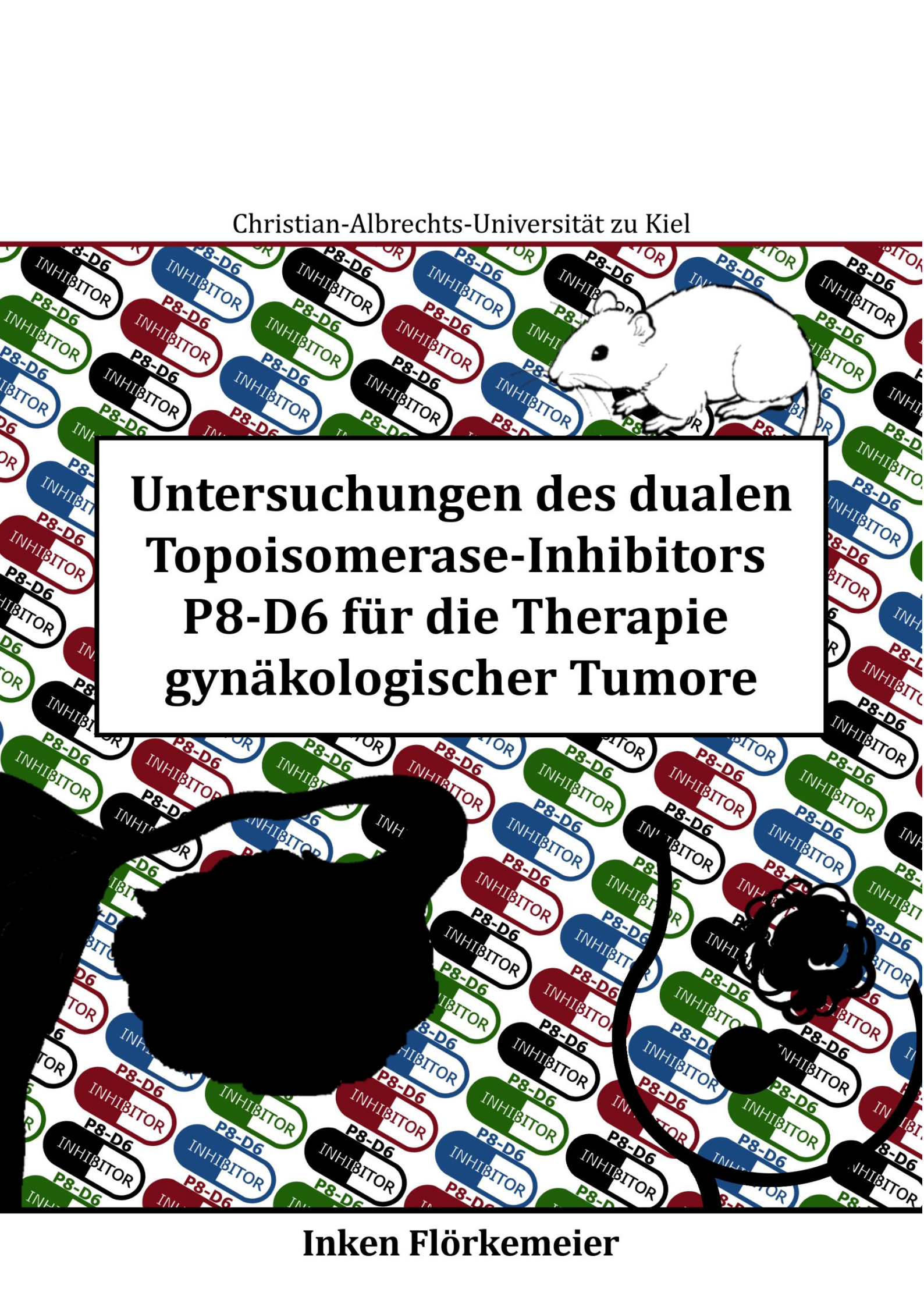


Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



# Untersuchungen des dualen Topoisomerase-Inhibitors P8-D6 für die Therapie gynäkologischer Tumore

Inken Flörkemeier

---

**Untersuchungen des dualen Topoisomerase-  
Inhibitors P8-D6 für die Therapie  
gynäkologischer Tumore**

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Inken Flörkemeier**

Kiel 2020

Erster Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Clement

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

29.01.2021

Zum Druck genehmigt:

29.01.2021

Prof. Dr. Frank Kempken  
(Dekan)

*Die Spielregeln des Lebens verlangen von uns nicht,  
dass wir um jeden Preis siegen,  
wohl aber, dass wir den Kampf niemals aufgeben.*  
– Dr. med. et Dr. phil. Viktor Frankl (1905 - 1997)

*Für meine Familie*

## VORBEMERKUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Bernd Clement (Pharmazeutisches Institut, Abteilung Pharmazeutische/Medizinische Chemie) und Prof. Dr. med. Dirk O. Bauerschlag (Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, im Zeitraum Februar 2017 bis November 2020 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen bereits veröffentlicht:

### Publikationen:

1. Aichinger, G.; Lichtenberger, F.-B.; Steinhauer, T. N.; Flörkemeier, I.; Del Favero, G.; Clement, B.; Marko, D.  
 "The Aza-Analogous Benzo[c]phenanthridine P8-D6 Acts as a Dual Topoisomerase I and II Poison, thus Exhibiting Potent Genotoxic Properties." 2020 *Molecules* 25 (7)  
 DOI: 10.3390/molecules25071524
2. Klausz, K.; Kellner, C.; Gehlert, C. L.; Krohn, S.; Wilcken, H.; Flörkemeier, I.; Günther, A.; Bauerschlag, D. O.; Clement, B.; Gramatzki, M.; Peipp, M.  
 "The novel dual topoisomerase inhibitor P8-D6 shows anti-myeloma activity in vitro and in vivo." 2020 *Publikation in Vorbereitung*.
3. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Hedemann, N.; Ölander, M.; Artursson, P.; Clement, B.; Bauerschlag, D. O.  
 "Newly developed dual Topoisomerase P8-D6 is highly active in ovarian cancer" 2020 *Publikation in Vorbereitung*.

### Tagungsbeiträge:

1. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Clement, B.; Bauerschlag D. O.  
 „Wirkung eines dualen Topoisomerase-Inhibitors an gynäkologischen Tumoren.“  
*Poster Präsentation:* 132. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG), 2017, Hannover, Deutschland
2. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Bauerschlag D. O.; Clement, B.  
 „A dual topoisomerase inhibitor with markedly superior antitumor activity in ovarian cancer relative to standard therapeutics.“  
*Poster Präsentation:* DPhG Annual Meeting 2017, Saarbrücken, Deutschland
3. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Artursson, P.; Ölander, M.; Clement, B.; Bauerschlag D. O.  
 „Antiproliferative effect of a dual topoisomerase I and II inhibitor on gynecological tumors“  
*Poster Präsentation:* 33. Deutscher Krebskongress, 2018, Berlin, Deutschland

4. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Artursson, P.; Ölander, M.; Clement, B.; Bauerschlag D. O.  
„Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drug activity of a dual topoisomerase inhibitor on ovarian cancer”  
*Vortrag*: 10. Wissenschaftliches Symposium der Kommission TraFo der AGO, 2018, Düsseldorf, Deutschland
5. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Artursson, P.; Ölander, M.; Bauerschlag D. O.; Clement, B.  
„Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drug activity of a dual topoisomerase inhibitor on ovarian cancer”  
*Poster Präsentation*: DPhG Annual Meeting 2018, Hamburg, Deutschland
6. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; van Meckelenbergh, M.; Clement, B.; Bauerschlag, D. O.  
„Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drug activity of a dual topoisomerase inhibitor on breast cancer.”  
*Poster Präsentation*: Senologiekongress 2019 in Berlin, Deutschland
7. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Bauerschlag, D. O.; Clement, B.  
„Targeting gynaecological cancer with the new dual topoisomerase inhibitor P8-D6”  
*Poster Präsentation*: DPhG Annual Meeting 2019, Heidelberg, Deutschland
8. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Weimer, J.-P.; Clement, B.; Bauerschlag, D. O.  
„Neuer dualer Topoisomerase-Inhibitor P8-D6 für die Therapie gynäkologischer Tumore ”  
*Poster Präsentation*: XXVI. Akademische Tagung Deutschsprachiger Hochschullehrer der Gynäkologie und Geburtshilfe 2019, Kiel, Deutschland
9. Flörkemeier, I.; Steinhauer, T. N.; Weimer, J.-P.; Clement, B.; Bauerschlag, D. O.  
„Targeting breast cancer with the new dual topoisomerase inhibitor P8-D6”  
*Poster Präsentation*: 11. COMBATing Breast Cancer / TraFo Symposium 2019, Potsdam, Deutschland. *Posterpreis*
10. Flörkemeier, I.  
„Vom Wirkstoff zum Arzneimittel. Von der Präklinik zu Phase-1-Studien bei gynäkologischen Tumoren”  
*Vortrag*: 12. TraFo Symposium 2020, Düsseldorf, Deutschland.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Strukturformelverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XIV</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Maligne Tumorerkrankungen	1
1.2 Ovarialkarzinom	2
1.3 Mammakarzinom	4
1.4 Allgemeine Therapiemöglichkeiten	5
1.4.1 Platinkomplexverbindungen	9
1.4.2 Mitosehemmstoff	9
1.4.3 Hemmstoffe der humanen Topoisomerase I und II	12
1.4.4 Gegenwärtige Arzneimittelforschung auf dem Gebiet des Ovarialkarzinoms	17
1.5 Benzo[c]phenanthridine	19
1.5.1 6-Aminobenzo[c]phenanthridine	20
1.5.2 Pyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline - P8-D6	21
1.5.3 Wirkmechanismus von P8-D6	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit	27
<b>2. Materialien und Geräte</b>	<b>29</b>
2.1 Zelllinien & Patientenzellen	29
2.2 Medien und Mediensupplemente	29
2.3 Puffer und Gele	30
2.4 Antikörper	31
2.5 Materialien und Reagenzien	31
2.6 Geräte	33
2.7 In vivo Experiment	34
2.8 Verwendete Software	34
<b>3. Experimentelle Methoden</b>	<b>35</b>
3.1 Identität und Stabilitätstestung von P8-D6	35
3.2 Zellbiologische Methoden	35
3.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien und <i>ex vivo</i> Patientenzellen	35
3.2.2 Mikroskopie adhärenter Zellen	38

3.2.3	Viabilitäts- und Apoptose- Assays	39
3.2.4	Co-Kultur	43
3.2.5	3D-Modell	45
3.2.6	Hepatotoxizität	49
3.2.7	Fluoreszenzmikroskopie	51
3.3	Proteinbiochemische Methoden	52
3.3.1	Proteinbestimmung	52
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.3.3	Western Blot Analyse	52
3.4	Tierexperimentelle Methoden	53
3.4.1	Versuchstiere	53
3.4.2	Erste Behandlungsstudie	54
3.4.3	Methodenvalidierung	55
3.4.4	Zweite Behandlungsstudie	56
3.4.5	Sektion der Versuchstiere	57
3.4.6	Histologische Präparation	58
3.5	Datenanalyse	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
4.1	P8-D6: Entitätsübergreifender antitumoraler Effekt	59
4.2	Wirkort: DNA und Topoisomerasen	60
4.3	Abschätzung des Nebenwirkungspotentials	62
4.3.1	Effekte auf nicht-tumorassoziierte Zellen	62
4.3.2	Hepatotoxizität	64
4.4	Zielgewebe: gynäkologische Tumore	67
4.4.1	2D-Kultur	67
4.4.2	Co-Kultur	85
4.4.3	3D Kultur	87
4.5	<i>In vivo</i> Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell	104
4.5.1	Erste Behandlungsstudie	105
4.5.2	Methodenvalidierung	107
4.5.3	Zweite Behandlungsstudie	113
4.6	Biomarker	117
<b>5.</b>	<b>Diskussion und Ausblick</b>	<b>120</b>
5.1	Targetkontrolle	121
5.2	Keine Wirkung ohne Nebenwirkung	122
5.3	Das Tumorwachstum in der Petrischale bremsen	125
5.4	Wirkung im lebenden Organismus	131
5.5	Geplanter Weg bis zu den klinischen Studien	135
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>138</b>



<b>Anhang</b>	<b>157</b>
<b>Erklärung zu §7 der Promotionsordnung</b>	<b>178</b>
<b>Danksagung</b>	<b>179</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>181</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>182</b>
<b>Abstract</b>	<b>183</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

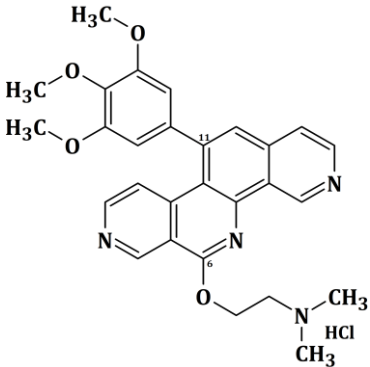
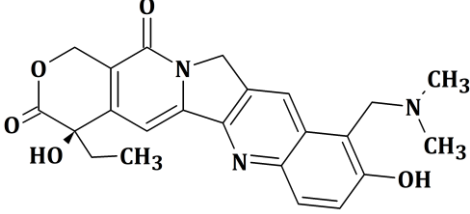
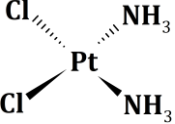
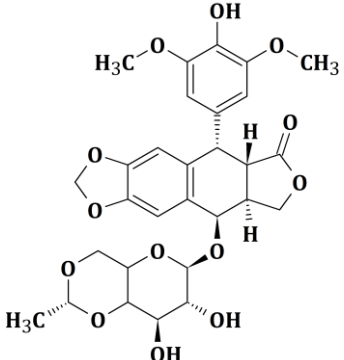
---

