiesen werden (Ge und Elghetany, 2003). Graham *et al.* (1999) konnten zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen *in vitro* MDA-MB-231-Zellen eine erhöhte Menge von uPAR-mRNA entwickeln. Weiterhin wurde gezeigt, dass in *in vitro*-Assays die Invasivität der MDA-MB-231-Zellen unter hypoxischen Bedingungen signifikant erhöht ist (Graham *et al.*, 1999). Nahezu 50% der Brusttumoren sind hypoxisch, wobei die Tumoren unter hypoxischen Bedingungen resistent gegen konventionelle Radio- und Chemotherapien werden (Vaupel *et al.*, 2002). Es ist vorstellbar, dass die Effizienz der ADEPT gerade bei einer erhöhten Expression von uPAR unter hypoxischen Bedingungen verbessert wird. Auch größere Tumoren bieten ein gutes Ziel für ADEPT, weil durch die Hypoxie und die größere Oberfläche mehr uPAR-Expression zu erwarten ist. So kann mehr anti-uPAR- $\beta$ -D-Gal gebunden werden und entsprechend mehr Prodrug in Drug umgewandelt werden, was die zytotoxische Wirkung verstärkt.

Eine große Bedeutung für eine zukünftige Anwendung des ADEPT-Konzepts in klinischen Studien hat die Tatsache, dass bei schwer therapierbaren Mammatumoren von prämenopausalen und postmenopausalen Patientinnen eine hohe uPAR-Expression festgestellt werden konnte (Grondahl-Hansen *et al.*, 1997). Auch bei 36 stark invasiven, primären Mammakarzinomen wurden von Kennedy *et al.* (1998) immunzytochemisch, besonders in den Stromazellen, hohe Konzentrationen von uPAR nachgewiesen. Die Metastasen, die mit einer hohen uPAR-Expression einhergehen, verringern den Erfolg herkömmlicher Therapien, während dieses ADEPT-Konzept von hoher uPAR-Expression und dadurch mehr „Angriffsstellen“ profitiert. Die erhöhte Expression von uPAR in Tumoren macht uPAR zu einem guten Target für die ADEPT.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der ADEPT auch an Lymphomen in der Leber *in vivo* an Mäusen untersucht. In diesem Lymphom-Modell entwickeln sich drei Wochen nach der i.v. Implantation von A20-Zellen Lymphome in der Leber. Zu diesem Zeitpunkt wurden keine vergrößerten Lymphknoten beobachtet. In einem ähnlichen Lymphom-Modell unter Verwendung von A20-Lymphomzellen, entwickelten sich drei bis vier Wochen nach der Injektion Lymphome, die sich hauptsächlich in der Leber und nach etwa sechs Wochen auch in den Lymphknoten und der Milz befanden (Levitsky *et al.*, 1996; Passineau *et al.*, 2005). Dieses Modell ist für präklinische *in vivo*-Evaluierungen von Therapiekonzepten, wie z.B. der Immuntherapie, weit verbreitet (Krop *et al.*, 1996a).

Da A20-B-Lymphom-Zellen an der Oberfläche der Zellmembran das Antigen CD19 exprimieren, wurde der murine anti-CD19 als Bote für das Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase im ADEPT-Konzept verwendet. CD19 stellt ein B-Zell-spezifisches Antigen dar, dessen Expression durch die Differenzierung zu Plasmazellen verloren geht (Goulet *et al.*, 1997). CD19 ist nahezu in allen Entwicklungsstadien der B-Zellen exprimiert und reguliert die B-Lymphozytenentwicklung, Aktivierung und Differenzierung (Mitchell *et al.*, 2003). Weiterhin wird CD19 an der Zelloberfläche der B-Zellen gehalten und nicht in hämatopoetischen Stammzellen, T-Zellen oder anderen nicht-lymphoiden Zellen exprimiert (Bruenke *et al.*, 2005). Dies macht CD19 zu einem attraktiven Target-Antigen für die ADEPT.

#### **4.2 *In vitro*-Nachweis der Anwendbarkeit einzelner ADEPT-Komponenten am Mammakarzinom- und Lymphom- Modell**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase\*FITC *in vitro* mit hoher Affinität ausschließlich an Zellmembranen von MDA-MB-231-Tumorzellen bindet und nicht internalisiert wird. Die Kopplung des Enzyms  $\beta$ -D-Galaktosidase mit anti-uPAR führte zu einer Verzögerung der Antikörperbindung an die Zellmembranen *in vitro* um 24 Stunden. Dass das Immunoglobulin IgG1\*FITC nicht an den Zellmembranen der MDA-MB-231-Zellen band, zeigt die Spezifität der anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*FITC Bindung. Der anti-uPAR eignet sich aufgrund der hohen Konzentration von uPA-Rezeptoren auf der Zellmembran der Tumorzellen besonders gut für die ADEPT im Mammakarzinom-Modell. Li *et al.* (1999) konnten mittels Durchflusszytometrie eine Konzentration von 2500 uPA-Rezeptoren pro Epithelzelle der Brustdrüse ermitteln. In anderen Zelllinien wie z.B. MCF-7, MDA-MB-361, T-47D,

MDA-MB-231, BT-20 und Hs578T wurden diese Rezeptoren in der Zahl von ~13.700 bis ~58.800 pro Zelle nachgewiesen (Li *et al.*, 1999). Ferner konnten Jessani *et al.* (2004) über ein Proteom-Labeling und eine Quantifizierung der Enzym-Aktivität zeigen, dass MDA-MB-231-Zellen *in vitro* deutlich weniger uPAR Antigene haben als *in vivo*. Es ist daher zu erwarten, dass *in vivo* mehr anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal an die MDA-MB-231 Zellen bindet als *in vitro*.

Die Spezifität und Dauer der Bindung sowie die Internalisierung des anti-CD19 und des anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase wurde an A20-Tumorzellen untersucht. Mittels konfokalem Laser Scan Mikroskop wurde die Bindung des anti-CD19\*FITC an die Zellmembranen von A20-Zellen nach 2 h Inkubation gezeigt. Dabei wurde nach weiteren 5 h eine Zunahme der Antikörperbindung beobachtet, während die Bindung des Antikörper-Enzym-Konjugats im weiteren Zeitverlauf konstant blieb.

Der anti-CD19\*FITC wurde nach 24 h internalisiert, während bei der anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*FITC erst nach 48 h eine schwache Internalisierung im Zytoplasma der Zellen beobachtet wurde. Die Kopplung des Enzyms  $\beta$ -D-Galaktosidase mit anti-CD19 führte zu einer Verzögerung der Antikörperinternalisierung an die Zellmembranen *in vitro* um 24 Stunden. Dass das Immunoglobulin IgG2a\*FITC nicht an den Zellmembranen der A20-Zellen band, zeigt die Spezifität der anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*FITC Bindung. Der anti-CD19 eignet sich aufgrund der hohen Konzentration auf der Zellmembran der Tumorzellen besonders gut für die ADEPT im Lymphom-Modell (Uckun *et al.*, 1988).

Da fast alle Zellen doppelt positiv in einer FACS-Analyse über die Bindung des anti-CD19\*FITC und anti-CD45\*PE waren folgt, dass die A20-Zellen noch nicht ausdifferenziert waren und CD19 exprimierten. Die negative Isotyp-Kontrolle zeigt die spezifische Bindung des anti-CD19\*FITC.

Durch die Kopplung des anti-CD19 mit der  $\beta$ -D-Galaktosidase scheint die Internalisierung reduziert worden zu sein. Falls das Antikörper-Enzym-Konjugat internalisiert wurde, jedoch das Prodrug nicht durch die Zellmembran dringt, kann es nicht aktiviert werden. Daher ist nach bisherigen Kenntnissen ein Antikörper, der nicht internalisiert wird, für das ADEPT-Konzept vorzuziehen.

Aber auch Antikörper, die internalisiert werden, trotzdem aber noch in ausreichender Menge an der Zellmembran verbleiben, können für das ADEPT-Konzept verwendet werden, wie es bei anti-CD19 der Fall ist.

Sapra und Allen (2004) verwendeten anti-CD20 und anti-CD19 als Boten für Immunliposomen für humane B-Zell Lymphome. Sie konnten zeigen, dass anti-CD20 nicht internalisiert wird (Sapra und Allen 2002). Somit wäre anti-CD20 gut für das

ADEPT-Konzept geeignet. CD20 ist ein Lymphozyten-spezifisches Antigen, das die transmembranen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporte reguliert und in der Zellzyklus-Progression während der B-Zell Aktivierung exprimiert wird (Uchida *et al.*, 2004). Allerdings war zu Beginn dieser Arbeit noch kein muriner anti-CD20 verfügbar. Der humanisierte anti-CD20 wird häufig für die Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen verwendet (Collins-Burow und Santos, 2007). Eine Kombination von murinem anti-CD19 und anti-CD20 oder nur anti-CD20 könnte für die Optimierung des ADEPT-Konzepts in Lymphomen verwendet werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Bindungsspezifität, Bindungsdauer und die Internalisierung des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase\*FITC an MDA-MB-231-Zellen, wie auch des anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase\*FITC an A20-Zellen führten zu dem Schluss, dass beide Antikörper-Enzym-Konjugate für weiterführende *in vivo* Experimente in der ADEPT geeignet sind.

### **4.3 Vergleich der Langzeit-Bindung des anti-uPAR\*Cy5.5 mit anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 im orthotopen Mammakarzinom-Mausmodell**

Um mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 gekoppelte Antikörper und Antikörper-Enzym-Konjugate *in vivo* zu detektieren, wurde in dieser Arbeit das eXplore Optix-System (GE Medical Systems/ART Montreal Canada) verwendet. Das eXplore Optix-System erlaubt die zeitaufgelöste Messung von Fluoreszenzsignalen im NIR-Bereich (Ma *et al.*, 2007). Aus dem Fluoreszenzphotonen-Laufzeithistogramm (TPSF) wurden dann Streu- und Absorptionskoeffizienten abgeleitet, die Fluoreszenzemitter quantifiziert, sowie die Lebensdauer der Fluoreszenzsignale bestimmt. Über die Fluoreszenzlebensdauer wurden nur die spezifischen Fluoreszenzsignale des Antikörpers\*Cy5.5 und der Antikörper-Enzym-Konjugate\*Cy5.5 in den Tumorbereichen ausgewertet.

Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro*-Studien der beiden Antikörper wurden die *in vivo*-Studien an Mäusen durchgeführt.

