

Aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin

der Universität zu Lübeck

Direktor Prof. Dr. Jörg Barkhausen

**Radioaktiv markierter Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-  
Antikörper Cetuximab in der multimodalen Krebstherapie: Stabilität  
und synergistische Effekte mit der Strahlentherapie**

Inauguraldissertation

Zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Christian Wolff

aus St.Wendel

Lübeck 2009

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Birgit Meller

2. Berichtstatter: Priv.-Doz Dr. med. Birgit Kahle

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>10</b>
1.1 Maligne Tumore	10
1.2 Klassische Therapieformen	11
1.2.1 chirurgische Therapie	11
1.2.2 Strahlentherapie	11
1.2.3 Chemotherapie	13
1.3 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern	15
1.3.1 Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR)	17
1.3.2 Cetuximab	19
1.4 Radioaktiv markierte EGFR-affine Substanzen	20
1.5 Ziel dieser Arbeit	22
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Material und Methoden	23
2.1.1 Zellkulturen	23
2.1.2 Antikörper	24
2.2 Experimente	26
2.2.1 Bestimmung des <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake	28
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	30
2.2.3 Spezifität und Reversibilität der Cetuximab-Bindung	30
2.2.4 Spezifische Aktivität von <sup>131</sup> I-Cetuximab	30
2.2.5 Externe Bestrahlung	31
2.3 Berechnungen und Statistik	32
2.3.1 Standardkurve	32
2.3.2 Rechnung	32
2.3.3 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch <sup>131</sup> I-markiertes Cetuximab	33
2.3.4 Statistische Auswertung	33
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1 Radiochemische Reinheit und Stabilität des radioaktiv markierten Antikörpers	34
3.1.1 Qualitätskontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC)	34
3.1.2 Qualitätskontrolle mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)	35

3.2 Zellwachstum	36
3.2.1 Auswirkung hoher Antikörperkonzentrationen auf die Proliferation	37
3.2.2 Das Zellwachstum bei Variation der Antikörper-Menge	38
3.2.3 Die Zellzahl bei externer Bestrahlung	39
3.3 Standardkurve als Basis der Uptake-Experimente	40
3.4 <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake	41
3.3.1 <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake bei Verdrängung des heißen durch kalten Antikörper	42
3.3.2 <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake bei Variation der Konzentration an kaltem Antikörper	43
3.3.3 Der <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake bei externer Bestrahlung	44
<b>4. Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1 Zellkulturen	47
4.2 Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR)-vermittelte Therapie	48
4.3 EGFR-vermittelte Bestrahlungsresistenzen	52
4.4 Multimodale Therapie	53
4.5 Radioaktiv markierter Antikörper	55
4.6 EGFR-gerichtete Therapie beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC)	57
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>59</b>
<b>6. Literaturverzeichniss</b>	<b>60</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>71</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>72</b>
<b>9. Puplication</b>	<b>73</b>
<b>10. Annex</b>	<b>74</b>
Radioiodiertes Cetuximab plus Ganzhirnbestrahlung bei Hirnmetastasen eines nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom	74

## Abkürzungsverzeichnis

A(0)	Aktivität zum Zeitpunkt Null
A(t)	Aktivität zum Messzeitpunkt
A-431	Zellkulturen
Abb	Abbildung
ABX-EGF	Panitumumab
avg.	Anfang
BMS	Bristol-Myers Squibb
C	Kohlenstoff
C225	ältere Bezeichnung für Cetuximab
ca.	circa
CDR	Complementarity Determining Region
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	Zerfälle pro Minute
CTS	counts per second
DC	Dünnschichtchromatographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid
DTPA	diethylenetriaminepentaacetic acid
E <sub>avg</sub>	anfangs Energie
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
E <sub>max</sub>	maximale Energie
EMD 72000	ein Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-Antikörper
erB2	Estrogen-Rezeptor-Beta-2
et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
Exp.	Experiment
exp	Exponent
F	Flour
FBS	fötales bovines Serum

FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor #
g	Gramm
G <sub>0</sub>	Ruhender Zellpool
G <sub>1</sub>	Präsynthetische Phase
G <sub>2</sub>	Postsynthetische Phase
GBq	Giga-Becquerel
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gy	Gray
H	Wasserstoff
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
hEGF	human Epidermal-Growth-Factor
HER1	human Epidermal-Growth-Factor-Receptor 1
HER2	human Epidermal-Growth-Factor-Receptor 2
HER3	human Epidermal-Growth-Factor-Receptor 3
HER4	human Epidermal-Growth-Factor-Receptor 4
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
hR3	ein Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-Antikörper
I	Iod
I <sup>+</sup>	Iodonium-Ion
I <sup>-</sup>	Iodid
ICR62	ein Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-Antikörper
IgG	Immunglobulin G
IMC-C225	ältere Bezeichnung für Cetuximab
In	Indium
IPQA	(E)-But-2-enedioic acid [4-(3- <sup>124</sup> Iodoanilino)-quinazolin-6-yl]-amide-(3-morpholin-4-yl-propyl)-amide
ITLC	Instant-Thin-Layer-Chromatographie
i.v.	Intravenös
J	Joule
JIMT	Zellkulturen
kD	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien

konst.	konstant
konz.	Konzentration
l	Liter
ln2	Logarithmus zur Basis 2
M	Mitosephase
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mAk	monoklonaler Antikörper
mAk-I	<sup>131</sup> I-Cetuximab
MB49	Zellkulturen
Med	Medium
MEM	Modified Eagle Medium
MeV	Mega-Elektronenvolt
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
mol	Mol
mRNA	Messenger-Ribonikleinsäure
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
n	Anzahl
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid
NaI	Natrium-Iodid
Nm	Nanometer
NSCLC	nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
O	Sauerstoff
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphate buffered saline
PEG	poly(Etholene Glycol)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration einer wässrigen Lösung

p.i.	post injektionem
R	Rest
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RC	radiochemische Reinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	DNS-Synthesephase
s.	siehe
sec.	Sekunde
s.o.	siehe oben
SPET	Single-Photon-Emission-Tomographie
T	Zeit
t	Messzeitpunkt
t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TBq	Terra-Becquerel
Tc	Technetium
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
T-Zellen	T-Lymphozyten
UV	Ultraviolett
VIS	visible
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
<sup>18</sup> F	Flourisotop
<sup>64</sup> Cu	Kupferisotop
<sup>68</sup> Ga	Galliumisotop
<sup>99m</sup> Tc	Technetiumisotop
<sup>111</sup> In	Indiumisotop
<sup>123</sup> I	Iodisotop
<sup>131</sup> I	Iodisotop
*I-mAb	<sup>131</sup> I-Cetuximab
*I-Erbi	<sup>131</sup> I-Cetuximab
°	Grad
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm

$\mu\text{l}$	Mikroliter
%	Prozent
=	ist gleich
>	größer als
<	kleiner als

# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Tumore

Ein Tumor ist eine aus körpereigenen entdifferenzierten Zellen bestehende abnorme Gewebemasse. Tumorerkrankungen stehen als Todesursache an zweiter Stelle hinter den Herz- und Kreislauferkrankungen. Weltweit sterben 25 % aller Menschen an Krebs. In Deutschland erkranken jährlich mehr als 300 000 Patienten an einer Tumorerkrankung. Malignome treten vor allem im höheren Lebensalter auf. Die Transformation von einer gesunden Zelle zu einer Tumorzelle geht mit einer Störung im Regulationsmechanismus von Proliferation, Differenzierung und Apoptose einher. Es wird davon ausgegangen, dass in verschiedenen Genen ein Defekt vorliegen muss, bis es zur Entartung von Zellen kommt.

Eine wichtige Rolle spielt dabei das Ungleichgewicht zwischen den Onkogenen und ihren Gegenspielern, den Tumorsuppressorgenen. Onkogene kommen auch in normalen Zellen vor. Ihre Genprodukte regulieren die Proliferation, die Mobilität und die Differenzierung von Zellen. Mutationen in den Onkogenen führen zu der Produktion von Onkoproteinen. Hieraus resultiert eine gestörte Regulation der Onkoproteine, was eine gesteigerte Funktion nach sich ziehen kann, die als „gain of function“ bezeichnet wird. Wichtige Onkoproteine sind dabei Wachstumsfaktoren wie z. B. der Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF. Beim Vorhandensein passender Rezeptoren können diese Wachstumsfaktoren zu einer autokrinen Stimulation des Zellwachstums führen. Weitere Onkoproteine sind die Wachstumsfaktor-Rezeptoren. Hierzu zählen der erB2-Rezeptor und der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor EGFR. Eine EGFR-Überexpression oder die Expression mutierter, dauernd aktiver Wachstumsfaktor-Rezeptoren ist in vielen Karzinomen nachzuweisen. Zusätzlich sind in neoplastischen Zellen die Tumorsuppressorgene und ihre Genprodukte, die die Proliferation hemmen, gestört. Ein Verlust dieser Gene, ihre Fehlregulation oder Defekte in den Genprodukten können zusätzlich zu Tumorwachstum führen. Man spricht hier von einem „loss of function“.

Ein wichtiges Tumorsuppressorgen ist das Gen p53. Es ist für die Einleitung des programmierten Zelltodes verantwortlich. Der Funktionsverlust von p53 führt dazu, dass bei geschädigten Zellen keine Apoptose eingeleitet wird. Man vermutet, dass über diesen Mechanismus – im ungünstigsten Fall – aus einer einzigen veränderten Zelle Karzinome entstehen. Das ungehemmte Wachstum dieser Zelle und deren Zellklone führt zur Verdrängung von gesundem Gewebe. Die Tumorentstehung kann

sich über viele Jahre hinziehen (Böcker und Kleihues, 2004).

Während jahrzehntelang Tumorerkrankungen klassisch mit operativen Verfahren und Chemotherapie behandelt wurden, zeichnen sich heute neue Methoden ab, die auf bereits beschriebenen genetischen Veränderungen in maligne transformiertem Gewebe basieren. In den folgenden Abschnitten werden verschiedenen Möglichkeiten der Malignom-Therapie beschrieben.

## **1.2 Klassische Therapieformen**

Die klassische Tumorthherapie von operablen Tumormanifestation erfolgt durch eine primär chirurgische Verringerung der Tumormasse, mit anschließender lokoregionärer Nachbestrahlung und ggf. einer systemischen Chemotherapie. Abhängig von der Tumorentität sowie dem Staging kann die Variation der zeitlichen Abfolge sinnvoll sein.

In der Krebstherapie unterscheidet man kurative von palliativen Ansätzen. Bei kurativen Therapieansätzen wird versucht, den Patienten von seinem Tumorleiden zu heilen. Die Heilung erfolgt im Regelfall durch chirurgische oder strahlentherapeutische Maßnahmen ggf. in Kombination mit einer systemischen Chemotherapie. Je nach Tumorentität und dem Staging können auch alle drei Verfahren zum Einsatz kommen. Palliative Therapieansätze haben das Ziel, die Lebensqualität zu verbessern und Schmerzen zu lindern. Die Lebensverlängerung steht dabei nicht im Vordergrund. Gerade palliativ behandelte Patienten könnten von neuen, potentiell kurativen Behandlungsmöglichkeiten in der Krebstherapie profitieren. Dies sind wichtige Gründe neue Therapieansätze zu verfolgen und weiterzuentwickeln.

### **1.2.1 chirurgische Therapie**

Auf die chirurgische Therapie von Tumoren wird nicht näher eingegangen, da sie nicht Bestandteil dieser Arbeit ist.

### **1.2.2 Strahlentherapie**

Im Rahmen der Strahlentherapie wird eine Tumormanifestation einer Behandlung mit ionisierender Strahlung unterzogen. Hierdurch werden in den Zellen im Bestrahlungsfeld DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche erzeugt. Neoplastische

Zellen im Zielvolumen – deren Reparaturmechanismen weniger effektiv sind als im Normalgewebe – werden hierdurch vermehrt in den Zelltod getrieben. Abhängig von der Tumorentität kommt es zum reproduktiven oder Interphase-Zelltod.

Zumeist erfolgt die Bestrahlung maligner Tumoren mit Hilfe von Photonenstrahlung mit einer Energie von bis zu 30 MeV. Diese wird in einem Linearbeschleuniger erzeugt (Schulz-Ertner und Kager, 2004). Die perkutane Strahlentherapie mit Photonenstrahlen hat zu den großen Erfolgen der Tumorthherapie der letzten Jahrzehnte beigetragen. Allerdings birgt sie ein nennenswertes Risiko für Zweittumore in dem mitbestrahlten gesunden Gewebe.

Im Gegensatz zur perkutanen Strahlentherapie erfolgt bei der sogenannten Brachytherapie die Applikation der Strahlendosis mittels eines umschlossenen Radionuklids. Dieses wird so nah wie möglich am Tumor positioniert. Die Strahlung der eingesetzten Radionuklide weist – basierend auf der Energie der emittierten Strahlung – meist einen starken Dosisabfall im Gewebe auf. Durch unterschiedliche geometrische Anordnung lässt sich so eine hohe Strahlendosis im Zielvolumen erreichen und gleichzeitig lassen sich benachbarte Strukturen schonen (Schulz-Ertner und Kager, 2004). Ein Nachteil der Brachytherapie gegenüber der Photonenstrahlung besteht darin, dass die Strahlenquellen invasiv in das Zielgebiet eingebracht werden müssen. Dies ist zumeist mit chirurgischen Maßnahmen verbunden. Zum anderen gibt es auch technische Besonderheiten im Bezug auf die Lagerung und die Entsorgung der Radionuklide.

Wie bereits oben beschrieben, kommt es unabhängig von der Bestrahlungsmodalität zu Zellschäden, auch im gesunden Gewebe. Das Ausmaß dieser Schäden hängt von der Strahlendosis ab. Hierbei wird zwischen der direkten und der indirekten Strahlenwirkung unterschieden. Bei den direkten Effekten werden, ausgelöst durch Anregung und Ionisation, aus biologischen Makromolekülen Radikale dieser Verbindung gebildet. Dabei kann es zu Veränderungen ihrer Struktur kommen, beispielsweise durch Aufbrechen ihrer Wasserstoffbrückenbindungen. Die wichtigste direkte Strahlenwirkung ist dabei die DNS-assozierte. Zusätzlich entsteht durch Ionisation und Anregung von Wassermolekülen die indirekte Strahlenwirkung welche zur Bildung hoch reaktiver freier Radikale führt. Diese Radikale beeinflussen ihrerseits die DNS und andere Makromoleküle. Durch direkte und indirekte Strahleneffekte kommt es in der DNS zu Veränderung der Basen. Modifikationen an den Zucker- und Phosphorverbindungen der DNS können zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen. Einzelstrangbrüche spielen im Allgemeinen keine

große Rolle, da sie schnell repariert werden. Doppelstrangbrüche können nur in einer geringen Anzahl repariert werden. Irreparable Doppelstrangbrüche führen zu dem Verlust der Replikationsfähigkeit einer Zelle und zur Apoptose dieser Zelle. Das Überleben subletaler Zellschäden ist möglich. Dies kann zu mutativen Veränderungen der genetischen Information führen. Eine Folge solcher Veränderungen können genetische Schäden und Malignomen sein (Meller und Meller, 2007). Vor allem im umliegenden Gewebe von bestrahlten Tumoren ist das Risiko für Zweitkarzinome erhöht. Diese können bei primär geheilten Patienten auch noch Jahrzehnte später auftreten. Aus diesem Grund sollte man bei der Entwicklung neuer strahlentherapeutischer Therapiekonzepte auch darauf bedacht sein, die Bestrahlungsdosis im gesunden Gewebe zu verringern, um dadurch das Risiko für Zweitmalignome zu vermindern.

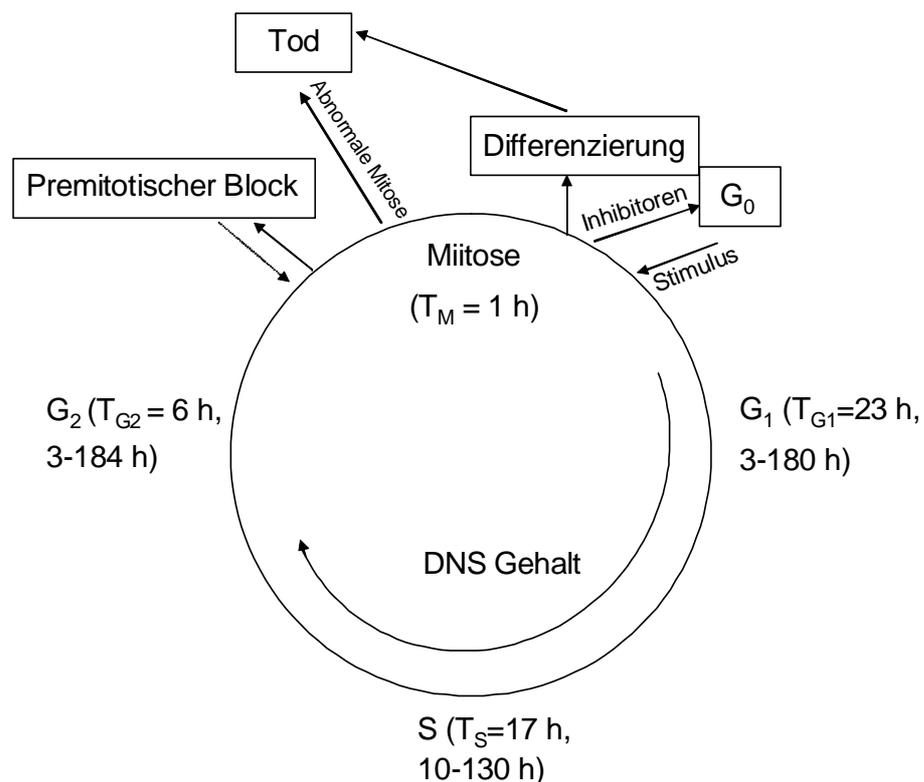
### **1.2.3 Chemotherapie**

Eine weitere Form der klassischen Tumorthherapie ist die Chemotherapie. Durch sie wurden in den letzten Jahrzehnten erhebliche Fortschritte in der Therapie von Krebspatienten erreicht. Unter Chemotherapie versteht man die Therapie von Tumoren mit zytotoxischen und zytostatischen Substanzen. In den meisten Fällen werden diese zytotoxischen Substanzen systemisch verabreicht. In Abhängigkeit von der Zielsetzung unterscheidet man hier neben den kurativen und palliativen Ansätzen in adjuvante und neoadjuvante Therapieregime. Die adjuvante Chemotherapie wird nach kurativen Lokalthapien durchgeführt, um Rezidiven oder Metastasen vorzubeugen. Eine präoperative Zytostatika-Therapie, die das Ziel hat, die Operabilität des Tumors zu verbessern, wird als neoadjuvante Chemotherapie bezeichnet.

Tumore haben meist ein schnelles Wachstum und eine damit verbundene hohe Zellteilungsrate. Viele Chemotherapeutika greifen vor allem Zellen an, die sich in der Teilungsphase befinden. Neben den pathologischen Tumorzellen gibt es auch physiologisches Gewebe, welches eine hohe Teilungsrate besitzt. Hierzu gehören z.B. die blutbildenden Organe und die Schleimhäute im Magendarmtrakt. Dieses Gewebe ist am meisten von einer Chemotherapie mit betroffen.

Das Kompartimentmodell ist ein Modell, das dazu dient, den Zellzyklus von Tumorzellen erklären zu können. Beim Kompartimentmodell des Tumorwachstums wird zwischen dem Proliferationspool, dem ruhenden Zellpool, den nicht mehr teilungsfähigen Zellen und den toten Zellen unterschieden. Zellen, die zum

Proliferationspool gerechnet werden, befinden sich aktiv im Zellzyklus. Kleine Karzinome haben einen hohen Anteil an Zellen, die den Zellzyklus durchlaufen und sich häufig teilen, daher sprechen sie auch besonders gut auf Proliferationsgifte an. Da die meisten Zytostatika Proliferationsgifte sind, wird der ruhende Zellpool oft nicht von der Chemotherapie angegriffen. Der Anteil ruhender Zellen ist vor allem bei großen Tumoren hoch. Chemotherapeutika eignen sich daher besonders gut für die adjuvante Nachbehandlung. Sie zielen auf makroskopisch noch nicht nachweisbare Tumorherde ab. Malignome mit einem großen Anteil an Zellen im Ruhepool sprechen dagegen meist schlechter auf eine Zytostatika-Therapie an. Diese ruhenden Zellen können erneut in den Zellzyklus eintreten und sind dann wieder vulnerabel. Weiterhin können bereits resistente Zellen zu Beginn der Therapie im Tumor vorhanden sein. Häufig bestehen Rezidive aus einem Zellklon der nicht mehr auf die ursprünglichen Zytostatika anspricht. Resistente Zellen können sich auch erst unter Zytostatika-Therapie entwickeln.