2D	Zweidimensionalität
3D	Dreidimensionalität
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
Abb.	Abbildung
ADC	<i>antibody-drug-conjugate</i>
ADCC	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AGO	Arbeitsgemeinschaft für gynäkologische Onkologie e. V.
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APAF-1	Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor 1
ApoLive-Glo™	ApoLive-Glo™ Multiplex Assay – Promega Corporation
Aqua bidest	Aqua bidestillata
AUC	<i>area under the curve</i>
BC	Mammakarzinom
BCA	Bicinchoninsäure
BCS	<i>biopharmaceutical classification system</i>
BRCA1/2	Breast Cancer Gene
CA 125	cancer-antigen 125
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CSF-1R	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
d	Tag
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DHE	Dihydroethidium
DMPU	Dimethylpropylenharnstoff
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
EMA	European Medicines Agency
EtOH	Ethanol
Ex	Excitation
Expr.	Expression
FADD	<i>fas-associated death domain</i>
FBS	fetales Kalberserum (fetal bovine serum)
FDA	Food and Drug Administration
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique

FL	Fluoreszenz
FS	Vorwärtsstreulicht ( <i>Forward Scatter</i> )
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GI <sub>50/60</sub>	<i>growth inhibition</i> 50% von 60 Tumorzelllinien
h	Stunden
hämor.	Hämorrhagisch
HE	Hämatoxylin-Eosin
HE 4	Humanes Epididymis-Protein 4
Her2	<i>human epidermal growth factor receptor2</i>
HOSE	<i>human ovarian surface epithelial cells</i>
IC <sub>50</sub>	<i>inhibitory concentration 50%</i>
ICE	<i>in vivo complex of enzyme</i>
IU	<i>international units</i>
<i>i.v.</i>	intravenös
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kran.	kranial
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
logD <sub>7.4</sub>	dekadischer Logarithmus des Konzentrationsverhältnis einer zwischen Octanol- und Wasserphase verteilten Substanz bei pH 7,4
M	molar (mol/l)
m	Meter
MeOH	Methanol
MGM	<i>mean graph midpoint</i>
Mikr.	mikroskopische
min	Minuten
mol	Mol
MSH 2	mutS homolog 2
MTD	maximal tolerierten Dosis
N	Stichprobengröße
NCI	National Cancer Institut
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglykol (Nonidet <sup>®</sup> P-40)
NSCLC	nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom
OC	Ovarialkarzinom
p-Wert	Signifikanzwert
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCC	Pearson'scher Korrelationskoeffizient

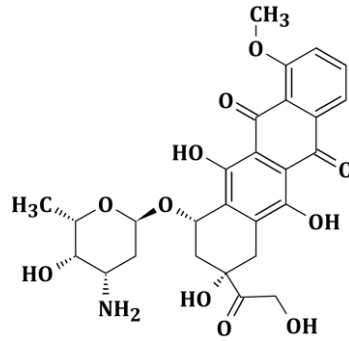
PDB	Protein Data Bank
PDGFR $\alpha$	<i>platelet-derived growth factor receptor <math>\alpha</math></i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	Der mit -1 multiplizierte Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration ( <i>potentia hydrogenii</i> )
PI	Propidiumiodid
PLD	pegyliertem liposomales Doxorubicin
PMS1/2	<i>postmeiotic segregation increased 1/2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROMA	<i>risk of ovarian malignancy algorithm</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	Suspension- und Anhaftungsmedium
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SS	Seitwärtsstreulicht ( <i>Side Scatter</i> )
STR	<i>short tandem repeat</i>
suppl.	supplementiert
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit 0,1 % (v/v) Tween <sub>R</sub> -20
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
Topo	Topoisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/ml	Enzymeinheit/ml
ULA	<i>ultra-low-attachment</i>
V	Volt
VEGF (R)	<i>vascular endothelial growth factor (receptor)</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\lambda$	Wellenlänge

## STRUKTURFORMELVERZEICHNIS

Verbindung	Strukturformel
<p>6-(2-Dimethylaminoethoxy)-11-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyrido[3,4-c][1,9]-phenanthrolin Hydrochlorid</p> <p><b>Bezeichnung in der Arbeit:</b> P8-D6</p>	
<p>(S)-10-(Dimethylaminomethyl)-4-ethyl-4,9-dihydroxy-1<i>H</i>-pyrano[3',4':6,7] indolizino[1,2-b]chinolin-3,14(4<i>H</i>,12<i>H</i>)-dion</p> <p><b>Bezeichnung in der Arbeit:</b> Topotecan</p>	
<p>cis-Diammindichloridoplatin(II)</p> <p><b>Bezeichnung in der Arbeit:</b> Cisplatin</p>	
<p>4'-Demethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-(R)-ethyliden-β-D-glucopyranosid)</p> <p><b>Bezeichnung in der Arbeit:</b> Etoposid</p>	

---

(7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6,9,11-trihydroxy-9-(2-hydroxyacetyl)-4-methoxy-8,10-dihydro-7H-tetracene-5,12-dione



**Bezeichnung in der Arbeit:**

Doxorubicin

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1: Epidemiologie von Krebserkrankungen der Frauen in 2016 in Deutschland	1
Abb. 1.2: Signalwege der Apoptose	6
Abb. 1.3: Therapiealgorithmus beim primären fortgeschrittenen OC und beim OC-Rezidiv	8
Abb. 1.4: Strukturformeln von Platinkomplexverbindungen	9
Abb. 1.5: Strukturen von etablierten Mitosehemmstoffen	10
Abb. 1.6: Entstehung des Strangbruchs und Bildung des kovalentes Enzym-DNA-Komplexes	13
Abb. 1.7: Mechanismus zur Stabilisierung des spaltbaren DNA-Topo-Intermediats	14
Abb. 1.8: Strukturen von Topo I-, Topo II- und duale Topo-Inhibitoren	16
Abb. 1.9: Strukturen von neuen Verbindungen, die sich in klinischen Ovarialkarzinom-Studien befinden	18
Abb. 1.10: Natürlich vorkommende Alkaloide der Benzo[c]phenanthridine	19
Abb. 1.11: Auf Benzo[c]phenanthridin-basierende Strukturen aus aktuellen klinischen Studien	20
Abb. 1.12: Kieler Entwicklung der Benzo[c]phenanthridine	21
Abb. 1.13: Synthese von P8-D6	22
Abb. 1.14: Postulierte Ausrichtung und mögliche Interaktionen von P8-D6 mit Topo II	23
Abb. 1.15: P8-D6 in der Bindetasche des DNA-Topo I-Komplexes (1K4T)	24
Abb. 1.16: P8-D6 in der Bindetasche des DNA-Topo II $\alpha$ -Komplexes (5GWL)	25
Abb. 1.17: P8-D6 in der Bindetasche des DNA-Topo II $\beta$ -Komplexes (3QX3)	25
Abb. 1.18: Wirkmechanismus von P8-D6 in Tumorzellen	26
Abb. 1.19: Phase der Arzneistoffentwicklung	27
Abb. 3.1: Prinzip des ApoLive-Glo™ Multiplex Assays	40
Abb. 3.2: Prinzip der Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe der Farbstoffe Annexin V-PE und 7AAD	42
Abb. 3.3: Allgemeiner Aufbau der Co-Kultur	44
Abb. 3.4: Schematische Übersicht der 3D-Methode	46
Abb. 3.5: Prinzip des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays	47
Abb. 3.6: Prinzip des RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability und des Caspase-Glo® 3/7 Assay	48
Abb. 3.7: Mechanismus des oxidativen Stresses in humanen Hepatozyten	50
Abb. 3.8: Schema zur Behandlungsstudie des <i>in vivo</i> Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodells	55
Abb. 3.9: Schema zur Etablierung des <i>in vivo</i> Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodells	56
Abb. 3.10: Schema zur Behandlungsstudie des <i>in vivo</i> Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodells	57
Abb.4.1: antiproliferative Aktivität von P8-D6 im NCI-60-Screening	59
Abb.4.2: Detektion der Penetration in den Zellkern via Fluoreszenzmikroskopie	61
Abb.4.3: Mikr. Aufnahmen von nicht-tumorassoziierten Zellen nach Behandlung	63
Abb.4.4: Viabilität und Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in nicht-tumorassoziierten Zellen	64
Abb.4.5: Mikr. Aufnahmen von primären humanen Hepatozyten nach Behandlung	65
Abb.4.6: Oxidatives Stresspotential in humanen primären Hepatozyten	66
Abb.4.7: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in humanen Hepatozyten	66
Abb.4.8: Mikr. Aufnahmen von Ovarialkarzinomzelllinien nach Behandlung	68
Abb.4.9: Zeitverlaufs-Behandlungsstudie von P8-D6 in Ovarialkarzinomzellen	69

Abb.4.10: Fluoreszenzaktivität von P8-D6 im Viabilitäts-Assay	70
Abb.4.11: IC <sub>50</sub> -Kurven von Ovarialkarzinomzelllinien nach Behandlung	71
Abb.4.12: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in Ovarialkarzinomzelllinien	72
Abb.4.13: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) von P8-D6 versus Etoposid-Topotecan Kombination	73
Abb.4.14: FACS-Analyse nach Annexin V-PE/7-AAD Färbung der Ovarialkarzinomzelllinien	75
Abb.4.15: Mikr. Aufnahmen von <i>ex vivo</i> -Ovarialkarzinom-Patientenzellen nach Behandlung	76
Abb.4.16 IC <sub>50</sub> -Kurven von <i>ex vivo</i> Ovarialkarzinom-Patientenzellen nach Behandlung	77
Abb.4.17: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in <i>ex vivo</i> Ovarialkarzinom-Patientenzellen	78
Abb.4.18: FACS-Analyse nach Annexin V-PE/7-AAD Färbung der <i>ex vivo</i> Ovarialkarzinom-Patientenzellen	79
Abb.4.19: Mikr. Aufnahmen von Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung	80
Abb.4.20: IC <sub>50</sub> -Kurven von Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung	81
Abb.4.21: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in Mammakarzinomzelllinien	82
Abb.4.22: Mikr. Aufnahmen von <i>ex vivo</i> Mammakarzinom-Patientenzellen nach Behandlung	83
Abb.4.23: IC <sub>50</sub> -Kurve von <i>ex vivo</i> Mammakarzinom-Patientenzellen nach Behandlung	83
Abb.4.24: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in <i>ex vivo</i> Mammakarzinom-Patientenzellen	84
Abb.4.25: Heatmap der IC <sub>50</sub> -Werte von Ovarialkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen	84
Abb.4.26: Mikr. Aufnahmen der Co-Kultur nach Behandlung	85
Abb.4.27: Behandlungseffekte in der Co-Kultur	86
Abb.4.28: Repräsentative Phasenkontrastbilder von Ovarialkarzinom-Sphäroiden	88
Abb.4.29: Größenentwicklung der Ovarialkarzinom Sphäroide/Aggregate	90
Abb.4.30: Mikr. Aufnahmen der Zytotoxizität von Ovarialkarzinom-Sphäroiden/Aggregaten	91
Abb.4.31: Zytotoxizität von Ovarialkarzinom-Sphäroiden/Aggregaten nach Behandlung	92
Abb.4.32: Apoptoseinduktion in Ovarialkarzinom-Sphäroiden/Aggregaten	93
Abb.4.33: Lebend-Tot-Diskriminierung von Ovarialkarzinom-Aggregaten nach Behandlung	94
Abb.4.34: Lebend-Tot-Diskriminierung von Ovarialkarzinom-Sphäroiden nach Behandlung	95
Abb.4.35: REM Aufnahmen von behandelten und unbehandelten Ovarialkarzinom-Aggregaten	96
Abb.4.36: REM Aufnahmen von behandelten und unbehandelten Ovarialkarzinom-Sphäroiden	97
Abb.4.37: Repräsentative Phasenkontrastbilder von Mammakarzinom-Sphäroiden	98
Abb.4.38: Mikr. Aufnahmen der Zytotoxizität von Mammakarzinom-Sphäroiden/Aggregaten	99
Abb.4.39: Zytotoxizität von Mammakarzinom-Sphäroiden/Aggregaten nach Behandlung	100
Abb.4.40: Apoptoseinduktion in Mammakarzinom-Sphäroiden/Aggregaten	101
Abb.4.41: Lebend-Tot-Diskriminierung von Mammakarzinom-Sphäroiden nach Behandlung	103
Abb.4.42: REM Aufnahmen von behandelten und unbehandelten Mammakarzinom-Sphäroiden	104
Abb.4.43: Tumorwachstum der ersten <i>in vivo</i> Behandlungsstudie	106
Abb.4.44: Überlebenskurve	107
Abb.4.45: Tumorwachstum der <i>in vivo</i> Methodenentwicklung	109
Abb.4.46: Tumorwachstum der ersten <i>in vivo</i> Behandlungsstudie	111
Abb.4.47: Immunhistologische Untersuchungen unterschiedlicher Gewebe der Maus nach Methodenetablierung	112