Die Langzeit-Bindungsstudien des anti-uPAR\*Cy5.5 und des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 *in vivo* mittels eXplore Optix zeigten, dass der Antikörper nicht unspezifisch in gesundes Gewebe, wie z.B. in Leber und Niere, aufgenommen wird, sondern spezifisch an die MDA-MB-231-Tumorzellen bindet. An uPAR-negative, humane BT474-Zellen jedoch nicht. Der histologische Nachweis von Fluoreszenzsignalen des anti-uPAR\*Cy5.5 in Tumorkryoschnitten in der NIR-Mikroskopie belegt, dass die



Fluoreszenzsignale aus dem Tumorbereich tatsächlich von dort gebundenen Fluoreszenz-markierten anti-uPAR stammen. Die anti-uPAR\*Cy5.5 Bindung war nach 24 h im Tumorbereich detektierbar und blieb bis zu 14 Tage lang konstant. Bei anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 wurde nach 3-7 Tagen die stärkste Bindung im Tumorbereich detektiert, die dann kontinuierlich bis zum 12. Tag abnahm. Der mit  $\beta$ -D-Galaktosidase gekoppelte anti-uPAR zeigt eine um 48 h verzögerte maximale Bindung im Tumorbereich und einen schnelleren Abbau, die Bindungseigenschaften an die Tumorzellen sind also vermutlich verändert. Trotz dieser Beeinträchtigung ist ein Zeitrahmen von 3-7 Tagen ausreichend für eine ADEPT.

Die Bindung des anti-uPAR\*Cy5.5 im Tumorbereich wurde über das eXplore Optix-System *in vivo* nachgewiesen. Ab der dritten Woche nach der Tumorimplantation wurden wöchentlich die spezifischen Fluoreszenzsignale nach der Applikation von 50  $\mu$ g anti-uPAR\*Cy5.5 gemessen. Diese nahmen unter wöchentlicher Kontrolle bis zur 6. Woche an Intensität zu, obwohl die Konzentration des applizierten Antikörpers gleich blieb. Dies weist darauf hin, dass die verwendete Menge des anti-uPARs von 50  $\mu$ g für das ADEPT-Konzept auch bei großen Tumoren ausreichend gewählt war.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass 24 h nach der i.v. Injektion des Antikörpers durch die Verabreichung von Prodrug eine gute Wirkung erzielt werden kann.

Neben der Bindungseigenschaft von uPAR kommt auch der Applikation der Antikörper und der Wirkstoffe eine wichtige Bedeutung für die Optimierung von ADEPT zu. Alle Applikationen in dieser Arbeit wurden intravenös gegeben, weil sich so eine schnelle Verteilung im ganzen Körper ohne eine vorherige Resorption der Wirkstoffe über die serösen Häute einstellt, wie es bei einer intraperitonealen Injektion der Fall wäre. Dadurch verkürzt sich die Eliminationszeit aus dem Blut. Die effektivere Verteilung über das Blut verspricht hierbei eine größere Sicherheit in der Anwendung. Gleichzeitig lässt sich die Tatsache nutzen, dass die Mikrogefäße im Tumorbereich zum Teil undicht sind (Pedley *et al.*, 1999). Für das ADEPT-Konzept bedeutet dies, dass sich die Zugänglichkeit für das Antikörper-Enzym-Konjugat in den Tumoren noch verbessert.

#### **4.4 Vergleich der Langzeit-Bindung des anti-CD19\*Cy5.5 mit anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 im Lymphom-Mausmodell**

Die hier eingesetzten monoklonalen Antikörper anti-CD19\*Cy5.5 und anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 wurden über die Fluoreszenz-Messung mittels eXplore Optix ausschließlich

im Bereich der Lymphome in der Leber nachgewiesen. Dies zeigt eine spezifische Bindung *in vivo* des anti-CD19\*Cy5.5 und des anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 exklusiv an Lymphomen. Die Kopplung von  $\beta$ -D-Galaktosidase an anti-CD19 hatte in diesem Modell keinen Einfluss auf die Bindungskinetik der Antikörper *in vivo*. Die Bindung der Antikörper wurde über die mikroskopischen NIR-Analysen an Lymphomkryoschnitten verifiziert, mit der die an A20-Zellen gebundenen Antikörper detektiert wurden. Die Bindungsdauer des anti-CD19\*Cy5.5 an Lymphomen war im Vergleich zu anti-uPAR\*Cy5.5 an Mammakarzinomen kürzer. Es sind folgende Gründe für die hier gemessene, relativ kurze Bindungsdauer des anti-CD19\*Cy5.5 an Lymphomen im Vergleich zu anti-uPAR\*Cy5.5 an Mammakarzinomen denkbar: Entweder der anti-CD19\*Cy5.5 war tatsächlich kürzer an die A20-Zellen *in vivo* gebunden oder die Cy5.5-Kopplung war weniger stabil und dadurch nach einiger Zeit der anti-CD19 nicht mehr fluoreszenzmarkiert. Auch ist denkbar, dass die Lymphomzellen aus dem Tumor in den Körper abwandern. Dies wurde bereits für Lymphome beschrieben (Cyster, 2005). Dadurch könnten mit der Zeit weniger Zellen mit anti-CD19\*Cy5.5 im Lymphom vorhanden sein. Cyster (2005) untersuchte die Migration der Lymphozyten *in vivo* bei Patienten mittels Indium-111 markierten B-Zellen der NHL. Die Migration der Lymphozyten wurde durch eine gamma-Strahlungs-Bildgebung beobachtet. Rankin *et al.* (1984) konnten zeigen, dass die Tumorzellen während der Antikörper-Behandlung in das Blut gelangten und durch das Retikuloendothelial-System in der Leber aus dem Blut entfernt wurden. Dies könnte erklären, warum in diesem Lymphom-Modell die Fluoreszenzsignale kürzer detektierbar sind als im Mammakarzinom-Modell.

Durch die kürzere Bindungsdauer des anti-CD19\*Cy5.5 an Lymphomen ist die Zeit für eine Prodrug-Applikation im Fall des Lymphom-Modells kürzer als bei Mammakarzinomen. Dies hat zur Folge, dass mehrere Antikörper-Enzym-Konjugat-Applikationen für einen Therapieerfolg notwendig sind. Da verschiedene Lymphome – Follikuläres Lymphom, Haarzelleukämie, lymphoplasmazytisches Immunozytom, Mantelzelllymphom und prolymphotische Läkämie - CD19 exprimieren (Rothe und Schmitz, 1996), wäre es theoretisch möglich, in diesen Fällen die ADEPT mittels anti-CD19\* $\beta$ -D-Gal anzuwenden.

Ein besseres Ergebnis bei der Behandlung von B-Lymphomen könnte zukünftig durch Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen CD20 oder durch eine Kombination von Antikörpern gegen CD19 und CD20 erzielt werden, da CD20-Antikörper keiner Internalisierung unterliegen, weshalb diese ideal für das ADEPT-Konzept wären. Von Senter *et al.* (1989) wurden bereits erfolgreiche Versuche mit Antikörpern gegen CD20

als konjugierte Träger für eine zytotoxische Substanz durchgeführt. Senter verwendete hierbei humane Antikörper für humane Tumorzellen in einem Mausmodell.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der anti-CD19\*Cy5.5 spezifisch an die Lymphome in der Leber bindet, was mittels Isotyp-Kontrolle IgG2a\*Cy5.5 bewiesen wurde. Bei dieser wurde gezeigt, dass sich die Immunglobuline nur innerhalb der ersten 24 h nach deren Applikation gleichmäßig in der Leber verteilen und nicht in den Lymphomen detektiert wurden, was auf ihre Umsetzung in der Leber zurückzuführen ist. Dass der Antikörper in der Leber verstoffwechselt wird, wurde von Baxter *et al.* (1994) beschrieben und untersucht. Es handelt sich also nicht um eine spezifische Bindung der Isotyp-Kontrolle in der Leber.

Die Werte der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale aus dem Leberbereich waren selbst innerhalb der untersuchten Gruppen inhomogen, da die Stärke der Ausprägung der Lymphome in den Lebern der einzelnen Mäuse sehr unterschiedlich war. Die gemessenen Werte der gemittelten Konzentrationen der Fluoreszenzsignale aus dem Leberbereich sind nur Relativwerte ohne physikalische Einheit. Diese Werte sind innerhalb einer Gruppe, die dasselbe Konjugat erhalten haben, vergleichbar. Zwischen den Gruppen, die unterschiedliche Konjugate bekommen haben, kann nur der Kurvenverlauf über die Zeit verglichen werden, aber nicht die Werte der gemittelten Konzentrationen, weil die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung des Antikörper-Farbstoff-Konjugats von der Anzahl der Farbstoffmoleküle am Antikörper sowie von deren Quanteneffizienz abhängig ist.

Die *in vivo*-Bindungsstudien der Antikörperfragmente anti-EAG1Fab\*Cy5.5 an MDA-MB-435S-Tumorzellen mittels eXplore Optix wurden von Pardo *et al.* (2005) und Stühmer *et al.* (2006) durchgeführt. Dabei wurden nur die spezifischen Signale ausgewertet. Im Gegensatz dazu basierten die *in vivo* Antikörper-Bindungsstudien früher auf radioaktiv markierten Antikörpern. Um die Quantität der Antikörper-Bindung zu bestimmen, wurden hierfür die Organe der Versuchstiere entnommen und deren Radioaktivität gemessen. Pervez *et al.* (1988) verwendeten mit <sup>125</sup>I radioaktiv markierte murine Antikörper gegen AUA1 für Kolontumorzellen (LoVo). Die LoVo-Tumorzellen wurden in immundefiziente Nacktmäuse implantiert, wobei die Menge des Antikörpers im Tumor detektiert wurde. Die Tiere wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen getötet und die Menge des gebundenen Antikörpers mittels Autoradiographie bestimmt (Pervez *et al.*, 1988). Diese Studie benötigte eine hohe Anzahl an Versuchstieren und einen großen Zeitaufwand. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete

Antikörpernachweis mittels eXplore Optix bietet eine höhere Genauigkeit bei sehr viel geringerem Zeitaufwand und einer geringeren Anzahl an Versuchstieren.

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ermöglicht ebenfalls eine nicht-invasive Detektion von Antikörpern *in vivo*, basiert aber auf einem anderen Prinzip als das eXplore Optix. Hierbei ist der Antikörper radioaktiv markiert, um z.B. Kolorektaltumoren (Kula et al., 2004) nachzuweisen. Die PET bietet die Vorteile einer herkömmlichen konventionellen Szintigraphie, bei einer höheren Kontrastauflösung und der Möglichkeit zur Quantifizierung der Radiopharmakaaufnahme in das Gewebe (Kula et al., 2004). Allerdings ist es über die PET nicht möglich die Bindungskinetik zu untersuchen, da die Signale stetig, auf Grund des radioaktiven Zerfalls der Markierung, an Intensität verlieren. Im Gegensatz dazu erlaubt das eXplore Optix-System in der hier vorliegenden Arbeit durch Beispielsweise die Verwendung des Cy5.5 markierten uPAR-Antikörpers die Messung konstanter Fluoreszenzsignale für bis zu 14 Tage *in vivo*.

Für einen Antikörpernachweis kann auch die Magnetresonanztomographie (MRT) über die Bindung von Metallpartikeln an den Antikörper oder eine *single-photon emission computed tomography* (SPECT) über die radioaktive Markierung des Antikörpers verwendet werden. Im Vergleich zu PET, welches die  $\beta$ -Strahlung misst, bietet SPECT durch Messung von  $\gamma$ -Strahlung weniger räumliche Auflösungsvermögen und geringere Sensitivität. Durch die langen Messzeiten mit diesen Verfahren ist eine dynamische Untersuchung des Antikörper-Bindungsverhaltens *in vivo* nicht möglich (Winnard und Raman, 2003).