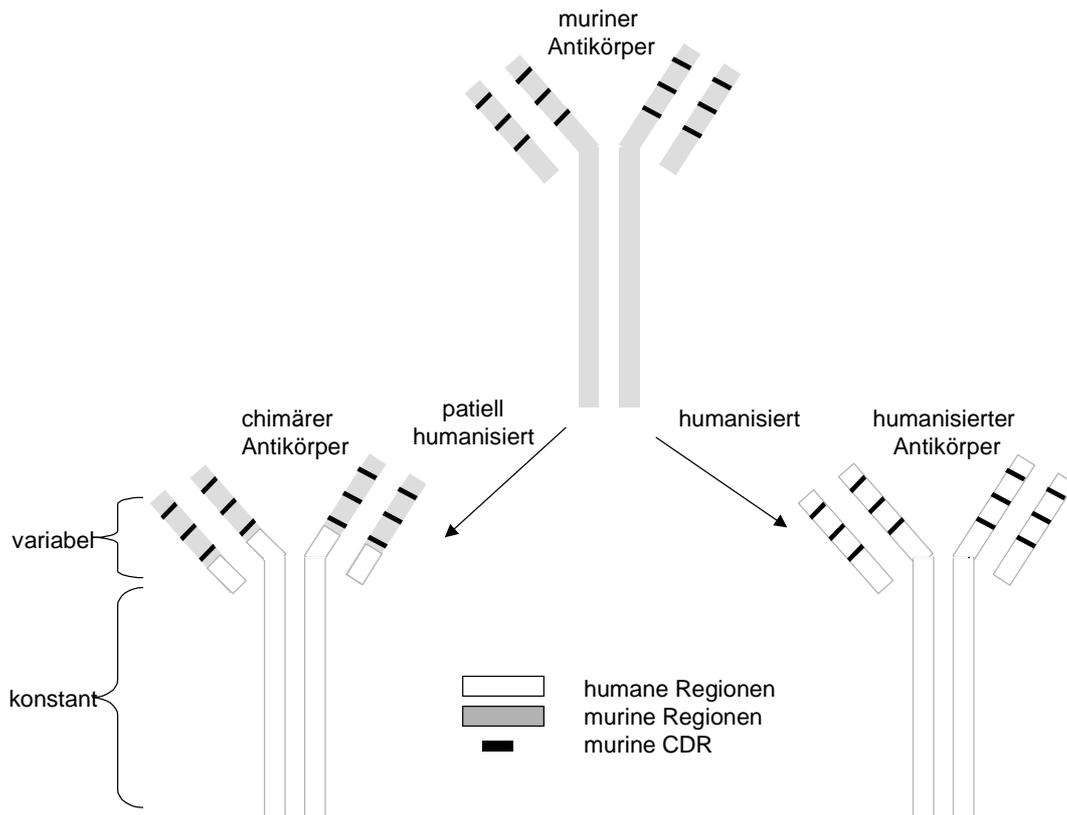
**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Zellzyklus. Die Zeitdauer der einzelnen Phasen ist als Mittelwert mit dem jeweiligen 95 % Konfidenz-Intervall für humane benigne und maligne Zellen angegeben (nach Tubiana 1980).

Obwohl heute eine große Anzahl an Bestrahlungsmodalitäten und Chemotherapeutika zur Verfügung steht, stößt man in der klassischen – oft nebenwirkungsreichen – Tumorthherapie bei diversen Tumorentitäten an Grenzen. Eine weitere Verbesserung ist hier nur durch neue Therapieoptionen realisierbar.

### **1.3 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern**

Im Jahr 1984 wurden Milstein und Köhler für ihre Forschung zur gezielten Produktion monoklonaler Antikörper mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Die Arbeiten, die hierbei gewürdigt wurden, bezogen sich auf die Fusion von Immunzellen mit Tumorzellen. Die durch die Fusion entstandenen Hybridomzellen besitzen die Fähigkeit, einzelne Antikörper zu synthetisieren und zeigen dabei das Wachstumsverhalten von Tumorzellen (Köhler 1993, Milstein 1993). In der Tumorthherapie werden heute zunehmend monoklonale Antikörper eingesetzt (Waldmann 2003). Diese sind gegen tumorspezifische oder in Karzinomen überexprimierte Antigene gerichtet. Durch die Antikörper-Antigen-Reaktion kommt es – abhängig von dem jeweiligen Antikörper – zu einer Wachstumshemmung, der Apoptose-Induktion oder auch der Opsonierung für das Immunsystem.

Die Möglichkeiten der ersten murinen Antikörper waren begrenzt, da sie als Fremdeiweiße vom Immunsystem als solche erkannt wurden und haben so ungewollte Immunreaktionen hervorrufen. Dies führte zur Entwicklung von chimären, humanisierten und humanen Antikörpern. Immunreaktionen gegen Fremdeiweiße werden dadurch stark reduziert (Waldmann 2003, Nissim und Chernajovsky, 2008).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Unterschiede von murinen, chimären und humanisierten Antikörpern (nach Meller et al., 2007).

Die Erfolge der Antikörpertherapie konnten mit der Entwicklung von Antikörpern gegen essentielle Zelloberflächenantigene weiter gesteigert werden. Für die Zelle vital wichtige Oberflächenantigene sind die Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Waldmann 2003). Das Wissen über das Genom in der Kombination mit der Benutzung von Bakteriophagen ermöglicht die schnelle Entwicklung von Antikörpern gegen neue Antigene (Siberil et al., 2005). Die Effektivität der Immuntherapie konnte durch die Kopplung der Antikörper an toxische und radioaktive Substanzen weiter gesteigert werden (Waldmann 2003). Die Wirkung radioaktiv markierter Antikörper wird im Folgenden näher beschrieben.

Bei der Radioimmuntherapie werden Antikörper an radioaktive Isotope gekoppelt. Hierzu eignen sich  $\alpha$ - oder  $\beta^-$ -Strahler sowie Radionuklide, die Auger-Elektronen emittieren. Die zytotoxische Wirkung des kalten Antikörpers wird auch bei der Radioimmuntherapie genutzt, diese ist analog zur Immuntherapie. Damit der Antikörper überhaupt an eine Zelle binden kann, müssen die Zellen der Zirkulation zugänglich sein und das passende Antigen exprimieren. Tumorzellen haben eine hohe Mutationsrate. Dies hat zur Folge, dass nicht jede Zelle eines Karzinoms auch

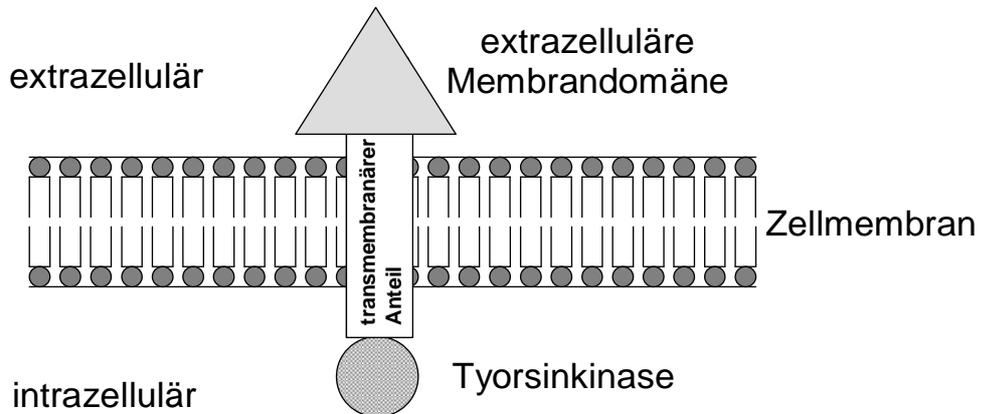
das Antigen für einen bestimmten Antikörper exprimiert. Durch eine hohe Proliferationsrate kommt es zu einem irregulären Wachstum. Dadurch kommt es teilweise zu unzulänglich vaskularisierten Bereichen im Tumor. Zudem herrscht in Tumoren ein hoher osmotischer Druck, der verhindert, dass Substanzen mit großer Molekülmasse schnell und weit in den Tumor eindringen können. IgG-Antikörper haben mit ca. 150 kD eine entsprechend große Molekülmasse. All diese Faktoren haben zur Folge, dass sich unter der Immuntherapie therapierefraktäre Zellklone entwickeln können. Durch die Kopplung eines radioaktiven Isotops – speziell  $\beta$ -Strahler – an die Antikörper werden auch Zellen mitbestrahlt, die das Antigen nicht exprimieren oder von den Antikörpern nicht erreicht werden können. Durch die Verwendung unterschiedlicher radioaktiver Isotope kann Reichweite, Dauer und Strahlenqualität variiert werden (Meller und Meller, 2007).

Für die Weiterentwicklung der Immuntherapie bzw. der Radioimmuntherapie ist es wichtig, geeignete Rezeptoren zu erforschen. Ein idealer Rezeptor sollte möglichst tumorspezifisch sein und bei vielen Tumorentitäten gehäuft auftreten. Weiterhin sollte dieser Rezeptor für wichtige Funktionen der Krebszelle verantwortlich sein, um über ihn vitale Funktionen der Zelle blockieren zu können. Ein solcher Rezeptor ist der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR).

### **1.3.1 Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR)**

Der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) ist ein Glykoprotein von 170 kD, das aus einer extrazellulären Rezeptor Domäne, einem transmembranären Anteil und einer intrazellulären Domäne besteht. Der intrazelluläre Anteil hat tyrosinkinase Aktivität. Der EGFR wird auch HER1 oder c-erbB-1 genannt (Herbst, 2004). Das Gen, das für den EGFR kodiert, ist auf Chromosom 7, Abschnitt q13-q21 lokalisiert (Kondo und Shimizu, 1983). Außer ihm gehören noch HER2, HER3 und HER4 zu der c-erbB-Gruppe (Herbst, 2004). Von dem EGFR sind 6 verschiedene Liganden bekannt. Diese Liganden sind der Epidermal-Growth-Factor (EGF), der Transforming-Growth-Factor- $\alpha$ , der Heparin-Binding EGF, das Amphiregulin, das Epregulin und das Betacellulin (Yarden, 2001). Nachdem ein Ligand an den EGFR gebunden hat, erfolgt intrazellulär eine Autophosphorylierung der Tyrosinkinase. Die aktivierte Tyrosinkinase setzt intrazelluläre Signalkaskaden in Gang. Die Aktivierung des EGFR kann zu Zellproliferation, Angiogenese der Genexpression und Inhibition der Apoptose führen (Herbst, 2004). Der EGFR ist physiologisch vor allem in der Entwicklungs- und Wachstums-Phase von Bedeutung. Bei der Drosophila-Fliege

konnte gezeigt werden, dass der EGFR fünf verschiedene Signale übermittelt, die alle mit der Entwicklung des Auges zusammenhängen. Der EGFR spielt dabei eine Rolle bei der Proliferation, dem Überleben und der Differenzierung der Zellen (Dominguez et al.; 1998). Neben der physiologischen Expression kann der EGFR auch in malignen Zellen gehäuft auftreten. Die EGFR-Stimulation führt bei Tumorzellen zu einer erhöhten Beweglichkeit, einem besseren Anhaften und zu einem leichteren Metastasieren (Herbst, 2004). In normalem Gewebe werden zwischen 40000 und 100000 EGF-Rezeptoren pro Zelle exprimiert. Im Gegensatz dazu ist der EGFR in einer Vielzahl von soliden Tumoren überexprimiert (Herbst, 2004). Zu diesen Tumorentitäten gehören Kopf und Halstumore (Ford und Grandis, 2003; Herbst, 2004; Gebbia et al., 2007), kolorektale Karzinome (Herbst, 2004; Jonker et al., 2007), Pankreas-Karzinome (Herbst, 2004; Xiong et al., 2004), Mama-Karzinome, nicht kleinzellige Bronchialkarzinome, Nieren-Karzinome, Ovarial-Karzinome und Urothel-Karzinome. Beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) korreliert die EGFR Überexpression mit einer schlechten Differenzierung, einem schnellen Wachstum und einer hohen Metastasierungsrate (Herbst, 2004). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Funktion des EGFR zu hemmen. Zu diesen gehören monoklonale Antikörper, Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren und toxische Substanzen, die an die Antikörper gebunden sind. Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) sind kleine Moleküle die die intrazelluläre EGFR-Phosphorylierung und damit die intrazelluläre Signaltransduktion verhindern. Die Signalübermittlung des EGFR kann durch Kombination eines EGFR-Antikörpers und eines TKI sehr gut unterbunden werden, so dass die extrazellulären und intrazellulären Bindungsstellen blockiert sind (Huang et al., 2004). Zu den EGFR-Antikörpern gehört Cetuximab, Panitumumab (ABX-EGF), EMD 72000, hR3 und ICR62. Diesen Antikörpern ist gemeinsam, dass sie an die extrazelluläre Domäne des EGFR binden. Sie verhindern dadurch, dass weitere Liganden an den Rezeptor andocken können. Der in dieser Arbeit eingesetzte Antikörper Cetuximab bekam 2004 die Zulassung zur Zweitlinientherapie in der Europäischen Union. 2005 hat Cetuximab die Zulassung von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für das kolorektale Karzinom bekommen (Camp et al., 2005).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des EGF-Rezeptors in der Zellmembran.

### 1.3.2 Cetuximab

Cetuximab (IMC-C225, Erbitux<sup>®</sup>) ist ein monoklonaler chimerer IgG-Antikörper, der gegen den Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor gerichtet ist (Kies und Harari, 2002; Ciardiello und Ma, 2005). Cetuximab wurde von ImClone, Merck KGaA und Bristol-Myers Squibb (BMS) entwickelt (Kies und Harari, 2002). Dieser Antikörper hat eine höhere Affinität zum EGFR als andere Liganden wie z.B. EGF (Ma und Hidalgo, 2007). Er verhindert die Ligandenbindung und bewirkt dadurch die Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion. Bei In-vitro-Experimenten brachte Cetuximab Zellen in den Zyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase (Ciardiello und Ma, 2005). Als Monotherapie wirkt Cetuximab zytostatisch (Ma und Hidalgo, 2007). Die Kombination von Cetuximab mit Irinotecan erzielt bei vorbehandelten Patienten mit kolorektalen Karzinomen gute Ergebnisse. In Kombination mit Oxaliplatin wird der Antikörper auch in der Erstlinientherapie und bei adjuvanten Ansätzen eingesetzt. Cetuximab wird mit einer Initialdosis von 400 mg/m<sup>2</sup> i.v. verabreicht. Im Anschluss wird eine wöchentliche Dosis 250 mg/m<sup>2</sup> i.v. appliziert (Ciardiello und Ma, 2005). Der Antikörper Cetuximab ist eine wichtige Behandlungsoption bei der Behandlung von Kopf-Halstumoren und bei dem metastasierten kolorektalen Karzinom (Blick und Scott, 2007). Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom, bei denen andere Behandlungsmethoden ausgeschöpft sind, führt Cetuximab zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit von im Median 4,6 Monaten auf im Median 6,1 Monaten. Die Lebensqualität ist ebenfalls

erhöht (Jonker et al., 2007). Patienten mit immunhistochemisch EGFR-negativem kolorektalem Karzinom zeigten ebenfalls ein Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab (Chung et al., 2005). Auch bei der Therapie des fortgeschrittenen Pankreas-Karzinoms konnte eine Aktivität von Cetuximab in Kombination mit Gemcitabine nachgewiesen werden (Xiong et al., 2004).

#### **1.4 Radioaktiv markierte EGFR-affine Substanzen**

In der Tumordiagnostik spielt neben den klassischen radiologischen Verfahren die molekulare Bildgebung eine große Rolle. Hier werden verschiedene radioaktive Isotope an Moleküle gekoppelt, die sich in bestimmten Strukturen anreichern. Dadurch können diese Strukturen sichtbar gemacht werden. Im Rahmen der Forschung zur EGFR-vermittelten Therapie werden z.T. radioaktiv markierte rezeptoraffine Substanzen eingesetzt. Auf der Suche nach geeigneten PET-Tracern für die EGFR-Tyrosinkinase markierten Bonasera et al. 5 verschiedenen 4-(Anilino)quinazoline Derivate radioaktiv mit  $^{18}\text{F}$ . Bei In-vivo-Experimenten stellte sich allerdings heraus, dass sie aufgrund kinetischer Faktoren und einer schnellen Clearance als Tracer zur Darstellung EGFR-positiver Tumoren ungeeignet waren (Bonasera et al., 2001). Pal et al. konnten über den  $^{124}\text{I}$ -markierten Tracer morpholino- $^{124}\text{I}$ -IPQA ((E)-But-2-enedioic-acid-[4-(3- $^{124}\text{I}$ iodoanilino)-quinazolin-6-yl]-amide-(3-morpholin-4-yl-propyl)-amide) mittels PET EGFR-positive Tumore identifizieren. Dies gelang ihnen vor allem bei Malignomen mit hoher EGFR-Kinase-Aktivität (Pal et al., 2006). Als ungeeigneter Tracer für eine nicht invasive Diagnostik des EGFR-Status in Malignomen mittels PET stellte sich  $^{18}\text{F}$ -Gefitinib heraus. Grund hierfür war eine hohe unspezifische Bindung des Tracers (Su et al. 2008). Mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -markiertem EGF konnten EGFR-positive Hirntumore bei Ratten mittels Gamma-Szintigraphie nachgewiesen werden. Da die Blut-Hirn-Schranke erst überwunden werden musste war der Uptake nicht sehr hoch (Yang et al., 2001). Cen et al. berichteten von einem wachstumshemmenden Effekt von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-hEGF ( $^{111}\text{In}$ -labeled diethylenetriaminepentaacetic acid human epidermal growth factor) bei EGFR-überexprimierenden Brustkrebszellen, die in Mäuse implantiert waren. Die besten Effekte wurden in kleinen Tumoren erreicht, die sich noch nicht etabliert hatten (Chen et al., 2003). Die Lokalisation von Bronchialkarzinomen gelang mit Hilfe von  $^{131}\text{I}$ -markiertem EGF. Allerdings behielten nach der Synthese weniger als die Hälfte der  $^{131}\text{I}$ -EGF Moleküle ihre Fähigkeit, an den EGFR zu binden (Cuartero-

Plaza et al., 1996).

Neben dem EGF wurde auch versucht, Antikörper, die gegen den EGFR gerichtet sind, radioaktiv zu markieren. In In-vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass mit  $^{111}\text{In}$ -markierten monoklonalen Antikörpern Tumore lokalisiert werden konnten (Goldenberg et al., 1989; Divgi et al., 1991). In vivo konnten mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-PEG-C225 ( $^{111}\text{In}$ -diethylenetriaminepentaacetic acid-poly(etholene glycol)-C225) selektiv Tumore mit einer hohen EGFR-Expression lokalisiert werden (Wen et al., 2001).

Aus diesem Kontext ergeben sich die optimalen Eigenschaften einer EGFR-affinen Substanz für die EGFR-vermittelte Diagnostik und Therapie. Diese sind:

- hohe Rezeptoraffinität
- einfache Synthese
- hohe Stabilität
- günstige Halbwertszeit

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Primäres Ziel dieser Arbeit war es einen radioaktiven Tracer zu entwickeln, der sowohl zur Diagnostik als auch zur Therapie von EGFR-positiven Tumoren eingesetzt werden kann.

Die Grundvoraussetzung für den Einsatz einer radioaktiven Verbindung – sei es zur Diagnostik oder Therapie – ist ihre Stabilität. Für uns war hierbei wichtig zu wissen, ob  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab über einen Zeitraum von 48-72 h stabil ist.

Für den von uns vorgesehenen Einsatz von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab ist es wesentlich, dass der Antikörper spezifisch an den EGFR bindet. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Bindung reversibel ist und welchen Einfluss die spezifische Aktivität auf den  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake hat.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die therapeutischen Möglichkeiten von Cetuximab zu erforschen. Hier sollte der Einfluss von Cetuximab auf das Wachstum der Zellen untersucht werden. Gegenstand der Untersuchung war zusätzlich, ob kaltes Cetuximab und  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab das Zellwachstum unterschiedlich beeinflussen.

Neben dem Einsatz als Monotherapie spielt Cetuximab in multimodalen Therapieregimen eine große Rolle. Es wurde untersucht ob die Kombination aus Bestrahlung und Cetuximab, im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie, einen additiven Einfluss auf die Zellproliferation hat und ob eventuelle Effekte dosisabhängig sind. Neben dem Einfluss der multimodalen Therapie auf das Zellwachstum wurde den Einfluss der Bestrahlung auf den  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake untersucht. Auch hier interessierte uns der Einfluss unterschiedlicher Strahlendosen auf die EGFR-Expression und die damit verbundene Änderung des  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake der Zellkulturen.

## **2 Material und Methoden**

Sämtliche Zellkulturexperimente wurden in einer Sicherheitswerkbank Klasse II unter Verwendung steriler Einwegartikel durchgeführt. Verwendete Chemikalien wurden in hochreiner Form zum Ansetzen der Lösungen eingesetzt.

### **2.1 Material und Methoden**

#### **2.1.1 Zellkulturen**

Als Zelllinien wurden A-431 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), JIMT (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und MB49 (Urologie, Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Deutschland) eingesetzt.

Von den A-431-Zellen ist bekannt, dass sie den Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) überexprimieren (Wrann und Fox, 1979). Die Zellen wurden von einem soliden Tumor einer 85-jährigen Frau gewonnen (Giard et al., 1973). Es handelte sich um Epithel-ähnliche Zellen, die in Monolayer-Kulturen wachsen. Das Kulturmedium enthielt 89 % RPMI 1640 ohne L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 Units/10 mg/ml, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 10 % fötales bovines Serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland).

Die JIMT-Zellen wurden aus einer Pleurametastase eines ductalen Mama-Karzinoms von einer 62-jährigen Frau gewonnen (Tanner et al., 2004). Sie dienten als Kontrolle, ohne bekannte EGFR-Überexpression jedoch mit HER2-Expression. Sie wurden ebenfalls als Monolayer-Kulturen gezogen. Das Kulturmedium enthielt 89 % Dulbecco's MEM (4,5 g/l Glucose, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) mit 2 mM L-Glutamin Natriumpyrovat, 10 % FBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 Units/10 mg/ml, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland).

Die MB49-Zellen stammten von Karzinom-Urothelzellen aus Mäusen (Bonfil et al., 1997). Sie wurden als Kontrolle verwendet, die keinen Rezeptor aus der c-erbB-Gruppe-überexprimiert. Sie wurden als Monolayer-Kulturen gezogen. Das Kulturmedium enthielt 89 % Dulbecco's MEM (4,5 g/l Glucose, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) mit 2 mM L-Glutamin Natriumpyrovat, 10 % FBS (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 Units/10 mg/ml, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland).

## 2.1.2 Antikörper

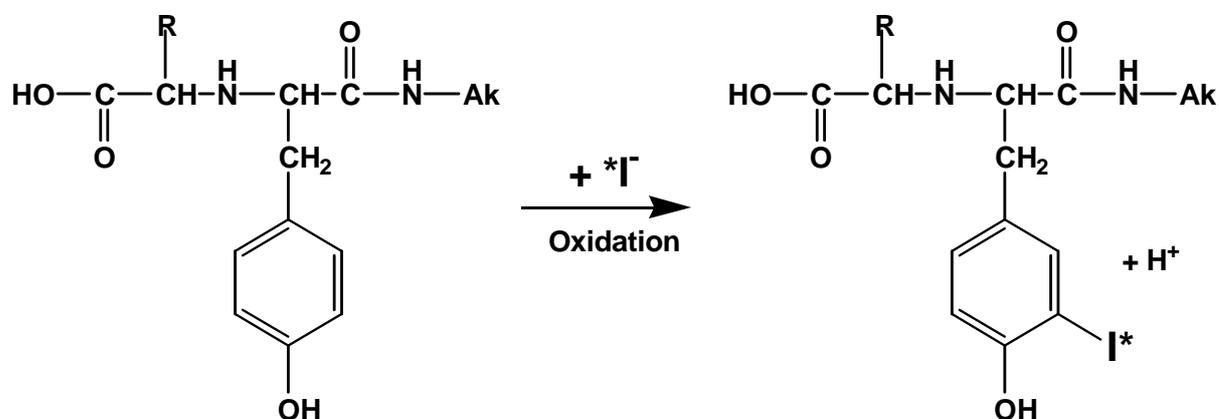
Als Antikörper wurde Cetuximab (2 mg/ml, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Bei einem Teil der Experimente wurde Cetuximab vor der Zugabe mit  $\text{Na}[^{131}\text{I}]\text{Iodid}$  (MDS Nordion S.A., Fleurus, Belgien) radioaktiv markiert. Der radioaktiv markierte Antikörper wird im Folgenden als „heißer“ Antikörper, der nicht markierte Antikörper als „kalter“ Antikörper bezeichnet.