Abb.4.48: Tumorwachstum der zweiten <i>in vivo</i> Behandlungsstudie – Biolumineszenz	114
Abb.4.49: Tumorwachstum der zweiten <i>in vivo</i> Behandlungsstudie – Ultraschall	115
Abb.4.50: Überlebenskurve und Veränderungen durch P8-D6-Behandlung	117
Abb.4.51: Charakterisierung der Expression von Topo I und II	119
Abb.5.1: Entstehung von Tumorsphäroiden im Peritoneum.	130
Abb.5.2: Wirkprinzip liposomaler Nanopartikel und aktiver Targeting-Nanopartikel für die Krebstherapie.	136
Abb. I: Mikroskopische Untersuchung der Hepatotoxizität nach Behandlung (Abschnitt:4.3.2)	157
Abb. II: Wachstumsverlauf der A2780-Aggregate und Zytotoxizität.	158
Abb. III: Wachstumsverlauf der SKOV-3-Sphäroide und Zytotoxizität.	159
Abb. IV: Wachstumsverlauf der OvCar8-Sphäroide und Zytotoxizität.	160
Abb. V: Wachstumsverlauf der HEY-Aggregate und Zytotoxizität.	161
Abb. VI: Wachstumsverlauf der MCF-7-Aggregate und Zytotoxizität.	162
Abb. VII: Wachstumsverlauf der Sk-Br 3-Aggregate und Zytotoxizität.	163
Abb. VIII: Wachstumsverlauf der UF-182 Sphäroide und Zytotoxizität.	164
Abb. IX: Lebend-Tod-Färbung der A2780-Aggregate.	165
Abb. X: Lebend-Tod-Färbung der SKOV-3 Sphäroide.	166
Abb. XI: Lebend-Tod-Färbung der OvCar8 Sphäroide.	167
Abb. XII: Lebend-Tod-Färbung der HEY-Aggregate.	168
Abb. XIII: Lebend-Tod-Färbung der MCF-7-Aggregate.	169
Abb. XIV: Lebend-Tod-Färbung der Sk-Br 3-Aggregate.	170
Abb. XV: Lebend-Tod-Färbung der UF-182-Sphäroide.	171
Abb. XVI: Tumorwachstum der ersten <i>in vivo</i> Behandlungsstudie	173
Abb. XVII: Tumorwachstum der <i>in vivo</i> Methodenentwicklung	174
Abb. XVIII: Tumorwachstum der der zweiten <i>in vivo</i> Behandlungsstudie	175

## TABELLENVERZEICHNIS

---

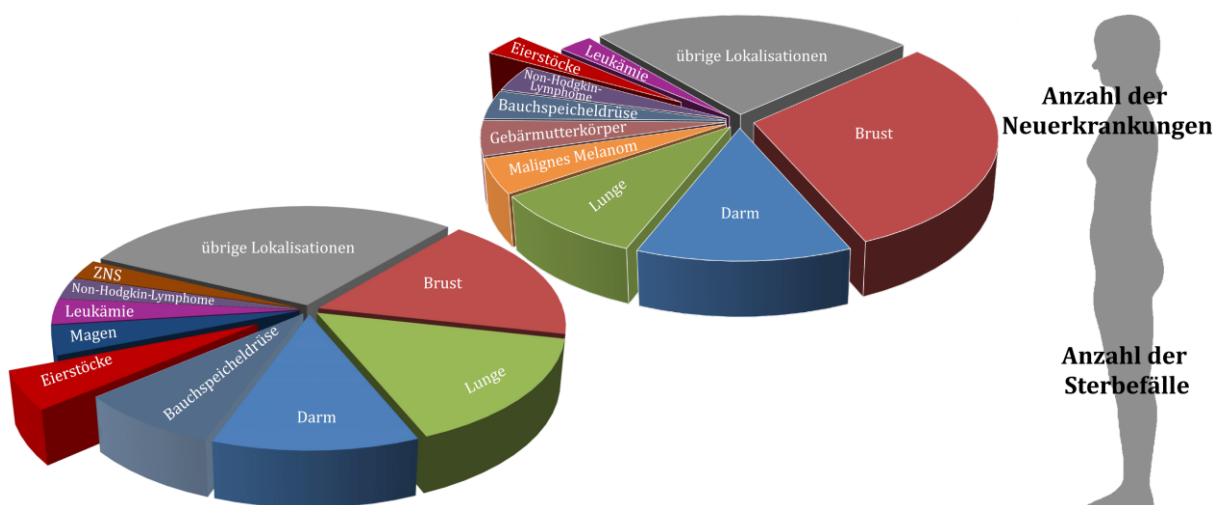
Tab. 1.1: Einteilung des Tumorgrades nach FIGO und TNM	3
Tab. 1.2: Vergleich der Ovarialkarzinome Typ I und Typ II	4
Tab. 1.3: Allgemein zytotoxisch wirksame Chemotherapeutika-Klassen	7
Tab. 3.1: Charakterisierung der verwendeten Ovarialkarzinomzellen	35
Tab. 3.2: Charakterisierung der verwendeten Mammakarzinomzellen	36
Tab. 3.3: Charakterisierung des Normalzellen	36
Tab. 3.4: Kulturmedium	37
Tab. 3.5: Medium für Langzeitlagerung (N <sub>2</sub> )	38
Tab. 3.6: Behandlungsschema ApoLive-Glo™ Multiplex Assays	41
Tab. 3.7: Behandlungsschema Durchflusszytometrie	42
Tab. 3.8: Zytometer-Einstellungen	43
Tab. 3.9: Schema Zellzahl 3D	46
Tab. 3.10: Behandlungsschema 3D	46
Tab. 3.11: Behandlungsschema Hepatotoxizität	49
Tab. 3.12: Applikationsschema Behandlungsstudie	55
Tab. 3.13: Applikationsschema Behandlungsstudie	57
Tab. 4.1: NCI-60 screening Daten der DTP-NCI Datenbank	60
Tab. 4.2: Zelleigenschaften Mammakarzinom	80
Tab. 4.3: Ultraschalluntersuchung während der Methodenetablierung	110

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Maligne Tumorerkrankungen

Krebs ist ein maligner Tumor, der durch unkontrollierte, infiltrative und destruktive Proliferation körpereigener Zellen charakterisiert ist (Mutschler *et al.*, 2020). Nach den kardiovaskulären Erkrankungen stellte Krebs im Jahr 2017 in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar. Bei Frauen war das Mammakarzinom neben dem Darmkrebs die am häufigsten diagnostizierte Krebsart (Abb. 1.1) (Statistisches Bundesamt, 2019).

Die Ursachen der Krebsentstehung sind sehr vielfältig und können sowohl endogener als auch exogener Natur sein (Mutschler *et al.*, 2020). Ihnen gemeinsam ist eine Störung im Kontrollmechanismus des physiologischen Wachstums aufgrund von irreversibler Differenzierung der Zellphysiologie und der DNA, welche zur ungehemmten Proliferation und Zerstörung umliegender Gewebe führt (Herdegen *et al.*, 2020). In diesen Geweben wird die maligne Transformation durch ein Ungleichgewicht bestimmt. Die Zellproliferation nimmt zu und die Apoptose wird gehemmt. Dabei ist die Tumorgenese ein mehrstufiger Prozess, untergliedert in Initiation (Fixierung permanenter DNA-Schäden), Promotion (klonale Expansion initiiertes Zellen) und Progression (Zunahme der Wachstumsautonomie sowie der Malignität des Tumors) (Efferth, 2007). HANAHAN und WEINBERG (2011) charakterisierten im „Hallmarks of cancer“ Tumorzellen durch ihre Aufrechterhaltung proliferativer Signalwege, Wachstumssuppressor-Unempfindlichkeit, Unsterblichkeit, Induktion von Angiogenese und die Aktivierung von Invasion und Metastasierung.



**Abb. 1.1: Epidemiologie von Krebserkrankungen der Frauen in 2016 in Deutschland**

Dargestellt ist die Anzahl der Neuerkrankten und der Sterbefälle für eine bestimmte Krebsform basierend auf den Daten des Robert Koch-Institutes (2019). Daraus ist abzuleiten, dass das Ovarialkarzinom zu den zehn häufigsten Neuerkrankungen aller Krebserkrankungen in Deutschland zählt und im Bereich der Sterberate zu den fünf häufigsten Ursachen gehört.

Die Risikofaktoren für eine Neoplasie können neben der genetischen Disposition auch der individuelle Lebensstil, die Ernährung sowie der Body-Maß-Index und das Alter sein. Des Weiteren spielen in Entwicklungsländern virale Infektionen als Grund für eine maligne Tumorentstehung eine bedeutende Rolle (Deutsche Krebsgesellschaft, 2016).

Trotz großer Fortschritte in Prävention, Früherkennung und Therapie im Bereich der Onkologie in den letzten Jahren, gibt es immer noch viele therapielimitierende Faktoren, wie unerwünschte Arzneimittelwirkungen oder die Problematik der Resistenzentwicklung. Die hohe Letalitätsrate und die große Anzahl an Neuerkrankungen, gerade im Bereich der gynäkologischen Onkologie, zeigen die essenzielle Bedeutung der Forschung an neuen Therapieansätzen und neuen Arzneimittelkandidaten.

## 1.2 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom, ein maligner Tumor des Eierstocks, zählt zu den aggressivsten Tumoren und besitzt für Frauen noch immer die fünft-häufigste Letalitätsrate aller Krebserkrankungen in Deutschland. Jährlich erkranken in Deutschland etwa 7.250 Patientinnen neu an diesem Karzinom. (Abb. 1.1) (Deutsche Krebsgesellschaft, 2017; Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019; Siegel *et al.*, 2020; Torre *et al.*, 2018). Für Ovarialkarzinome wird allgemein angenommen, dass Ovulationen, Zytokinexpositionen oder oxidativer Stress in den Zellen zu Mutationen und zur Akkumulation von DNA-Strangbrüchen führen können.

Aufgrund der relativen Symptomlosigkeit bzw. der sehr unspezifischen, gastrointestinal-urogenitalen Symptome zu Beginn der Erkrankung kommt es häufig erst im weit fortgeschrittenen Stadium zur Diagnose (>75% in FIGO III-IV) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020b) und somit zur erschwerten Therapie. Die 5-Jahres-Überlebensrate für das Ovarialkarzinomen liegt bei etwa 41 % und hat sich im Vergleich zu 1999 nur minimal verbessert (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019; Wright *et al.*, 2015). In Abhängigkeit vom Ansprechen auf die zumeist vorangegangene platinbasierte Chemotherapie unterscheidet man platinresponsive und platinnonresponsive Verläufe. Die Letzteren stellen in der Klinik die schwierigste Situation dar, da die therapeutischen Optionen stark limitiert sind.

Obwohl die Therapiemöglichkeiten sich im Bereich des Ovarialkarzinoms erheblich verbessert haben, ist die Behandlung von zum Teil therapielimitierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen, wie Blutbildstörungen, Hepatotoxizität, Neurotoxizität, gastrointestinale Beschwerden oder Emesis begleitet (Gridelli *et al.*, 2003; van Gijn *et al.*, 1999;

Creemers *et al.*, 1996). Häufig kommt es im Verlauf der Erkrankung zu Resistenzentwicklungen, die die Therapiemöglichkeiten zudem weiter einschränken (Ganapathi und Ganapathi, 2013).

Heutzutage erfolgt eine Diagnose des Ovarialkarzinoms häufig über die Transvaginalsonographie mit anschließendem operativen Staging. Die Bestimmung der CA-125 Konzentration im Blutplasma ( $> 35$  U/ml) in Kombination mit anderen Markern wie dem Humanen Epididymis-Protein HE4 (ROMA Index) dient als zusätzliche Risikobewertung (Petru *et al.*, 2014b). CA-125 konnte als Marker in der Früherkennung jedoch noch keine signifikante Reduktion der Mortalität erzielen. Des Weiteren erfolgt eine Stadieneinteilung der ovariellen Neoplasien auf Grundlage von klinischen und operativ gewonnenen Befunden (FIGO, Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique und TNM, Tumor-Nodus-Metastase) (Tab. 1.1). Dabei liegt die Heilungschance bei einem nicht-metastasierenden Tumor deutlich höher als bei einem metastasierenden Tumor.

**Tab. 1.1: Einteilung des Tumorgrades nach FIGO und TNM**

Eine Einteilung nach FIGO bezüglich der Invasivität vom Ovarialkarzinom (Javadi *et al.*, 2016).

TNM	FIGO/ Stadium	Charakteristikum	5-Jahres- Überlebensrate
T1	I (A,B,C)	Tumorwachstum auf Ovarien oder Tuben begrenzt	92 %
T2	II (A,B,C)	Tumorwachstum in einem oder beiden Ovarien oder Tuben mit Ausbreitung in den Beckenbereich oder primäres Peritonealkarzinom	55,1 %
T3	III (A,B,C)	Tumor in einem oder beiden Ovarien oder Tuben und/oder mit retroperitonealen Lymphknotenmetastasen. Oberflächliche Lebermetastasen. Tumor ist auf den Beckenbereich begrenzt, zeigt jedoch eine maligne, histologische Ausbreitung in den Dünndarm und das Omentum.	21,9 %
M1	IV	Tumorwachstum involviert eine oder beide Ovarien mit Metastasierung in entfernte Organe. Pleurale Effusionen und Metastasen im Leberparenchym.	5,6 %

Häufig treten Ovarialkarzinome sporadisch auf und nur 28 % sind erblicher (hereditärer) Natur (Harter *et al.*, 2017). Hierbei liegen Mutationen der DNA-Reparaturgene, wie z. B. BRCA1 und BRCA2 (breast cancer 1, 2) oder der „DNA mismatch repair“-Gene MSH2 (mutS homolog 2) und PMS1/2 (postmeiotic segregation increased 1/2) vor (du Bois und Pfisterer, 2002). Ein weiteres Hauptcharakteristikum für Ovarialkarzinome stellt eine Mutation am Tumorsuppressorgen p53 dar. Neben den epigenetischen Risikofaktoren und Karzinogenen ist die Reproduktionshistorie (Nulliparität, Infertilität) der Frau ein besonders starker Prädiktor für die Entstehung von Ovarialkarzinom (Cramer *et al.*, 1983). Daraus ableitend stellen erhöhte Parität und Laktation protektive Faktoren dar.