Neue Systeme, die auf der Messung von Fluoreszenzsignalen basieren und mit Spektrallampen arbeiten, wie z.B. Maestro (CRI) (Choy et al., 2003; Talanov et al., 2006) oder Xenogen (Troy et al., 2004) erlauben ebenfalls eine dynamische Antikörperbindungsstudie *in vivo*. Bei diesen Verfahren kann allerdings nicht die Fluoreszenzlebensdauer gemessen werden.

#### **4.5 Aktivität des an anti-uPAR gekoppelten Enzyms $\beta$ -D-Galaktosidase**

Der Nachweis der Enzymaktivität des anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal\*Cy5.5 wurde *in vitro* und *in vivo* über die Verwendung von DDAOG als Substrat erbracht. Das fluoreszierende DDAO wurde im eXplore Optix-System gemessen, nachdem es durch das aktive Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase von DDAOG abgespalten wurde. Es wurde gezeigt, dass

das an den anti-uPAR gekoppelte Enzym  $\beta$ -D-Galaktosidase an der Zelloberfläche aktiv ist. Die höchste Enzymaktivität wurde *in vitro* zwei Stunden nach der Inkubation mit MDA-MB-231-Tumorzellen beobachtet, wobei die Aktivität am Ende der Beobachtungszeit von 96 h 1,6-fach geringer als die Maximalaktivität war. *In vivo* wurde ebenfalls die  $\beta$ -D-Galaktosidase-Aktivität in Mäusen nach der Implantation von MDA-MB-231-Zellen untersucht. 48 h nach der Applikation von anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal wurden stärkere Fluoreszenzsignale im Tumor gemessen als 24 h nach der Applikation von anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal, was auf eine stärkere Enzymaktivität in dieser Zeit im Tumor hinweist. Dies zeigt, dass das Enzym die Aktivität *in vivo* nicht verloren hat und deutet auf eine Anreicherung des Antikörpers im Tumor im Zeitverlauf hin. Weil die  $\beta$ -D-Galaktosidase in einer ausreichenden Menge aktiv blieb um das Substrat DDAOG am Tumor zu aktivieren, ist davon auszugehen, dass das Enzym nach der Bindung des Konjugats eine genügende Enzymaktivität zur Prodrugaktivierung *in vivo* aufweist.

Tung *et al.* (2004) führten erste Experimente zur Messung der  $\beta$ -D-Galaktosidase-Enzymaktivität in LacZ-transfizierten 9L-Gliomazellen mittels DDAOG und optischer Bildgebung bei Nacktmäusen durch. Das stärkste Signal nach der DDAOG Injektion wurde nach 40-60 min beobachtet, wobei nach 5 h keine Signale mehr messbar waren. Analog dazu wurde auch in der vorliegenden Arbeit die optimale Signalstärke 1 - 2 h nach der DDAOG Injektion gemessen. Im Gegensatz zu dem direkten Nachweis der LacZ-positiven Zellen bei Tung *et al.* (2004) wurde hier die Enzymaktivität nachgewiesen. Hier war es das Ziel, die Aktivität des Enzyms nachzuweisen und nicht die Tumorzellen zu lokalisieren.

Eine andere Methode zur Detektion von Enzymaktivitäten wurde von Wehrman *et al.* (2006) mittels optischer Bildgebung etabliert. Dabei wurde die Aktivität einer an den Antikörper gekoppelten  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen, wobei die Reporter-Enzym-Lumineszenz verwendet wurde. Das Substrat war mit D-Luciferin-Galaktosid konjugiert und wurde mit  $\beta$ -Galaktosidase modifiziert, bevor es durch die Leuchtkafer-Luziferase aktiviert werden konnte und somit biolumineszierend wurde. Die Lumineszenz war abhängig von der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase. Mit diesem System ist es möglich, endogene und extrazelluläre Antigene *in vivo* zu detektieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass  $\beta$ -D-Galaktosidase *in vivo* aktiv ist. Krewer fand, dass ein Enzymmolekül ausreichend ist, um 26000 Prodrug-Moleküle in *seco*-Drug-Moleküle umzuwandeln (pers. Mitteilung). Die *seco*-Drug-Moleküle zyklisieren dann innerhalb von 30 min zu 90% in das aktive Drug. Das bedeutet, dass selbst niedrige Mengen des Enzyms an der Tumoroberfläche in der

Lage sein sollten, einen Einfluss auf das Tumorwachstum auszuüben. Dies stellt eine sehr gute Ausgangssituation für eine erfolgreiche ADEPT dar.

#### **4.6 Quantitativer Nachweis von anti-uPAR und anti-CD19 im Serum von tumortragenden Mäusen im Zeitverlauf**

Für das Mammakarzinom-Modell wurde als optimaler Zeitpunkt für die Verabreichung des Prodrugs mit 48 h nach der Injektion von anti-uPAR bestimmt, weil nach dieser Zeit die ursprünglich applizierte Antikörpermenge im Blut um 52,5% reduziert war.

Im Lymphom-Modell war ein schnellerer Konzentrationsabfall des Antikörpers im Serum zu beobachten als im Mammakarzinom-Modell. Die Konzentration des anti-CD19 im Serum war schon nach vier Stunden um 75% reduziert. Demnach ist hier schon 24 h nach der Antikörper-Applikation die Verabreichung des Prodrugs möglich.

Dass der Antikörper sich nur für kurze Zeit im Blut befindet, entspricht einer Voraussetzung des theoretischen Modells für das ADEPT-Konzept von Yuan *et al.* (1991) und Baxter *et al.* (1994). Dadurch kann vermieden werden, dass das Prodrug im Blut aktiviert wird und seine toxische Wirkung auf alle Organe entfaltet. Mit der gleichen Methode wie in der vorliegenden Arbeit wurde auch in anderen ADEPT-Konzepten (Sharma *et al.*, 1991) der optimale Zeitpunkt für die Verabreichung des Prodrugs gefunden. Sharma *et al.* verwendeten dabei den monoklonalen Antikörper anti-CEA, dessen höchste Konzentration im Tumor 24 h nach der Injektion gemessen wurde.

Da es fatal wäre ein Prodrug einzusetzen, dessen enzymatische Aktivierung schon unmittelbar im Blut erfolgt, und somit eine toxische Wirkung auf alle Organe erzielt werden würde, stellt ein Antikörper mit einer hohen Spezifität für die entsprechenden Tumorzellen eine wesentliche Voraussetzung für den optimalen Einsatz der Therapie bei minimaler Schädigung von nicht-Tumorgewebe dar.

#### **4.7 Tumorprogression des orthotopen Mammakarzinoms**

Über die fpVCT-Messung wurde die Volumenentwicklung der Mammakarzinome nach der Tumorzellimplantation wöchentlich untersucht. Die Tumore sind bereits drei Wochen nach orthotoper Implantation bei allen Tieren gut erkennbar und somit konnte die Therapie begonnen werden.

Auch das Lymphomwachstum in Balb/c-Mäusen wurde im Zeitverlauf nach Tumorzellimplantation mittels fpVCT untersucht. Die Lymphome in der Leber sind nicht

direkt über Kontrastmittelfärbung darstellbar, weil sie nicht vaskularisiert sind und daher für das Kontrastmittel nicht zugänglich sind. Die Lymphome wurden somit in der Leber mit Hilfe einer negativ-Kontrast-Bildgebung als dunkle Strukturen leicht abgrenzbar und vermessbar. Das hier verwendete Kontrastmittel, Fenestra hat einen hohen Iod-Anteil und wird durch die Leber verstoffwechselt. Durch die hohe Auflösung der Messdaten war es möglich, die Lymphomprogression während der Therapie *in vivo* zu verfolgen.

Eine Evaluierung der Lymphomentwicklung wurde von Chaise *et al.* (2006) durchgeführt, wobei nach der i.v. Implantation von A20-Tumorzellen *in vivo* in Balb/c-Mäuse mittels [F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose Positronen Emissionstomographie (FDG-PET) das Wachstum nicht-invasiv untersucht wurde. Weber *et al.* (2004) untersuchten Lebertumoren in Balb/c-Mäusen mittels Mikro-CT. Über diese Methode war es ebenfalls möglich, die Lebertumoren zu visualisieren. Dies gelang jedoch nicht im Zeitverlauf und nicht in ein und demselben Tier, da die lange Untersuchungszeit eine zu hohe Strahlenexposition zur Folge hat. Allgemein besteht ein großer Bedarf an der Entwicklung besserer Kontrastmittel zur Darstellung von Lebertumoren.

Die Möglichkeit der nicht-invasiven Tumoruntersuchung war in dieser Arbeit sehr wichtig, um die Veränderungen der Tumoren durch die Therapie verfolgen zu können. Durch die hohe isotrope Auflösung des fpVCT wurden in der vorliegenden Arbeit bis zu 75 µm grosse Tumoren detektiert. Das Auflösungsvermögen der fpVCT überschreitet selbst die Auflösung modernster klinischer mehrzeiliger Computertomographen, wie z.B. des 64-zeiligen Volumen-CT (LightSpeed, GE Global Research), um den Faktor 2 bis 3. Die Mikro-CTs haben zwar mit 50 µm eine höhere Auflösung, allerdings ist die Untersuchungszeit mit 30 min deutlich länger als die im fpVCT mit 8 sec (Paulus *et al.*, 2001). Daher sind Mikro-CT-Systeme wegen der hohen Belastung für den Organismus eher für die Untersuchung von Gewebeproben und nur mit Einschränkungen für Kleintiere geeignet (Litzlbauer *et al.*, 2006). Weichgewebedarstellung ist im CT auf Grund des geringen Weichgewebkontrastes nur mit Hilfe systemisch gegebener Kontrastmittel, wie auch in dieser Studie, möglich. Diese Kontrastmittel werden aber sehr schnell, innerhalb weniger Sekunden, wieder über die Nieren ausgeschieden. Die lange Aufnahmezeit der Mikro-CT-Systeme ermöglicht keine *in vivo* Bildgebung mit diesen Kontrastmitteln und ist daher für eine in dieser Arbeit präsentierte Tumorverlaufskontrolle nicht einsetzbar.

## 4.8 Detektion von Knochenmetastasen im Mammakarzinom-Modell mittels eXplore Optix und fpVCT

Knochenmetastasen und daraus resultierende Läsionen der Knochen bildeten sich drei Wochen nach der i.c. Implantation von MDA-MB-231-Zellen in SCID-Mäuse. Mittels fpVCT wurden die osteolytische Läsionen am Knochen, die durch die Tumorzellen verursacht waren, dreidimensional dargestellt. Durch die Erfassung der Fluoreszenzsignale des anti-uPAR\*Cy5.5 mittels des eXplore Optix-Systems konnten schon deutlich vor einer sichtbaren osteolytischen Veränderung die metastasierten Tumorzellen im Knochen detektiert werden.

