

Jenny Peterschmitt; geb. Mohr  
Dr. med.

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG EINES ANTIKÖRPERS GEGEN  
BONE SIALOPROTEIN IN KOMBINATION MIT EINEM  $\alpha v\beta 3$  INTERGRIN-  
INHIBITOR (CILENGITID) UND EINEM BISPHOSPHONAT (ZOLEDRONAT) AN  
MDA-MB-231 MAMMAKARZINOMZELLEN IN VITRO UND IN VIVO**

Geboren am 06.07.1978 in Bad Segeberg

Staatsexamen am 15.11.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. M.R. Berger

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Wirkung eines Antikörpers gegen Bone Sialoprotein in Kombination mit einem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin-Inhibitor (Cilengitid) und einem Bisphosphonat (Zoledronat) an MDA-MB-231<sup>GFP</sup> Zellen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

In einem Teil dieser Gesamtstudie wurden die Kombinationseffekte des anti-BSP IgY Antikörpers mit dem  $\alpha v\beta 3$ -Integrin-Inhibitor, Cilengitid, mit Hilfe von drei *in vitro*-Testmethoden an humanen MDA-MB-231<sup>GFP</sup>-Mammakarzinomzellen untersucht. Mittels eines Proliferationstests (PT) wurde die Überlebensrate der Zellen bzw. die Therapiewirkung gemessen. Der Einfluss der zu testenden Substanzen auf die gerichtete Bewegung von Tumorzellen in das Skelettsystem wurde mit Hilfe eines Migrationstests (MT) untersucht. Außerdem wurde die Fähigkeit einzelner Tumorzellen zur Bildung von Kolonien mit Hilfe eines Kolonietests (KT) analysiert. MDA-MB-231<sup>GFP</sup> Zellen wurden Konzentrationen von 25-200  $\mu\text{g/ml}$  (beide Substanzen) für 1-5 Tage (PT) bzw. für eine Dauer von 2 Tagen (KT, MT) ausgesetzt. Die Therapien erfolgten in Einzelbehandlungen sowie in simultanen Kombinationsbehandlungen. Die aus den Einzelwirkungen der Substanzen erwartete (errechnete) Kombinationswirkung wurde mit der tatsächlichen (beobachteten) Kombinationswirkung ins Verhältnis gesetzt (T/E).

Die Proliferation, die Migration sowie die Koloniebildungsfähigkeit von substanzexponierten Zellen konnte in Einzelbehandlungen mit anti-BSP IgY bzw. mit Cilengitid dosis- und zeitabhängig um bis zu 67, 80 und 53% (anti-BSP IgY Antikörper) bzw. um bis zu 45, 54, 37% (Cilengitid) reduziert werden. Im Kombinationsversuch zeigten sich im PT mit einem mittleren TE-Wert von 0,63 synergistische Effekte, während die mittleren T/E-Werte des MT und KT mit 1,2 und 1,05 auf additive Kombinationseffekte hinweisen.

Somit wurden der anti-BSP IgY Antikörper und der  $\alpha v\beta 3$ -Inhibitor, Cilengitid, erfolgreich in 3 *in vitro*-Testmethoden kombiniert, was den Ansatz zu weiteren Untersuchungen in einem *in vivo*-Modell bekräftigt.

In einem weiteren Teil dieser Gesamtarbeit sollte die Kombination des anti-BSP IgY Antikörpers mit dem Bisphosphonat, Zoledronat, sowohl *in vitro* (PT) als auch *in vivo* analysiert werden. Hierzu wurden MDA-MB-231<sup>GFP</sup> Zellen mit anti-BSP IgY (10-100) und Zoledronat (10-20 $\mu\text{g/ml}$  [25-50 $\mu\text{M}$ ]) für bis zu 5 Tage einzeln sowie in simultaner Kombination behandelt. Im PT zeigte sich im Kombinationsversuch bei der

Zoledronatkonzentration von 10µg/ml [25µM] ein additiver Kombinationseffekt während durch die Zoledronatkonzentration von 20µg/ml [50µM] sogar ein synergistischer Kombinationseffekt erreicht werden konnte.

Zur Untersuchung der Kombinationswirkung des anti-BSP IgY Antikörpers und Zoledronat *in vivo* wurden  $1 \times 10^5$  MDA-MB-231<sup>GFP</sup> Mammakarzinomzellen in die A. epidastrica superficialis dextra von Nacktratten inokuliert. Ca. 30 Tage nach der Tumorzellinokulation entwickelten die Tiere osteolytische Läsionen, welche röntgenologisch dokumentiert und vermessen wurden. Ratten mit bereits entwickelten Osteolysen wurde Zoledronat (60µg/kg/Woche s.c. x 8; n=10) bzw. Zoledronat und der anti-BSP IgY Antikörper (60µg/kg/Woche s.c. x 8; n=10 + 10mg/kg/Woche s.c. x 8; n=10) verabreicht. Weitere 20 Nacktratten mit entwickelten osteolytischen Läsionen blieben unbehandelt (Kontrollen). Außerdem erhielten zwei weitere Gruppen (jeweils n=10) eine Frühtherapie mit Zoledronat (60µg/kg/Woche s.c. x 4) bzw. Zoledronat und dem anti-BSP IgY Antikörper (60µg/kg/Woche s.c. x 4 + 20mg/kg/Woche s.c. x 4), welche direkt nach der Inokulation von Tumorzellen begonnen wurde. Zusätzlich erhielt eine Gruppe von Tieren (n=10) eine Präventive Therapie. Den Nacktratten aus dieser Gruppe wurde 2 Wochen vor der Tumorzellinokulation Zoledronat (60µg/kg/Woche s.c. x 2) verabreicht.

Durch die Zoledronattherapie wurde ein starker antiosteolytischer Effekt erzielt, was sich in einer Inhibition des Wachstums osteolytischer Läsionen zeigte. Durch das Hinzufügen des anti-BSP IgY Antikörpers konnte die Inzidenz von femoralen Osteolysen um 40% gesenkt werden, was auf Vorgänge der Remineralisierung hindeutet. Außerdem konnten durch die Kombinationstherapie die die Kortikalis durchbrechenden Läsionen im Vergleich zur Einzeltherapie mit Zoledronat um 20% reduziert werden. Diese Ergebnisse befürworten den therapeutischen Einsatz des anti-BSP IgY Antikörpers in Kombination mit Zoledronat, unter der Hypothese, so eine Osteoblasten induzierte Remineralisierung zu stimulieren.

Zusammenfassend ist zu betonen, dass diese Arbeit zur Weiterentwicklung der derzeit üblichen Therapie von Knochenmetastasen des Mammakarzinoms beiträgt. Die Untersuchung von zwei neuen Kombinationen zur Therapie von Knochenmetastasen (anti-BSP IgY / Cilengitid sowie anti-BSP IgY / Zoledronat) erbrachten die hier dargestellten Ergebnisse sowie eine Hypothese, welche in Folgestudien weiter untersucht werden sollte.