Zudem soll die regelmäßige Einnahme von Kontrazeptiva präventiv wirken (Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2015, 2008; Venn *et al.*, 1999). Das Ovarialkarzinom ist durch eine starke Heterogenität auf zellulärer und molekularer Ebene gekennzeichnet. Die meisten (90%) aller malignen Ovarialtumore sind epithelial und nur rund 10 % sind durch Mutationen in Stroma-, oder Keimzellen entstanden. Histopathologisch können die epithelialen Tumore laut WHO weiter als serös, muzinös, endometrioid, klarzellig und transitionalzellig klassifiziert werden (Petru *et al.*, 2014b). Pathogenetisch gibt es für Karzinome zwei Entstehungspfade (Pathways), einerseits über die Zwischenstufe von Borderline-Tumoren (Typ I), andererseits de novo (Typ II), die in Tab. 1.2 verglichen werden.

**Tab. 1.2: Vergleich der Ovarialkarzinome Typ I und Typ II**

Unterteilung nach der Entstehungsgeschichte, der Invasivität und dem genetischen Profil in Typ I und Typ II Ovarialkarzinome (Lax, 2017).

	Typ-I-Karzinome	Typ-II-Karzinome
<b>Histologische Typen</b>	„Low grade“ serös muzinös, seromuzinös „Low grade“ endometrioid	„High grade“ serös „High grade“ endometrioid
<b>Entstehungsmechanismus</b>	Adenom > Borderline > Karzinom	De-novo-Genese
<b>Stadium bei Diagnose (FIGO)</b>	Niedrig (meist I)	Hoch (meist III)
<b>Prognose</b>	Günstig	Schlecht
<b>Molekulare Alterationen</b>	KRAS-, BRAF-, PTEN- und PIK3CA-Mutationen, Mikrosatel- liteninstabilität	p53-Mutationen häufig

### 1.3 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist weltweit der bei Frauen am häufigsten auftretende bösartige Tumor (Bray *et al.*, 2018). In Deutschland wird bei 70.000 Patientinnen pro Jahr ein Mammakarzinom neu diagnostiziert. Laut statistischem Bundesamt erkranken 12 % aller Frauen im Laufe ihres Lebens daran. Trotz steigender Häufigkeit ist die Mortalitätsrate (23,0 %) bei Mammakarzinomen durch Fortschritte in der Früherkennung und der Therapieentwicklung relativ konstant (Robert Koch-Institut und Statistischen Bundesamt, 2005). Risikofaktoren für Mammakarzinome können erblicher oder erworbener Natur sein. Bei Mutationen in den BRCA 1 und 2 oder im p53-Gen liegt ein erblicher Brustkrebs vor. Weibliche Körperzellen, auch Tumorzellen, tragen weibliche Sexualhormonrezeptoren (Östrogene und Gestagene). So kann das Tumorwachstum auch hormonabhängig beeinflusst werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020a; Petru *et al.*, 2014a).

Wird mittels Mammographie oder Ultraschall ein Tumor entdeckt, folgt eine histologische Untersuchung zur Klärung der Dignität. Es wird zwischen invasive Karzinom ohne

speziellen Typ (ehemals invasiv duktales Karzinom, 70-80 %) und dem invasiven Karzinom mit speziellem Typ (z.B. invasiv-lobuläre Karzinom, invasiv tubulären, muzinösen, medullären, papillären Tumortypen), sowie der nicht-invasiven Präkanzerose des invasiven Mammakarzinoms (duktales Carcinoma in situ, lobuläres Carcinoma in situ) unterschieden (Petru *et al.*, 2014a). Diese Tumortypen werden anhand von Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate wiederum in drei Differenzierungsgrade eingeteilt (G1-G3). Außerdem sind die Tumorgröße, Anzahl der befallenen Lymphknoten und Fernmetastasierung pTNM Status, Alter, Hormonrezeptorstatus, Her2-Status oder Proliferationsindex Ki-67 prognostische Faktoren.

## 1.4 Allgemeine Therapiemöglichkeiten

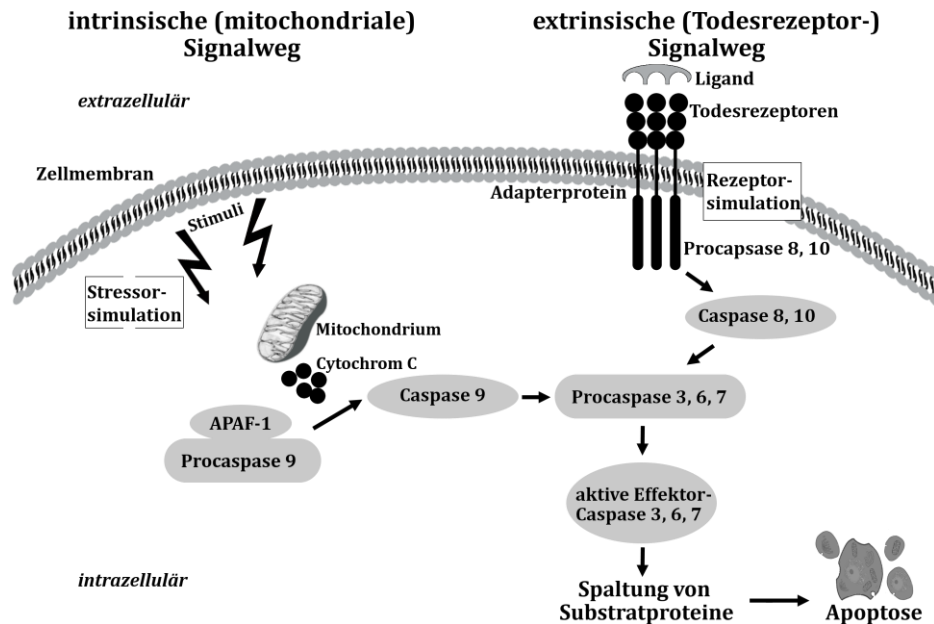
Eine Therapie ist immer abhängig von der Art und dem Fortschritt des Tumors. Die momentanen Behandlungsmöglichkeiten solider Tumore umfassen die operative Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie. Für bestimmte Mammakarzinome ist auch eine endokrine Therapie induziert.

Dabei wird in kurative (Heilung bzw. Lebensverlängerung) und palliative (Verbesserung der Lebensqualität) Therapie untergliedert (Mutschler *et al.*, 2020). Das Therapiekonzept eines fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms basiert auf einer *First-Line* Chemotherapie in Kombination mit der zuvor durchgeführten operativen Tumorregression (Petru *et al.*, 2014b). Diese ist individuell auf jede Patientin abgestimmt und sowohl abhängig von den Tumoreigenschaften als auch von der Wirksamkeit und Verträglichkeit des Zytostatikums. Im Folgenden wird näher die medikamentöse Therapie mit Zytostatika beschrieben.

Die *First-Line*-Therapie der meisten soliden Tumore basiert im größten Teil noch auf klassischen Chemotherapeutika. Dabei werden meist mehrere Substanzen verschiedener Wirkmechanismen kombiniert, um eine effektivere Therapie und eine geringere Toxizität zu gewährleisten und zusätzlich das Risiko einer Resistenzentwicklung zu minimieren.

Klassische Antineoplastika haben häufig den Nachteil einer engen therapeutischen Breite und eines schlechten Nebenwirkungsprofils, wie auftretende Blutbildstörungen, Hepatotoxizität, Neurotoxizität, gastrointestinale Beschwerden, Haarausfall oder Emesis (Gridelli *et al.*, 2003; van Gijn *et al.*, 1999; Creemers *et al.*, 1996). Die Strukturen greifen dabei in überlebenswichtige Prozesse der Zelle während der Zellteilung ein und beeinträchtigen somit auch gesunde Zellen mit hoher Proliferationsrate. Im Gegensatz dazu steht die zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*), die nur ausgewählte Angriffspunkte

der Krebszelle angreifen soll, um das Normalgewebe möglichst zu schonen. Molekulare Kenntnisse über die spezifischen Eigenschaften der Karzinogenese werden derzeit intensiv erforscht, um Signalübertragungskaskaden zu beeinträchtigen und das Wachstum des Tumors zu stoppen oder die Apoptose einzuleiten (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Signalwege der Apoptose**

Bindet ein Ligand an den Todesrezeptor an, so wird über Adaptormoleküle die Procaspase 8 und 10 gebunden und zur Caspase gespalten. Diese aktiviert die Caspase 3,6 und 7, welche wichtigste Proteine und Nucleinsäuren in der Zelle zerstören. Ein weiterer Weg führt durch Zellstress zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Dieses verbindet sich mit APAF-1 zur Caspase 9, die dann ebenfalls die Caspase 3,6 und 7 aktiviert (modifiziert nach Fahlke, 2015).

Der aktive Zelltod (Apoptose) spielt eine zentrale Rolle für die Regulation der Gewebehomöostase. Im extrinsischen und intrinsischen Signalweg dienen die Caspasen (Proteasen) als Haupteffektoren. Die Aktivierung des extrinsischen Weges wird durch Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor eingeleitet, indem durch das Adapterprotein FADD die Caspase 8 aktiviert wird, welche wiederum die Effektorcaspasen 3,6 und 7 aktiviert. Diese führen zur Zerstörung wichtigster Proteine und Nucleinsäuren in der Zelle. Der intrinsische Weg hingegen wird über DNA-Schäden aktiviert, wobei die Mitochondrien involviert sind. Nach Abgabe von Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Plasma bindet dieses an den APAF-1 und an die Procaspase 9 und formt so den Apoptosom-Komplex. In diesem Komplex wird nun die Caspase 9 aktiviert und kann so die Caspase 3, 6, 7 aktivieren, die wiederum zur Apoptose führen (Derakhshan *et al.*, 2017).

In der Tab. 1.3 sind die unterschiedlichen Substanzklassen der Zytostatika mit ihren Wirkmechanismen aufgeführt.



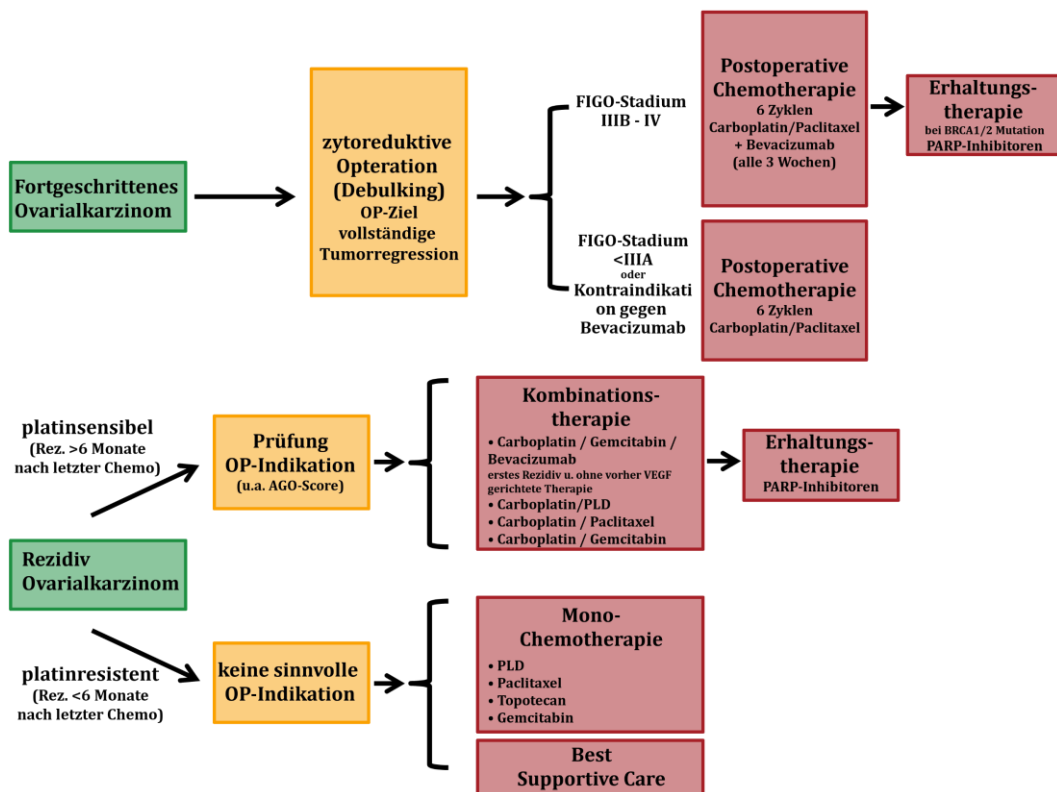
**Tab. 1.3: Allgemein zytotoxisch wirksame Chemotherapeutika-Klassen**  
Arzneistoffklassen der Zytostatika (Mutschler *et al.*, 2020).