Durch die Untersuchungen am eXplore Optix wurden die Knochenmetastasen fast drei Wochen früher entdeckt als Knochenläsionbefunde aus dem fpVCT. Die Kombination von fpVCT und eXplore Optix stellt aufgrund der anatomischen Darstellungsmöglichkeit und der empfindlichen Nachweismöglichkeit der Metastasen über die Antikörperbindung eine effektive Methode zur Untersuchung von Metastasen dar.

Wetterwald *et al.* (2002) konnten Knochenmetastasen durch Biolumineszenzreporter detektieren, die mittels einer i.c. Injektion von Luciferase-transfizierten MDA-MB-231-Zellen an Nacktmäusen erzeugt worden waren. Die Metastasen konnten vor der Osteolyse erkannt werden. Die Biolumineszenz wurde mittels eines Hamamatsu-Systems gemessen und die Knochenläsionen wurden über Radiographie detektiert.

Jenkins *et al.* (2005) zeigten Knochenmetastasen nach i.c. Implantation von MDA-MB-231-Tumorzellen, die Luciferase exprimierten. Bei diesen Studien wurden auf der Basis von Biolumineszenz mittels CCD (charge-coupled device) Kamera (IVIS, Xenogen) Messungen durchgeführt die bereits zwei Wochen nach der Tumorzellimplantation die Metastasen nachwies. Die Biolumineszenz-basierte Bildgebung ist *in vivo* ebenfalls eine schnelle und sensitive Methode, um Metastasen zu detektieren (Wetterwald *et al.*, 2002).

Die auch im Mammakarzinom-Modell verwendeten MDA-MB-231-Tumorzellen, die uPAR exprimieren, metastasieren im Knochen nach i.c. Implantation und führen dann zu Knochenläsionen. Die dort reichlich vorhandenen Zytokine und Wachstumsfaktoren regen die Tumorzellen zum Wachstum an, wodurch eine spezifische Aktivierung der Osteoklasten erfolgt. Diese führen dann zu Knochenabbau und es ergibt sich ein synergetischer Effekt, der die Entstehung von Knochenmetastasen fördert. Die über i.c. Implantation von MDA-MB-231-Zellen verursachten Knochenmetastasen gehören zu einem der meist erforschten Modelle für Metastasierungen (Hiraga *et al.*, 2001).



Bei 25-40% der Brustkrebs-Patientinnen kommen Knochenmetastasen vor, deren Auftreten meist die Überlebens- und Heilungschancen drastisch senken (Guarneri und Conte, 2004). Das ADEPT-Konzept könnte zur Behandlung solcher Metastasen verwendet werden und auch als begleitende Therapie nach der operativen Entfernung des Tumors genutzt werden.

Eine besondere Bedeutung für die künftige präklinische Diagnose von metastasierenden Tumoren in Tiermodellen kommt dem hohen Auflösungsvermögen der Untersuchungsmethode in dieser Arbeit zu, welche selbst Mikrometastasen detektieren kann, was mit herkömmlichen Methoden nicht möglich ist. Die Mikrometastasen könnten behandelt werden, bevor es zu einer weiteren Ausbreitung kommt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Mikrometastasen-Detektion über eXplore Optix eine besonders hohe Sensitivität aufweist.

Ein anderes Fluorophor zur Detektion von Knochenmetastasen stellt das GFP dar, welches von Yang *et al.* (2000) verwendet wurde. Dabei konnten die Knochenmetastasen aus GFP-transfizierten Melanomzellen *in vivo* in C57 BL/6- und Nacktmäusen detektiert werden. Die Untersuchungen basierten dabei auf Fluoreszenzmessungen mittels einer „Fluorescence Light Box“ und einer thermoelektrisch gekühlten CCD Kamera. Ein Nachteil dieses System ist, dass durch die starke Überlappung mit der Autofluoreszenz die Sensitivität der Messung stark reduziert ist. Yang *et al.* (2000) konnten dadurch nur große Metastasen nachweisen. Die maximale Eindringtiefe in dieser Methode lag bei nur 2,2 mm, während mittels eXplore Optix Signale aus eine Tiefe von bis zu 15 mm detektiert werden können.

#### **4.9 Planung des therapeutischen Einsatzes des ADEPT-Konzepts im Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell**

Die ADEPT wurde präklinisch im Mausmodell untersucht, indem anhand der Daten aus den *in vitro*- und *in vivo*-Voruntersuchungen Therapieschemata für die Behandlung im Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell erstellt wurden.

Für die präklinische Evaluation der ADEPT im SCID-Mausmodell für das humane Mammakarzinom wurde drei Wochen nach der Tumorimplantation das anti-uPAR\* $\beta$ -D-Gal in einer Menge von 50  $\mu$ g pro Maus appliziert. 48 h später wurden 104  $\mu$ g Prodrug verabreicht. Die Verträglichkeitsstudien von *anti*-Methy-seco-CBI-DMAI-Prodrug und -Drug zeigten, dass die gewählte Dosis keine Schädigung der Versuchstiere zur Folge hatte. Die Gabe des Prodrugs erfolgte dreimal innerhalb von sechs Tagen, wobei

dieser Zyklus der Antikörper-Enzym-Konjugat-Applikation und Prodrug-Gabe ein weiteres Mal wiederholt wurde. Dieses verstärkte den therapeutischen Effekt. Eine weitere Evaluation der ADEPT wurde am syngenem Lymphom-Modell in Balb/c-Mäusen durchgeführt. Drei Wochen nach der Tumorimplantation wurde Mäusen das anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase appliziert und 24 h später 104  $\mu$ g Prodrug verabreicht. Die Prodrug-Gabe erfolgte je einmal täglich über drei Tage, wobei dieser Zyklus der Antikörper-Enzym-Konjugat-Applikation und Prodrug-Gabe ebenfalls ein weiteres Mal wiederholt wurde.

Die optimale Antikörperdosis für die ADEPT hängt u.a. von mehreren Faktoren ab: der Injektionsmethode (i.v. oder i.p.), dem Zeitpunkt der Prodrug-Gabe und der Bindungsaffinität des Antikörpers. Das Hauptanliegen bestand darin, eine möglichst hohe Konzentration des Drugs am Tumor bei gleichzeitig möglichst niedriger Konzentration im Blut zu erzielen. Dies kann erreicht werden, indem die Antikörperkonzentration etwas geringer als das Sättigungsniveau gehalten wird (Yuan *et al.*, 1991). So wird vermieden, dass sich zum Zeitpunkt der Prodrug-Applikation viel ungebundenes Antikörper-Enzym-Konjugat im Blut befindet. Die Dosis des Prodrugs zu Beginn der Therapie sollte eine Konzentration im Blut erreichen, die nur wenig unter der toxischen Konzentration für das Drug liegt (Yuan *et al.*, 1991).

Durch die Erhöhung der Zyklenanzahl könnte der Therapieerfolg noch verbessert werden, allerdings geht dies mit einem zunehmenden Risiko einer Immunreaktion des Körpers auf die fremden Proteine einher. Entsprechende Reaktionen gegen die Antikörper sind beim Menschen bekannt (Sharma *et al.*, 1992), weswegen möglicherweise immunsuppressive Medikamente, wie z.B. Cyclosporin (Bagshawe und Sharma, 1996), mit in die ADEPT einbezogen werden müssten.

Die einzige Möglichkeit die Differenz der Drug- Konzentration am Tumor und im Plasma zu erhöhen ist eine erhöhte Aktivierung des Prodrugs am Tumor und eine reduzierte Aktivierung im Plasma. Dieses Ziel kann erreicht werden, indem das Zeitintervall zwischen Antikörper-Enzym-Konjugat- und Prodrug-Gabe verlängert wird. Das hat zur Folge, dass die Antikörperkonzentration im Tumor höher ist als im Plasma. Andererseits kann eine Verlängerung des Zeitintervalls zwischen Antikörper-Enzym-Konjugat- und Prodrug-Gabe die Gesamtkonzentration des Drugs am Tumor negativ beeinflussen, weil die Konzentration des Antikörpers an der Tumoroberfläche mit der Zeit sinkt (Yuan *et al.*, 1991).

## 4.10 Therapeutischer Einsatz des ADEPT-Konzepts im Mammakarzinom- und Lymphom-Mausmodell

Die ADEPT zeigte in der Anwendung im Mammakarzinom- und im Lymphom-Mausmodell einen inhibitorischen Effekt auf das Tumorwachstum. Bei dem Mammakarzinom-Mausmodell hatten die therapierten Tiere 132% niedrigere Tumorwachstumsraten als die Kontrolltiere. Die kleineren Tumoren reagierten stärker auf die Therapie, wobei auch große Tumoren im Wachstum gehemmt wurden. Die Tumorgewebedichte der Mammakarzinome der therapierten Mäuse war nach der Therapie signifikant höher als die der Kontrollmäuse. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich bspw. durch undichte Gefäße Flüssigkeiten im nekrotischen Bereich innerhalb des Tumors ansammelten. Kraul und Löwe (1957) zeigten, dass nekrotische Teile des Tumors zu einem höheren Tumorgewicht bei gleicher Größe führen.

Auch im Lymphom-Modell wurde der inhibitorische Effekt der ADEPT auf das Lymphomwachstum gezeigt. Die therapierten Tiere hatten im Mittel 1034% (Faktor 3,6) niedrigere Lymphomwachstumsraten als die Kontrolltiere. In vier von acht Fällen sind die Lymphome sogar kleiner geworden. Die Unterschiede der Lymphomvolumina zwischen den Lymphomen der therapierten und denen der Kontrolltiere waren groß, aber es konnten bei der histologischen Analyse der Lymphome keine Unterschiede der Morphologie beobachtet werden.

Die Blutuntersuchungen von therapierten und Kontrolltieren lieferten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die ADEPT in der hier beschriebenen Version von allen Tieren gut vertragen wurde.

In der von Tietze *et al.* (2002) entwickelten ADEPT wurden in einem xenograften Modell SCID-Mäusen humane Bronchialkarzinom (A-549) implantiert. Die Therapie mit einem Prodrug wurde schon 8 Tage nach der Implantation mit der i.v. Gabe des Antikörper-Enzym-Konjugats begonnen. Dabei lag der Behandlungsbeginn in einer wesentlich früheren Phase der Erkrankung, als es in der hier vorliegenden Arbeit der Fall war. Als Antikörper wurde von Tietze und Feuerstein (2003) ein Antikörper gegen humanes Epithel-Membran-Antigen (anti-EMA) verwendet. 84 Stunden später wurde das Prodrug in einer Dosis von 25 µg/kg i.p. verabreicht. Diese Behandlung wurde jeden zweiten Tag bis zum Therapieende am Tag 30 wiederholt. Die behandelten Tiere hatten am Ende der Therapie keine oder kleinere Tumoren als die Kontrolltiere, was histologisch belegt wurde. Eine Verlaufsuntersuchung wurde in diesen Experimenten nicht durchgeführt, weshalb nicht bekannt ist, wie sich die Tumoren unter der Therapie

entwickelt haben (Tietze und Feuerstein, 2003).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das neue *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI-Prodrug in der Mammakarzinom- und der Lymphom- Therapie hemmend auf das Tumorenwachstum wirkte. Dieses Ergebnis ist auf die Eigenschaften des Drugs *anti*-Methyl-seco-CBI-DMAI mit seiner Fähigkeit zur Bindung an AT-reiche Regionen der DNA, z.B. die TATA-Box, zurückzuführen (Tietze *et al.*, 2002; Baraldi *et al.*, 2004, Tietze *et al.*, 2006). Wenn das Drug an die TATA-Box bindet, verhindert es so die Replikation der DNA und hemmt damit die Proliferation.