### 2.1.2.1 Antikörpermarkierung

#### Prinzip der Antikörpermarkierung

Die Wand des Reaktionsgefäßes ist mit dem Oxidationsmittel IODO-GEN<sup>®</sup> (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA) beschichtet. Durch IODO-GEN<sup>®</sup> wird Iodid ( $\text{I}^-$ ) zum hoch reaktivem Iodonium-Ion ( $\text{I}^+$ ) oxidiert. Das sehr elektrophile  $\text{I}^+$  geht über den Mechanismus einer elektrophilen Substitution eine Bindung mit den Tyrosinresten im Antikörpermolekül ein (Abb. 4).

Reaktionsgleichung:



**Abb. 4:** In der Abbildung ist die Reaktion von Cetuximab und  $^{131}\text{I}^-$  zu  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab gezeigt. Das Iodid ( $\text{I}^-$ ) wird zu einem Iodonium-Ion ( $\text{I}^+$ ) oxidiert.  $\text{I}^+$  substituiert ein Proton ( $\text{H}^+$ ) am aromatischen Ring des Tyrosinrestes. \*I steht in dieser Formel für alle Iod-Isotope, wie z.B. der reine  $\gamma$ -Strahler  $^{123}\text{I}$ , der  $\gamma$ -/ $\beta$ -Strahler  $^{131}\text{I}$  oder der Positronenstrahler  $^{124}\text{I}$ .

#### Radioaktive Markierung

Initial hatte das  $\text{Na}[^{131}\text{I}]\text{Iodid}$  (MDS Nordion S.A., Fleurus, Belgien) eine Konzentration von 7,4 GBq/ml (spezifische Aktivität >1 TBq). Die Verdünnung des  $\text{Na}[^{131}\text{I}]\text{Iodids}$  erfolgte mit einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung. Zur Markierung wurde in angegebener Reihenfolge 0,5 ml PBS-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit

pH 7,2, 0,6 mg Cetuximab (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und 75 MBq Na<sup>131</sup>I]Iodid in ein Reaktionsröhrchen (s. Prinzip der Antikörpermarkierung) pipettiert und 30 min auf einem Magnetrührgerät gerührt. Die Reaktion wurde durch die Entnahme der Reaktionslösung aus dem IODO-GEN<sup>®</sup>-beschichteten Reaktionsgefäß gestoppt. Es folgte die Verdünnung des Gemischs mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung auf 5 MBq/ml. Im Anschluss wurde die Qualitätskontrolle zum einen per Dünnschichtchromatographie (DC) und zum anderen per Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt.

### **2.1.2.2 Qualitätskontrolle**

#### ***Dünnschichtchromatographie (DC)***

Die stationäre Phase der DC bestand aus einem 10 cm langen Instant-Thin-Layer-Chromatographie-(ITLC)-Streifen (Pall GmbH, Dreieich, Deutschland). Dieser wurde mit Markierungen für den Startpunkt (1 cm oberhalb des einen Endes) und für den Endpunkt (1 cm unterhalb des anderen Endes) sowie einer Markierung 5 cm von beiden Enden versehen. Die mobile Phase bestand aus 0,9 %-iger NaCl-Lösung.

Es wurden 50 µl des <sup>131</sup>I-markierten Antikörpers auf die Startlinie eines Dünnschichtchromatographie-Streifens (Pall GmbH, Dreieich, Deutschland) pipettiert. Der Streifen wurde vertikal in eine Glaskammer gestellt, deren Boden mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung bedeckt war. Die Plattenseite mit dem Antikörper zeigte dabei nach unten. Die Atmosphäre in der Kammer war mit Wasserdampf gesättigt. Die Platte wurde so lange entwickelt, bis die Flüssigkeit die obere Endlinie der Platte erreicht hatte. Nach vollständiger Entwicklung wurde die Platte aus der Kammer genommen und in der Mitte geteilt. Es erfolgte die Messung (Aktivimeter, CRC-15R, Capintec, inc., Ramsey, USA) der Aktivität der unteren Hälfte ( $x_1$ ) des Streifens sowie die Messung der Aktivität der beide Hälften ( $x_1+x_2$ ) zusammen.

Formel:

$$RC = x_1/(x_1+x_2)*100$$

Mittels dieser Formel wurde die radiochemische Reinheit (RC) in % berechnet.

#### ***Hochdruck Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)***

Die HPLC erfolgte über eine Size-Exclusion-Säule (Bio-Sil(R) SEC 250-5, 300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Als mobile Phase wurde hier 0,5 M

PBS Puffer, pH 6,8, bei einem Fluss von 1 ml/min verwendet.

Vor Beginn der Messung wurde die Säule mit PBS-Puffer pH 6,8, Flow 0,5 ml/min über 15 min konditioniert. Für die Chromatographie wurden 20 µl des radioaktiv markierten Antikörpers injiziert. In Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße passierten die Teilchen die Säule unterschiedlich schnell (radioaktiv markierte Antikörper: ca. 150 kD, freies  $^{131}\text{I}$ : 131 g/mol), wobei kleinere Moleküle eine längere Retentionszeit aufweisen. Für die Detektion wurden ein Radioaktivitätsdetektor sowie ein UV-VIS-Detektor (254 nm) eingesetzt. Die Messwerte wurden von einem Computer als Kurven der Aktivität über die Zeit aufgezeichnet. Die Messung wurde nach 20 min beendet.

### ***Radiochemische Reinheit***

Für die Versuche wurde Antikörper mit einer radiochemischen Reinheit >90 % eingesetzt. Wenn diese Reinheit nicht erreicht wurde, erfolgte eine erneute Synthese von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab. Das Ziel dieser Anforderung war es, möglichst reines  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab in den Versuchen einzusetzen. Hiermit sollten ungewollte Einflüsse von freiem  $^{131}\text{I}^-$  und ungebundenem Cetuximab verringert werden.

### ***Stabilität des $^{131}\text{I}$ -Cetuximab***

Um sicher zu stellen, dass das, wie unter Punkt 2.1.2.1 beschrieben, synthetisierte  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab über den Untersuchungszeitraum stabil war, erfolgte je eine Qualitätskontrolle mittels DC und HPLC nach 24, 48 und 72 h.  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab wurde über den Untersuchungszeitraum sowohl mit Medium als auch mit PBS Puffer pH 7,2 inkubiert. Die Inkubation fand jeweils bei 4° und 37°C statt.

## **2.2 Experimente**

Alle Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert. Dabei hatten die Zellkulturgefäße (Greiner BIO-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche. Während der Proliferation der Zellkulturen erfolgte der Mediumwechsel alle 2 bis 3 Tage. Unmittelbar vor Aktivitätszugabe wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zellen wurden zweimal pro Woche und am Vortag der Aktivitätszugabe umgesetzt (1:3). Während der Experimente wurde weder das Medium gewechselt, noch die Zellen umgesetzt.

In Tab. 1 sind die verschiedenen Experimente mit ihren Variationen, der Zielsetzung

und ihren Messzeitpunkten zusammengefasst.

	Versuch	Durchführung/Variation	Zielsetzung	Messzeitpunkte
1.	Bestimmung des <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake und -Kinetik bei den A-431-Zellen	Inkubation mit 5 µg heißem mAk (0,5 MBq), Bestimmung des Uptake	Bindungseigenschaften des Antikörpers in EGFR-überexprimierenden Kulturen	24, 48, 72 h
2.1	Verdrängungsversuch an A-431-Zellen	Inkubation der Zellen mit 5 µg <sup>131</sup> I-mAk (24 h vor Messbeginn (Messzeitpunkt 0 h))  Coinkubation von 250 µg mAk und Beginn der Messung (Messzeitpunkt 0 h)	Spezifität der mAk-Bindung an A-431-Zellen.  Reversibilität der Antikörper-Bindung  Zellwachstum bei hoher mAk konz.	0, 4, 24 h
2.2	Bestimmung des <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake bei den JIMT-Zellen	Inkubation der Zellen mit 5 µg <sup>131</sup> I-mAk	Spezifität der <sup>131</sup> I-Cetuximab Aufnahme  Zellwachstum	72 h
2.3	Bestimmung des <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake und -Kinetik bei den MB49-Zellen  Verdrängungsversuch an MB49-Zellen	Inkubation der Zellen mit 5 µg <sup>131</sup> I-mAk (24 h vor Messbeginn (Messzeitpunkt 0 h))  Coinkubation von 250 µg mAk und Beginn der Messung (Messzeitpunkt 0 h)	Spezifität und Kinetik der <sup>131</sup> I-Cetuximab Aufnahme  Zellwachstum bei hoher mAk konz.	24, 48 h
3	Variation des Verhältnisses von kaltem zu heißem mAk (konst. Menge heißer mAk) bei den A-431-Zellen	Inkubation aller Zellen mit 2,5 µg <sup>131</sup> I-Cetuximab.  Coinkubation der Zellen mit 0, 2,25, 9 oder 22,5 µg Cetuximab	Einfluss der spezifischen Aktivität auf die Kinetik des <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake  Zellwachstum bei verschiedenen mAk konz.	(0), 24, 48, 72 h
4.1	Bestrahlung der A-431-Zellen	Bestrahlung der Zellen 0, 2, 4, 10 Gy,	Untersuchen einer dosisabhängigen Proliferation	(0), 24, 48, 72 h

4.2	Bestrahlung der A-431-Zellen  Inkubation mit kaltem Cetuximab	Bestrahlung der Zellen 0, 2, 4, 10 Gy.  Inkubation der Zellen mit 5 µg kaltem Cetuximab	Untersuchen einer Dosisabhängigen Proliferation unter Cetuximab-Einfluss	(0), 24, 48, 72 h
4.3	Bestrahlung der A-431-Zellen  Inkubation mit heißem Cetuximab	Bestrahlung der Zellen 0, 2, 4, 10 Gy.  Inkubation der Zellen mit 5 µg <sup>131</sup> I-Cetuximab  Uptake-Bestimmung analog zu 1.	Untersuchen des Einflusses hochenergetischer Photonen auf die Kinetik des <sup>131</sup> I-Cetuximab-Uptake und  Dosisabhängigen Proliferation unter <sup>131</sup> I-Cetuximab-Einfluss	(0), 24, 48, 72 h

**Tab. 1:** Zusammenfassung aller Experimente. Dargestellt sind der Versuch, die Variation, die Zielsetzung und die Messzeitpunkte der einzelnen Experimente (mAk = Antikörper).

## **2.2.1 Bestimmung des <sup>131</sup>I-Cetuximab-Uptake**

### **2.2.1.1 Inkubation mit radioaktivem Antikörper**

Der Beginn des Messzeitraums startete mit der Inkubation der Zellen mit heißem Antikörper. Dazu wurden 100 µl (5 µg) <sup>131</sup>I-Cetuximab (s.o.) zu den Zellen pipettiert. Das frisch synthetisierte <sup>131</sup>I-Cetuximab wurde zuvor mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. 100 µl (5 µg) der verdünnten Lösung hatten danach eine Aktivität von 0,5 MBq. Der genaue Zeitpunkt der Aktivitätsmessung wurde festgehalten, um spätere Messergebnisse mit Hilfe des Zerfallsgesetzes korrigieren zu können. Der Zeitraum der Inkubation lag je nach Experiment zwischen 4 und 72 h.

### **2.2.1.2 Messung der applizierten Aktivitätsmenge**

Das Messen der applizierten Aktivität erfolgte in einer Gasionisationskammer (Aktivimeter, CRC-15R, Capintec, inc., Ramsey, USA). Hierbei beruht das Messprinzip darauf, dass die Radioaktivität in einer gasgefüllten Kammer Ionisationen erzeugt, die als Strom gemessen werden können. Dieser Strom ist proportional zur Aktivität eines bestimmten Radionuklids. Das Gerät verfügt über eingespeicherte Programme für unterschiedliche Isotope.

### **2.2.1.3 Uptake-Messung**

Vor der Uptake-Messung wurde das Medium abgegossen und der Zellrasen zweimal mit PBS-Puffer<sup>1</sup> (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Der hierfür verwendete PBS-Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hatte einen pH-Wert von 7,2. Das Lösen des Zellrasens aus dem Kulturgefäß erfolgte mit Accutase (PAA, Pasching Österreich) in einfacher Konzentration. Nach 10 min Inkubation mit Accutase (PAA, Pasching Österreich) bei 37°C folgte die Zugabe von RPMI 1640 Medium (PAA, Pasching Österreich) und das Abgießen der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen. Die anschließende Zentrifugation bei 1100 rpm und 4°C (Varifuge 32RS, Heraeus Sepatch, Osterode/Harz) dauerte 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml Medium RPMI 1640, (PAA, E15-039) resuspendiert.

Die Proben wurden in einem Bohrloch-Detektor (Multi-Logger LB 5310, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Die Messeinheit des Geräts registriert Szintilationsblitze, die durch die Energie der absorbierten Strahlung im NaI-Szintillationskristall entstehen. Der Ausgabewert der Zerfälle pro Minute ist proportional zur Anzahl der Lichtblitze. Diese ist wiederum abhängig von der Stoffmenge, der Aktivität und dem Isotop.

Die Messung der Zellsuspension erfolgte in 1,4 ml Medium (PAA, E15-039). Die Zerfälle pro Minute wurden anschließend auf ein Volumen von 1,5 ml umgerechnet, da vor der Messung die Entnahme von 100 µl Zellsuspension zur Auszählung erfolgte (s.2.2.2). Die Messzeit pro Probe betrug 1 Minute. Jede Probe wurde zweimal gemessen. Der Zeitpunkt der Messung wurde festgehalten und zur Zerfallskorrektur verwendet.

### **2.2.1.4 Leerwert Bestimmung**

Für jeden Messzeitpunkt gab es eine Negativkontrolle. Dafür diente eine Zellkulturflasche ohne Zellen aber mit Nährmedium und 100 µl heißem Antikörper. Die Negativkontrollen und die Flaschen mit Zellen erhielten eine simultane Behandlung (s. 2.2.1.1-2.2.1.3). Der so ermittelte Leerwert wurde von den Uptake-Werten des jeweiligen Zeitpunkts abgezogen.

### **2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach dem Trypanblau-Ausschluss-Verfahren (0,4 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mittels eines Auflichtmikroskops (Bx 40, Olympus-Europe, Hamburg, Deutschland). Dabei wurden 100 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau (0.4 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verdünnt. Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer.

### **2.2.3 Spezifität und Reversibilität der Cetuximab-Bindung**

Nach einer Inkubationszeit der A-431-Zellkulturen von 24 h mit 5 µg heißem Antikörper (0,5 MBq) (s.2.2.1.1) wurden die Zellen mit 250 µg kaltem Cetuximab coinkubiert. Der Uptake (s. 2.2.1.3-2.2.1.4) wurden zum Zeitpunkt der Zugabe des kalten Antikörpers (0 h), nach 4 h und nach 24 h bestimmt. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben ausgezählt.

Die JIMT-Zellkulturen wurden mit 5 µg (0,5 MBq) radioaktiv markiertem Cetuximab inkubiert (s. 2.2.1.1). Bei der Hälfte der Flaschen erfolgte eine Coinkubation mit 250 µg kaltem Antikörper. Die Bestimmung des Uptake (s. 2.2.1.3-2.2.1.4) erfolgte nach einer Inkubationszeit von 72 h. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben ausgezählt.

Die MB49-Zellkulturen wurden mit 5 µg (0,5 MBq) radioaktiv markiertem Cetuximab inkubiert (s. 2.2.1.1). Nach 24 h erfolgte bei einem Teil der Flaschen die Uptake-Bestimmung. Die Hälfte der verbleibenden Kulturflaschen wurde mit 250 µg kaltem Antikörper coinkubiert. Nach 48 h wurde der Uptake (s. 2.2.1.3-2.2.1.4) der Flaschen mit und ohne kalten Antikörper bestimmt. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben ausgezählt.

### **2.2.4 Spezifische Aktivität von <sup>131</sup>I-Cetuximab**

Im Gegensatz zu der unter Punkt 2.2.1 beschriebenen Bestimmung des Uptake, wurden 2,5 µg radioaktiv markiertes Cetuximab zum Inkubieren verwendet. Diese 2,5 µg <sup>131</sup>I-Cetuximab hatten eine Aktivität von 0,5 MBq. Im Anschluss erfolgte das Pipettieren von kaltem Antikörper bzw. 0,9 %-iger NaCl-Lösung zu den Zellkulturen. Je nach Versuchsreihe wurden 22,5; 9; 2,25 bzw. 0 µg kaltes Cetuximab zu den Zellen pipettiert, um eine spezifische Aktivität von ca. 20; ca. 40; ca. 100 bzw. ca. 200 MBq/mg zu erzielen. Der Antikörper war mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Die Bestimmung des Uptake lief analog zu dem unter Punkt 2.2.1.3-2.2.1.4

beschriebenen Verfahren ab. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben ausgezählt.

### **2.2.5 Externe Bestrahlung**

Die externe Radiatio mit 2, 4 und 10 Gy erfolgte mit einem Linearbeschleuniger (Merwaton 74, Siemens, München, Deutschland). Das Gerät verfügte über eine Dosisleistung von etwa 3 Gy/min bei einer Bremsstrahlung von 10 MeV. Die Bestrahlung der Zellen wurde in Zellkulturflaschen durchgeführt. Die Fläche der Kulturflaschen betrug 25 cm<sup>2</sup>. Der Zellrasen auf dem Boden der Flaschen war mit 7 ml Kulturmedium bedeckt. Die gleichen, nicht bestrahlten Zellkulturen (0 Gy) dienten als Kontrolle. Bei Zellen, die mit Antikörper inkubiert wurden, fand die Bestrahlung unmittelbar vor Antikörperzugabe statt. Der Uptake wurde wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben bestimmt. Die Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben ausgezählt.

## 2.3 Berechnungen und Statistik

### 2.3.1 Standardkurve

Vor Beginn der Experimente wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurden 10, 25, 50, 100 und 1500 µl einer <sup>131</sup>I-Lösung (86,5 kBq/ml) jeweils auf 1,5 ml aufgefüllt und im Bohrloch-Detektor (s.o.) die Aktivität gemessen. Mit Hilfe von Excel (Microsoft, Redmond, USA) wurde aus der Standardkurve durch lineare Regression eine Geradengleichung ermittelt. Mittels dieser Gleichung konnten die Zerfälle pro Minute der Probe in MBq umgerechnet werden.

### 2.3.2 Rechnung

Für eine Interpretation des Messergebnisses mussten die Messwerte zerfallskorrigiert werden. Da der radioaktive Zerfall einer Kinetik nullter Ordnung unterliegt, ist die Aktivität zum Zeitpunkt (t) nur vom Messzeitpunkt und der Halbwertszeit des Isotops abhängig. Die Stoffmenge spielt für den Zerfall keine Rolle.

$$A(t) = A(0) \cdot \exp(-\ln 2 \cdot t / t_{1/2})$$

Nach linearer Umformung ergibt sich:

$$A(0) = A(t) / (\exp(-\ln 2 \cdot t / t_{1/2}))$$

(mit  $A(0)$  = Aktivität zum Zeitpunkt der Zugabe des <sup>131</sup>I markierten Antikörpers ,  
 $A(t)$  = Aktivität beim Messzeitpunkt,  $t$  = Messzeitpunkt und  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit)

Der Messwert des Uptake wurde durch Einsetzen in die obige Gleichung korrigiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe der aus der Standardkurve erhaltenen Geradengleichung die Berechnung des Wertes in MBq. Das Ergebnis wurde auf die applizierte Aktivität pro ml bezogen. Da ein vom Zellwachstum unabhängiger Vergleichswert erzielt werden sollte, wurde der prozentuale Uptake anschließend auf  $10^6$  Zellen bezogen.

### **2.3.3 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch <sup>131</sup>I-markiertes Cetuximab**

Die maximale Bestrahlungsdosis durch <sup>131</sup>I-Cetuximab, die auf die Zellen gewirkt hatte, wurde nach einer Variante der Marinelli-Formel berechnet:

$$\text{Energie [eV]} = E_{\text{avg}} \times \text{avg. Aktivität } ^{131}\text{I} \times \text{Bestrahlungszeit}$$

(für  $\beta^-$ :  $E_{\text{avg}} = 1/3 E_{\text{max}}$  und avg. Aktivität <sup>131</sup>I wurde berechnet aus der kumulativen Aktivität über die Zeit (über 24 h  $\approx$  95 % der initialen Aktivität))

$$1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$\text{Dosis [Gy]} = \text{Energie [J]} / \text{Masse [kg]}$$

Die absolute  $\beta^-$  Dosis wurde über die Zeit integriert und betrug 0,25 Gy nach 24 h, 0,48 Gy nach 48 h sowie 0,69 Gy nach 72 h.

### **2.3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 15.0 (SPSS inc., Chicago, USA). Bestimmt wurden Mittelwerte, Mediane und die Standardabweichungen. Es wurden nicht parametrische Tests, der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, bzw. der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Hiermit wurden signifikante Änderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten und den verschiedenen Uptake-Kurven ermittelt. Als signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Radiochemische Reinheit und Stabilität des radioaktiv markierten Antikörpers

Da die Bindungseigenschaften von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab wesentlich von der radiochemischen Reinheit des mit  $^{131}\text{I}$ -markierten Produkts abhängig sind, erfolgte eine Qualitätskontrolle nach jeder  $^{131}\text{I}$ -mAk-Synthese. So wurde sichergestellt, dass die Ergebnisse nicht durch ungebundenes radioaktives Iodid beeinflusst wurden. Die Reinheit des markierten Antikörpers sollte mindestens 90 % betragen. Im Falle einer Reinheit von <90 % erfolgte die erneute Synthese des  $^{131}\text{I}$ -mAk.