Substanzgruppe	Wirkmechanismus	Beispiele
<b>Klassische Chemotherapeutika (Zytostatika)</b>		
Antimetabolite	Hemmung der Nucleotid- und DNA-Synthese	6-Mercaptopurin, Methotrexat, 5-Fluorouracil, Cytarabin, Gemcitabin
Alkylanzien	Alkylierung nukleophiler Zentren biologischer Systeme wie DNA, RNA und Proteine	Cyclophosphamid, Cisplatin, Carboplatin
Interkalatoren	Interkalation in die DNA, Produktion von Superoxid-Radikalanionen, Alkylanzien	Doxorubicin, Daunorubicin, Bleomycin
Topoisomerase-Inhibitoren	Hemmung der DNA-Replikation, Transkription	Topotecan, Etoposid, Irinotecan, P8-D6
Mitosehemmstoff	Hemmung der Mikrotubuli Funktion (Zellteilung)	Vincristin, Vinblastin, Paclitaxel, Docetaxel
<b>Gezielte Therapie</b>		
Antikörper	Zielgerichtet gegen Wachstumsfaktoren, Wachstumsrezeptoren oder Proteine	Trastuzumab, Cetuximab, Bevacizumab
Tyrosinkinase-Inhibitor	Hemmung der Signalweiterleitung	Imatinib, Axitinib, Sunitinib

Durch die Entwicklung neuer zielgerichtete Therapieoptionen wirkt die Behandlung mit klassischen zytotoxischen Substanzen als entbehrlich. Tatsächlich sind Zytostatika „nach wie vor Säule und Goldstandard der Therapie der meisten Tumorarten“ (Freissmuth *et al.*, 2016). Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern und Antikörper-Drug-Konjugaten gewannen auch neue Erkenntnisse der Krebsimmuntherapie immer mehr an Bedeutung. Beispiel hierfür ist die Her2-Überexpression bei bestimmten Mammakarzinomarten, in der eine Antikörper-Therapie indiziert ist.

In der Therapie vom malignen Ovarialkarzinom sind Carboplatin oder Paclitaxel wertvolle Substanzen. Die bisherige *First-Line*-Therapie für das fortgeschrittene Ovarialkarzinom, bestehend aus der zytoreduktiven Chirurgie und einer systemischen, platinbasierten Kombinationschemotherapie mit einem Taxan und/oder stadienabhängig in Kombination mit dem anti-VEGF Antikörper Bevacizumab (Abb. 1.3) (Colombo *et al.*, 2003; Oza *et al.*, 2015). Der verbliebende Tumorrest nach zytoreduktiver Operation und das Auftreten von Aszites sind dabei wichtige Prognosefaktoren. Häufig treten jedoch innerhalb von 18 Monaten Rezidive auf, die in platinresponsive (Progression nach platinhaltigem Therapieregime nach mehr als sechs Monaten) und platinnonresponsive (Progression nach platinhaltigem Therapieregime nach weniger als sechs Monaten) Verläufe eingeteilt werden. Die S3-Leitlinie empfiehlt derzeit zur Therapie des rezidierten, platinsensiblen Ovarialkarzinoms eine Kombination aus Carboplatin mit Gemcitabin,

pegyliertes liposomales Doxorubicin (PLD) oder Paclitaxel. Auch steht die Kombination mit Bevacizumab zur Verfügung, sofern die Patientinnen diesen Antikörper nicht bereits in der *First-Line*-Therapie bekommen haben (Aghajanian *et al.*, 2015). Seit Juni 2019 sind ebenso die PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase)-Inhibitoren nach Ansprechen auf die Platinreinduktion, unabhängig vom BRCA-Mutationsstatus, zugelassen. Diese können das progressionsfreie Intervall zum Teil erheblich verlängern und dienen als Erhaltungstherapie (Pujade-Lauraine *et al.*, 2014; Ledermann *et al.*, 2012; Mirza *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2018).



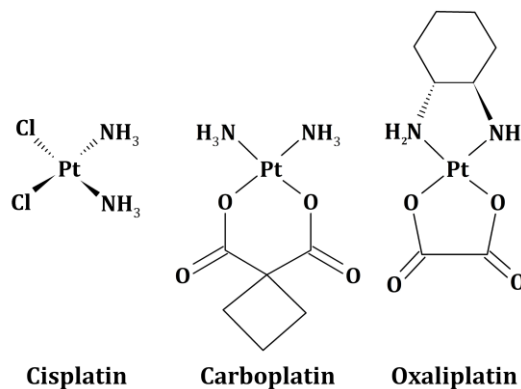
**Abb. 1.3: Therapiealgorithmus beim primären fortgeschrittenen OC und beim OC-Rezidiv**

Dargestellt ist das momentane Therapieschema für das fortgeschrittene und rezidierte Ovarialkarzinom nach S3-Leitlinie des Leitlinienprogramms Onkologie (2020b). Dabei wird die bedeutende Rolle von Cisplatin und Paclitaxel in der Therapie des fortgeschrittenen OC deutlich. Tritt ein platinresistentes Rezidiv auf, so ist die PLD, Gemcitabin oder Topotecan, ein Topoisomerase I-Inhibitor das Mittel der ersten Wahl (modifiziert nach Mahner *et al.*, 2013; Leitlinienprogramm Onkologie, 2020b).

Im Falle eines platinresistenten Rezidives ist eine Monotherapie indiziert. Hierfür stehen Gemcitabin oder PLD zur Verfügung (Abb. 1.3). Zudem wurde Ende 1996 der Topoisomerase I-Hemmstoff Topotecan zur Behandlung des fortgeschrittenen platinresistenten Ovarialkarzinoms zugelassen und wird in der Klinik routinemäßig eingesetzt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2020b).

### 1.4.1 Platinkomplexverbindungen

In den 1960er Jahren wurde zufällig die zytostatische Wirkung von Platinverbindungen durch Rosenberg *et al.*, entdeckt, als sie die Wirkung des Wechselstroms auf das Wachstum von *Escherichia coli* untersuchten. Derzeit werden hauptsächlich Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin in der Onkologie verwendet, welche durch Bildung von Aquo- und Hydroxy-Platinkomplexen DNA-Stränge vernetzen können (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Strukturformeln von Platinkomplexverbindungen**

Entscheidend für die Wirkung ist die Entstehung der hochreaktiven Aquo- und Hydroxy-Platinkomplexe in der Zelle, welches die DNA-Stränge miteinander vernetzen. Bei Carboplatin und Oxaliplatin geschieht dieser Prozess durch die hydrolytische Abspaltung bidentaten Liganden. So kann die DNA nicht mehr oder nur noch falsch abgelesen werden (Herdegen *et al.*, 2020; Eckstein, 2011).

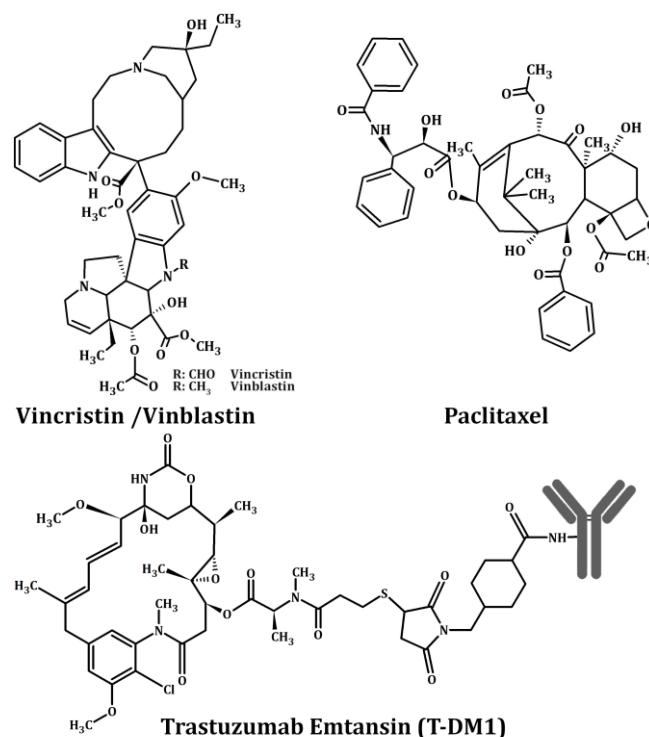
Carboplatin besitzt im Vergleich zu Cisplatin eine langsamere Umwandlung in die aktive Form, sodass die Wirkung langsamer einsetzt. Dieses führt zu weniger starken Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, weshalb Carboplatin beim Ovarialkarzinom deutlich häufiger Anwendung findet (Ovar-3 Studie du Bois *et al.*, 2000). Carboplatin wird mit Paclitaxel kombiniert, wobei Carboplatin in einer Dosis von AUC 5 über 3 h *i.v.* für 6 Zyklen alle 3 Wochen verabreicht wird.

### 1.4.2 Mitosehemmstoff

Mitosehemmstoffe verhindern den Aufbau der Mitosespindel und die Separation der Chromosome in der Mitose, sodass die Zellen in der Metaphase arretieren. Mikrotubuli sind für den Aufbau des Zytoskeletts sowie für die Teilung der Zelle durch die Bildung der mitotischen Spindel von Bedeutung. Stören die pflanzlichen Alkaloide diese Prozesse, so wird in der Zelle die Apoptose eingeleitet (Herdegen *et al.*, 2020). Die Mitosehemmstoffe werden in zwei Klassen aufgeteilt (Abb. 1.5):

- **Vinca-Alkaloide** (Vincristin, Vinblastin): hemmen den Aufbau des Spindelapparats
- **Taxane** (Paclitaxel, Docetaxel): hemmen den Abbau des Spindelapparats

Paclitaxel wurde in den 1960er Jahren als Wirkstoff der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) entdeckt, doch erst spät erlangte Paclitaxel durch Aufklärung des Wirkmechanismus an Bedeutung in der Behandlung von Mamma- und Ovarialkarzinomen (Wani *et al.*, 1971; Leitlinienprogramm Onkologie, 2020b, 2017). Dabei fördert Paclitaxel die Aggregation von Mikrotubuli aus  $\alpha/\beta$ -Dimeren des Tubulins und stabilisiert die Mikrotubuli durch Hemmung der Depolymerisation, sodass das dynamische Gleichgewicht aus der Balance gerät. Zudem induziert Paclitaxel eine ungewöhnliche Anordnung der Mikrotubulibündel während des gesamten Zellzyklus. Somit ist die dynamische Reorganisation des mikrotubulären Netzwerkes und dadurch sind die vitalen Zellfunktionen gestört (Mutschler *et al.*, 2020). Wie im Abschnitt 1.4.4 beschrieben ist Paclitaxel durch sein breites zytostatisches Wirkungsspektrum wichtiger Teil der *First-Line*-Therapie des Ovarialkarzinoms und zusätzlich zugelassen für das Mammakarzinom und das fortgeschrittene nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) (Hospira Deutschland GmbH, 2011). Trotz der großen Bedeutung der Mitosehemmstoffe für die verschiedenen Bereiche der Krebstherapie limitieren starke Nebenwirkungen, wie die dosislimitierende Neurotoxizitäten, die Therapie (Dominguez-Brauer *et al.*, 2015)



**Abb. 1.5: Strukturen von etablierten Mitosehemmstoffen**

Vincristin und Vinblastin hemmen die Tubulin-Polymerisation, indem sie an der Vinca-Stelle der  $\beta$ -Untereinheit des Tubulins binden. Paclitaxel ist ein in der Krebstherapie sehr etablierter Wirkstoff, der durch Bindung an die Taxol-Bindestelle seine Wirkung entfaltet. T-DM1 ist ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat, welches auf einem neuen Wirkprinzip basiert. Hierbei binden die spezifischen Antikörper an die Her2-Rezeptoren des Mammakarzinoms und internalisieren den Wirkstoff Emtansin, welcher dann gezielt in der Tumorzelle wirken kann (LoRusso *et al.*, 2011; Avendano und Menendez, 2015; Mutschler *et al.*, 2020).

In den letzten Jahren hat ein neues Therapieprinzip, das Antikörper-Wirkstoff-Konjugat (ADC, engl. *antibody-drug-conjugate*), an Bedeutung gewonnen. ADC sind zytotoxische Wirkstoffe, die über einen chemischen Linker an einen Antikörper gebunden sind (Beck *et al.*, 2010). Der Antikörper dient dabei als gezielter Transporter von diesen hochwirksamen Zytostatika, indem er an das spezifische Zielantigen einer Tumorzelle bindet und einen endozytotischen Internalisierungsprozess auslöst. Das ADC gelangt so in die Zelle und wird durch endolysosomale Degradation in Wirkstoff und Antikörper gespalten, bevor es aus dem Lysosom entlassen wird (Ritchie *et al.*, 2013). So kann der Wirkstoff gezielt am gewünschten Target in der Tumorzelle wirken und den Zelltod einleiten. Vorteil dieses Prinzips ist das geringere Nebenwirkungspotential. Ein optimaler Therapieerfolg wird nur erzielt, wenn es sich um ein plasmastabiles Konjugat handelt und der Wirkstoff nicht vor dem Andocken an das Zielantigen, sondern erst unmittelbar nach Internalisierung freigesetzt wird. Für diese Stabilität sind die Linker entscheidend. Sie werden in zwei Kategorien eingeteilt: spaltbare Linker und nichtspaltbare Linker. Bei den ADCs mit nichtspaltbaren Linkern, wie dem T-DM1, wird der Antikörper nach der Internalisierung abgebaut, sodass das Konjugat aus Linker und Wirkstoff wirkt. T-DM1 (Trastuzumab-Emtansin, Kadcyła) wurde von der Firma Roche entwickelt (Abb. 1.5). T-DM1 ist ein ADC aus dem anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und dem hochpotenten Mitosehemmstoff DM1 (Maytansinderivat), die über einen Thioether-Linker (4-[N-Maleimido-methyl]cyclohexan-1-carboxylat, MCC) kovalent verbunden sind. Der monoklonale Antikörper Trastuzumab bewirkt dabei eine höhere Selektivität auf Her2-exprimierende Zellen. Zudem entfaltet es selbst auch eine antitumorale Wirkung, indem es eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) induziert und eine intrazelluläre Signalübertragungskaskade inhibiert. Das erst am Zielort freigesetzte Lysin-gebundene Emtansin hemmt die Tubulin-Polymerisation, wodurch der Aufbau der Mitosespindel und die Zellteilung gestört werden (Barok *et al.*, 2014). Es wurde 2013 für die Behandlung des fortgeschrittenen Her2-positiven Mammakarzinoms zugelassen (Jelovac und Emens, 2013). Mit Trastuzumab Deruxtecan steht ein weiteres ADC für das nicht resezierbare oder metastasierte Her2-positive Mammakarzinom kurz vor der Zulassung, nachdem die Studie DESTINY-Breast01 den Nutzen eindrucksvoll belegte (Modi *et al.*, 2020). Auch das gegen den triple negativen Brustkrebs getestete ADC Sacituzumab-Govitecan zeigte in klinischen Studien eine deutliche Wirkung und wurde bereits von der FDA im April 2020 zugelassen (Bardia *et al.*,

2020). Damit stehen zeitnah zwei ADC, welche mit einem Topo I Inhibitor beladen sind, für die Therapie des Mammakarzinoms bereit. Allgemein stellt dieses Wirkprinzip eine wichtige Strategie der gegenwärtigen Forschung neuer Arzneistoffe dar.