In anderen ADEPT-Konzepten (Sharma *et al.*, 1991) führte die Anwendung des Prodrugs nicht zu einer verzögerten Tumorentwicklung, wobei das Prodrug erst 5-6 Tage nach dem Antikörper-Enzym-Konjugat appliziert wurde, um die Gesamtoxizität zu reduzieren.

Es gibt mehrere ADEPT-Konzepte in verschiedenen Tumormodellen, die sich in den verwendeten Prodrugs, Antikörpern und Enzymen unterscheiden. Beispielsweise haben Eccles *et al.* (1994) Brusttumoren, die durch MDA-MB-361-Zellimplantation verursacht wurden, in weiblichen athymischen Mäusen mittels Antikörper-Enzym-Konjugat, das sog. ICR12\*Carboxypeptidase-G2, und CMDA als Prodrug untersucht. Bagshawe *et al.* (1988) haben das xenografte Modell des Kolorektaltumors mit CC3-Chorionkarzinomzellen mittels Carboxypeptidase-G2 und CMDA-Prodrug untersucht und Meyer *et al.* (1993) verwendeten für ihr ADEPT-Konzept das LS174T-Kolonkarzinom mit Antikörpern gegen das *Carcinoembryonic*-Antigen CEM2314 und dem Enzym  $\beta$ -Laktamase und dem Cephalosporin-vinca-Alkaloid als Prodrug (Meyer *et al.*, 1993).

Eine weitere Variante der ADEPT ist das so genannte drei-Phasen-System, bei dem zwischen der Antikörper-Enzym-Konjugat-Gabe und der Prodrug-Applikation ein neutralisierender Antikörper eingesetzt wird. Dieses System wurde von Sharma *et al.* (1991) entwickelt. Hierbei wurde die Residualmenge des Antikörper-Enzym-Konjugats im Plasma durch einen galaktosidierten anti-CPG2-Antikörper (SFB43gal) neutralisiert. Dadurch ergab sich die Anwendungsmöglichkeit für das Prodrug innerhalb von 24 h. Die Verwendung dieses drei-Phasen-Systems bewirkte ein deutlich reduziertes Tumorenwachstum bereits nach einem einzigen Behandlungszyklus. Die Verabreichung von SFB43gal erfolgte 19 h nach der Antikörper-Enzym-Konjugat-Applikation und wurde von drei Injektionen des Prodrugs gefolgt. Ein in dem hier untersuchten ADEPT-Konzept einsetzbarer neutralisierender Antikörper müsste ein glykosilierter Antikörper gegen  $\beta$ -D-Galaktosidase sein. Ein neutralisierender Antikörper ist bei dem in dieser

Arbeit vorgestellten ADEPT-Konzept jedoch nicht notwendig, da bereits nach 24 h das Prodrug eingesetzt werden kann.

Ein direkter Vergleich der unterschiedlichen ADEPT-Konzepte ist nicht möglich, da jede Änderung einer einzelnen Komponenten wie Prodrug, Antikörper-Enzym-Konjugat und Tumormodell das gesamte System beeinflusst.

Eine Optimierung des vorliegenden ADEPT-Konzepts könnte durch Kombination unterschiedlicher Ansätze erfolgen. Bspw. wurden zur verbesserten Antikörperbindung an den Tumorzellen Medikamente eingesetzt, die die Druckunterschiede zwischen der interstitiellen Flüssigkeit und dem mikrovaskulären Druck modifizierten, wie z.B. Angiotensin II (Jain *et al.*, 2007). Möglich ist auch die Nutzung von Interleukin-2, das eine Mikrofenestration in der mikrovaskulären Umgebung des Tumors verursacht und so einen besseren Zugang für den Antikörper oder das Prodrug gewährleistet (Jain *et al.*, 2007).

In schlecht vaskularisierten Tumoren, wie zum Beispiel Lymphomen, ist der Transport von großen Konjugaten nur begrenzt möglich, und es ist unmöglich, das Antikörper-Enzym-Konjugat zu allen Tumorzellen zu bringen (Xu und McLeod, 2001). Durch die oftmals geringe Enzymmenge am Tumor ist es schwierig, eine genügende Menge aktiven Drugs zu erhalten, um einen letalen Effekt auf die Tumorzellen zu erzielen.

Das Hauptproblem in der ADEPT ist die Immunogenität des Antikörper-Enzym-Konjugats, welche für schwerwiegende Nebenwirkungen bei häufigen Therapiezyklen verantwortlich sein kann. Um dieses Problem zu lösen, wurden unterschiedliche Versuche mit der Verwendung von humanisierten Antikörpern und einer begleitenden Therapie mit Immunsuppressoren vorgestellt (Syrigos und Epenetos, 1999). Aus diesen Gründen wurden unterschiedliche Modifikationen des ADEPT-Konzepts verwendet. Eine Möglichkeit ist zum Beispiel, das Enzym nicht mit Antikörpern sondern nur mit Teilen des Antikörpers zu koppeln, was eine schnellere Entfernung aus dem Plasma ermöglichen und damit einen früheren Prodrug-Einsatz erlauben würde. Eine weitere Möglichkeit ist, das ADEPT-Konzept mit einem Angiogenese-Inhibitor zu kombinieren, der selektiv die Bildung von Tumorgefäßen hemmt und eine stärkere Nekrotisierung bewirkt (Xu und McLeod, 2001). Auch die Verwendung einer chimären Form des Enzyms, um die systemische Toxizität von nicht-humanen Enzymen, sowie eine Immunreaktion auf humane Enzyme zu vermeiden, wäre denkbar.

## 4.11 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Für eine Mammakarzinom-Therapie wären mehrere Therapiezyklen für die Optimierung der ADEPT denkbar. Eine osmotische Pumpe, die kontinuierlich über einen gewünschten Zeitraum Prodrug in den Körper abgibt, so dass eine bestimmte Menge an Prodrug kontinuierlich präsent ist, könnte dafür sorgen, dass die Prodrug-Konzentration zwischen den Antikörper-Gaben konstant bleibt. Um genau festzustellen, welche Mengen Prodrug und Drug während der ADEPT im Tumor, im Blut und in den Organen vorhanden sind, könnte eine Analyse von HPLC-homogenisiertem Gewebe durchgeführt werden, analog zur Anwendung in anderen Konzepten. Somit könnte die eingesetzte Konzentration des Prodrugs noch weiter optimiert werden.

Die Effekte einer Kopplung des Drugs mit anderen Zuckerresten könnten untersucht werden. Hieraus könnten sich verbesserte Eigenschaften bezüglich der Löslichkeit, der Resorption und der Verteilung ergeben.

Für das Lymphom-Modell könnte zukünftig neben anti-CD19 auch anti-CD20 verwendet werden um eine erhöhte Bindung des Konjugats an die Lymphomzellen zu erreichen. Eine Kopplung des Prodrugs mit Cy5.5 oder einem anderen geeigneten Farbstoff und anschließender Untersuchung mittels eXplore Optix könnte Informationen liefern, wie die Prodrug-Verteilung im Körper nach der i.v. Applikation abläuft. Auch die Internalisierung von Prodrug sollte untersucht werden. So könnte man sich nicht nur auf die nicht-internalisierenden Antikörper beschränken, sondern auch die internalisierenden wären verwendbar, sollte das Prodrug die Zellmembran passieren können. Diese Studie könnte auch *in vitro* mittels konfokalem Laser Scan Mikroskop mit einem mit PE markierten Prodrug durchgeführt werden.

Dieses ADEPT-Konzept müsste an weiteren Tumormodellen überprüft werden, um seine Einsetzbarkeit an anderen Tumorentitäten zu prüfen.

Das Fernziel besteht darin, eine selektive Tumorthherapie ohne Nebenwirkungen für tumorerkrankte Menschen zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es ein neues Therapiekonzept *Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy* (ADEPT) in Tieren zu evaluieren. Damit sollte eine höhere Spezifität und Selektivität in der Behandlung von Tumoren erreicht werden. Dabei wurden ein orthotopes Mammakarzinom- mit MDA-MB-231-Tumorzellen in weiblichen SCID-Mäusen und ein syngenes Lymphom-Modell mit hochmalignem B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom in Balb/c-Mäusen unter Verwendung von murinen A20-Zellen untersucht. Es wurden die Antikörper anti-uPAR und anti-CD19 für den Transport von  $\beta$ -D-Galaktosidase an den Tumor verwendet. Um die ADEPT zu evaluieren wurden die nichtinvasiven Methoden fpVCT und eXplore Optix angewendet.

Anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase bindet sowohl *in vitro* als auch *in vivo* an MDA-MB-231-Tumorzellen. Dabei wurde jeweils eine Enzymaktivität nachgewiesen. 48 Stunden nach der anti-uPAR Applikation sank die Menge des freien Antikörpers im Serum von tumortragenden Mäusen derart, dass nach dieser Zeit das Prodrug i.v. verabreicht werden konnte. Die Therapie im Mammakarzinom-Modell wurde in zwei Zyklen durchgeführt. Dabei erfolgte zunächst eine anti-uPAR\* $\beta$ -D-Galaktosidase Applikation, die von drei Prodrug-Applikationen in 48-stündigen Intervallen ergänzt wurde. Die Tumorumfänge wurden mittels fpVCT vor und nach dem ersten und zweiten Therapiezyklus bestimmt. Die ADEPT verursachte eine Hemmung des Mammakarzinomwachstums bei therapierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren, bei denen die Tumorumfängen um den Faktor 1,7 höher lagen.

Im Lymphom-Modell band anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase *in vitro* und *in vivo* an die A20-Tumorzellen des Balb/c-Mausmodells. Hier konnte bereits nach 24 h das Prodrug i.v. verabreicht werden. Die Therapie wurde ebenfalls wie beim Mammakarzinom-Modell in zwei Zyklen durchgeführt, jeweils eine anti-CD19\* $\beta$ -D-Galaktosidase Applikation und drei Prodruganwendungen in einem 24-stündigem Intervall. Die Lymphomumfänge wurden mittels fpVCT am Beginn und Ende der Therapie untersucht. Die ADEPT verursachte eine Hemmung des Lymphomwachstums bei den therapierten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren, wo die Lymphomwachstumsraten um den Faktor 3,6 höher lagen.