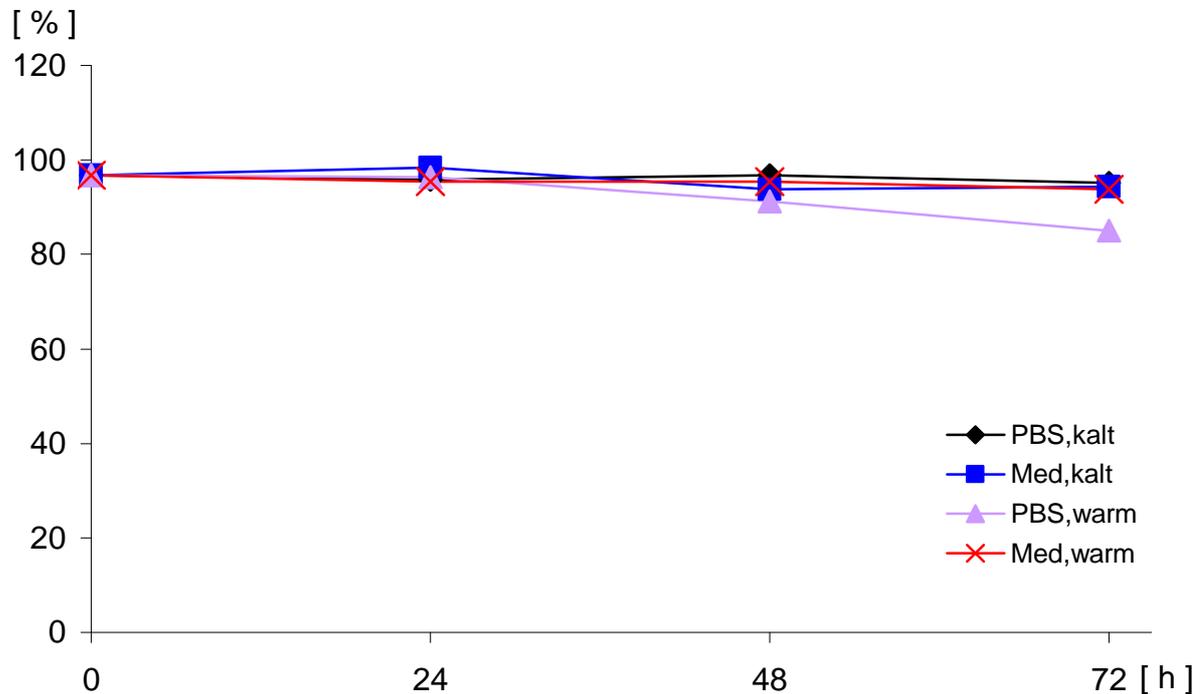
Die radiochemische Reinheit nahm unter Versuchsbedingungen (Verwendung von Zellkulturmedium) von  $m = 96,8\%$  – kurz nach der Markierung – auf  $m = 93,6\%$  nach 72 h ab. Diese Ergebnisse waren unabhängig von der Inkubationstemperatur ( $4^\circ$ ,  $37^\circ\text{C}$ ). Lediglich bei der Verwendung von PBS-Puffer als Lösungsmittel und einer Inkubationstemperatur von  $37^\circ\text{C}$  ergab sich nach 72 h eine Reinheit von lediglich 85 %. Diese Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden (DC, HPLC) stimmten überein.

#### 3.1.1 Qualitätskontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Im Anschluss an die Synthese des  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab wurde eine Qualitätskontrolle mittels Dünnschicht-Chromatographie durchgeführt. Hier wurde eine radiochemische Reinheit von 96,8 % erreicht. Somit waren 96,8 % des  $^{131}\text{I}$  nach der Inkubation an den Antikörper gebunden.

In den ersten 48 h nach Markierung konnte keine signifikante Änderung der radiochemischen Reinheit festgestellt werden. So variierte nach 24 h die radiochemische Reinheit des  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab zwischen 98,4 % der im Kühlschrank ( $4^\circ\text{C}$ ) gelagerten Probe und 95,4 % der bei  $37^\circ\text{C}$  gelagerten Probe. Beide  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Proben waren mit Medium inkubiert worden. 48 h nach Markierung gab es eine Spannbreite von 96,8 % bei  $4^\circ\text{C}$  bis 91,3 % bei  $37^\circ\text{C}$ . Hier waren beide  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Proben mit PBS-Puffer inkubiert worden. Bei der Probe, die analog zu den Versuchsbedingungen (s. 2.2) gelagert wurde, lag eine Reinheit von 95,4 % vor. 72 h nach der Synthese sank die radiochemische Reinheit des  $^{131}\text{I}$ -mAk auf Werte zwischen 95,2 % und 85,0 %. Die größte Stabilität wurde bei  $4^\circ\text{C}$ , die geringste bei  $37^\circ\text{C}$  ermittelt. Beide Proben waren mit PBS-Puffer inkubiert. Bei Proben, die analog

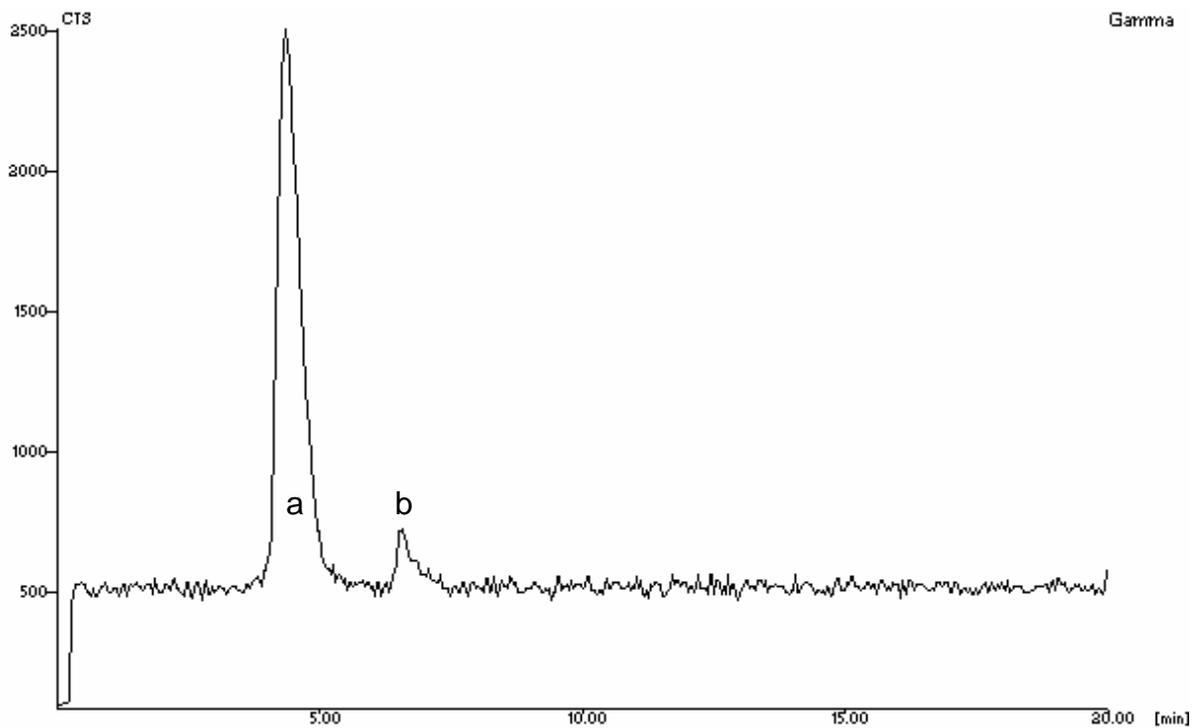
zu den Versuchsbedingungen (s. 2.2) gelagert wurden, ergab sich eine Reinheit von 93,8 %.



**Abb. 5:** Chemische Reinheit des  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab bei Inkubation mit Medium bzw. PBS-Puffer und unter verschiedenen Lagerungsbedingungen (4° oder 37°C). Alle Werte sind als chemische Reinheit in % zu den jeweiligen Messzeitpunkten dargestellt.

### **3.1.2 Qualitätskontrolle mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)**

Die Ergebnisse der HPLC bestätigen die Ergebnisse der DC-Qualitätskontrolle. Auch hier zeigte sich eine weitgehende Stabilität der markierten Probe. Abb. 6 gibt beispielhaft die Ergebnisse der HPLC-Analyse wieder. Die Fläche unter der Kurve von Peak a entspricht dabei dem markierten Antikörper, die Fläche unter der Kurve von Peak b gibt die Menge an Iodid in der Reaktionslösung wieder.



**Abb. 6:** Graph der Qualitätskontrolle mittels HPLC der 48 h im Brutschrank (37°C) gelagerten, mit Medium verdünnten, Probe. Dargestellt sind die Zerfälle / sec. Die Messung wurde nach 20 min gestoppt.

## 3.2 Zellwachstum

### **A-431**

Die unbehandelten Zellen proliferierten im Versuchszeitraum wie erwartet. Die Zellen in behandelten Kulturen zeigten ein wesentlich geringeres Wachstum. Die jeweiligen Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

### **JIMT und MB49**

Bei der Zelllinie MB49 konnten innerhalb von 24 h eine Vervierfachung der Zellzahl nachgewiesen werden. Analoge Ergebnisse wurden nach Inkubation mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen erzielt.

Bei der Zelllinie JIMT zeigte sich nach 72 h eine Verdopplung der Zellzahl. Die unterschiedlichen Konzentrationen von Cetuximab hatten keinen Einfluss auf das Zellwachstum.

Ein Einfluss der Antikörper-Inkubation konnte demnach für keine der beiden Kontrollzelllinien nachgewiesen werden. Deshalb wurden die jeweiligen Ergebnisse graphisch nicht dargestellt.

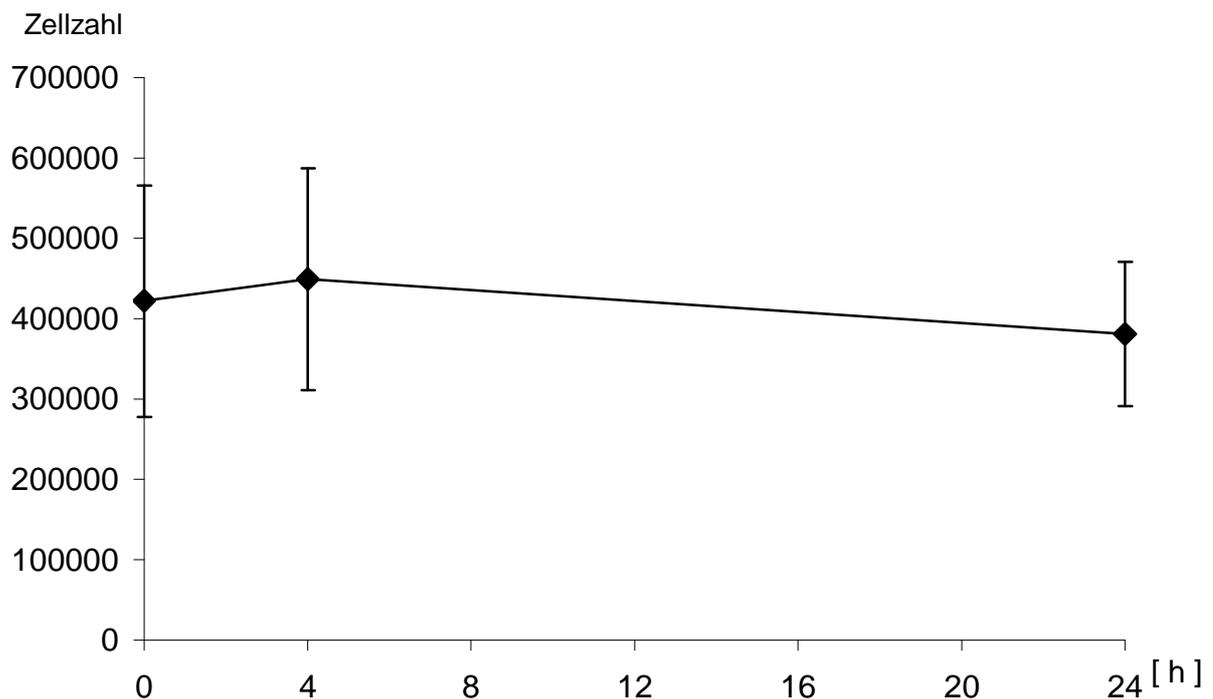
### 3.2.1 Auswirkung hoher Antikörperkonzentrationen auf die Proliferation

Im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollkulturen konnten bei den A-431-Zellen, die mit hoher Antikörperkonzentration inkubiert wurden, zwischen den Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede im Zellwachstum nachgewiesen werden (Abb. 7). Die Proliferation wurde inhibiert.

Bei der JIMT-Zelllinie ist bekannt, dass sie den HER2-Rezeptor, einen nahen Verwandten des EGFR, überexprimieren. Die Inkubation mit Cetuximab hatte jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der JIMT-Zelllinie.

Bei der EGFR-negativen MB49-Zelllinie bewirkte die Inkubation mit Cetuximab auch keine Veränderung im Zellwachstum.

Die Inkubation mit dem radioaktiv markierten Antikörper hatte bei diesen Zelllinien – ohne eine EGFR-Überexpression – ebenfalls keinen nachweisbaren Einfluss auf deren Proliferation.



**Abb. 7:** Zellzahl der A-431-Zellen in Kultur nach 24 h-Inkubation mit  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab vor Beginn (0 h) der Messung sowie der Coinkubation mit 50facher Menge an kaltem Cetuximab zum Messzeitpunkt 0 h. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei getrennten Experimenten, jeweils bestehend aus drei Messwerten pro Messzeitpunkt, dargestellt (n = 6).

### 3.2.2 Das Zellwachstum bei Variation der Antikörper-Menge

Da davon auszugehen war, dass die Expression des EGFR Zellzahl-abhängig ist, war in allen Experimenten die Bestimmung der Zellzahl essentiell. Das Wirkungsprinzip von EGFR-Antikörpern besteht u.a. in einer Proliferationshemmung der EGFR-exprimierenden Zellen (Ford und Grandis, 2003; Ma und Hidalgo, 2007). Dies konnte auch in vitro nachvollzogen werden. Die Proliferation der A-431-Zellen veränderte sich mit der Antikörperkonzentration.

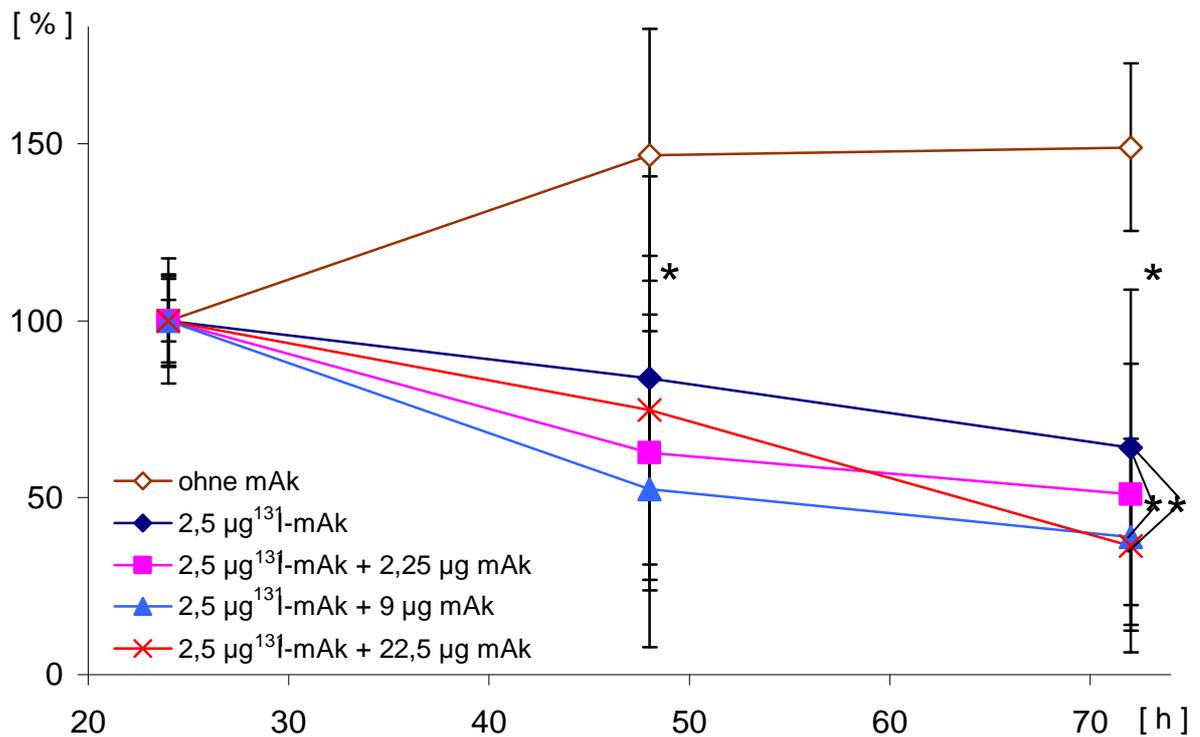
Wie in Tab.2 wiedergegeben, wuchsen unter Versuchsbedingungen die Zellkulturen der A-431-Zellen während des gesamten Untersuchungszeitraums. Dem gegenüber konnte eine signifikante Abnahme der Zellzahl überall dort nachgewiesen werden, wo die Zellen mit den Antikörper Cetuximab inkubiert wurden.

	24 h	48 h	72 h
<i>ohne mAk</i>	100 %	147 %*	149 %
<i>2,5 µg <sup>131</sup>I-mAk</i>	100 %	84 %	64 %*
<i>2,5 µg <sup>131</sup>I-mAk + 2,25 µg mAk</i>	100 %	63 %*	51 %
<i>2,5 µg <sup>131</sup>I-mAk + 9 µg mAk</i>	100 %	52 %*	39 %
<i>2,5 µg <sup>131</sup>I-mAk + 22,5 µg mAk</i>	100 %	75 %*	36 %*

**Tab 2:** Zellwachstum nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen Cetuximab. Alle Werte sind in [%] angegeben. Die Zellzahl nach 24 h wurde jeweils als 100 % festgelegt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus drei getrennten Experimenten, mit jeweils drei Messwerten pro Messzeitpunkt (n = 9). Die Signifikanzen sind im Vergleich zu den jeweilig zeitlich vorhergehenden Werten in derselben Versuchsvariante aufgeführt (\*p < 0,05).

Die Unterschiede in der Zellzahl zwischen unbehandelten und mit Cetuximab-inkubierten A-431-Zellkulturen vergrößerten sich im Untersuchungszeitraum. Signifikante Unterschiede wurden vor allem bei längerer Inkubationszeit und großen Dosis-Unterschieden in der mAk-Konzentration festgestellt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 8 gezeigt.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war, spätestens nach 72 h, die Proliferation in sämtlichen anderen Kulturen gehemmt.

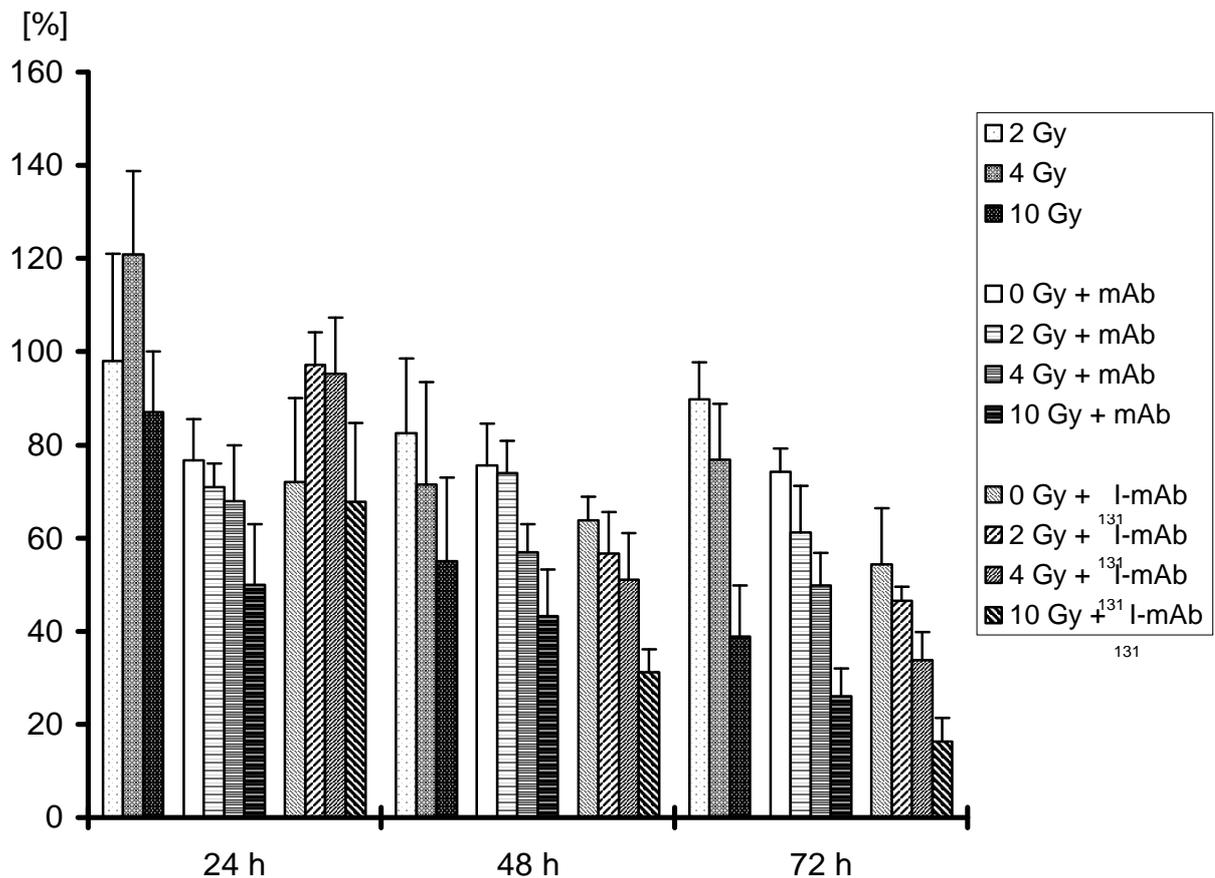


**Abb. 8:** Zellzahl der A-431-Zellkulturen nach Variation der Antikörperkonzentration. Die Zellzahl nach 24 h wurde jeweils als 100 % festgelegt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei getrennten Experimenten, mit jeweils drei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt, abgebildet (n = 9, \*p < 0,05).