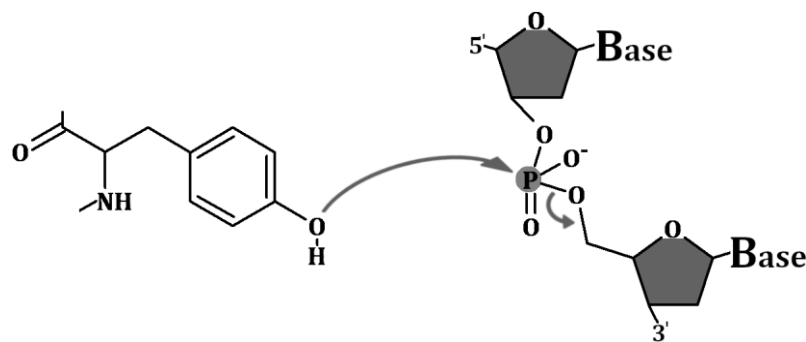
### 1.4.3 Hemmstoffe der humanen Topoisomerase I und II

Topoisomerasen sind primäre Targets einer Vielzahl von klinisch interessanten Krebstherapeutika. Dabei werden die Topoisomerasen inhibiert und bewirken so einen antibakteriell und antitumoral einzigartigen Effekt (Osheroff, 1998).

In der vorliegenden Arbeit spielen die humanen Topoisomerasen I und II (Topo I/II) und die Inhibition dieser Enzyme eine übergeordnete Rolle, weshalb diese Wirkstoffklasse im Folgenden im Detail betrachtet wird.

Humane Zellen besitzen ein komplexes Ordnungssystem, welches die genetische Information in eine kompakte Form komprimiert (Pommier, 2013). Für DNA-Prozesse der Zelle, wie Replikation, Transkription und Reparatur muss ein DNA-Doppelstrang entwunden und anschließend wieder verdrillt werden. Topoisomerasen sind essenzielle Enzyme, die die Topologie der DNA durch Einfügen von Strangbrüchen, Hindurchführen von anderen Strängen und Religation der Brüche, regulieren (Champoux, 2001). Diese Enzymklasse wird aufgrund ihrer Struktur, Aktivität und ihres Vorkommens in Topo I, II $\alpha$ /II $\beta$  und III (Boege, 1996; Osheroff, 1986) unterteilt. Die Topo I führt Einzelstrangbrüche durch und ermöglicht eine kontrollierte Rotation der DNA-Stränge. Die Topo II ist in der Zelle für den Doppelstrangbruch zuständig, um das Durchführen eines weiteren Doppelstrangs durch die Bruchstelle zu ermöglichen und so positive und negative Überspiralisierungen aufzuheben und Knotenbildung aufzulösen. Während Topo I als Monomer den Einzelstrangbruch induziert, bildet Topo II Homodimere aus und benötigt ATP divalente Metallionen (Mg<sup>2+</sup>) als Cofaktoren, damit beide DNA-Stränge der Doppelhelix am 5'-Ende geschnitten werden können (Pommier *et al.*, 2010). Dabei greifen die Enzyme mit dem Tyrosinrest (Topo I: Tyr<sup>723</sup>; Topo II $\alpha$ : Tyr<sup>805</sup>; Topo II $\beta$ : Tyr<sup>821</sup>) des aktiven Zentrums nukleophil am DNA-Rückgrat an (Abb. 1.6). Es entsteht durch Umesterung ein kovalentes Enzym-DNA-Intermediat (*cleavable complex*) (Champoux, 2001; Berger *et al.*, 1996). Während dieses transienten Strangbruchs ist der Komplex sensitiv für kleine Moleküle, welche sich in die Lücken einlagern und diesen Komplex stabilisieren können. Die Topo II besitzt eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Isoform, welche eine hohe Sequenz- und Funktionshomologie aufweisen (Deweese und Osheroff, 2009). Es wird angenommen, dass die Topo II $\alpha$  im Menschen hauptsächlich für die DNA-Replikation und die

Chromosomensegregation verantwortlich ist, während die Topo II $\beta$  mit der Transkriptionsregulation in Verbindung gebracht wird. Zudem trägt die Topo II zur korrekten Faltung und Trennung der Chromosomen bei. Aufgrund der unterschiedlichen Wirkziele lässt sich vermuten, dass die Topo II $\alpha$  zellzyklusabhängig ist, während die Topo II $\beta$  kontinuierlich während des Zellzyklus exprimiert wird (Deweese und Osheroff, 2009; Ju *et al.*, 2006).

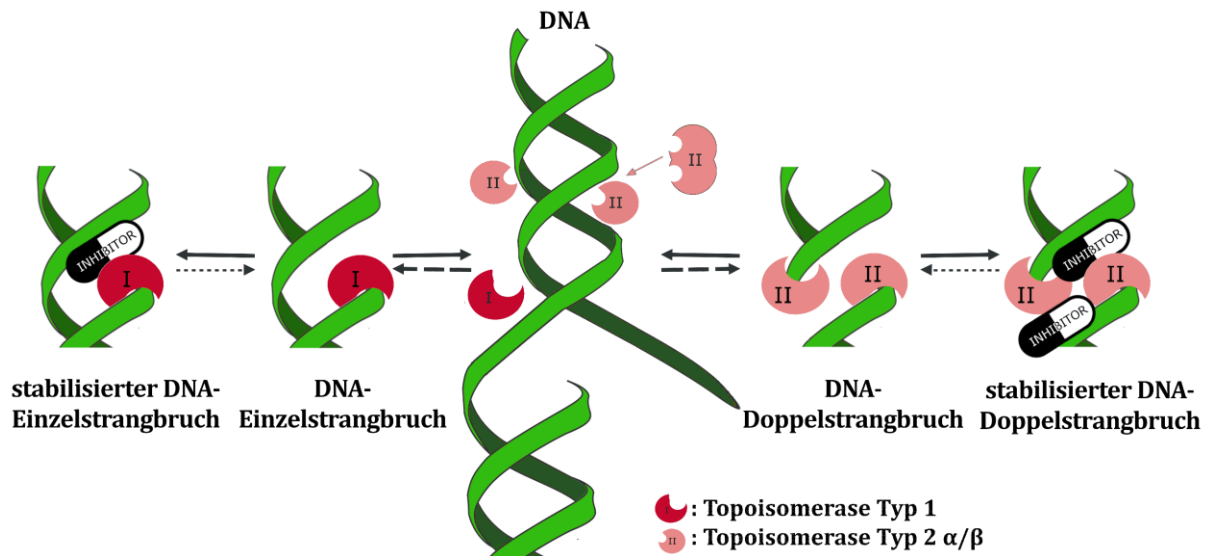


**Abb. 1.6: Entstehung des Strangbruchs und Bildung des kovalentes Enzym-DNA-Komplexes**

Der nukleophile Angriff des Tyrosins im Aktiven Zentrums der Topo I an das Phosphat des DNA-Rückgrats bewirkt eine Umesterung. Am 5'-Ende entsteht eine freie Hydroxylgruppe und am 3'-Ende wird das Tyrosin kovalent gebunden (modifiziert nach Pommier, 1998).

Aufgrund ihrer relevanten Funktion in Proliferationsprozessen stellt diese Enzymklasse ein wichtiges Target in der Krebstherapie dar. Topo-Inhibitoren hemmen Topo I und / oder II. Dabei wird zwischen zwei verschiedenen Wirkmechanismen unterschieden: Topo-Giftung und katalytische Inhibition (Froelich-Ammon und Osheroff, 1995; Pommier, 1998; Boege, 1996). Katalytische Topo-Inhibitoren interagieren mit dem Zielenzym, indem sie die Bindung zwischen DNA und Topoisomerase behindern, die ATP-Bindung bei der Topo II blockieren oder nicht-kovalent den DNA-Enzym-Komplex stabilisieren. Dabei finden diese Inhibitoren nicht nur Einsatz als Zytostatikum, sondern wirken auch kardioprotektiv, wirkverstärkend oder werden zur Prävention von Resistenzen mit Topo-Giften kombiniert (Larsen *et al.*, 2003). Demgegenüber sind Topo-Gifte in der Lage das kovalente Enzym-DNA-Intermediat während des DNA-Strangbruchs zu stabilisieren und führen so zu Störungen in Replikations- und Transkriptionsvorgängen (Abb. 1.7). Durch Topo-Gifte kommt es zum erhöhten Auftreten von „cleavable complex“, die wiederum zu Kollisionen mit Replikations- und Transkriptionenzymen in kontinuierlich teilenden Zellen führen. Dies verursachen fatale DNA-Schäden, welche nicht repariert werden können. Die Topo-Gifte wandeln somit Topoisomerasen in physiologische Toxine um, sodass spezifische Zelltodsignalwege aktiviert werden, welche letztlich zur Apoptose oder Nekrose führen (Froelich-Ammon und Osheroff, 1995; Vos *et al.*, 2011).

Die Topo-Gifte können dabei mit der DNA-Spaltstelle interkalieren und so die Religation physikalisch blockieren. Alternativ können durch sterische Verlagerung des DNA-Rückgrats oder durch nicht kovalente Wechselwirkungen die Prozesse gestört werden. Die Wirkstärke der Topo-Gifte ist dabei von der Bindungsstärke und -kinetik abhängig (Wilstermann und Osheroff, 2003).



**Abb. 1.7: Mechanismus zur Stabilisierung des spaltbaren DNA-Topo-Intermediats**

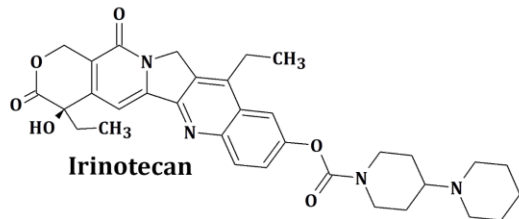
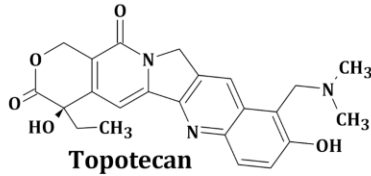
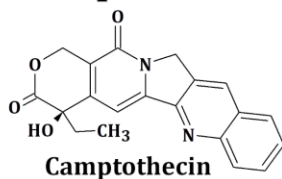
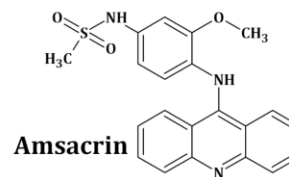
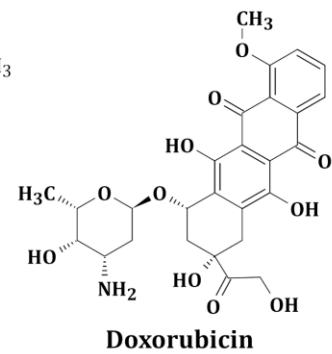
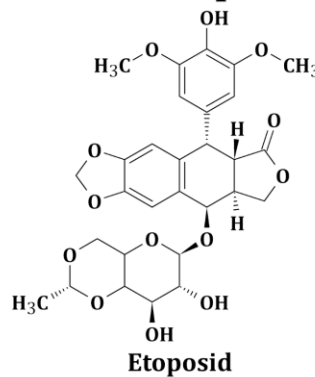
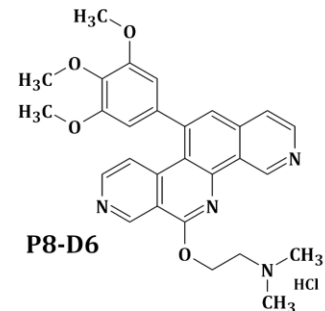
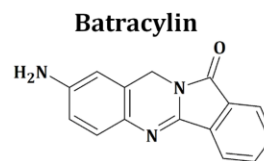
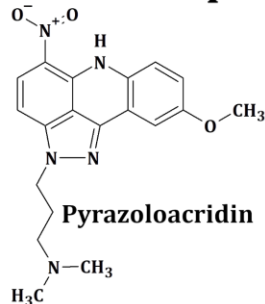
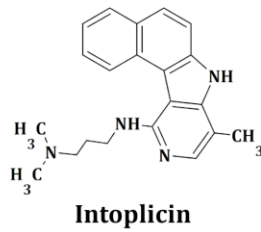
Schematische Darstellung der Stabilisierung spaltbarer DNA/Topo-Komplexe durch Topo-Gifte. Topo I ist ein Monomer, welches Einzelstrangbrüche induziert, während Topo II als Homodimer Doppelstrangbrüche bewirkt. Durch Einlagerung kleiner Moleküle in die Enzym-DNA-Intermediäre können diese stabilisiert werden (modifiziert nach Pommier *et al.*, 2010; Meier, 2014).