Es wurde gezeigt, dass die ADEPT in beiden Modellen *in vivo* eine Hemmung des Tumor- bzw. Lymphomwachstums bewirkt. Das ADEPT-Konzept bietet eine potentielle Therapie mit größerer Selektivität und eventuell weniger Nebenwirkungen für Krebserkrankungen.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abutalib S. A.**, Tallman M. S. (2006). Monoclonal antibodies for the treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol.*, 7: 343-69.

**Azar H. A.** (1997). Rudolf Virchow, not just a pathologist: a re-examination of the report on the typhus epidemic in Upper Silesia. *Ann Diagn Pathol.*, 1: 65-71.

**Azoulay M.**, Florent J. C., Monneret C., Gesson J. P., Jacquesy J. C., Tillequin F., Koch M., Bosslet K., Czech J., Hoffman D. (1995). Prodrugs of anthracycline antibiotics suited for tumor-specific activation. *Anticancer Drug Des.*, 10: 441-50.

**Bagshawe K. D.** (1987). Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept. *Br J Cancer*, 56: 531-2.

**Bagshawe K. D.**, Springer C. J., Searle F., Antoniow P., Sharma S. K., Melton R. G., Sherwood R. F. (1988). A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br J Cancer*, 58: 700-3.

**Bagshawe K. D.**, Sharma S. K. (1996). Cyclosporine delays host immune response to antibody enzyme conjugate in ADEPT. *Transplant Proc.*, 28: 3156-8.

**Bakina E.**, Farquhar D. (1999). Intensely cytotoxic anthracycline prodrugs: galactosides. *Anticancer Drug Des.*, 14: 507-15.

**Baraldi P. G.**, Bovero A., Fruttarolo F., Preti D., Tabrizi M. A., Pavani M. G., Romagnoli R. (2004). DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med Res Rev.*, 24(4):475-528.

**Bastiaannet E.**, Beukema J. C., Hoekstra H. J. (2005). Radiation therapy following lymph node dissection in melanoma patients: treatment, outcome and complications. *Cancer Treat Rev.*, 31: 18-26.

**Baxter L. T.**, Zhu H., Mackensen D. G., Jain R. K. (1994). Physiologically based pharmacokinetic model for specific and nonspecific monoclonal antibodies and fragments in normal tissues and human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.*, 54: 1517-28.



**Boado R. J.** (2005). RNA interference and nonviral targeted gene therapy of experimental brain cancer. *NeuroRx.*, 2: 139-50.

**Boven E.**, Pinedo H. M. (1986). Monoclonal antibodies in cancer treatment: where do we stand after 10 years? *Radiother Oncol.*, 5: 109-17.

**Braga S.**, dal Lago L., Bernard C., Cardoso F., Piccart M. (2006). Use of trastuzumab for the treatment of early stage breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 6: 1153-64.

**Brodeur G. M.** (1987). The involvement of oncogenes and suppressor genes in human neoplasia. *Adv Pediatr.*, 34: 1-44.

**Bruenke J.**, Barbin K., Kunert S., Lang P., Pfeiffer M., Stieglmaier K., Niethammer D., Stockmeyer B., Peipp M., Repp R., Valerius T., Fey G. H. (2005). Effective lysis of lymphoma cells with a stabilised bispecific single-chain Fv antibody against CD19 and FcγRIII (CD16). *Br J Haematol.*, 130: 218-28.

**Cailleau R.**, Young R., Olive M., Reeves W. J. Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.*, 53: 661-74.

**Cantero D.**, Friess H., Deflorin J., *et al.* (1997). Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*, 75: 388-95.

**Chaise C.**, Itti E., Petegnief Y., Wirquin E., Copie-Bergman C., Farcet J. P., Delfau-Larue M. H., Maignan M., Talbot J. N., Molinier-Frenkel V. (2006). [F-18]-Fluoro-2-deoxy-D: -glucose positron emission tomography as a tool for early detection of immunotherapy response in a murine B cell lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother.*, 56: 1163-71.

**Cheson B. D.** (2003). Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood*, 101: 391-8.

**Cheson B. D.** (2005). The role of radioimmunotherapy with yttrium-90 ibritumomab tiuxetan in the treatment of non-Hodgkin lymphoma. *BioDrugs*, 19: 309-22.

**Cheson B. D.** (2006). Radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphomas. *Curr Drug Targets*, 7: 1293-300.

- Chowdhury S.**, Pickering L., Ellis P. (2006). Controversies in the use of adjuvant trastuzumab (Herceptin). *J Br Menopause Soc.*, 12: 172-4.
- Choy G.**, Peter C., Libutti S. K. (2003). Current advances in molecular imaging: noninvasive *in vivo* bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. *Molecular Imaging*, 2: 303 – 12.
- Collins-Burow B**, Santos E. S. (2007). Rituximab and its role as maintenance therapy in non-Hodgkin lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 7: 257-73.
- Coluccia M.**, Natile G. (2007). Trans-platinum complexes in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.*, 7: 111-23.
- Croom K. F.**, Perry C. M. (2003). Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs*, 63: 513-22; discussion 523-4.
- Cvetkovic R. S.**, Perry C. M. (2006). Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs*, 66: 791-820.
- Cyster J. G.** (2005). Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.*, 23: 127-59.
- Eccles S. A.**, Court W. J., Box G. A., Dean C. J., Melton R. G., Springer C. J. (1994). Regression of established breast carcinoma xenografts with antibody-directed enzyme prodrug therapy against c-erbB2 p185. *Cancer Res.*, 54: 5171-7.
- Erlach K. C.**, Podlech J., Rojan A., Reddehase M. J. (2002). Tumor control in a model of bone marrow transplantation and acute liver-infiltrating B-cell lymphoma: an unpredicted novel function of cytomegalovirus. *J Virol.*, 76: 2857-70.
- Fearon D. T.** (1993). The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol.*, 5: 341-8.
- Francis R. J.**, Sharma S. K., Springer C., Green A. J., Hope-Stone L. D., Sena L., Martin J., Adamson K. L., Robbins A., Gumbrell L., O'Malley D., Tsiompanou E., Shahbakhti H., Webley S., Hochhauser D., Hilson A. J., Blakey D., Begent R. H. (2002). A phase I trial of antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) in patients with advanced colorectal carcinoma or other CEA producing tumours. *Br J Cancer*, 87: 600-7.

**Friedberg J. W.**, Fisher R. I. (2004). Iodine-131 tositumomab (Bexxar): radioimmunoconjugate therapy for indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 4: 18-26.

**Ge Y.**, Elghetany M. T. (2003). Urokinase plasminogen activator receptor (CD87): something old, something new. *Lab Hematol.*, 9: 67-71.

**Geissler M.**, Weth R. (2002). Immunotherapy: new insights. *Schweiz Rundsch Med Prax.*, 91: 2236-46.

**Gellrich S.**, Muche J. M., Wilks A., Jasch K. C., Voit C., Fischer T., Audring H., Sterry W. (2005). Systemic eight-cycle anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) therapy in primary cutaneous B-cell lymphomas--an applicational observation. *Br J Dermatol.*, 153: 167-73.

**Giannopoulou I.**, Mylona E., Kapranou A., Mavrommatis J., Markaki S., Zoumbouli Ch., Keramopoulos A., Nakopoulou L. (2007). The prognostic value of the topographic distribution of uPAR expression in invasive breast carcinomas. *Cancer Lett.*, 246: 262-7.

**Gladson C. L.**, Pijuan-Thompson V., Olman M. A., Gillespie G. Y., Yacoub I. Z. (1995). Up-regulation of urokinase and urokinase receptor genes in malignant astrocytoma. *Am J Pathol.*, 146: 1150-60.

**Goulet A. C.**, Goldmacher V. S., Lambert J. M., Baron C., Roy D. C., Kouassi E. (1997). Conjugation of blocked ricin to an anti-CD19 monoclonal antibody increases antibody-induced cell calcium mobilization and CD19 internalization. *Blood*, 90: 2364-75.

**Graham C. H.**, Forsdike J., Fitzgerald C. J., Macdonald-Goodfellow S. (1999). Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer*, 80: 617-23.

**Grondahl-Hansen J.**, Christensen I. J., Briand P., Pappot H., Mouridsen H. T., Blichert-Toft M., Dano K., Brunner N. (1997). Plasminogen activator inhibitor type 1 in cytosolic tumor extracts predicts prognosis in low-risk breast cancer patients. *Clin Cancer Res.*, 3: 233-9.

- Guarneri V.**, Conte P. F. (2004). The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31: 149-61.
- Hadfield J. A.**, Ducki S., Hirst N., McGown A. T. (2003). Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog Cell Cycle Res.*, 5: 309-25.
- Hall P. F.** (1991). Cancer risks after medical radiation. *Med Oncol Tumor Pharmacother.*, 8: 141-5.
- Hande K. R.** (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34: 1514-21.
- Harris A. L.** (2002). Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2: 38-47.
- Hayes D. F.**, Henderson I. C., Shapiro C. L. (1995). Treatment of metastatic breast cancer: present and future prospects. *Semin Oncol.*, 22: 5-19; discussion 19-21.
- Hickey M. M.**, Simon M. C. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Curr Top Dev Biol.*, 76: 217-57.
- Hiraga T.**, Williams P. J., Mundy G. R., Yoneda T. (2001). The bisphosphonate ibandronate promotes apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells in bone metastases. *Cancer Res.*, 61: 4418-24.
- Holst-Hansen C.**, Johannessen B., Hoyer-Hansen G., Romer J., Ellis V., Brunner N. (1996). Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their *in vitro* invasiveness. *Clin Exp Metastasis*, 14: 297-307.
- Hudson P. J.**, Souriau C. (2003). Engineered antibodies. *Nat Med.*, 9: 129-134.
- Huai Q.**, Mazar A. P., Kuo A., Parry G. C., Shaw D. E., Callahan J., Li Y., Yuan C., Bian C., Chen L., Furie B., Furie B. C., Cines D. B., Huang M. (2006). Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science*, 311: 656-9.
- Jain M.**, Venkatraman G., Batra S. K. (2007). Optimization of radioimmunotherapy of solid tumors: biological impediments and their modulation. *Clin Cancer Res.*, 13: 1374-82.