### 3.2.3 Die Zellzahl bei externer Bestrahlung

Ohne die Zugabe des Antikörpers proliferierten die scheinbestrahlten Zellen (0 Gy) wie bereits unter 3.2 beschrieben. Wie zu erwarten, zeigten die externe Bestrahlung und die Inkubation der A-431-Zellen mit Antikörper additive Effekte. Bereits nach 48 h verringerte sich die Anzahl der Zellen bei allen behandelten Zellkulturen signifikant ( $p < 0,05$ ). 72 h nach Bestrahlung hemmte die Inkubation mit <sup>131</sup>I-Cetuximab zusätzlich in jeder der vier Dosisgruppen (0, 2, 4, 10 Gy) das Wachstum der Zellen. <sup>131</sup>I-Cetuximab hemmte dabei das Zellwachstum signifikant stärker als Gabe gleicher Mengen kaltem Antikörper. Die mittlere durch <sup>131</sup>I-Cetuximab verursachte Strahlendosis wurde auf 0,25 Gy nach 24 h und auf bis zu 0,7 Gy nach 72 h berechnet.

Eine Inkubation der Kulturen mit Cetuximab hemmte die Proliferation. Diese Effekte waren unabhängig davon ob mit heißem oder kaltem Antikörper inkubiert wurde. Bei den extern bestrahlten Zellen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Applizierten Strahlendosis und der Abnahme der Zellzahl (Abb. 9).

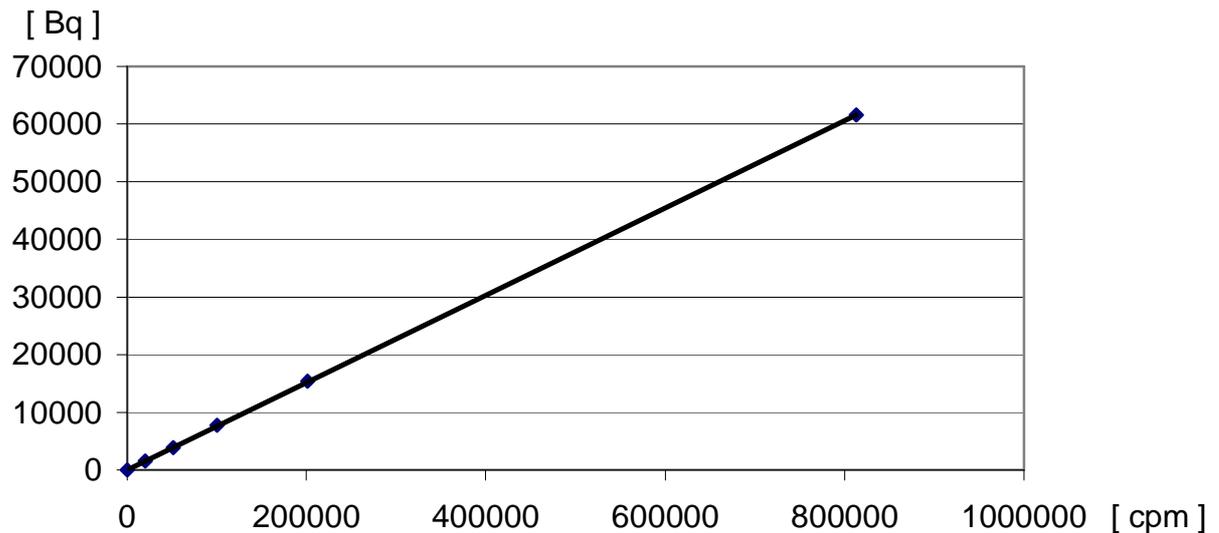


**Abb. 9:** Zellzahl der A-431-Zellkulturen nach Bestrahlung und Inkubation mit Antikörper. Die Zellzahl ist auf den 24 h Wert der unbehandelten Zellen (ohne mAk) normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus vier getrennten Experimenten, mit jeweils drei Messwerten pro Messzeitpunkt und einem Experiment, mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt, abgebildet (n = 14).

Die höchste Zellzahl fand sich zu jedem Messzeitpunkt in den unbehandelten Zellkulturen. Bei den mit  $^{131}\text{I}$ -mAk inkubierten und zusätzlich mit 10 Gy extern bestrahlten Zellen wurde zu allen Messzeitpunkten die geringste Zellzahl ermittelt. Die Zellzahl der übrigen Versuchsreihen lag zwischen diesen beiden. Die Wirkung der Behandlungen war additiv zeit- und dosisabhängig (Abb. 9).

### 3.3 Standardkurve als Basis der Uptake-Experimente

Die Standardkurve zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen Zerfällen pro Minute und der applizierten Aktivität – gemessen in Becquerel – besteht. Die Kurve wurde für  $^{131}\text{I}$  erstellt. Mittels linearer Regression wurde dann die an dem Graphen angegebene Geradengleichung ermittelt.  $R^2$  bezeichnet in diesem Zusammenhang das Bestimmtheitsmaß.



**Abb. 10:** Standardkurve für  $^{131}\text{I}$  mit eingezeichneter Trendlinie. Hierbei wurden die gemessenen Zerfälle pro Minute (cpm) gegen die eingesetzten Becquerel (Bq) aufgetragen.

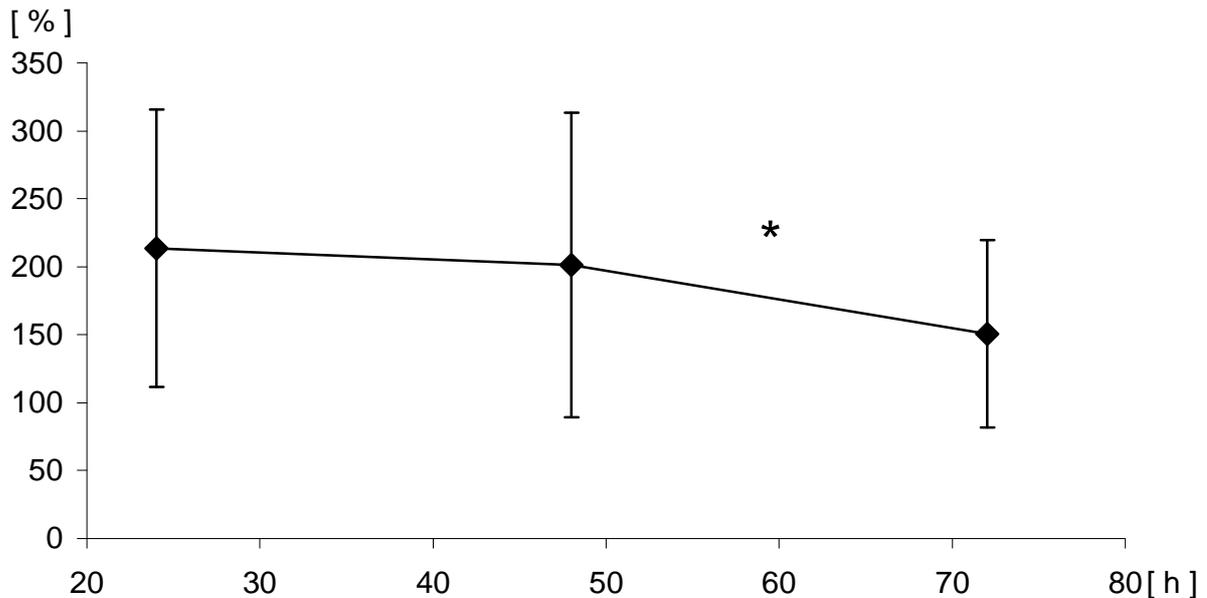
Wie aus der Abbildung hervorgeht, ergab sich für  $^{131}\text{I}$  der Zusammenhang:

$$y = 0,0807x \text{ mit } R^2 = 0,9986$$

Durch Einsetzen der zerfallskorrigierten gemessenen Zerfälle pro Minute in die Gleichung, erhält man die entsprechende Aktivität in Becquerel, in der Zellsuspension die auf die im Experiment eingesetzte Aktivitätsmenge bezogen werden konnte.

### 3.4 $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake

Die EGFR-überexprimierenden A-431-Zellen zeigten einen hohen  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake. Das Maximum wurde nach 24 h erreicht. Danach war der Uptake rückläufig (Abb. 11).



**Abb. 11:**  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake der A-431-Zelllinie in Kultur. Die Werte sind als prozentualer Uptake / $10^6$  Zellen angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus vier getrennten Experimenten mit jeweils drei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt und einem Experiment mit jeweils zwei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt angegeben (n = 14, \*p < 0,05).

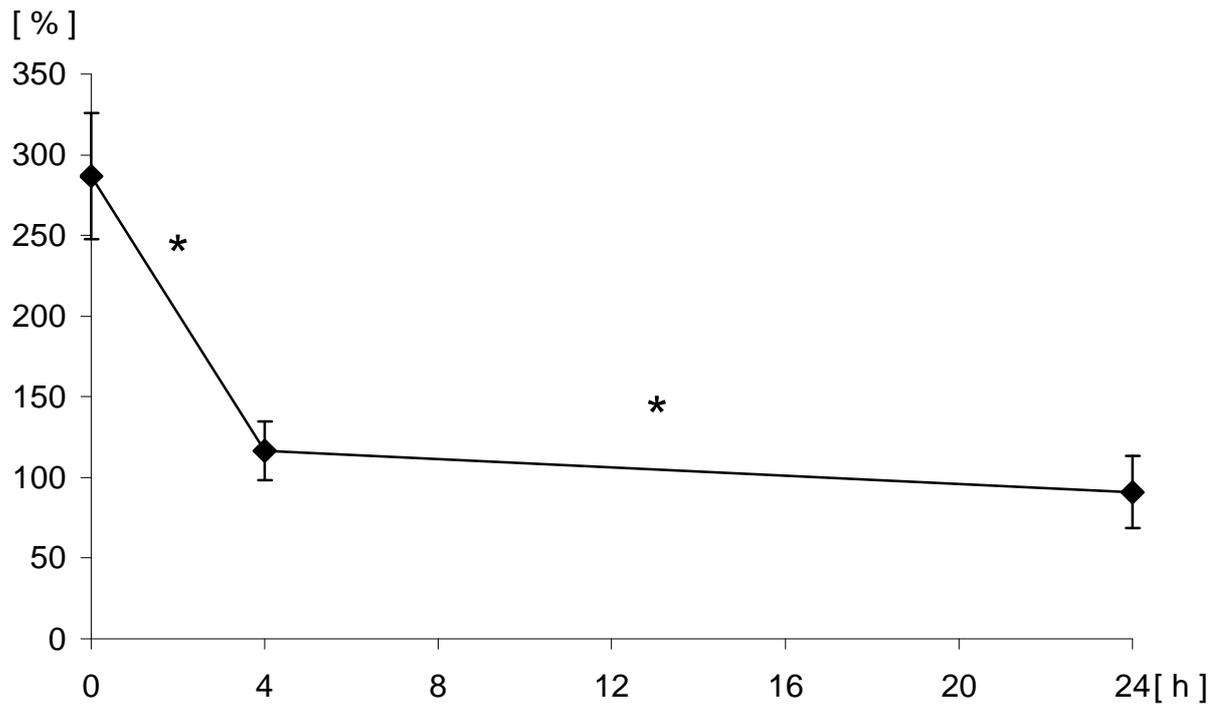
Im Gegensatz hierzu, zeigten die JIMT-Zellen und die MB49-Zellen nur einen sehr geringen Uptake. Dabei betrug der Uptake beider Zelllinien weniger als 1 % des  $^{131}\text{I}$ -mAk-Uptake der A-431-Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten.

### **3.3.1 $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake bei Verdrängung des heißen durch kalten Antikörper**

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Cetuximab reversibel an den EGFR bindet. Hierzu wurden A-431-Zellen 24 h mit  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab inkubiert. Nach diesen 24 h wurden die Zellen mit kaltem mAk in 50fache höherer Dosis coinkubiert und der Ausgangs-Uptake (Messzeitpunkt 0 h) bestimmt. Bereits nach 4 h nahm der Uptake um mehr als 50 % ab. Der Verlauf der Uptakekurve ist in Abb. 12 gezeigt.

Wie oben bei den A-431-Zellen beschrieben, wurden auch Kulturen der JIMT- und MB49-Zellen behandelt. Sie dienten als Kontrolle. Bei ihnen konnte nur ein über hundertfach geringerer Uptake als bei den A-431-Zellen bestimmt werden. Der Uptake der MB49-Zellen zeigte nach Coinkubation mit kaltem Cetuximab über einen Zeitraum von 24 h keine Veränderungen.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass radioaktiv markierte Antikörper spezifisch und reversibel an den EGF-Rezeptor binden.

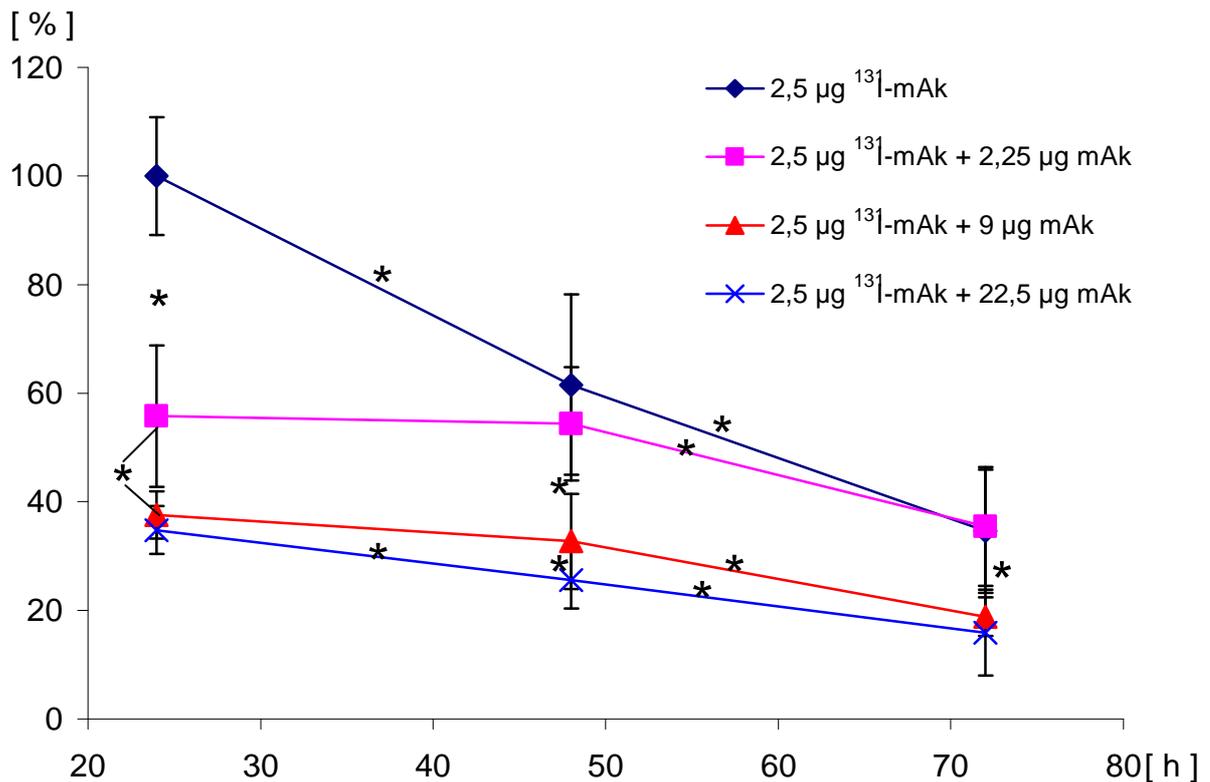


**Abb. 12:**  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake der A-431-Zellen in Kultur nach Coinkubation mit 50facher Menge an kaltem Cetuximab. Alle Werte sind als Uptake in % /  $10^6$  Zellen, für den jeweiligen Messzeitpunkt, dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus zwei getrennten Experimenten, jeweils bestehend aus drei Messwerten pro Messzeitpunkt dargestellt ( $n = 6$ ,  $*p < 0,05$ ).

### 3.3.2 $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake bei Variation der Konzentration an kaltem Antikörper

Zur Evaluation des Einflusses der Antikörperkonzentration – und somit der spezifischen Aktivität – wurde bei konstanter Menge an heißem Cetuximab die Menge an kaltem Antikörper variiert. Wie in Abb. 13 dargestellt, konnte für alle Messreihen gezeigt werden, dass der Uptake im zeitlichen Verlauf abnahm.

Die Variation der spezifischen Aktivität bewirkte eine Differenz im Uptake. Der  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake der Zellen ohne Gabe an kaltem Antikörper war höher. Die Zellen mit hohen Konzentrationen an kaltem mAk hatten einen signifikant niedrigeren Uptake. Der Uptake war jeweils nach 24 h am größten. Mit zunehmender Inkubationszeit verringerte sich der Uptake bei allen Versuchsreihen. Die Unterschiede im Uptake zwischen den verschiedenen Antikörperkonzentrationen fielen mit zunehmender Inkubationszeit geringer aus. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität, also das Verhältnis von heißem zu kaltem Antikörper, einen signifikanten und dosisabhängigen Einfluss auf den  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake hat. Dieser Einfluss ist bei kurzer Inkubationszeit größer als bei langer Inkubationszeit.



**Abb. 13:** <sup>131</sup>I-Cetuximab-Uptake der Zelllinie A-431 nach Coinkubation mit kaltem Cetuximab. Alle Werte sind als Uptake zum dargestellten Zeitpunkt / 24 h-Uptake der 2,5 µg <sup>131</sup>I-mAk Zellen x 100, angegeben. Die Ergebnisse sind, als Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei getrennten Experimenten, jeweils bestehend aus drei Messwerten pro Messzeitpunkt dargestellt (n = 9, \*p < 0,05).

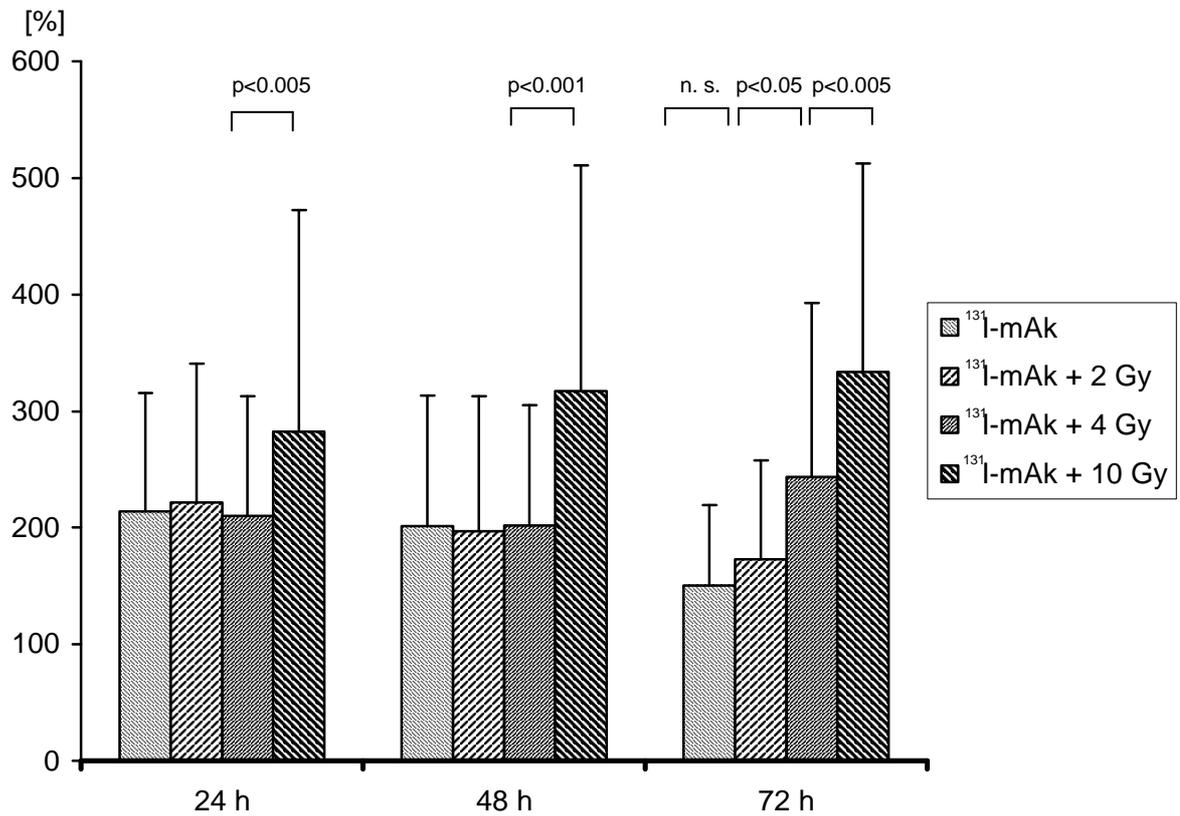
### 3.3.3 Der <sup>131</sup>I-Cetuximab-Uptake bei externer Bestrahlung

Hochenergetische Photonenstrahlung hat einen Einfluss auf den Uptake von <sup>131</sup>I-Cetuximab bei der A-431-Zelllinie. Der Anstieg des Uptake ist dabei von der Dosis der Bestrahlung abhängig. Hohe Dosen führen dabei zu einem Anstieg des Uptake. Tab. 3 beschreibt den Verlauf des <sup>131</sup>I-Cetuximab-Uptake während des Messzeitraums von 72 h. Die Grafik zeigt, dass der Uptake während der ersten 24 h auf über 200 % stieg und ein Plateau erreichte. Im zeitlichen Verlauf war danach bei den nicht bestrahlten Zellen (0 Gy) eine Abnahme des Uptake zu erkennen. Bei Bestrahlung mit 2 Gy nahm der Uptake nach 72 h signifikant ab. Bei mittlerer (4 Gy) Bestrahlung zeigte der Uptake im Untersuchungszeitraum keine signifikanten Unterschiede. Eine Bestrahlung mit 10 Gy führte zu einem Anstieg des Uptake des Antikörpers über den gesamten Messzeitraum.