Aufgrund der oben beschriebenen proliferationshemmenden Eigenschaften von Topoisomerase-Inhibitoren vor allem in Tumorzellen ist diese Arzneistoffklasse in der Krebstherapie gut etabliert. Das aus *Camptotheca acuminata* isolierte Pflanzenalkaloid Camptothecin interagiert mit Topo I und diente als strukturelle Leitstruktur für weitere Topo I-Inhibitoren wie Topotecan und Irinotecan. Die Strukturen dieser Topo I-Inhibitoren sind in Abb. 1.8 zu finden. Wegen der schlechten Wasserlöslichkeit und starken Nebenwirkungen besitzt Camptothecin jedoch keine hohe klinische Relevanz. Topotecan und Irinotecan sind beide fest in der Krebstherapie verankert (Wall und Wani, 1995; Hsiang *et al.*, 1985; Pommier, 2006). Topotecan ist oral und *i.v.* als Monotherapie beim metastasierten Ovarial- und dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (small cell lung cancer, SCLC) sowie in Kombination mit Cisplatin bei dem rezidierten Karzinom der Cervix uteri zugelassen. Die Dosierung laut Fachinformation liegt *i.v.* für 5 Tage bei 1,5 mg/m<sup>2</sup>/d (oral 2,3 mg/m<sup>2</sup>/d); mit einer Wiederholung nach 3 Wochen (Hexal AG, 2018). Irinotecan ist ein wasserlösliches Prodrug, welches erst durch Stoffwechselfvorgänge im Körper in die aktive Form überführt wird. Irinotecan besitzt eine Zulassung für die Therapie des



fortgeschrittenen, metastasierenden kolorektalen Karzinoms in Kombination mit 5-Fluorouracil und Leucovorin oder Cetuximab. Die typische Dosis liegt hier bei  $180 \text{ mg/m}^2$  alle 2 Wochen bzw.  $350 \text{ mg/m}^2$  alle 3 Wochen (Freissmuth *et al.*, 2016). Ein Vorteil dieser Substanzen ist ihre hohe Selektivität, jedoch ist die Therapie mit Camptothecin-Derivaten von schweren Nebenwirkungen, wie Neutropenien, Anämien und Thrombozytopenien begleitet. Vertreter der Gruppe der Indenoisoquinoline und der Benzo[c]phenanthridine befinden sich in der präklinischen und klinischen Entwicklung (Beck *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2015; Pommier *et al.*, 2010; Meier *et al.*, 2017). Die für diese Arbeit wichtigen Benzo[c]-phenanthridine werden in Abschnitt 1.5 näher beschrieben.

Für die Topo II-Inhibitoren sind Etoposid, Doxorubicin und m-Amsacrin bekannte Vertreter (Abb. 1.8). Etoposid ist ein *i.v.* und oral verfügbarer Arzneistoff, der nur die Topo II hemmt, ohne Effekt auf Tubulin auszuüben. Laut European Medicines Agency (EMA) ist es für die Therapie des Hodenkarzinoms, des kleinzelligen Lungenkarzinoms, des Lymphoms (Hodgkin-/Non-Hodgkin), der akuten myeloischen Leukämie, des nicht-epithelialen Ovarialkarzinoms und des platinresistenten/-refraktären epithelialen Ovarialkarzinoms zugelassen (EMA, 2017). Die Dosierung liegt hier für 5 Tage bei  $50\text{--}100 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ ; mit einer Wiederholung nach 3-4 Wochen. Doxorubicin ist ein Anthrazyklin, welches die DNA- und RNA-Synthese hemmt, wobei das Ringsystem mit den Basen interkaliert, während der Aminozucker mit den Phosphatresten interagiert. Ein weiterer entscheidender Wirkmechanismus von Doxorubicin ist die Hemmung der Topo II  $\alpha/\beta$ . Doxorubicin wird größtenteils als liposomale Formulierungen, die dann eine längere Halbwertszeit von 55 h bis 75 h besitzen, appliziert. Schwere Nebenwirkungen wie Knochenmarkschädigungen, Schleimhautentzündungen, Gefäßschädigung und Leberfunktionsstörungen treten bei der Therapie mit Doxorubicin häufig auf (Mutschler *et al.*, 2020; Freissmuth *et al.*, 2016). m-Amsacrin ist ein Acridin-Derivat, welches Anwendung in der Induktions- und Erhaltungstherapie der akuten myeloischen Leukämie und der akuten lymphatischen Leukämie nach Versagen konventioneller Therapie findet (Nelson *et al.*, 1984; Schneider und Richling, 2017).

**Topo I-Inhibitoren****Topo II-Inhibitoren****Duale Topo I/II-Inhibitoren****Abb. 1.8: Strukturen von Topo I-, Topo II- und duale Topo-Inhibitoren**

(Pommier, 2006; Mutschler *et al.*, 2020; Nelson *et al.*, 1984; Adjei *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2017; Newman *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2007)

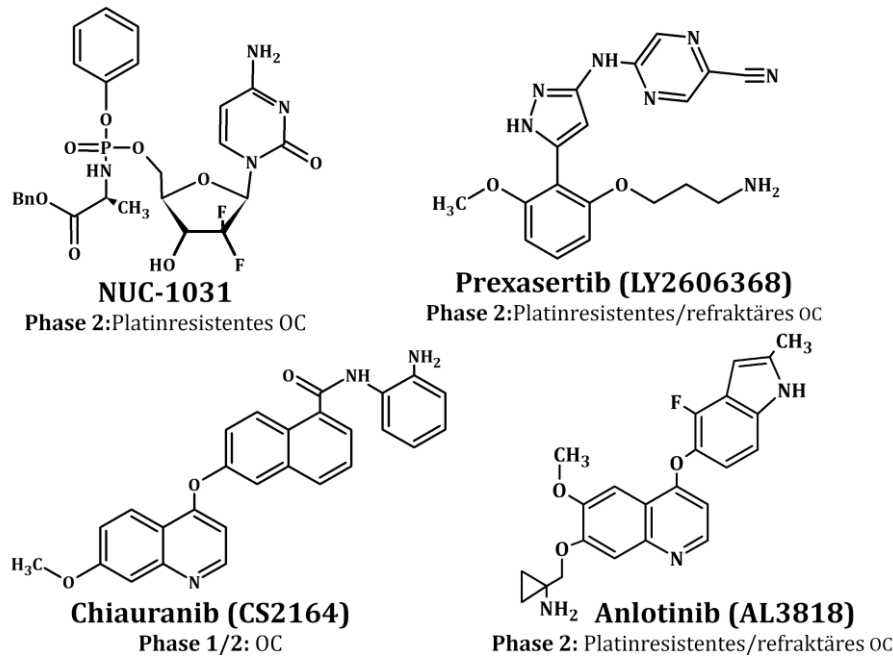
Während die Mehrzahl an Topo-Inhibitoren eine Selektivität entweder gegenüber Topo I oder Topo II aufweist, kann eine kleine Gruppe von Substanzen beide Enzyme hemmen. Als Beispiel stabilisieren das Benzopyridoindol „Intoplicin“, das Indenochinolinon „TAS-103“, das Pyrazoloacridin „NSC 366140“, das Batracyclin „NSC 320846“ und das Benzo[c]phenanthridin „P8-D6“ (Abb. 1.8) den DNA-Enzym-Komplex beider Enzyme (Agarwal *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 1999; Adjei *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 2017). Andere Verbindungen erkennen Struktur motive, die in beiden Enzymen vorhanden sind und induzieren Einzel- und Doppelstrangbrüche ohne Bildung eines spaltbaren Komplexes. Hierfür ist das Benzoisochinolin NK 109 ein Beispiel (Koh *et al.*, 2005). Trotz des Wissens über den Wirkmechanismus sind die Grundlagen für die hohe Antitumoraktivität einiger Topo-Inhibitoren noch nicht eindeutig verstanden. Vermutungen beschreiben, dass es vom komplexen Aktivitätsmuster abhängig ist, welches sowohl die Inhibierung als auch die Vergiftung der beiden Enzyme einschließt (Denny und Baguley, 2003). Ein

wesentlicher Vorteil eines dualen Topo-Inhibitors liegt in der geringeren Resistenzentwicklung. Die Hemmung nur eines der beiden Enzyme bewirkt die kompensatorische Hochregulierung des jeweils anderen Enzyms (Aronson, 2004; van Gijn *et al.*, 1999; van Gijn *et al.*, 2000; Lefevre *et al.*, 1991) und somit die Resistenz. Die Wirksamkeit dualer Topo-Inhibitoren auf solide Tumore wurde bereits in mehreren klinischen Phase 1/2-Studien an einigen Substanzen (z.B. Intoplicin) gezeigt, jedoch traten bei diesen starke unerwünschte Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität, Neutro- und Thrombozytopenie auf, weshalb sie die Zulassung nicht erreichten (Aichinger *et al.*, 2020; van Gijn *et al.*, 1999; Ewesuedo *et al.*, 2001; Abigerges *et al.*, 1996).

#### **1.4.4 Gegenwärtige Arzneimittelforschung auf dem Gebiet des Ovarialkarzinoms**

Aufgrund der oben beschriebenen schlechten Prognose nach Erkrankung am Ovarialkarzinom, ist die Forschung an neuen Arzneistoffen für die Therapie dieser Erkrankung essenziell. Neue Chemotherapeutika können eventuell bei resistenten Tumoren eingesetzt werden oder besitzen weniger Nebenwirkungen als die momentanen Standards und verbessern somit die Therapieoptionen. Aus diesem Grund befinden sich momentan einige neuentwickelte Substanzen, wie NUC-1031, Prexasertib oder Chiauranib in klinischen Studien zur Behandlung des Ovarialkarzinoms (Abb. 1.9).

NUC-1031 ist ein Nukleosid-Analogon, welches ähnlich wie Gemcitabin die DNA-Synthese hemmt. Das Einfügen eines Phosphoramids im Vergleich zu Gemcitabin schützt vor einigen Resistenzentwicklungen (Slusarczyk *et al.*, 2014). Die klinische Phase II Studie zur Behandlung mit NUC-1031 rekrutierte 51 Patientinnen mit platinresistentem Ovarialkarzinom, die entweder mit 500 mg/m<sup>2</sup> oder 750 mg/m<sup>2</sup> behandelt wurden. Die Studie wurde im Januar 2020 aufgrund einer verringerten Dosisintensität abgebrochen (NuCana plc, 2017; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03146663).



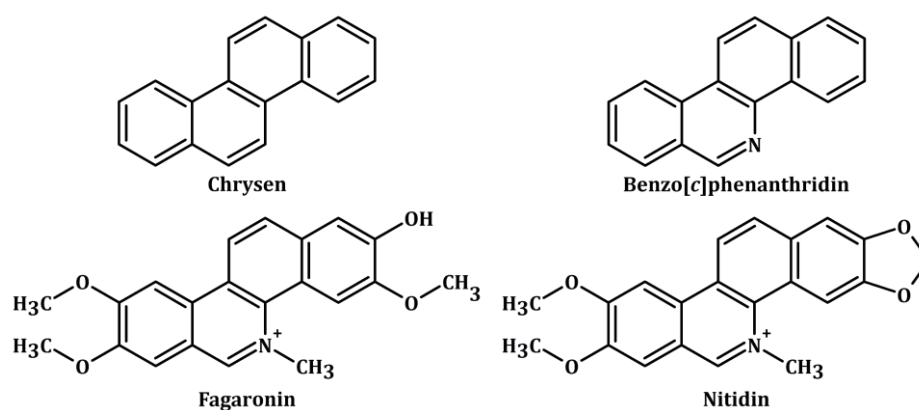
**Abb. 1.9: Strukturen von neuen Verbindungen, die sich in klinischen Ovarialkarzinom-Studien befinden**

NUC-1031 ist ein Nucleosid-Analogon, welches die DNA-Synthese hemmt, jedoch nicht Gemcitabin Resistenzen zeigt (Slusarczyk *et al.*, 2014). Es befand sich bis Ende 2019 in einer Phase II Studie zur Behandlung des platinresistenten Ovarialkarzinoms, die Studie wurde jedoch vorzeitig abgebrochen. Prexasertib ist ein Checkpoint-Kinase 1 Inhibitor und Anlotinib ein Tyrosinkinase Inhibitor, welche sich in klinische Phase II Studien befinden (Gao *et al.*, 2020; King *et al.*, 2015). Chiauranib ist ein Multi-Kinase-Inhibitor, bei welchem 2020 die klinische Phase II Studie abgeschlossen wurde (Zhou *et al.*, 2017).

Eine weitere klinische Phase II Studie zur Behandlung des platinresistenten Ovarialkarzinoms wurde mit Prexasertib, einem Checkpoint-Kinase 1 Inhibitor, geplant, in der die Rekrutierung momentan abgeschlossen ist (Eli Lilly and Company, 2018; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03414047). Chiauranib ist ein neuartiger oral wirksamer Multi-Target-Inhibitor, der gleichzeitig die Angiogenese-verwandten Kinasen (VEGFR2, VEGFR1, VEGFR3, PDGFR $\alpha$  und c-Kit), die Mitose-verwandte Kinase Aurora B und die chronisch entzündungsverwandte Kinase CSF-1R hemmt. Für diese Substanz wurde 2020 die klinische Phase II Studie zur Therapie des Ovarialkarzinoms abgeschlossen (Chipscreen Biosciences, 2017; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03166891). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Anlotinib befindet sich momentan für das platinresistente oder refraktäre Ovarialkarzinom in der Rekrutierungsphase. Es ist ein neuartiger oraler Wirkstoff, der auf den Rezeptor 2 und 3 des VEGF, den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 1–4, den von Blutplättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor-Rezeptor  $\alpha$  und  $\beta$ , c-Kit und Ret abzielt (Gao *et al.*, 2020; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03924882).