- Jenkins D. E.**, Hornig Y. S., Oei Y., Dusich J., Purchio T. (2005). Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res.*, 7: 444-54.
- Jessani N.**, Humphrey M., McDonald W. H., Niessen S., Masuda K., Gangadharan B., Yates J. R. 3rd, Mueller B. M., Cravatt B. F. (2004). Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101: 13756-61.
- Jung M.** (2001). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) and related approaches for anticancer therapy. *Mini Rev Med Chem.*, 1: 399-407.
- Kang T-W.** (2007). *In vivo*- und *in vitro*-Funktionsanalysen von Bax Inhibitor-1 bei humanen Karzinomzellen. Dissertation
- Kennedy S.**, Duffy M. J., Duggan C., Barnes C., Rafferty R., Kramer M. D. (1998). Semi-quantitation of urokinase plasminogen activator and its receptor in breast carcinomas by immunocytochemistry. *Br J Cancer*, 77: 1638-41.
- Kim K. J.**, Kanellopoulos-Langevin C., Merwin R. M., Sachs D. H., and Asofsky R. (1979). Establishment and characterization of Balb/c lymphoma lines with B cell properties. *J. Immunol.*, 122: 549-54.
- Klotz L.** (2000). Hormone therapy for patients with prostate carcinoma. *Cancer*, 88: 3009-14.
- Koeffler H. P.**, McCormick F., Denny C. (1991). Molecular mechanisms of cancer. *West J Med. Nov.*, 155: 505-14.
- Kraul M. A.**, Lowe H. (1957). Estimation of growth process of solid mouse tumors by determination of weight. *Z Krebsforsch.*, 61: 662-5.
- Krauss W. C.**, Park J. W., Kirpotin D. B., Hong K., Benz C. C. (2000). Emerging antibody-based HER2 (ErbB-2/neu) therapeutics. *Breast Dis.*, 11: 113-24.
- Krop I.**, de Fougères A. R., Hardy R. R., Allison M., Schlissel M. S., Fearon D. T. (1996a). Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *Eur J Immunol.*, 26: 238-42.

**Krop I.**, Shaffer A. L., Fearon D. T., Schlissel M. S. (1996b). The signaling activity of murine CD19 is regulated during cell development. *J Immunol.*, 157: 48-56.

**Kula Z.**, Szefer J., Zuchora Z., Romanowicz G., Pietrzak T. (2004). Evaluation of positron emission tomography by using F-18-fluorodeoxyglucose in diagnosis of recurrent colorectal cancer. *Pol Merkur Lekarski*, 17: 63-6.

**Lacroix M.**, Leclercq G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.*, 83: 249-89.

**Lehman T. A.**, Reddel R., Peifer A. M., Spillare E., Kaighn M. E., Weston A., Gerwin B. I., Harris C. C. (1991) Oncogenes and tumor-suppressor genes. *Environ Health Perspect.*, 93: 133-4.

**Levitsky H. I.**, Montgomery J., Ahmadzadeh M., Staveley-O'Carroll K., Guarnieri F., Longo D. L., Kwak L. W. (1996). Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotypic-specific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. *J Immunol.*, 156: 3858-65.

**Li L. H.**, Swenson D. H., Schpok S. L., Kuentzel S. L., Dayton B. D., Krueger W. C. (1982). CC-1065 (NSC 298223), a novel antitumor agent that interacts strongly with double-stranded DNA. *Cancer Res.*, 42: 999-1004.

**Li Y.**, Wood N., Yellowlees D., Donnelly P. K. (1999). Cell surface expression of urokinase receptor in normal mammary epithelial cells and breast cancer cell lines. *Anticancer Res.*, 19: 1223-8.

**Litzlbauer H. D.**, Neuhaeuser C., Moell A., Greschus S., Breithecker A., Franke F. E., Kummer W., Rau W. S. (2006). Three-dimensional imaging and morphometric analysis of alveolar tissue from microfocal X-ray-computed tomography. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 291: 535-45.

**Ma G.**, Gallant P., McIntosh L., (2007). Sensitivity characterisation of a time-domain fluorescence imager: eXplore Optix. *Appl Opt.*, 46: 1650-7.

**Ma Z.**, Webb D. J., Jo M., Gonias S. L. (2001). Endogenously produced urokinase-type plasminogen activator is a major determinant of the basal level of activated ERK/MAP kinase and prevents apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *J Cell Sci.*, 114:

3387-96.

**Mareel M.**, Leroy A. (2003). Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev.*, 83: 337-76.

**Martinelli G.**, Soverini S., Rosti G., Cilloni D., Baccarani M. (2005). New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 90: 534-41.

**Meyer D. L.**, Jungheim L. N., Law K. L., Mikolajczyk S. D., Shepherd T. A., Mackensen D. G., Briggs S. L., Starling J. J. (1993). Site-specific prodrug activation by antibody-beta-lactamase conjugates: regression and long-term growth inhibition of human colon carcinoma xenograft models. *Cancer Res.*, 53: 3956-63.

**Mißbach-Güntner J.** (2007). Neue Funktionen von Discoidin-Domain-Rezeptoren in der Tumorprogression und in der Organentwicklung bei Mäusen. Dissertation.

**Mitchell P.**, Lee F. T., Hall C., Rigopoulos A., Smyth F. E., Hekman A. M., van Schijndel G. M., Powles R., Brechbiel M. W., Scott A. M. (2003). Targeting primary human Ph(+) B-cell precursor leukemia-engrafted SCID mice using radiolabeled anti-CD19 monoclonal antibodies. *J Nucl Med.*, 44: 1105-12.

**Moller J. V.**, le Maire M. (1993). Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *J Biol Chem.*, 268: 18659-72.

**Mouridsen H. T.**, Rose C., Brodie A. H., Smith I. E. (2003). Challenges in the endocrine management of breast cancer. *Breast*, 12: 2-19.

**Nguyen D. H.**, Catling A. D., Webb D. J., Sankovic M., Walker L. A., Somlyo A. V., Weber M. J., Gonias S. L. (1999). Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol.*, 146: 149-64.

**Noble R. L.** (1990). The discovery of the vinca alkaloids-chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem Cell Biol.*, 68: 1344-51.

**Otero D. C.**, Anzelon A. N., Rickert R. C. (1996). CD19 function in early and late B cell development: I. Maintenance of follicular and marginal zone B cells requires CD19-dependent survival signals. *Eur J Immunol.*, 26: 238-42.

**Pardo L. A.**, Contreras-Jurado C., Zientkowska M., Alves F., Stühmer W. (2005). Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J. Membrane Biol.*, 205: 115–124.

**Pardoll D. M.** (2002). Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol.*, 2: 227-38.

**Passineau M. J.**, Siegal G. P., Everts M., Pereboev A., Jhala D., Wang M., Zhu Z. B., Park S. K., Curiel D. T., Nelson G. M. (2005). The natural history of a novel, systemic, disseminated model of syngeneic mouse B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 46: 1627-38.

**Pasteur L.**, Chamberland, Roux. (2002) Summary report of the experiments conducted at Pouilly-le-Fort, near Melun, on the anthrax vaccination, 1881. *Yale J Biol Med.*, 75: 59-62.

**Paulus M. J.**, Gleason S. S., Easterly M. E., Foltz C. J. (2001). A review of high-resolution X-ray computed tomography and other imaging modalities for small animal research. *Lab Anim (NY)*., 30: 36-45.

**Pedley R. B.**, Sharma S. K., Boxer G. M., Boden R., Stribbling S. M., Davies L., Springer C. J., Begent R. H. J. (1999). Enhancement of antibody-directed enzyme prodrug therapy in colorectal xenografts by an antivascular agent. *Cancer Res.*, 15;59: 3998-4003.

**Pervez S.**, Paganelli G., Epenetos A. A., Mooi W. J., Evans D. J., Krausz T. (1988). Localization of biotinylated monoclonal antibody in nude mice bearing subcutaneous and intraperitoneal human tumour xenografts. *Int J Cancer Suppl.*, 3: 30-3.

**Peters G. J.**, Schornagel J. H., Milano G. A. (1993). Clinical pharmacokinetics of anti-metabolites. *Cancer Surv.*, 17: 123-56.

**Philpott G. W.**, Bower R. J., Parker C. W. (1973). Selective cytotoxicity in a hapten substituted cell culture model system. *J Immunol.*, 111: 930-7.

**Pohlman B.**, Sweetenham J., Macklis R. M. (2006). Review of clinical radioimmunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther.*, 6: 445-61.

**Pommier Y.** (2006). Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*, 6: 789-802.



**Rankin E. M.**, Hekman A., Hardeman M. R., Hoefnagel C. A. (1984). Dynamic studies of lymphocytes labelled with indium-111 during and after treatment with monoclonal anti-idiotypic antibody in advanced B cell lymphoma. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 289: 1097-100.

**Rapp F.** (1989). The Friend legacy: from mouse to man. *Ann N Y Acad Sci*, 567: 349-53.

**Rothe G.**, Schmitz G. (1996). Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working group on flow cytometry and image analysis. *Leukemia*, 10: 877-95.

**Sambrook J.**, Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular manual* (2nd edition). Cold Spring Harbour, New York, USA.

**Sapra P.**, Allen T. M. (2002). Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res.*, 62: 7190-4.

**Sapra P.**, Allen T. M. (2004). Improved outcome when B-cell lymphoma is treated with combinations of immunoliposomal anticancer drugs targeted to both the CD19 and CD20 epitopes. *Clin Cancer Res.*, 10: 2530-7.

**Schneeweiss U.** (1983). The doctrine of immunity in the light of Robert Koch's concepts. *Z Erkr Atmungsorgane*, 161: 46-50.

**Senter P. D.**, Saulnier M. G., Schreiber G. J., Hirschberg D. L., Brown J. P., Hellstrom I., *et al.* (1988). Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate. *Proc Nat Acad Sci USA.*, 85: 4842-6.

**Senter P. D.**, Schreiber G. J., Hirschberg D. L., Ashe S. A. Hellstrom K. E., Hellstrom I. (1989). Enhancement of the *in vitro* and *in vivo* antitumor activities of phosphorylated mitomycin C and etoposide derivatives by monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugates. *Cancer Res.*, 49: 5789-92

**Sharma S. K.**, Bagshawe K. D., Springer C. J., Burke P. J., Rogers G. T., Boden J. A., Antoniow P., Melton R. G., Sherwood R. F. (1991). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a three phase system. *Dis Markers*, 9: 225-31.

**Sharma S. K.**, Bagshawe K. D., Melton R. G., Sherwood R. F. (1992). Human immune response to monoclonal antibody-enzyme conjugates in ADEPT pilot clinical trial. *Cell Biophys.*, 21: 109-20.

**Sinkule J. A.** (1984). Etoposide: a semisynthetic epipodophyllotoxin. Chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, adverse effects and use as an antineoplastic agent. *Pharmacotherapy*, 4: 61-73.

**Springer C. J.**, Antoniow P., Bagshawe K. D., Searle F., Bisset G. M., Jarman M. (1990). Novel prodrugs which are activated to cytotoxic alkylating agents by carboxypeptidase G2. *J Med Chem.*, 33: 677-81.

**Stanbridge E. J.** (1989). The evidence for human tumor suppressor genes. *Princess Takamatsu Symp.*, 20: 3-13.

**Stühmer W.**, Alves F., Hartung F., Zientkowska M., Pardo L. A. (2006). Potassium channels as tumour markers. *FEBS Letters*, 580: 2850–2.

**Swenson D. H.**, Li L. H., Hurley L. H., Rokem J. S., Petzold G. L., Dayton B. D., Wallace T. L., Lin A. H., Krueger W. C. (1982). Mechanism of interaction of CC-1065 (NSC 298223) with DNA. *Cancer Res.*, 42: 2821-8.

**Syrigos K. N.**, Epenetos A. A. (1999). Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review of the experimental and clinical considerations. *Anticancer Res.*, 19: 605-13.

