Frank Schönsiegel
Dr. sc. hum.

Therapie des malignen Melanoms mittels gewebespezifischer Viren und benzamidgekoppeltem Chlorambucil

Geboren am 09.05.1972 in Mannheim

Diplom der Fachrichtung Biologie am 03..05.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. med. Uwe Haberkorn

Das maligne Melanom fällt als systemische Erkrankung nicht nur wegen seiner zunehmenden Häufigkeit, sondern auch aufgrund seines aggressiven, biologischen Wachstumsverhaltens und seiner ausgeprägten Therapieresistenz bei eingetretener Metastasierung auf. Da konventionelle Behandlungsstrategien bei betroffenen Patienten bislang keine nennenswerten Heilungserfolge brachten, muss nach neuen Therapieansätzen gesucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine gewebsspezifische Gentherapie des malignen Melanoms mittels AAV-vermittelter Übertragung eines Suizidgens untersucht. Hierzu wurde hinter einem potentiell Melanom-spezifischen Promotorkonstrukt (hMIAIV), bestehend aus dem humanen Promotor der „Melanoma-Inhibitory Activity“ (hMIA) und multiplen Kopien des murinen Tyrosinase-Gen-Enhancers, sowohl ein Reportergen (EGFP) als auch ein Suizidgen (HSVtk) kloniert. Von beiden genregulatorischen Elementen war durch Voruntersuchungen bekannt, dass sie eine gewebsspezifische Expression im malignen Melanom ermöglichen bzw. gewebsspezifisch verstärken. Als Kontrolle wurden analog Genkonstrukte mit dem universell in eukaryontischen Zellen stark aktiven CMV (Zytomegalo-Virus)-Promotor generiert. Zur anschließenden transienten Transduktion der Zellen wurden die Konstrukte in rekombinante AAV-Partikel verpackt. Nach Infektion der Melanomzelllinien B16, MeWo und SK-Mel-23 sowie der Zervixkarzinomzelllinie HeLa mit rAAV/hMIAIV-EGFP-Partikeln konnte daraufhin eine Melanom-spezifische Expression des Reportergens festgestellt werden. Darüber hinaus konnte nach Infektion der Zellen mit rAAV/hMIAIV-HSVtk-Partikeln anhand einer Anreicherung der spezifischen HSVtk-Substrate ³H-Thymidin bzw. ³H-GCV in den Melanomzelllinien auch eine Melanom-spezifische Expression des HSVtk-Gens unter Kontrolle des hMIAIV-Promotors beobachtet werden. Analog führte jedoch eine Infektion der Zellen mit rAAV/CMV-EGFP- bzw. rAAV/CMV-HSVtk-Partikeln zu einer Expression des EGFP- bzw. HSVtk-Gens bei allen Zelllinien. Somit konnte nicht nur die Transduzierbarkeit aller Zelllinien mittels rAAV-Partikeln sowie die Gewebsspezifität des hMIAIV-Promotorkonstrukts gezeigt werden, sondern darüber hinaus auch der Nachweis einer intrazellulären HSVtk-Aktivität *in vitro* geführt werden. Um nachfolgend auch die Wirkungseffizienz des Suizidsystems, bestehend aus dem HSVtk-Gen und dem Vorläufer-Medikament Ganciclovir (GCV), *in vitro* festzustellen, wurden die Zellen mit rAAV/CMV-HSVtk- bzw. rAAV/hMIAIV-HSVtk-Partikeln infiziert und nach 48 Stunden für weitere 48 Stunden mit GCV behandelt. Unter Kontrolle des hMIAIV-Promotors konnte dabei nur bei den Melanomzelllinien sowohl anhand einer Abnahme der Zellzahl als auch anhand eines verminderten Einbaus von ³H-Thymidin in die Zell-DNA ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden, während sich unter Kontrolle des CMV-Promotors ein zytotoxischer Effekt bei allen Zelllinien zeigte. Ein überwiegend zytotoxischer Effekt infolge einer alleinigen rAAV-Infektion oder einer alleinigen GCV-Behandlung konnte dabei nicht festgestellt werden, nur SK-Mel-23-Zellen reagierten leicht sensitiv auf eine rAAV-Infektion. Eine erste *in vivo*-Therapie von transient