	24 h	48 h	72 h
$^{131}\text{I}$ -mAk	214 %	201 %	151 %*
$^{131}\text{I}$ -mAk + 2 Gy	222 %	197 %	173 % <sup>*(24 h)</sup>
$^{131}\text{I}$ -mAk + 4 Gy	210 %	202 %	243 %
$^{131}\text{I}$ -mAk + 10 Gy	282 %	317 %	334 % <sup>*(24 h)</sup>

**Tab 3:**  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake der A-431-Zelllinie in Kultur nach externer Bestrahlung. Alle Daten sind als prozentualer Uptake / $10^6$  Zellen für den jeweiligen Messzeitpunkt angegeben. Die Ergebnisse sind die Mittelwert aus vier getrennten Experimenten mit jeweils drei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt und aus einem Experiment mit jeweils zwei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt (n = 14, \*p < 0,05).

Während dieses Zeitraums hatten die mit 10 Gy bestrahlten Zellen zu jedem Messzeitpunkt den signifikant höchsten Uptake. Nach 72 h führte eine Bestrahlung mit einer Dosis von 10 Gy zu einer Verdoppelung des Uptake von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab verglichen mit den scheinbestrahlten (0 Gy) Zellen. Der Uptake der mit 4 Gy bestrahlten Messreihe war nach 72 h signifikant höher als der Uptake der Zellen mit einer niedrigeren Strahlendosis.



**Abb. 14:**  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake der A-431-Zelllinie in Kultur nach externer Bestrahlung. Alle Daten sind als Uptake in  $\%/10^6$  Zellen für den jeweiligen Messzeitpunkt angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus vier getrennten Experimenten mit jeweils drei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt und einem Experiment mit jeweils zwei Zellkulturflaschen pro Messzeitpunkt angegeben ( $n = 14$ ,  $*p < 0,05$ ).

## 4. Diskussion

Diese Arbeit wurde durchgeführt um einen Beitrag zu Verbesserung multimodaler Therapiekonzepte zu leisten. Basis dieser Untersuchung war es den Einfluss einer Bestrahlung auf die Immuntherapie mit dem gegen den EGFR-gerichteten Antikörper Cetuximab zu erforschen.

### 4.1 Zellkulturen

Für unsere Untersuchungen zur EGFR-Expression von Zellen nach einer Bestrahlung, benötigten wir Zellen, die den EGFR überexprimieren. Unsere Wahl fiel dabei auf die Zelllinie A-431 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). Von den A-431-Zellen ist bekannt, dass sie den EGF-Rezeptor in einer großen Anzahl exprimieren (Wrann und Fox, 1979). Diese Zelllinie wurde oft erfolgreich zur Erforschung des EGF-Rezeptors in In-vitro-Experimenten eingesetzt (Goldenberg et al., 1989; Schmidt-Ulrich et al., 1997; Saleh et al., 1999; Meenakshi et al., 2003; Jimeno et al., 2005; Ping et al., 2008; Webb et al., 2008; Ahsan et al., 2009). Die hohe Anzahl an EGF-Rezeptoren und die Tatsache, dass sich die A-431-Zelllinie in der EGFR-Forschung etabliert hat, waren wichtige Gründe für unsere Entscheidung.

Um zu überprüfen, ob das von uns synthetisierte  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab spezifisch an den EGFR bindet, benötigten wir zusätzlich Zellkulturen, die den EGFR nicht überexprimieren. Bei den JIMT-Zellen und den MB49-Zellen ist in der Literatur keine EGFR-Überexpression beschrieben. Wir konnten bei beiden Zellkulturen einen deutlich geringeren  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake als bei den A-431-Zellen feststellen. Von den JIMT-Zellen ist bekannt, dass sie den HER2-Rezeptor – einen nahen Verwandten des EGFR aus der c-erbB-Familie – überexprimieren (Tanner et al., 2004). Trotzdem war bei den JIMT-Zellen der  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake gering. Eine Kreuzreaktion konnte somit ausgeschlossen werden. Eine hohe Spezifität von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab ist daher naheliegend. A-431-Zellen wiesen einen mehr als 50fach höheren  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake als die Kontrollzellen auf. Im Gegensatz zu den Kontrollen lies sich bei den A-431-Zellen, durch Coinkubation mit der 50fachen Menge an kaltem Cetuximab, der  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake nach 24 h auf ca. ein Drittel des Ausgangswertes senken. Durch diese Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass der EGFR Antikörper Cetuximab – wie vom Hersteller beschrieben – spezifisch an den EGFR bindet. Weiterhin konnten wir die Ergebnisse von Nordberg et al. bestätigen, dass die Bindung des Antikörpers an den Rezeptor reversibel ist

(Nordberg et al., 2007).

## **4.2 Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR)-vermittelte Therapie**

EGFR-vermittelte Mechanismen und Therapieansätze sind Basis vieler Untersuchungen. Der EGFR gehört zur c-erbB-Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Das Wachstum und das Überleben von Tumorzellen scheint unter anderem von einem Netzwerk aus Rezeptoren und Liganden der c-erbB-Familie abhängig zu sein. In menschlichen Krebszellen wird der EGFR oft überexprimiert (Normanno et al., 2006). Zu den Tumorentitäten, in denen er häufig vorkommt, gehören die Kopf-Halstumore (Ford und Grandis, 2003; Herbst, 2004; Gebbia et al., 2007), kolorektale Karzinome (Herbst, 2004; Jonker et al., 2007), Pankreas-Karzinome (Herbst, 2004; Xiong et al., 2004), Mama-Karzinome, nicht kleinzellige Bronchialkarzinome, Nierenzell-Karzinome, Ovarial-Karzinome und Urothel-Karzinome (Herbst, 2004).

Die Tatsache, dass der EGFR bei vielen Tumorentitäten überexprimiert wird, macht ihn zu einem interessanten Ziel bei der Erforschung neuer Krebstherapien. In unseren Ergebnissen hat sich gezeigt, dass der EGFR-Antikörper Cetuximab ein sehr effektives Mittel ist, um das Wachstum EGFR-positiver Zellen zu hemmen. Wie in Tab. 2 dargestellt proliferierten die unbehandelten Zellen ungehindert, während bei den mit Cetuximab inkubierten Zellkulturen die Zellzahl abnahm. Diese Wachstumshemmung war von der jeweiligen Cetuximab-Dosis abhängig.

Merkmale maligner Zellen sind Zellproliferation, Angiogenese, Genexpression und die Inhibition von Apoptose. Die Aktivierung des EGFRs durch einen seiner Liganden (s. 1.3.1) kann alle diese Eigenschaften der malignen Zellen zur Folge haben (Herbst, 2004). Chung et al. haben herausgefunden, dass bei den Plattenepithel-Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich häufig eine hohe Anzahl von Genkopien des EGFR vorliegen. Dies ist mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten verbunden (Chung et al., 2006). An den extra- und den intrazellulären Anteilen des EGFR konnten Mutationen identifiziert werden, die zur Aktivierung von Tumoren führen (Ferguson KM, 2008). Eine schlechte Prognose bei Tumoren hängt häufig mit dem Vorhandensein von Metastasen zusammen. Dem Epidermal-Growth-Factor (EGF) und dem EGFR werden große Bedeutung sowohl bei der lymphogenen als auch bei der hämatogenen Metastasierung neoplastischer Erkrankungen zugeschrieben (Pryczynicz et al., 2008). Diese Schlüsselposition ist für den Grad der Malignität von Tumoren mit entscheidend. Dies ist Ansatz für eine gezielte Therapie,

die an den EGFR anzugreifen vermag. Wie wir in unseren Untersuchungen bestätigen konnten, ist eine gezielte EGFR-vermittelte Therapie mit Cetuximab möglich und sinnvoll. Es ist naheliegend, dass hierdurch die Prognose von Patienten mit Malignomen, die den EGFR überexprimieren, verbessert werden kann.

Daher steht nicht nur die Erforschung des EGFR alleine im Mittelpunkt, sondern auch der detaillierteren Untersuchung der EGFR-gerichteten Therapie kommt immer größere Bedeutung zu. Eine gut erforschte Möglichkeit, die Signaltransduktion des EGFRs gezielt zu blockieren, sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI).

Einer dieser Tyrosinkinase-Inhibitoren ist Gefitinib. Helfrich et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an EGFR-Genmutationen sowie EGFR-Genkopien und der Sensibilität gegenüber Gefitinib (Helfrich et al., 2006). Ein sehr gutes Outcome für eine First-Line-Therapie mit Gefitinib berichteten Sequist et al. für Patienten mit vorgeschrittenem nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC), das EGFR-Mutationen aufweist (Sequist et al., 2008). Wegen seiner guten Verträglichkeit ist Gefitinib besonders bei älteren Patienten mit vorgeschrittenem NSCLC auch als Monotherapie geeignet (Ebi et al., 2008). Ein weiterer TKI zur EGFR-gerichteten Therapie ist Erlotinib. Bei der Therapie von vorbehandelten Patienten mit vorgeschrittenem NSCLC ist Erlotinib effektiv und wird gut vertragen (Ardavanis et al., 2008). Bei einer Resistenz gegenüber Gefitinib bleibt ein Wechsel der Therapie auf Erlotinib meist erfolglos (Costa et al., 2008). Neben den TKI hat sich auch der Antikörper Cetuximab erfolgreich in der EGFR-gerichteten Therapie etabliert. Kim et al. zeigten, dass bei einer Resistenz gegenüber Gefitinib durch die Therapie mit Cetuximab und Lapatinib diese Resistenz überwunden werden konnte (Kim et al., 2008). Die Erfolge, die in der Monotherapie des EGFRs erzielt werden, lassen sich durch Kombination von Cetuximab mit den TKI noch steigern. Matar et al. fanden in In-vivo-Experimenten, dass sowohl Cetuximab als auch Gefitinib in sehr hohen Dosen zu einer vorübergehenden Tumorremission der Zellen führen. Durch die kombinierte Gabe beider Präparate erreichten bereits geringere Dosen beider Wirkstoffe eine komplette und dauerhafte Tumorremission (Matar et al., 2004). Huang et al. stellten fest, dass die Kombination von Cetuximab entweder mit Gefitinib oder Erlotinib zu einer stärkeren Hemmung des Tumorwachstums führten als die einzelnen Präparate (Huang et al., 2004). Diese Studien werfen die Frage auf, ob sich die in unseren Ergebnissen gezeigte Wachstumshemmung durch die Kombination von Cetuximab und Radiatio auch durch die Kombination Tyrosinkinase-Inhibitoren und Bestrahlung erreichen lässt. Eine weitere Frage wäre,

ob durch die Dreierkombination das Zellwachstum noch stärkerer als die von uns beschriebene Zweierkombination beeinflusst. Die Beantwortung dieser Fragen bleibt Folgestudien überlassen.

Neben den TKI, die die intrazellulär Signaltransduktion des EGFRs hemmen, gibt es auch die Möglichkeit die extrazelluläre Domäne des EGFRs durch den Antikörper Cetuximab zu blockieren. Perez-Torres et al. konnten zeigen, dass mit dem Antikörper Cetuximab Tumore, die mutiertes EGFR überexprimieren, effektiv therapiert werden können. Diese Untersuchungen erfolgten in Zellkulturen, die L858R/T790M-EGFR exprimieren und gegenüber TKIs resistent sind (Perez-Torres et al., 2006). Cetuximab eignet sich demnach hervorragend sowohl für die Erforschung des EGF-Rezeptors als auch für die EGFR-gerichtete Therapie. Cetuximab besitzt eine höhere Affinität zum EGFR als andere Liganden, wie z.B. der EGF und der Transforming-Growth-Factor (Ma und Hidalgo, 2007). Nordberg et al. konnten zeigen, dass die Bindung von Cetuximab an den EGFR reversibel ist. Das Maximum des Uptake des von ihnen verwendeten <sup>125</sup>I-Cetuximab wurde 4 bis 8 h nach der Inkubation erreicht (Nordberg et al., 2007). Diese 4 bis 8 h sind für Therapiezwecke klinisch von relativ geringer Bedeutung. Aus diesem Grund haben wir den Uptake vor allem in der voraussichtlichen Wirkphase des Antikörpers, dem Zeitraum zwischen 24 und 72 h, bestimmt. Hier konnten wir nachweisen, dass der <sup>131</sup>I-Cetuximab-Uptake in diese Zeit nur gering abnahm und der Antikörper dadurch in der Wirkphase in hoher Konzentration vorliegt.

In unseren Ergebnissen zeigten wir, dass sich bereits gebundenes <sup>131</sup>I-Cetuximab durch kaltes Cetuximab aus der Bindung an den EGFR verdrängen lässt. Durch die Coinkubation mit der 50fachen Menge an kaltem Cetuximab ließ sich der Uptake von <sup>131</sup>I-Cetuximab nach 24 h auf ein Drittel reduzieren. Dies zeigt, dass der Antikörper reversibel an den Rezeptor gebunden ist. Nordberg et al. fanden heraus, dass ein Teil der Antikörper nach dem Binden an den Rezeptor intrazellulär aufgenommen wird (Nordberg et al., 2007). Die intrazelluläre Aufnahme erklärt, warum der <sup>131</sup>I-Cetuximab-Uptake nach der Coinkubation mit dem kalten Antikörper in den ersten 4 h um fast 60 % abnahm. In den Folgenden 20 h wurde der Uptake aber nur noch um weitere 8 % auf ca. ein Drittel des Ausgangswertes reduziert (s. Abb. 12). Da ein Teil des radioaktiv markierten Antikörpers – wie von Nordberg et al. beschrieben – intrazellulär aufgenommen wurde (Nordberg et al., 2007), konnte dieser nicht mehr durch den kalten Antikörper aus der extrazellulären Bindung an den EGFR verdrängt werden. Klinisch stellt diese intrazelluläre <sup>131</sup>I-Cetuximab-Aufnahme ein Problem dar.

Intrazellulär befinden sich Deiodasen, die  $^{131}\text{I}$  vom Antikörper trennen können. Das freie  $^{131}\text{I}$  kann ungehindert aus der Zelle diffundieren. Somit würde die Wirkung des  $^{131}\text{I}$ -Antikörpers im Tumor abnehmen und unerwünschte Wirkungen im Körper durch  $^{131}\text{I}^-$  zunehmen. Die hohen Uptake-Werte, die wir bei späten Messungen hatten, sprechen allerdings gegen eine hohe Internalisierung und Deiodierung von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab.

Durch das Andocken an den EGFR verhindert Cetuximab die Ligandenbindung und bewirkt die Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion (Ciardiello und Ma, 2005). Cetuximab induziert eine down-Regulation des EGFR (Jimeno et al., 2005). In unserer Studie zeigte sich dieser Sachverhalt bei den scheinbestrahlten Zellen (0 Gy) durch eine Abnahme des Uptake nach 72 h, was auch durch die Deiodierung bedingt sein könnte. Dagegen führte eine Bestrahlung von 10 Gy zu einem signifikanten Anstieg des Uptake während des gesamten Messzeitraums. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich eine Strahlentherapie positiv auf eine parallel durchgeführte Immuntherapie mit Cetuximab auswirken sollte. Unsere Ergebnisse geben Hinweise, dass die Strahlentherapie Einfluss auf die EGFR-Expression nimmt. Dies kann durch die vermehrte Neusynthese von EGFR auf mRNA-Ebene geschehen oder durch Translokalisierung präformierter EGF-Rezeptoren aus dem Zytosol, wie 2006 bereits für zelluläre Transporter diskutiert wurde (Meller et al., 2006). Die synergistischen Effekte von einer Bestrahlung mit einer Cetuximab-Therapie wurden von Bonner et al. in einer Studie mit 424 Patienten mit fortgeschrittenen Kopf-Halstumoren klinisch nachgewiesen. Verglichen wurden eine Hochdosis-Strahlentherapie mit einer Hochdosis-Strahlentherapie in Kombination mit einer zusätzlichen wöchentlichen Cetuximab Gabe. Bei den Patienten mit der Kombinationsbehandlung dauerte es im Median 24,4 Monate, bis die Erkrankung sich regional wieder ausbreitete. Diese Patienten hatten eine mediane Überlebenszeit von 49 Monaten. Patienten die eine Monotherapie erhielten, hatten im Median nach nur 14,9 Monate einen Tumorprogress und die Überlebenszeit verringerte sich auf 19,3 Monate (Bonner et al., 2006). Unsere Daten geben Hinweise auf den zugrunde liegenden Mechanismus.

Die Therapie mit Cetuximab wird oft von spezifischen Nebenwirkungen der Haut begleitet. Diese sind selten lebensgefährlich, können aber für den Betroffenen sehr belastend sein. Oft brechen die behandelnden Ärzte die Therapie ab, obwohl mit einer symptomatischen Therapie die Nebenwirkungen gut in den Griff zu bekommen sind. Patienten werden so um eine Therapie gebracht von der sie profitieren könnten

(Eaby et al., 2008). Um in solchen Fällen einen Therapieabbruch zu vermeiden, ist es wichtig, über die Erfolgsaussichten einer Cetuximab-Therapie zu informieren. Wir konnten zeigen, dass sich durch Cetuximab das Zellwachstum in EGFR-überexprimierenden Zellen hemmen lässt. In diesem Zusammenhang ist unsere Untersuchung als ein Beitrag zur Verbreitung des Wissens über die Wirksamkeit einer EGFR-gerichteten Therapie mit dem Antikörper Cetuximab zu sehen. Anstelle des von uns verwendeten  $^{131}\text{I}$  kann Cetuximab auch mit  $^{123}\text{I}$  markiert werden.  $^{131}\text{I}$  und  $^{123}\text{I}$  verhalten sich chemisch identisch. Im Gegensatz zu  $^{131}\text{I}$  ist  $^{123}\text{I}$  als reiner  $\gamma$ -Strahler zur Diagnostik geeignet. Durch die Diagnostik mit  $^{123}\text{I}$ -Cetuximab könnten Responder und Nichtresponder einer Cetuximab-Therapie identifiziert werden und so im Vorfeld einer Cetuximab-Therapie Aussagen über die Erfolgsaussichten gemacht werden.

Es wurden aber auch schon schwere Nebenwirkungen aufgrund einer Cetuximab-Therapie beschrieben. Krishnan et al. beschrieben ein Cetuximab assoziiertes Tumor-Lyse-Syndrom (Krishnan et al., 2008) und Lin et al. berichteten von einer tödlichen toxischen Hautnekrose infolge einer Cetuximab-Therapie (Lin et al., 2008). Multimodale Therapieregime können helfen, die Toxizität der einzelnen Komponenten zu reduzieren, ohne das dabei die Wirkung im Tumor verringert wird. Eine solche mögliche Kombination ist die auch von uns erforschte Kombination aus dem Antikörper Cetuximab und einer Bestrahlung. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Tumoren durch die Kombination von Strahlentherapie mit Cetuximab gegenüber der jeweiligen Monotherapie verbessert werden konnte (Raben et al., 2005; Bonner et al., 2006; Diaz Miqueli et al., 2009) und zwar ohne Zunahme der Nebenwirkungen (Bonner et al., 2006). Dies sind Hinweise auf die Überlegenheit der multimodalen Therapie gegenüber den Monotherapien. Wir konnten durch unsere Ergebnisse bestätigen, dass die Kombination aus Bestrahlung und Cetuximab das Zellwachstum stärker hemmt als die jeweilige Monotherapie.

### **4.3 EGFR-vermittelte Bestrahlungsresistenzen**

Bei einigen Tumoren hat man das Problem, dass eine Strahlentherapie nicht den gewünschten Erfolg erbringt. Die Gründe für das schlechte Ansprechen einer Strahlentherapie können in Resistenzmechanismen der Tumorzellen liegen. Auch dem EGFR wird dabei eine Rolle zugeschrieben. Das Wachstum klonogener

Tumorzellen im Verlauf einer Radiatio ist ein Mechanismus der Resistenzentwicklung (Withers et al., 1988). Schmidt-Ulrich et al. haben gezeigt, dass bei Zellen, die eine Radiatio überlebten, eine Vermehrung des EGF-Rezeptors bis auf das neunfache stattgefunden hatte (Schmidt-Ulrich et al., 1994). Diese Ergebnisse fanden wir über einen vermehrte Bindung des Antikörpers nach Radiatio bestätigt. Viele Untersuchungen liefern Hinweise, dass der EGFR radioprotektive Wirkung besitzt (Akimoto et al., 1999; Raben et al., 2005; Bonner et al., 2006). Der EGFR kann gut zur Ermittlung der Prognose einer Strahlentherapie für Tumore im Kopf- Halsbereich herangezogen werden. Dabei ist eine hohe EGFR-Expression mit einer schlechteren Prognose verbunden als eine niedrige EGFR-Expression (Ang et al., 2002; Psyrri et al., 2005). Für die EGFR-vermittelte Strahlenresistenz wurden verschiedene Ursachen festgestellt. Ionisierende Strahlung führt zu einer Phosphorylierung und damit zu einer Aktivierung des EGFRs. Diese Phosphorylierung erfolgt ligandenunabhängig (Schmidt-Ulrich et al., 1997). Bandyopadhyay et al. fanden heraus, dass der EGFR über DNS-Proteinkinasen einen direkten Einfluss auf die Reparatur der DNS nimmt (Bandyopadhyay et al., 1998). Der aktivierte EGFR blockiert apoptotisch wirkende Signalkaskaden und schützt die Zelle dadurch vor Apoptose (Zhan und Han, 2004; Toulany et al., 2005). Diese EGFR-vermittelten Strahlentherapieresistenzen machen ihn zu einem wichtigen Angriffsziel in multimodalen Therapiekonzepten. Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass die Kombination aus Cetuximab und Radiatio das Zellwachstum stärker hemmt als die Bestrahlung alleine. Diese Effekte sind noch stärker ausgeprägt, wenn man statt dem kalten Antikörper den heißen Antikörper  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab verwendet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich mit  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab die EGFR-vermittelten Resistenzmechanismen der Strahlentherapie noch effektiver überwinden lassen als mit dem kalten Antikörper und dies bereits mit geringer Strahlendosis von  $< 1$  Gy in vitro.