**Talanov V. S.**, Regino C. A., Kobayashi H., Bernardo M., Choyke P. L., Brechbiel M. W. (2006). Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Nano Lett.*, 6: 1459-63.

**Tietze L. F.**, Herzig T., Fecher A., Haurert F., Schuberth I. (2001). Highly selective glycosylated prodrugs of cytostatic CC-1065 analogues for antibody-directed enzyme tumor therapy. *Chembiochem.*, 2: 758-65.

**Tietze L. F.**, Feuerstein T., Fecher A., Haurert F., Panknin O., Borchels U., Schuberth I., Alves F. (2002). Proof of principle in the selective treatment of cancer by antibody directed enzyme prodrug therapy. The development of a highly potent prodrug. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.*, 41: 759-61.

**Tietze L. F.** and Feuerstein T. (2003). Highly selective compounds for the antibody-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Aust. J. Chem.*, 56: 841-54.

**Tietze L. F.**, Major F., Schuberth I. (2006). Antitumor agents: development of highly potent glycosidic duocarmycin analogues for selective cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45: 6574 –7.

**Tietze L. F.**, Major F., Schuberth I., Spiegl D. A., Krewer B., Maksimenka K., Bringmann G., Magull J. (2007). Selective treatment of cancer: synthesis, biological evaluation and structural elucidation of novel analogues of the antibiotic CC-1065 and the duocarmycins. *Chem. Eur. J.* online angenommen.

**Troy T.**, Jekic-McMullen D., Sambucetti L., Rice B. (2004). Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging*, 3: 9-23.

**Tung C. H.**, Zeng Q., Shah K., Kim D. E., Schellingerhout D., Weissleder R. (2004). *In vivo* imaging of beta-galactosidase activity using far red fluorescent switch. *Cancer Res.*, 64: 1579-83.

**Uchida J.**, Lee Y., Hasegawa M., Liang Y., Bradney A., Oliver J. A., Bowen K., Steeber D. A., Haas K. M., Poe J. C., Tedder T. F. (2004). Mouse CD20 expression and function. *Int Immunol.*, 16: 119-29.

**Uckun F. M.**, Jaszcz W., Ambrus J. L., Fauci A. S., Gajl-Peczalska K., Song C. W., Wick M. R., Myers D. E., Waddick K., Ledbetter J. A. (1988). Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood*, 71: 13-29.

**Vaupel P.**, Briest S., Hockel M. (2002). Hypoxia in breast cancer: pathogenesis, characterization and biological/therapeutic implications. *Wien Med Wochenschr.*, 152: 334-42.

**Willis NJ.** (1997). Edward Jenner and the eradication of smallpox. *Scott Med J.*, 42: 118-21.

**Weber S. M.**, Peterson K. A., Durkee B., Qi C., Longino M., Warner T., Lee F. T. Jr., Weichert J. P. (2004). Imaging of murine liver tumor using microCT with a hepatocyte-

selective contrast agent: accuracy is dependent on adequate contrast enhancement. *J Surg Res.*, 119: 41-5.

**Wehrman T. S.**, von Degenfeld G., Krutzik P. O., Nolan G. P., Blau H. M. (2006). Luminescent imaging of beta-galactosidase activity in living subjects using sequential reporter-enzyme luminescence. *Nat Methods*, 3: 295-301.

**Wetterwald A.**, van der Pluijm G., Que I., Sijmons B., Buijs J., Karperien M., Lowik C. W., Gautschi E., Thalmann G. N., Cecchini M. G. (2002). Optical imaging of cancer metastasis to bone marrow: a mouse model of minimal residual disease. *Am J Pathol.*, 160: 1143-53.

**Winnard P. Jr.**, Raman V. (2003). Real time non-invasive imaging of receptor-ligand interactions *in vivo*. *J Cell Biochem.*, 90: 454-63.

**Xu G.**, McLeod H. L. (2001). Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin Cancer Res.*, 7: 3314-24.

**Yamamoto M.**, Sawaya R., Mohanam S. *et al.* (1994). Expression and localization of urokinase-type plasminogen activator receptor in human gliomas. *Cancer Res.*, 54: 5016-20.

**Yang M.**, Baranov E., Jiang P., Sun F. X., Li X. M., Li L., Hasegawa S., Bouvet M., Al-Tuwajiri M., Chishima T., Shimada H., Moossa A. R., Penman S., Hoffman R. M. (2000). Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97: 1206-11.

**Yuan F.**, Baxter L.T., Jain R.K. (1991). Pharmacokinetic analysis of two-step approaches using bifunctional and enzyme-conjugated antibodies. *Cancer Res.*, 51: 3119-30.

**Zelenetz A. D.**, Hamlin P., Kewalramani T., Yahalom J., Nimer S., Moskowitz C. H. (2003). Ifosfamide, carboplatin, etoposide (ICE)-based second-line chemotherapy for the management of relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.*, 14: 5-10.

**Zhang J.**, Tian Q., Yung Chan S., Chuen Li S., Zhou S., Duan W., Zhu Y. Z. (2005). Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications. *Drug Metab Rev.*, 37: 611-703.

---

**Zhao J.**, Kim J. E., Reed E., Li Q. Q. (2005). Molecular mechanism of antitumor activity of taxanes in lung cancer (Review). *Int J Oncol.*, 27: 247-56.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

**Name:** Marta Paulina Zientkowska  
**Geburtsdatum:** 14.01.1980  
**Geburtsort:** Bydgoszcz, Polen  
**Nationalität:** Polnisch

### Bildungsweg

**1986-1994** Besuch der Grundschule Nr.1 Stanislaw Staszic in Piła / Polen  
**1994-1998** Besuch des Lyzeums Marie Sklodowska - Curie in Piła / Polen  
**1998-2003** Biologiestudium an der Nicolaus-Copernicus-Universität in Thorn / Polen  
Spezialisierung: Molekularbiologie – Humangenetik  
**2000** Absolvierung der Baltic Sea University  
**2001-2002** Diplomarbeit an der Universität Paris 7, Institute Jacques Monod  
„Biochemie von Chromatin“  
**2003** Abschluss des Studiums mit *Master of Science*, äquivalent Diplom  
**2003-2004** Experimentelle Arbeiten am Institut für Humangenetik der Georg-August-Universität in Göttingen  
**2004–2007** Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität in Göttingen und der Abteilung Hämatologie & Onkologie des Universitätsklinikums  
**2007** Wissenschaftliches Stipendium des Max Planck Instituts für Experimentelle Medizin in Göttingen

## 8 Veröffentlichungen

**Zientkowska M.**, Kimmina S., Dullin C., Missbach-Güntner J., Krell H.W., Stühmer W., Tietze L.F., Alves F. "In-vivo binding of Cy5.5 labeled uPAR antibody to orthotopic breast tumors using near-infrared optical imaging." (in preparation)

**Zientkowska M.**, Kimmina S., Dullin C., Missbach-Güntner J., Krell H.W., Tietze L.F., Alves F. "Detection of bone metastases by near-infrared optical imaging cross validated with flat panel-volume computed tomography." (in preparation)

Dullin C., **Zientkowska M.**, Missbach-Guntner J., Krell H.W., Tietze L.F., Grabbe E., Alves F. "Semi-automatically landmark based image fusion: an approach to correlate NIR fluorescence and fpVCT datasets in mouse models." (in preparation)

Pardo L. A., Contreras-Jurado C., **Zientkowska M.**, Alves F., Stühmer W. (2005). Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol.*, 205(3):115-24. Review.

Stühmer W., Alves F., Hartung F., **Zientkowska M.**, Pardo L. A. (2006). Potassium channels as tumour markers. *FEBS Lett.*, 580: 2850-2. Review.

Missbach-Güntner J., Dullin C., **Zientkowska M.**, Dohmeyer-Missbach, M., Obenauer S., Kauer F., Stühmer W., Grabbe E., Vogel, W.F. Alves F. "Flat-Panel Detector Volume Computed Tomography: a novel 3D imaging technique to monitor osteolytic bone lesions in a mouse metastatic tumor model." (in preparation)

Schroeter M. R., Sudholt P., Leifheit M., Dellas C., Rohm I., Heida N. M., Alves F., **Zientkowska M.**, Rafail S., Puls M., Hasenfuss G., Konstantinides S., Schäfer K.. "Leptin enhances recruitment of endothelial progenitor cells into vascular lesions by promoting integrin-mediated adhesion and transmigration." (under review)

Missbach-Güntner J., Dullin C., Kimmina S., **Zientkowska M.**, Domeyer-Missbach M., Grabbe E., Stühmer W., Alves F. "Morphological changes of mammary carcinomas in mice over time monitored by Flat-Panel Detector Volume Computed Tomography." (in preparation)

Elsner L., Muppala V., Gehrman M., Lozano J., Malzahn D., Bickeböller H., Brunner E., **Zientkowska M.**, Herrmann T., Walter L., Alves F., Multhoff G., and Dressel R. "The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors which express inducible NKG2D ligands" (under review - *Journal of Immunology*)

## 9 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. I. Feußner dafür danken, dass er die vorliegende Dissertation an der biologischen Fakultät vertritt und die Korrektur übernimmt.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. L. F. Tietze bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten, für das interessante Thema, hilfreiche Diskussionen mit ihm, die stets anregend und motivierend waren und für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Frauke Alves für die freundschaftliche Unterstützung, Anregung und Förderung während meiner Doktorarbeit und für die gründliche Durchsicht des Manuskriptes. Für die Möglichkeiten der Reisen zu Vorträgen möchte ich ihr ebenso danken.

Meinen Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe Rosi Streich, Hanna Widera, Sarah Greco, Christian Dullin, Katharina Janasch, Jeaninne Missbach-Güntner, Melanie Dohmeyer-Missbach und Joanna Napp möchte ich für die außerordentliche Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre, die ich sehr geschätzt habe, danken.

Ingrid Schuberth, Birgit Krewer, Felix Major und den Mitarbeitern der Abteilung Organische und Biomolekulare Chemie möchte ich für die Synthese des verwendeten Prodrugs, die intensive Einführung in die Tiefen der organischen Chemie, incl. mehrerer „Arbeitsausflüge“ und die gute Freundschaft danken.

Herrn Prof. Dr. W. Stühmer und Herrn Dr. L. Pardo danke ich für die Möglichkeit der äußerst interessanten Zusammenarbeit.

Bastian, Birgit, Katharina, Christian und Melanie danke ich für die Durchsicht und Korrektur der Manuskripte.

Bei Milena und Henk möchte ich mich für ihre wunderbare Freundschaft bedanken.

Sarah und Marc Kimmina möchte ich aus ganzem Herzen für die Unterstützung während der gesamten göttinger Zeit und ihre Freundschaft danken.



Einen besonderen Dank an Tae-Won, für Wärme und Liebe jeden Tag, aber auch für die kritischen Ratschläge, die mir geholfen haben, durch die Promotionszeit zu gehen und von dem ich so viel gelernt habe.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Jolanta und Marek. Für ihre Liebe, die Geborgenheit die sie mir geben und die Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Träume und Ziele danke ich.