transduzierten Melanomzellen wurde nach 27 Tagen kontinuierlicher GCV-Behandlung ergebnislos abgebrochen. Auch eine Therapie von transient transduzierten Zervixkarzinomzellen unter Verwendung des starken viralen CMV-Promotors zeigte keinen Erfolg. Aufgrund einer zu geringen Anzahl HSVtk-exprimierender Zellen konnte unter GCV-Behandlung kein signifikanter Unterschied im Tumorwachstum zwischen nicht transduzierten und Suizidgen-transduzierten Zellen beobachtet werden. Für weitere *in vivo*-Versuche wurde daher eine stabil HSVtk-exprimierende Melanomzelllinie generiert. Dadurch sollte sowohl eine stabile Aktivität des gewebsspezifischen Promotors *in vivo* gezeigt als auch eine höhere HSVtk-Expression *in vivo* erzielt werden. Hierzu wurden MeWo-Zellen mit rAAV/hMIA(493)IV-HSVtk-IRES2-EGFP-Partikeln infiziert. Da dieses Konstrukt neben dem Gen für die HSVtk noch ein Gen für EGFP enthielt, musste aufgrund der begrenzten Verpackungskapazität von AAV innerhalb des gewebsspezifischen hMIAIV-Enhancer/Promotorkonstrukts der Vollängen-MIA-Promotor (1386 bp) gegen die minimale Version des Promotors (493 bp) ausgetauscht werden. Parallel durchgeführte Versuche belegten dabei auch die Gewebsspezifität des hMIA(493)IV-Promotorkonstrukts, wenn auch eine leicht niedrigere Expressionsaktivität des hMIA(493)IV-Promotors gegenüber des hMIAIV-Promotors festgestellt werden konnte. Mit Hilfe des EGFP-Gens konnten daraufhin mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) einzelne positiv-transduzierte Zellen isoliert und diese zu Zellpopulationen herangezogen werden. Anschließend war es mittels Durchflusszytometrie möglich, diese Zellpopulationen auf nahezu 100 % positiv-transduzierte Zellen hin zu überprüfen. Bei der so ausgewählten MeWo K4-Zelllinie konnte daraufhin im Vergleich zu MeWo Wildtyp-Zellen sowohl anhand einer stark erhöhten Aufnahme von spezifischen HSVtk-Substraten als auch anhand eines beobachteten zytotoxischen Effekts nach GCV-Behandlung eine stabile HSVtk-Expression *in vitro* nachgewiesen werden. Zur anschließenden Untersuchung der intrazellulären HSVtk-Aktivität *in vivo* wurde die Anreicherung des spezifischen HSVtk-Substrats ¹³¹I-Deoxycytidin in MeWo Wildtyp- bzw. MeWo K4-tumortragenden Mäusen gemessen. Dabei wurde nach systemischer Applikation des Substrats nach 24 bzw. 48 Stunden eine erhöhte Anreicherung von ¹³¹I-Deoxycytidin in dem MeWo K4-Tumor festgestellt. Nach dem positiven Nachweis der intrazellulären HSVtk-Aktivität *in vivo* wurde unter Verwendung der MeWo K4-Zelllinie auch die Effizienz des Suizidsystems gezeigt. So konnte bei MeWo K4-tumortragenden Mäusen nach 27 Tagen kontinuierlicher, systemischer GCV Applikation ein völliges Verschwinden der Tumore festgestellt werden, während im Zeitraum von 40 Tagen bei MeWo Wildtyp-tumortragenden Mäusen eine stetige Progression des Tumors zu beobachten war. Des Weiteren konnte 22 Wochen nach Therapieende kein Rezidiv der MeWo K4-Tumore festgestellt werden. Schließlich konnte somit auch eine stabile Aktivität des gewebsspezifischen Promotors *in vivo* bewiesen werden.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde unabhängig von dem vorherigen Ansatz eine mögliche Therapie des malignen Melanoms mittels Chlorambucil-Amidderivaten untersucht. Das Zytostatikum Chlorambucil wird vor allem zur Behandlung von Lymphomen, Leukämien und Ovarialkarzinomen verwendet. Aufgrund der unspezifischen Wirkung von Chlorambucil sind die Nebenwirkungen einer Chlorambucil-Therapie jedoch beachtlich. Um eine höhere Aufnahme des Zytostatikums in Melanome und dadurch auch eine Entlastung für den Patienten zu erreichen, wurden Melanom-spezifische Benzamide an das Zytostatikum Chlorambucil gekoppelt. Die gewisse Affinität radiojodierter Benzamide zu Melanozyten wurde zufällig entdeckt und führte im Vorfeld zur Entwicklung einiger N-(2-Dialkyaminoalkyl)-4-Iodbenzamid-Derivate. Untersuchungen von strukturellen Variationen in diesen Benzamid-Derivaten bezüglich ihres biologischen Verhaltens lenkten dabei den Blick auf die Amid-Substituenten. Die Kopplung der Benzamide an Chlorambucil erfolgte durch Amid-Substitution, wobei das Chlorambucil-Amidderivat AM402 N,N-Dimethylaminoethylamin, das Chlorambucil-Amidderivat AM521 Procainamid als Amid-Substituenten besaß. Zur Untersuchung der *in vivo*-Melanom-Affinität von AM402 und

AM521 wurden Bioverteilungstudien in B16-tumortragenden Mäusen durchgeführt. Im Vergleich zu Chlorambucil konnte dabei 60 bzw. 240 Minuten nach systemischer Applikation eine spezifische Anreicherung von AM402 und AM521 in den Tumoren beobachtet werden. Aber auch *in vitro* im Vergleich zu einer nicht melanozytären Tumorzelllinie (MH3924A) konnte die Melanom-Affinität von AM402 und AM521 im Gegensatz zu Chlorambucil im Verlauf von zwei Stunden demonstriert werden. Bei einem abschließenden Zytotoxizitätstest *in vitro* konnte darüber hinaus im Vergleich zu Chlorambucil eine Melanom-spezifische Zytotoxizität der Chlorambucil-Amidderivate AM402 und AM521 gegenüber B16-Zellen festgestellt werden.