#### **4.4 Multimodale Therapie**

Eine gute Möglichkeit, den EGFR selektiv zu blockieren und damit auch die Induktion von Resistenzmechanismen zu verhindern, ist der von uns erforschte monoklonale Antikörper Cetuximab. So könnten Patienten, die bisher eine schlechte Prognose hatten, von der Kombination aus Radiatio und einer EGFR-gerichteten Therapie mit Cetuximab profitieren. Dass die Therapie mit Cetuximab zu einer Radiosensitivierung

der Zellen führen kann, wurde bereits in einigen anderen In-vitro-Experimenten nachgewiesen (Bonner et al., 1994; Huang et al., 1999; Saleh et al., 1999; Bonner et al., 2000). Einen Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und dem Zellwachstum, wie er bei unseren Untersuchungen gefunden wurde, ist in diesen Studien nicht erforscht. Wir konnten zeigen, dass bei gleicher Antikörpermenge eine Strahlenintensität von 10 Gy – wie zu erwarten – das Zellwachstum signifikant stärker hemmt als 4 Gy. Das gleiche traf auch auf die nur bestrahlten Zellen zu. Auch klinisch konnten Bonner et al. durch die Kombination von Bestrahlung und einer Cetuximab-Therapie eine Reduktion der Sterblichkeit bei Patienten mit vorgeschrittenem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich erzielen. Dabei konnte keine Zunahme der bestrahlungs-assoziierten Nebenwirkungen nachgewiesen werden (Bonner et al., 2006). Beim nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom wurden In-vitro-Untersuchungen durchgeführt, in denen die Therapie mit Cetuximab alleine oder in Kombination mit Bestrahlung und Chemotherapie (Cisplatin und Paclitaxel) untersucht wurde. Entsprechend unserer Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination von Cetuximab mit Radiatio das Zellwachstum besser hemmt als die jeweilige Monotherapie. Die Kombination aller drei Therapieoptionen ergab gegenüber der Zweierkombination keinen Vorteil (Raben et al., 2005). Bei Glioblastomen im Mausmodell bewirkte Cetuximab eine Radiosensitivierung der Tumorzellen. Die Kombination der beiden Therapiemodalitäten war den jeweiligen Monotherapien überlegen (Diaz Miqueli et al., 2009). Des Weiteren führen eine Therapie mit Cetuximab und eine Radiatio dazu, dass sich vermehrt Tumorzellen in einer strahlensensiblen Phase des Zellzyklus befinden. Zusätzlich bewirkt Cetuximab eine Hemmung der zellulären Reparaturvorgänge, die nach einer Bestrahlung stattfinden (Huang und Harari, 2000).

Die oben beschriebenen Ergebnisse, die eine stärkere Wachstumshemmung der Kombination aus Bestrahlung und Cetuximab beschreiben, konnten wir also auch in unseren Untersuchungen bestätigen. So betrug die Zellzahl der mit 10 Gy bestrahlten Zellen nach 72 h noch mehr als 60 % des 24 h Referenzwertes. Bei den mit 10 Gy bestrahlten und mit  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab inkubierten Zellen reduzierte sich die Zellzahl nach 72 h auf weniger als 30 % des 24 h-Referenzwertes (s. Abb. 9). Zusätzlich sahen wir, dass durch die Erhöhung der Bestrahlungsintensität auch der  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake zunahm. Darüber hinaus ist in unseren Ergebnissen eine Abhängigkeit zwischen der Strahlendosis und dem  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake zu erkennen. Dabei war der Uptake pro Zelle der mit 10 Gy bestrahlten Zellen nach 72 h

mehr als doppelt so hoch wie der Uptake der nicht bestrahlten Zellen. Somit hat sich vermutlich auch die Anzahl der EGF-Rezeptoren pro Zelle mehr als verdoppelt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass nur Zellen die den EGFR viel exprimieren die Bestrahlung überlebt haben. Die Zunahme des  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake könnte aber auch mit der De-novo-Synthese von EGFR auf mRNA-Ebene erklärt werden. Die Translokalisierung präformierter Rezeptoren hätte vor allem in der Frühphase nach der Bestrahlung stattgefunden. Aus unseren Ergebnissen kann man ableiten, dass es vor allem bei hohen Strahlendosen wichtig ist, die EGFR-vermittelten Resistenzmechanismen zu blockieren.

Ahsan et al. fanden heraus, dass es eine Aufgabe des EGFR ist, ruhende Zellen in die Synthese-Phase des Zellzyklus (s. Abb. 1) zu bringen. Diese Signalkaskade kann auch durch EGFR-Inhibitoren blockiert werden, so dass ein Teil der Zellen in der strahlenresistenteren Ruhephase bleibt (Ahsan et al., 2009). Wie wir in unseren Ergebnissen zeigen konnten sind die zytotoxischen Wirkungen der multimodalen Therapie stärker als die alleinige Radiatio. Aus diesem Grund sollte auf die Cetuximab Gabe zusätzlich zur Strahlentherapie nicht verzichtet werden, sofern eine EGFR-Überexpression vorliegt. Auch Ahsan et al. sehen die Vorteile der multimodalen Therapie und schlagen vor, EGFR-Inhibitoren wie z.B Cetuximab nicht vor Beginn der Bestrahlung zu geben (Ahsan et al., 2009). Unsere Ergebnisse sprechen dafür die Cetuximab-Therapie parallel oder kurz nach Beginn der Strahlentherapie durchzuführen. Dies deckt sich auch mit den Untersuchungen von Ahsan et al..

#### **4.5 Radioaktiv markierter Antikörper**

Im Vorfeld dieser Arbeit stellte sich die Frage nach dem passenden Isotop für die radioaktive Antikörpermarkierung. Neben den pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Cetuximab spielte auch die technische Realisierbarkeit der Antikörpermarkierung eine Rolle. Hierbei sollte auch die Möglichkeit berücksichtigt werden, den Antikörper später am Patienten einsetzen zu können. Betrachtet man die pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Cetuximab, so muss der radioaktiv markierte Antikörper wenigstens für 48-72 h stabil sein, um sich im Tumor anzureichern und an die EGF-Rezeptoren binden zu können. Das relativ hohe molekulare Gewicht von Cetuximab erlaubt keine schnelle Penetration in das Tumorgewebe. Die radioaktive Markierung

von EGFR-Antikörpern wurde bereits mit  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  durchgeführt (Meenakshi et al., 2003; Reilly et al., 2004; Velikyan et al., 2005; Nordberg et al., 2007; Ping et al., 2008). Diese Isotope sind, im Gegensatz zu dem von uns verwendeten  $^{131}\text{I}$ , nur zur Diagnostik geeignet. Weiterhin wäre die Halbwertszeit von  $^{68}\text{Ga}$  (68 min) und  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (6 h) zu kurz, um Untersuchungszeiträume von 72 h zu erreichen. Eine mögliche Option wären  $^{64}\text{Cu}$  mit einer Halbwertszeit von 12,7 h oder  $^{111}\text{In}$  mit einer Halbwertszeit von 72 h. Auch  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-Cetuximab als Positronen-Emissions-Tomography (PET)-Tracer könnte geeignet sein EGFR-positive Tumore zu erkennen (Ping et al., 2008).  $^{68}\text{Ga}$  ist ebenfalls für PET-Untersuchungen geeignet. Hier stellt sich jedoch die Frage, ob die Antikörper-Kinetik schnell genug ist. Die Halbwertszeit des reinen  $\gamma$ -Emitters  $^{123}\text{I}$  (13,2 h) scheint ebenfalls lange genug zu sein, um die vorgegebene Stabilität zu erreichen. Bei  $^{125}\text{I}$  wäre die Halbwertszeit von 59,4 Tagen lange genug um die vorgegebene Stabilität zu erreichen, aber für den Einsatz am Patienten ist eine Halbwertszeit von 59,4 Tagen wiederum zu lange. Weiterhin hat die  $\gamma$ -Strahlung von  $^{125}\text{I}$  eine zu geringe Energie für die molekulare Bildgebung. Gegenüber  $^{64}\text{Cu}$  und  $^{111}\text{In}$  haben  $^{123}\text{I}$  und  $^{125}\text{I}$  den Vorteil, dass die radioaktive Markierung einfach ist und es bei Cetuximab keine relevanten chemischen Modifikationen erfordert. Chemische Modifikationen bergen immer das Risiko, die pharmakokinetischen Eigenschaften des Antikörpers zu verändern. Die chemische Analogie der Iod-Isotope erlaubt die Verwendung des weniger teuren  $^{131}\text{I}$  ( $\beta^-$ - und  $\gamma$ -Emitter), um das zusätzlich zytotoxische Potential des radioaktiv markierten Antikörpers zu untersuchen. Diese Untersuchung ergab, dass es möglich ist, über den Zeitraum von 72 h und länger stabiles  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab herzustellen. Diese Zeit wäre ausreichend, dass sich der Antikörper mit dem an ihn gebundenen  $^{131}\text{I}$  in den tieferen Regionen des Tumors anreichert. So könnte  $^{131}\text{I}$  dort die zytotoxischen Eigenschaften des Antikörpers verstärken.  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab könnte für die Therapie und  $^{123}\text{I}$ -Cetuximab für die Diagnostik von Bedeutung sein. Des Weiteren könnte molekulare Bildgebung helfen, Patienten herauszufiltern, die von einer Cetuximab-Therapie profitieren würden. So gibt es Patienten mit immunhistochemisch EGFR-negativem kolorektalem Karzinom, die trotzdem ein Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab zeigen (Chung et al., 2005). Diese Patienten werden mit den herkömmlichen Methoden zur EGFR-Status-Bestimmung nicht erfasst. Hier könnte die molekulare Bildgebung von Vorteil sein. Durch sie könnte man eine Ganzkörperdarstellung sämtlicher Tumorlokalisationen

und dem jeweiligen Rezeptorstatus bestimmen. Demgegenüber hat eine Biopsie den Nachteil, dass hier im Regelfall nur eine Tumorlokalisation und auch nur ein kleiner Teil dieser untersucht wird. Bei inhomogener Rezeptorverteilung können hierdurch Nachteile für die Patienten entstehen. Weiterhin stellt die Biopsie eines Tumors eine invasive Maßnahme dar, die mit der Gefahr der Verschleppung von Tumorzellen verbunden ist. Durch molekulare Bildgebung könnte dies vermieden werden. Vor allem für Patienten mit einem palliativen Therapieansatz könnte dies einen Gewinn an Lebensqualität bedeuten. Hier könnte die molekulare Bildgebung mit  $^{123}\text{I}$ -Cetuximab als reinen  $\gamma$ -Emitter einen wertvollen Beitrag leisten, um diesen Patienten den Zugang zu einer wirksamen Therapie zu ermöglichen. Eine wirkungsvolle Therapie setzt normalerweise eine Anreicherung des Therapeutikums an die Zielstrukturen voraussetzt. Auf der anderen Seite könnte man auch Patienten identifizieren, die nicht auf eine Therapie mit Cetuximab ansprechen. Hier könnte die molekulare Bildgebung dazu beitragen, den Kranken die Nebenwirkungen einer Cetuximab-Therapie zu ersparen, sie anderen Therapieformen zuzuführen und auf der anderen Seite unnötige Kosten zu senken.

Ein zweites wichtiges Ergebnis dieser Untersuchung ist die Entdeckung, dass  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab die Resultate einer Bestrahlung mehr verstärkt als nicht markiertes Cetuximab. Das kann zum Teil damit erklärt werden, dass externe Bestrahlung den Uptake von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab zu erhöhen scheint (s. Abb. 9), ist aber sicherlich auch ein Resultat der Bestrahlung der Zellen im Rahmen der „Radioimmuntherapie“. Diese Erkenntnisse legen nahe, radioiodiertes Cetuximab sowohl für diagnostische als auch therapeutische Zwecke einzusetzen, was zuvor noch nicht gezeigt werden konnte.

#### **4.6 EGFR-gerichtete Therapie beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC)**

Bei kurativen Therapieansätzen steht beim nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) die chirurgische Therapie im Vordergrund. Allerdings sind fast 75 % der Patienten bei Diagnosestellung inoperabel (Gerber et al., 2008). Für diese Patienten werden alternative Therapieoptionen erforscht. Der EGFR wird in 80 % der NSCLC überexprimiert (Raben et al., 2005). Aus diesem Grund lohnt es sich die EGFR-gerichtete Therapie beim NSCLC zu erforschen. Cappuzzo et al. berichteten, dass sich für Patienten mit EGFR-positive fortgeschrittenem NSCLC die mit dem

Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Gefitinib behandelt wurden die Prognose verbesserte. Sie konnten zeigen das durch Gefitinib die Kontrolle der Erkrankung, die Zeit bis zur Tumorprogression und die Überlebenszeit verbessert wurden (Cappuzzo et al., 2005). Pirker et al. verglichen bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC Chemotherapie (Cisplatin) als Monotherapie mit der Kombination aus Chemotherapie und Cetuximab. Sie konnten eine Verlängerung der Überlebenszeit bei der Gruppe mit Kombinationsbehandlung feststellen (Pirker et al., 2009). Es besteht auch die Möglichkeit beim NSCLC Cetuximab mit Bestrahlung zu kombinieren. Hier zeigte sich, dass die Kombination der jeweiligen Monotherapie überlegen ist (Raben et al., 2005). Auch wir konnten in unserer Untersuchung den Vorteil der multimodalen Therapie mit Radiatio und Cetuximab gegenüber der Monotherapie zeigen. Aufgrund unserer Ergebnisse ist eine Folgestudie bei Patienten EGFR-positivem NSCLC und Hirnmetastasen geplant. Erste Ergebnisse – die nicht Teil dieser Arbeit waren – sind der Vollständigkeit halber kurz im Annex zu dieser Arbeit dargestellt. Parallel zur sonst alleinigen Bestrahlung des ganzen Kopfes soll eine Cetuximab-Therapie durchgeführt werden. Wir hoffen das unsere Studie eine direkten Beitrag leisten kann die Prognose dieser Patienten zu verbessern.

## 5. Zusammenfassung

Die Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-(EGFR)-Überexpression maligner Tumore ist meist mit einem schlechten Ansprechen auf eine Strahlentherapie und mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert. Seit wenigen Jahren besteht nun die Möglichkeit einer EGFR-gerichteten Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab. Ziel dieser Arbeit war es zunächst, einen möglichen radioaktiven Tracer zur Diagnostik EGFR-positiver Tumore zu entwickeln. Weiterhin wollten wir den Einfluss einer externen Radiatio auf die Bindung von Cetuximab im Rahmen einer multimodalen Therapie in vitro untersuchen.

Hierfür wurden drei Zelllinien eingesetzt. Bei einer dieser Linien ist eine EGFR-Überexpression, bei einer weiteren eine HER2-Überexpression bekannt. Die dritte Zelllinie exprimiert keinen Rezeptor der c-erbB-Familie. Für die In-vitro-Untersuchungen wurden Cetuximab mit  $^{131}\text{I}$  radioaktiv markiert und die Stabilität wurde über 72 h bestimmt. Die Inkubation der Zellkulturen – ohne und nach externer Radiatio – erfolgte bis zu 72 h mit  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab und/oder „kaltem“ Antikörper. Uptake und Zellwachstum wurden alle 24 h bestimmt.

Die radiochemische Markierung gelang mit hoher Ausbeute und Stabilität. Der  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake war bei den EGFR-überexprimierenden Zellen über 50fach höher als bei beiden Kontrollzelllinien und hemmte das Zellwachstum signifikant. Bestrahlung und Coinkubation mit dem Antikörper führte zu einer stärkeren Wachstumshemmung dieser Zellen als die Bestrahlung alleine. Diese Effekte waren bei der Verwendung von  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab stärker ausgeprägt als bei Gabe des „kalten“ Antikörpers. Im Vergleich zu den scheinbestrahlten (0 Gy) Zellen erhöhte sich der  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab-Uptake signifikant und dosisabhängig.

$^{131}\text{I}$ -Cetuximab ließ sich in hoher Ausbeute, Reinheit und Stabilität herstellen. In vitro ist die Bindung und Wirkung des Antikörpers abhängig von der EGFR-Expression. Die externe Radiatio führte in EGFR-überexprimierenden Zellen zu einem vermehrten Antikörper-Uptake und Wachstumshemmung. Durch diesen synergistischen Effekt eignet sich die zeitnahe Kombination sehr gut zur Behandlung EGFR-positiver Tumore. Zusätzlich ist  $^{131}\text{I}$ -Cetuximab ein potentiell Radioimmuntherapeutikum. Diese Daten konnten bereits publiziert werden (Rades et al.).

Mit  $^{123}\text{I}$  ( $\gamma$ -Strahler) markiert eignet sich Cetuximab für die nicht invasive Diagnostik des EGFR-Status vor Therapie. Entsprechende In-vivo-Untersuchungen wurden mittlerweile begonnen (s. 10. Annex).

## 6. Literaturverzeichnis

Ahsan A, Hiniker SM, Davis MA, Lawrence TS, Nyati MK: Role of Cell Cycle in Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor-Mediated Radiosensitization. *Cancer Res.* 6, 5108-14 (2009)

Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L: Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murin carcinomas. *Clin Cancer Res.* 5, 2884-90 (1999)

Ang KK, Berky BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L: Impact of epidermal growth factor receptor expression and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 62, 7350-6 (2002)

Ardavanis A, Koumna S, Fragos I, Malliou S, Kyriakou F, Mantzaris I, Scorilas A, Rigatos G: Erlotinib monotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer: an effective approach with low toxicity. *Anticancer Res.* 28, 2409-15 (2008)

Bandyopadhyay D, Mandal M, Adam L, Mendelsohn J, Kumar R: Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J Biol Chem.* 273, 1568-73 (1998)

Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortés-Funes H, Hitt R, Gascón P, Amellal N, Harstrick A, Eckardt A: Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 23, 5568-77 (2005)

Blick SK, Scott LJ: Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs.* 67, 2585-607 (2007)

Böcker W, Kleihues P, Höfler H K, Lax S, Poremba C, Moll R: Allgemeine Tumoralogie

In: Böcker W, Denk H, Heitz P U: Pathologie  
3.Auflage, 169-195, Urban & Fischer, 2004

Bonasera TA, Ortu G, Rozen Y, Kraiss R, Freedman NM, Chisin R, Gazit A, Levitzki A, Mishani E : Potential (18)F-labeled biomarkers for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Nucl Med Biol.* 28, 359-74 (2001)

Bonfil RD, Russo DM, Schmilovich AJ, Garcia-Palazzo IB: Intravesical therapy with vinorelbine tartrate: antitumor activity in orthotopic murine cell carcinoma of the bladder. *J Urol.* 158, 912-5 (1997)

Bonner JA, Maihle NJ, Folven BR, Christianson TJ, Spain K: The interaction of epidermal growth factor and radiation in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines with vastly different radiosensitivities. *Int J Radiation Oncology Biol Phys.* 29, 243-7 (1994)

Bonner JA, Raisch KP, Trummell HQ, Robert F, Meredith RF, Spencer SA, Buchsbaum DJ, Saleh MN, Stackhouse MA, LoBuglio AF, Peters GE, Carroll WR, Waksal HW. Enhanced apoptosis with combination C225/radiation treatment serves as the impetus for clinical investigation in head and neck cancers. *J Clin Oncol.* 18, 47-53 (2000)

Bonner JA, Buchsbaum DJ, Russo SM, Fiveash JB, Trummell HQ, Curiel DT, Raisch KP: Anti-EGFR-mediated radiosensitization as a Result of augmented EGFR expression. *Int J Radiation Oncology Biol. Phys.* 59, 2-10 (2004)

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones Cu, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 345, 567-78 (2006)

Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick GE, Ellis LM: Molecular Mechanisms of Resistance to Therapies Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *Clin Cancer Res.* 11, 397-405 (2005)

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witta S, Dannenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoin A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella- Garcia M: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 97, 643-55 (2005)

Chen P, Cameron R, Wang J, Vallis KA, Reilly RM: Antitumor Effects and Normal Tissue Toxicity of <sup>111</sup>In-Labels Epidermal Growth factor Administered to Athymic Mice Bearing Epidermal Growth Factor Receptor –Positive Human Breast Cancer Xenografts. *J Nucl Med.* 44, 1469-78 (2003)

Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Jarrett C, Carter J, Murphy Ba, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR: Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 24, 4170-6 (2006)

Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB: Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol.* 23, 1803-10 (2005)

Ciaridiello F, Ma B: EGF-Rezeptorblockade mit monoklonalen Antikörpern und so genannten „small molecules“. *Onkologie* 28, 18-24 (2005)

Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, Yeap BY, Halmos B, Kim JH, Jänne PA, Huberman MS, Pao W, Tenen DG, Kobayashi S: Effects of erlotinib in EGFR mutated non-small cell lung cancer with resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res.* 14, 7060-7 (2008)

Cuartero-Plaza A, Martínez-Miralles E, Rosell R, Vadell-Nadal C, Farré M, Real FX: Radiolocalization of Squamous Lung Carcinoma with <sup>131</sup>I-labeled Epidermal Growth Factor. *Clin Cancer Res.* 2, 13-20 (1996)

Diaz Miqueli A, Rolff J, Lemm M, Fichtner I, Perez R, Montero E: Radiosensitisation of U87MG brain tumours by antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Br J Cancer*. 100, 950-8 (2009)

Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM: Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 83, 97-104 (1991)

Dominguez M, Wasserman JD, Freeman M: Multiple functions of the EGF receptor in *Drosophila* eye development. *Curr Biol*. 8, 1039-48 (1998)

Eaby B, Culkun A, Lacouture ME: An interdisciplinary consensus on managing skin reactions associated with human epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin J Oncol Nurs*. 12, 283-90 (2008)

Ebi N, Semba H, Tokunaga SJ, Takayama K, Wataya H, Kuraki T, Yamamoto H, Akamine SJ, Okamoto I, Nakanishi Y; Lung Oncology Group in Kyushu, Japan: A phase II trial of gefitinib monotherapy in chemotherapy-naive patients of 75 years or older with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 3, 1166-71 (2008)

Ferguson KM: Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys*. 37, 353-73 (2008)

Ford AC, Grandis JR: Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck*. 25, 67-73 (2003)

Gebbia V, Giuliani F, Valori VM, Agueli R, Colucci G, Maiello E: Cetuximab in squamous cell head and neck carcinomas. *Ann Oncol*. 18, 5-7 (2007)

Gerber DE: EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Smal Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res*. 69, 359-372 (2008)

Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 51, 1417-23 (1973)

Goldenberg A, Masui H, Divgi C, Kamrath H, Pentlow K, Mendelsohn J: Imaging of human tumor xenografts with an indium-111 labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *J Natl Cancer Inst.* 81, 1616-25 (1989)

Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, Coldren C, Barón A, Zeng C, Franklin WA, Hirsch FR, Gazdar A, Minna, J Bunn PA Jr.: Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD 1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gen copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin. Cancer Res.* 12, 7117-25 (2006)

Herbst RS: Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 59, 21-6 (2004)

Herold G: Internistische Tumorthherapie

In: Herold G: Innere Medizin

Jahrgang 2006, 91-98 Herausgeber: Dr. med. Gerd Herold, Bernhard-Falk-Str. 27, 50737 Köln

Huang SM, Bock JM, Harari PM: Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 59, 1935-40 (1999)

Huang SM, Harari PM: Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 6, 2166-74 (2000)

Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM: Dual-Agent Molecular Targeting of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *Cancer Res.* 64, 5355-5362 (2004)

Jimeno A, Rubio-Vequeira B, Amador ML, Oppenheimer D, Bouraoud N, Kulesza P, Sebastiani V, Maitra A, Hidalgo M: Epidermal Growth Factor Receptor Dynamics Influence Response to Epidermal growth Factor Receptor Targeted Agends. *Cancer Res.* 15, 3003-3010 (2005)

Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au, HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ: Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 357, 2040-8 (2007)

Kies MS, Harari PM: Cetuximab (ImClone/Merck/Bristol-Myers Squibb). *Curr Opin Investig Drugs.* 3, 1092-100 (2002)

Kim HP, Han SW, Kim SH, Im SA, Oh DY, Bang YJ, Kim TY: Combined lapatinib and cetuximab enhance cytotoxicity against gefitinib-resistant lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 7, 607-15 (2008)

Köhler G: The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1984. Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *Scand J Immunol.* 37, 117-29 (1993)

Kondo I, Shimizu N: Mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the q13 leads to q22 region of chromosome 7. *Cytogenet cell Genet.* 35, 9-14 (1983)

Krishnan G, D'Silva K Al-Janadi A: Cetuximab-related tumor lysis syndrome in metastatic colon carcinoma. *J Clin Oncol.* 26, 2406-8 (2008)

Lin WL, Lin WC, Yang JY, Chang YC, Ho HC, Yang LC, Yang CH, Hung SI, Chung WH: Fatal toxic epidermal necrolysis associated with cetuximab in a patient with colon cancer. *J Clin Oncol.* 26, 2779-80 (2008)

Ma WW, Hidalgo: Exploiting novel molecular targets in gastrointestinal cancers. *World J Gastroenterol.* 13, 5845-5856 (2007)

Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, Guzmán M, Rodríguez S, Arribas J, Palacios J, Baselga J: Combined epidermal growth factor receptor targeting with tyrosin kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res.* 10, 6487-501 (2004)

Meenakshi A, Ganesh v, Suresh Kumar S, Siva Kumar N: Radioimmuno targetting (99m)technetium labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in exoerimental tumor models. *Q J Nucl Med.* 47, 139-44 (2002)

Meller B, Deisting W, Wenzel BE, Pethe A, Nadrowitz R, Meller J, Richter E, Baehre M: Increased Radioiodine Uptake of Thyroid Cell Cultures after External Irradiation. *Strahlenther Onkol* 182, 30-6 (2006)

Meller B, Meller J: Aspekte der Strahlenbiologie, Radiochemie und des Strahlenschutz bei der Radioimmuntherapie (RAIT)

In: Trümper L: Radioimmuntherapie in der Hämatologie und Onkologie

1.Aufl., 32-53, UNI-MED Science, Bremen, 2007

Milstein C: The Nobel Lectures in Immunology. Lecture for the Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1984. from the structure of antibodies to the diversification of the immune response. *Scand J Immunol.* 37, 385-98 (1993)

Nissim A, Chernajovsky Y: Historical development of monoclonal antibody therapeutics. *Handb Exp Pharmacol.* 3-18 (2008)

Nordberg E, Friedman M, Göstring L, Adams GP, Brismar H, Nilsson FY, Ståhl S, Glimelius B, Carlsson J: Cellular studdies of binding, internalization and retention of radiolabeled EGFR-binding affibody molecule. *Nucl Med Biol.* 34, 609-18 (2007)

Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Cortenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS: Epidermal Growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene.* 366, 2-16 (2006)

Pal A, Glekas A, Doubrovin M, Balatoni J, Namavari M, Beresten T, Maxwell D, Soghomonyan S, Shavrin A, Ageyeva L, Finn R, Larson SM, Bornmann W, Gelovani JG: Molecular imaging of EGFR kinase activity in tumors with <sup>124</sup>I-labeled small molecular tracer and positron emission tomography. *Mol imaging Biol.* 8, 262-77 (2006)

Perez-Torres M, Guix M, Gonzales A, Arteaga CL: Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody downregulates mutant receptors and inhibits tumors expressing EGFR mutations. *J Biol Chem.* 281, 40183-92 (2006)

Ping Li W, Meyer LA, Capretto DA, Sherman CD, Anderson CJ: Receptor-binding, biodistribution, and metabolism studies of <sup>64</sup>Cu-DOTA-cetuximab, a PET-imaging agent for epidermal growth-factor receptor-positive tumors. *Cancer Biother Radiopharm.* 23, 158-71 (2008)

Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Vynnychenko I, Park K, Yu CT, Ganul V, Roh JK, Bajetta E, O'Byrne K, de Marinis F, Eberhardt W, Goddemeier T, Emig M, Gatzemeier U, FLEX Study Team: Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet.* 373, 1525-31 (2009)

Pryczynicz A, Guzińska-Ustymowicz K, Kemon A, Czyżewska J: Expression of EGF and EGFR strongly correlates with metastasis of pancreatic ductal carcinoma. *Anticancer Res.* 28, 1399-404 (2008)

Psyrrri A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burness BA: Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res.* 11, 5856-62 (2005)

Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Barón AE, Zeng C, Johnson TK, Bunn PA Jr.: The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and /or chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 11, 795-805 (2005)

Reilly RM, Scollard DA, Wang J, Mondal H, Chen P, Henderson LA, Bowen BM, Vallis KA: A kit formulated under good manufacturing practices for labeling human epidermal growth factor with <sup>111</sup>In for radiotherapeutic applications. *J Nucl Med.* 45, 7001-8 (2004)

Saleh MN, Raisch KP, Stackhouse MA, Grizzle WE, Bonner JA, Mayo MS, Kim HG, Meredith RF, Wheeler RH, Buchsbaum DJ: Combined modality therapy of A431 human epidermoid cancer using anti-EGFR antibody C225 and radiation. *Cancer Biother Radiopharm.* 14, 451-63 (1999)

Schmidt-Ulrich RK, Valerie KC, Chan W, McWilliams D: Altered expression of epidermal growth factor receptor and estrogen receptor in MCF-7 cells after single and repeated radiation exposures. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 29, 813-9 (1994)

Schmidt-Ulrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD, Contessa JN, Rorrer WK, Chen PB: Radiation induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene.* 15, 1191-7 (1997)

Schulz-Ertner D und Karger C: Strahlentherapie

In: Reiser M, Kuhn F P, Debus J: Radiologie

1.Aufl., 97-106, Thieme, Stuttgart, 2004

Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Jänne PA, Joshi VA, McCollum D, Evans TL, Muzikansky A, Kuhlmann GL, Han M, Goldberg JS, Settleman J, Iafrate AJ, Engelman JA, Haber DA, Johnson BE, Lynch TJ : First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 26, 2442-9 (2008)

Siberil S, Dutertre CA, Boix C, Teillaud JL: Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique: un peu d'histoire, beaucoup d'ingénierie et ... quelques succès cliniques. *Transfusion Clin Biol.* 12, 114-22 (2005)

Su H, Seimbille Y, Ferl GZ, Bodenstern C, Fueger B, Kim KJ, Hsu YT, Dubinett SM, Phleps ME, Czernin J, Weber WA: Evaluation of [(18)F]gefitinib as a molecular imaging probe for the assessment of the epidermal growth factor receptor status in malignant tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 35, 1089-99 (2008)

Tabernero J, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, André T, Van Laethem JL, Soulié P, Casado E, Verslype C, Valera JS, Tortora G, Ciardiello F, Kisker O, de Garmont A: Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 25, 5225-32 (2007)

Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J: Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 3, 1585-92 (2004)

Toulany M, Dittmann K, Krüger M, Baumann M, Rodemann HP: Radioresistance of K-Ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway. *Radiother Oncol*. 76, 143-50 (2005)

Velikyan I, Sundberg AL, Lindhe O, Höglund AU, Eriksson O, Werner E, Carlsson J, Bergström M, Långström B, Tolmachev V: Preparation and evaluation of (68)Ga-DOTA-hEGF for visualization of EGFR expression in malignant tumors. *J Nucl Med*. 46, 1881-8 (2005)

Waldmann A: Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med*. 9, 269-77 (2003)

Webb SE, Roberts SK, Needham SR, Tynan CJ, Rolfe DJ, Winn MD, Clarke DT, Barraclough R, Martin-Fernandez ML: Single-molecule imaging and fluorescence lifetime imaging microscopy show different structures for high- and low-affinity epidermal growth factor receptors in A431 cells. *Biophys J*. 94, 803-19 (2008)

Wen X, Wu QP, Lu Y, Fan Z, Charnsangavej C, Wallace S, Chow D, Li C: Poly(ethylene glycol)-conjugated anti-EGF receptor antibody C225 with radiometal chelator attached to the termini of polymer chains. *Bioconjug Chem*. 12, 545-53 (2001)

Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B: The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.* 27, 131-46 (1988)

Wrann MM, Fox CF: Identification of epidermal growth factor receptors in a hyperproducing human epidermoid carcinoma cell line. *J Biol Chem.* 254, 8083-6 (1973)

Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, Needle M, Abbruzzese JL: Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial: *J Clin Oncol.* 22, 2610-6 (2004)

Yang W, Barth RF, Leveille R, Adams DM, Ciesielski M, Fenstermaker RA, Capala J: Evaluation of systemically administered radiolabeled epidermal growth factor as a brain tumor targeting agent. *J Neurooncol.* 55, 19-28 (2001)

Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer, signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 37, 3-8 (2001)

Zhan M, Ham ZC: Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation response. *Histol Histopathol.* 19, 915-23 (2008)

## 7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD. Dr. Birgit Meller für ihre exzellente Betreuung mit ihren Antworten auf meine vielen Fragen und ihre ständige Hilfsbereitschaft. Sie stand mir persönlich immer zur Seite, wenn Probleme bei den Versuchen oder beim Schreiben aufkamen.

Dankeschön auch an den ehemaligen Leiter der Nuklearmedizin Prof. Dr. Manfred Bähre für die Bereitstellung der Materialien und den Arbeitsplatz im Labor.

Auch einen herzlichen Dank an die Mitarbeiter in der Nuklearmedizin, für die Geduld und Rücksichtnahme auf uns Doktoranden, die wir zeitweise zu viert im Labor beschäftigt waren.

Wibke Deisting danke für die gute Einarbeitung und Christian Breunig für die Unterstützung bei den Experimenten. Da beide ähnlich wie ich mit Zellkulturen gearbeitet hatten war ihre Erfahrung unersetzlich.

Ich möchte auch Herrn Roger Nadrowitz für seine Zeit danken, die er geopfert hat um die Zellkulturen zu bestrahlen.

Ein herzlicher Dank auch an die Mitdoktoranden Christiane, Christina und Marcus für die gegenseitige Rücksichtnahme im Labor, auch wenn es dort zu viert manchmal doch recht anstrengend war.

Vielen Dank natürlich auch an meine Familie und alle Freunde, die sich immer nach meiner Arbeit erkundigt haben und die mich jederzeit beim Vorankommen mit dieser Arbeit unterstützt haben.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Christian Wolff

Geburtsdatum: 27.03.1982

Geburtsort: St.Wendel

Eltern: Armin und Ruth Wolff

Geschwister: Martin Wolff

Nationalität: deutsch

Familienstand: verheiratet (seit 09.05.2008 mit Dr med. Deborah Wolff geb. Zeeden)



### Schulbildung

1988-1992 Grund- und Hauptschule Niederkirchen

1992-2001 Cusanus Gymnasium St.Wendel

07.06. 2001 Schulabschluss (Allgemeine Hochschulreife)

### Zivildienst

September 2001 – Juni 2002: Wohnheim für Geistigbehinderte der Lebenshilfe St.Wendel

### Studium

Seit WS 2002/03 Studium der Humanmedizin im vorklinischen Abschnitt an der Universität Mainz

08.09.2004 Ärztliche Vorprüfung

Seit WS 2004/05 Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt an der Universität Mainz

Seit WS 2005/06 Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt an der Universität zu Lübeck

WS 2006/07 Experimentelle Untersuchungen zur Doktorarbeit

30.04.2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

08/2009 Fertigstellung der Doktorarbeit

## 9. Puplication

Rades D, Wolff C, Nadrowitz R, Breunig C, Schild SE, Baehre M, Meller B: Radioactive EGFR antibody Cetuximab in multimodal cancer treatment: stability and synergistic effects with radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* – im Druck –

## 10. Annex

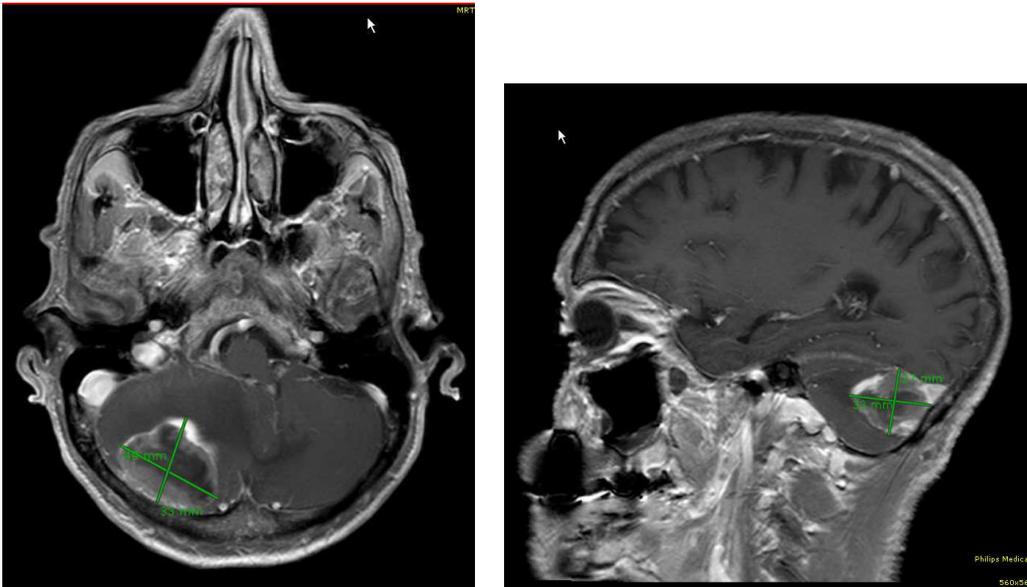
### **Radioiodiertes Cetuximab plus Ganzhirnbestrahlung bei Hirnmetastasen eines nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom**

Ein 49-jähriger Patient stellte sich zur Ganzhirnbestrahlung (WBI) von Hirnmetastasen bei einem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) vor. Der Primärtumor des Patienten befand sich im rechten Oberlappen und infiltrierte bereits den Mittellappen, das Mediastinum und die laterale Pleura. Weiterhin zeigten sich Lymphknotenmetastasen im Mediastinum und in der rechten Subklavikularregion sowie bilaterale Lungenmetastasen. Er wurde zur palliativen WBI in der Strahlentherapie vorgestellt. Ihm wurde die Kombination aus Bestrahlung und Immuntherapie mit dem Antikörper Cetuximab zur Verbesserung seiner Prognose angeboten.

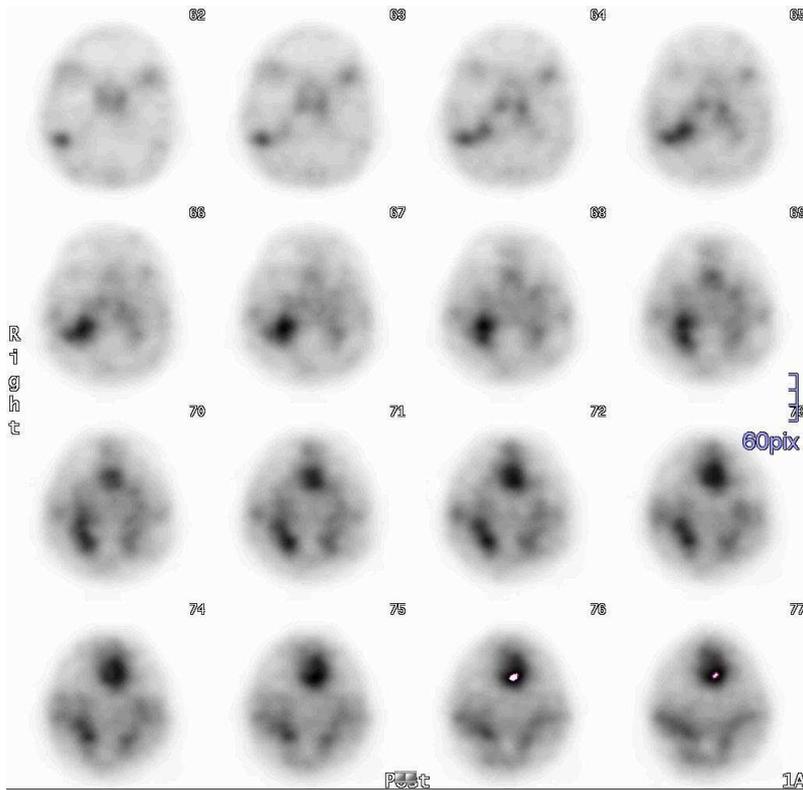
Um zu überprüfen, ob Cetuximab die Blut-Hirn-Schranke überwindet, wurde mit <sup>123</sup>I (γ-Strahler) markiertes Cetuximab eingesetzt. Die Anreicherung der Hirnmetastasen wurde mittels SPET 24 und 48 h nach Injektion des Radiopharmakons (1 mg) sowie der Initial-Dosis des „kalten“ Cetuximab (400 mg/m<sup>2</sup>) untersucht. Die Cetuximab-Therapie wurde über 12 Wochen weitergeführt, wobei die wöchentliche Cetuximab-Dosis ab der zweiten Wochen 250 mg/m<sup>2</sup> betrug. Die WBI begann eine Woche nach Beginn der Cetuximab-Therapie. Die Gesamtdosis betrug 30 Gy (5 x 3 Gy pro Woche).

<sup>123</sup>I-Cetuximab reicherte sich in der Referenz-Läsion im Gehirn an. Dies bewies, dass Cetuximab die Blut-Hirn-Schranke überwinden konnte. Die Referenz-Läsion zeigte ein gutes Ansprechen auf die Kombinationsbehandlung aus WBI und Cetuximab. Die Metastase verkleinerte sich um mehr als 50 % im Vergleich zu ihrer Größe vor der Behandlung (MRT).

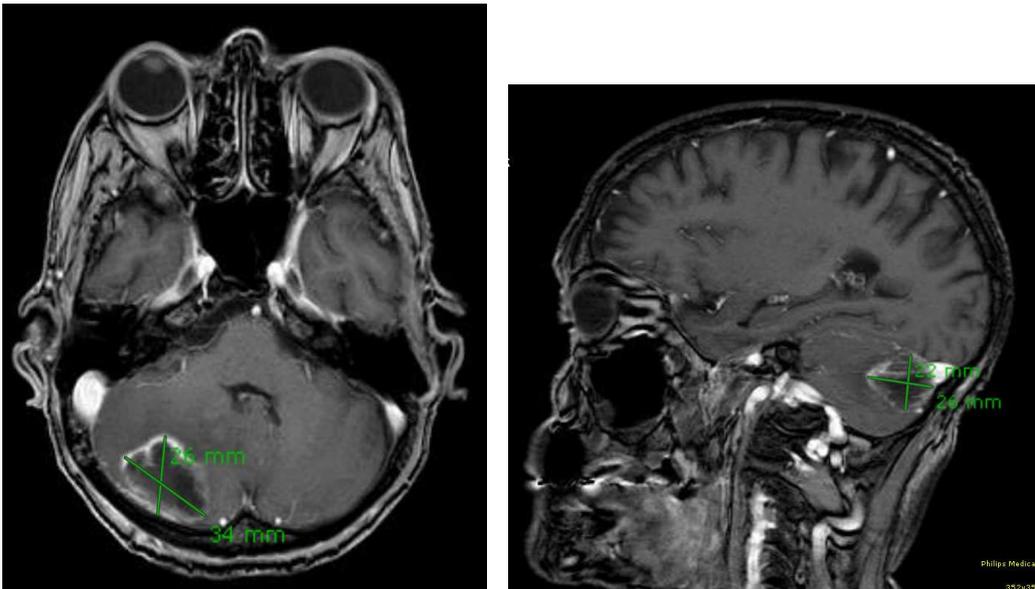
Mit radioiodiertem Cetuximab konnte der Nachweis der Antikörper-Passage über die Blut-Hirn-Schranke erbracht werden. Die Referenz-Läsion sprach gut auf die Kombination aus WBI und Immuntherapie mit Cetuximab an. Die Kombinationsbehandlung wurde gut vertragen und der Patient hatte keine ernsthaften Nebenwirkungen. Molekulare Bildgebung zur Untersuchung der Anreicherung von radioaktiv markiertem Cetuximab kann helfen zwischen Respondern und Non-Respondern einer Cetuximab-Immuntherapie zu unterscheiden.



**Abb. 15:** Schädel-MRT mit der Referenz-Läsion vor Therapiebeginn



**Abb. 16:** SPET-Darstellung der Referenz-Läsion zu Beginn der Therapie mit  $^{123}\text{I}$ -Cetuximab



**Abb. 17:** Schädel-MRT mit der Referenz-Läsion nach WBI und Cetuximab-Therapie