## 1.5 Benzo[*c*]phenanthridine

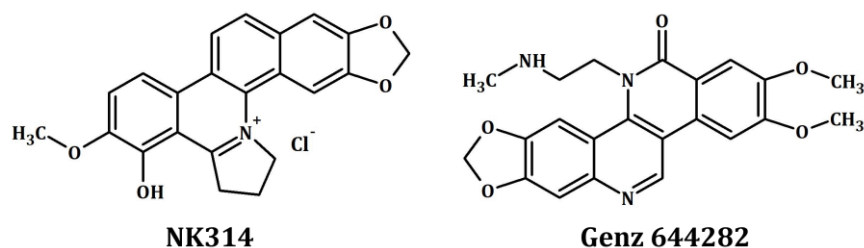
Erstmals 1839 von PROBST im Schöllkraut (*Chelidonium majus*) identifiziert, besitzen Benzo[*c*]phenanthridine (viergliedrige, stickstoffhaltige Heterozyklen) ein weitreichendes pharmakologisches Wirkspektrum von antimikrobiell, antiinflammatorisch bis antitumoral, welches auf der Hemmung von Topo I und II beruht. Die Naturstoffe Nitidin und Fagaronin, die als Leitstrukturen dienen, konnten aus Mohn- und Rautengewächsen (*Papaveraceae* und *Rutaceae*) isoliert werden und wirken antitumoral durch DNA-Interkalation und Topo I und II Hemmung (Larsen *et al.*, 1993; Messmer *et al.*, 1972; Wang *et al.*, 1993) (Abb. 1.10).



**Abb. 1.10: Natürlich vorkommende Alkaloide der Benzo[*c*]phenanthridine**

Chrysen ist der viergliedrige Grundbaustein der Benzo[*c*]phenanthridine. Die Naturstoffe Fagaronin und Nitidin, die sich aus diesen Grundstrukturen ableiten, besitzen potente antitumorale Aktivitäten (Simeon *et al.*, 1989; Phillips und Castle, 1981).

Probleme der damals identifizierten Benzo[*c*]phenanthridine lagen in der schlechten Ausbeute, akuten Toxizität und Instabilität in wässrigem Milieu (Cushman und Cheng, 1978). Zur Verbesserung dieser Faktoren dienten die Ausgangsstrukturen als Leitstrukturen und wurden weiter modifiziert, um selektive, hochpotente Benzo[*c*]phenanthridin-Derivate als potentielle Arzneistoffe zu entwickeln (Clement *et al.*, 2016; Stenzel, 2009; Meier, 2014; Steinhauer, 2016). Einige Benzo[*c*]phenanthridin-Derivate haben bereits vielversprechende präklinische Ergebnisse erzielt und finden sich derzeit in klinischen Studien für die Krebstherapie. Beispiele hierfür sind NK314 und Genz-644282, die sich derzeit noch in Phase I Studien befinden (Abb. 1.11).



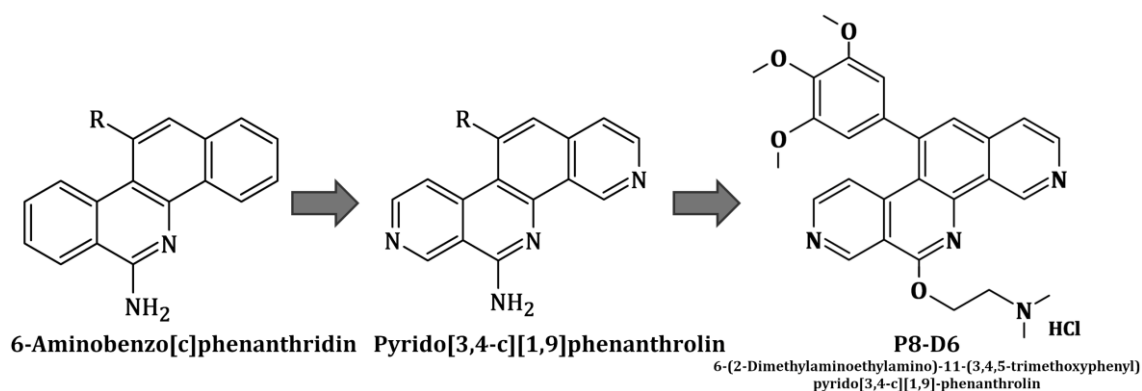
**Abb. 1.11: Auf Benzo[*c*]phenanthridin-basierende Strukturen aus aktuellen klinischen Studien**  
(Guo *et al.*, 2007; Kurtzberg *et al.*, 2011)

NK314 induziert in einen signifikanten G2-Zellstillstand, unabhängig vom p53-Status, so dass ein gemeinsamer Mechanismus der Checkpoint-Aktivierung wahrscheinlich ist. Des Weiteren ist NK314 fähig die Topo II $\alpha$  zu hemmen (Guo *et al.*, 2007). Genz-644282 befindet sich als Topo I-Inhibitor in einer klinischen Phase I Studie (Genzyme (Sanofi), 2009; ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00942799). Es besaß bereits in präklinischen Testungen an humanen Knochenmarkszellen und im *human tumor xenograft*-Modell mit NSCLC und Kolonkarzinomzellen eine stärkere Wirksamkeit als Standardtherapeutika wie Topotecan (Kurtzberg *et al.*, 2011).

### 1.5.1 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine

CLEMENT und WEIDE entwickelten 1995 erstmals einen effizienten und einfachen zwei-stufigen Syntheseweg, um tetrazyklische 11-substituierte Benzo[*c*]phenanthridine zu synthetisieren. Dabei führten sie eine basenkatalysierte Eintopf-Zwei-Komponentenumsetzung von zwei Äquivalenten *o*-Tolunitril mit einem Äquivalent einer aromatischen Aldehydkomponente in dipolarem aprotischen Lösungsmittel DMPU durch (Clement *et al.*, 2005; Kock *et al.*, 2005). Das erhaltene 11,12-Dihydro-Derivat konnte weiter mit DDQ zu einem vollständig konjugierten Heterozyklus dehydriert werden. Die Variabilität in der Aldehydkomponente erzielt eine Vielfalt unterschiedlicher 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridin-Derivate, wie das Pyrido[3,4-*c*][1,9]phenanthrolin (Abb. 1.12) (Clement *et al.*, 2016; Stenzel, 2009; Meier, 2014; Steinhauer, 2016). Auch Modifizierungen der Substituenten an der 11-Position und der 6-Position waren so möglich, um die physikochemischen und zytostatischen Eigenschaften zu verändern. Zwar besaßen die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine *in vitro* und *in vivo* vielversprechende antitumorale Effekte, jedoch besaßen diese Derivate auch eine hohe Lipophilie ( $\log D_{7.4} > 5$ ) und eine geringere Wasserlöslichkeit bei physiologischem pH-Wert sowie hohe Phototoxizitäten, sodass eine Weiterentwicklung als Arzneistoffkandidat aufgrund resultierender schlechter Bioverfügbarkeiten und Instabilitäten nicht erstrebenswert war. Aufgrund der strukturellen

Ähnlichkeit zu den natürlich vorkommenden Benzo[*c*]phenanthridin-Derivaten wie Fagaronin und Nitidin wurden für die 6-Aminobenzo[*c*]phenanthridine und ihre aussichtsreichen Derivate intensive Testungen zur antitumoralen Effektivität vom National Cancer Institut (*NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screening*) durchgeführt. Einige Verbindungen erzielten dabei im Vergleich zu den Naturstoffen stärkere antiproliferative Aktivitäten mit *mean graph midpoint* (MGM)  $GI_{50/60}$ -Werten (*growth inhibition 50 %*) kleiner als 1  $\mu\text{M}$  (Kock *et al.*, 2005). Dabei war auch zu erkennen, dass für die an 11-Position Di- oder Trimethoxyphenyl substituierten Derivate eine höhere Aktivität zu messen war. In diesem Zuge wurden auch weitere *in vivo NCI hollow fiber assay* durchgeführt. Anhand dieser Erkenntnisse wurden die Pyrido[3,4-*c*][1,9]phenanthrolin-Grundkörper mit Trimethoxyphenyl-Gruppe an Position 6 substituiert.

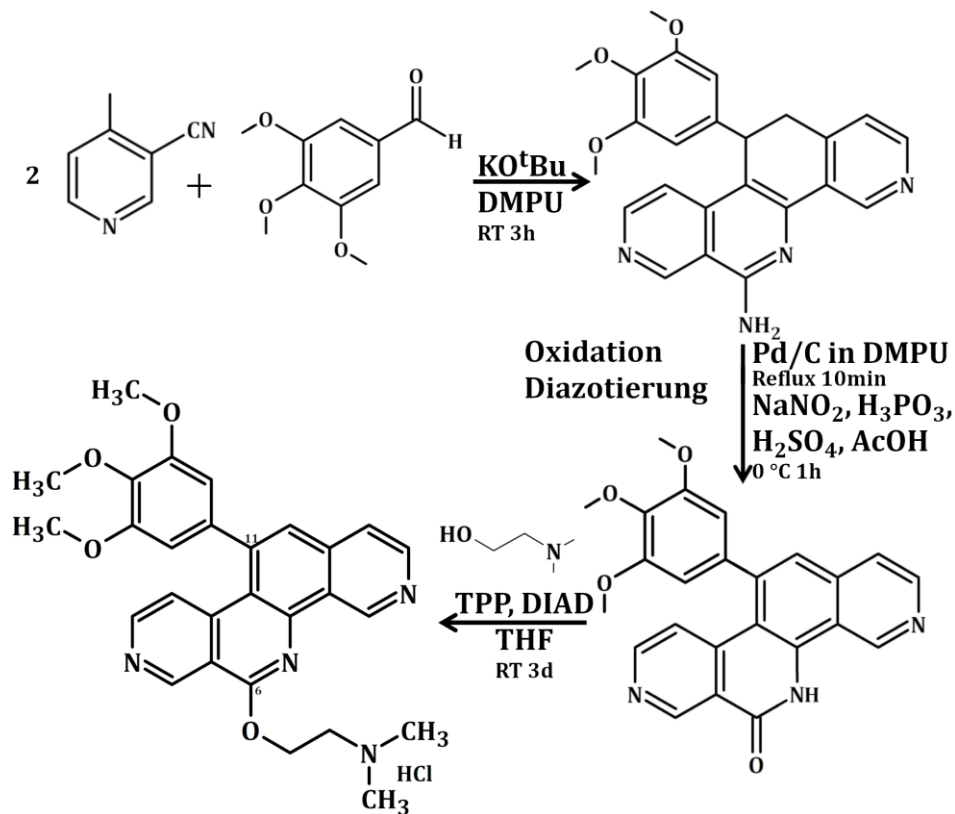


#### Abb. 1.12: Kieler Entwicklung der Benzo[*c*]phenanthridine

Seit 1995 wurden in der AG Clement mittels CLEMENT und WEIDE Synthese verschiedene Benzo[*c*]phenanthridin-Derivate synthetisiert und getestet. Ausgehend von dem 6-Amino-benzo[*c*]phenanthridinen wurden weitere Analoga synthetisiert und charakterisiert. P8-D6 erwies sich hier als vielversprechende Substanz zur weiteren Testung als Zytostatikum (Meier, 2014; Stenzel, 2009).

### 1.5.2 Pyrido[3,4-*c*][1,9]phenanthroline - P8-D6

In der Arbeit von MEIER (2014) konnten mit Hilfe der CLEMENT und WEIDE Synthese erfolgreich aza-analoga Benzo[*c*]phenanthridine mit dem Pyrido[3,4-*c*][1,9]phenanthrolin-Grundkörper hergestellt werden. Diese isostere Veränderung des Grundkörpers („*scaffold hopping*“) durch Einführung zusätzlicher endocyclischer Stickstoffatome sollte die Polarität erhöhen, mehr Wasserstoffbrückenbindungen entstehen lassen und die Phototoxizität abschwächen. Dies dient einer besseren Löslichkeit sowie der Verbesserung der Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion (ADME) und eine Erniedrigung der Lipophilie, welches wiederum positiv auf die Phototoxizität wirkt. Der potenteste und aus physikochemischer Sicht am besten geeignete Arzneistoffkandidat aus dieser Synthesereihe war das P8-D6 (Abb. 1.13). P8-D6 ist Hauptgegenstand dieser vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden näher beschrieben.



**Abb. 1.13: Synthese von P8-D6**

Durch den Einsatz von 4-Methylpyridin-3-carbonitril mit 3,4,5,-Trimethoxybenzaldehyd in einer Eintopfreaktion konnte die Substanzklasse der Pyrido[3,4-c][1,9]phenanthroline hergestellt werden. Anschließend erfolgte die Dehydrierung an der 11,12-Position und die Einführung eines Lactam (Lactam-Lactim-Tautomerie) an der 6-Position (Meier, 2014; Meier *et al.*, 2017).

Durch die Verwendung von *o*-Methylhetarencarbonitril statt *o*-Tolunitril gelang STENZEL (2009) erstmalig die Synthese von 6-Amino-11,12-dihydropyrido[3,4-c][1,9]phenanthrolin. Im Weiteren erfolgte die Dehydrierung an der 11,12-Position mittels Palladium auf Aktivkohle in DMPU unter Rückfluss und Schutzgas. Die Dehydrierung zum korrespondierenden vollständig aromatisierten Heterozyklus bietet nicht nur den Vorteil der Eliminierung des Enantiomers (Racemate), sondern zeigte vor allem bei den Trimethoxyphenyl-substituierten Derivaten auch in *NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screening* eine deutlich höhere zytotoxische Aktivität (Clement *et al.*, 2016; Meier, 2014).

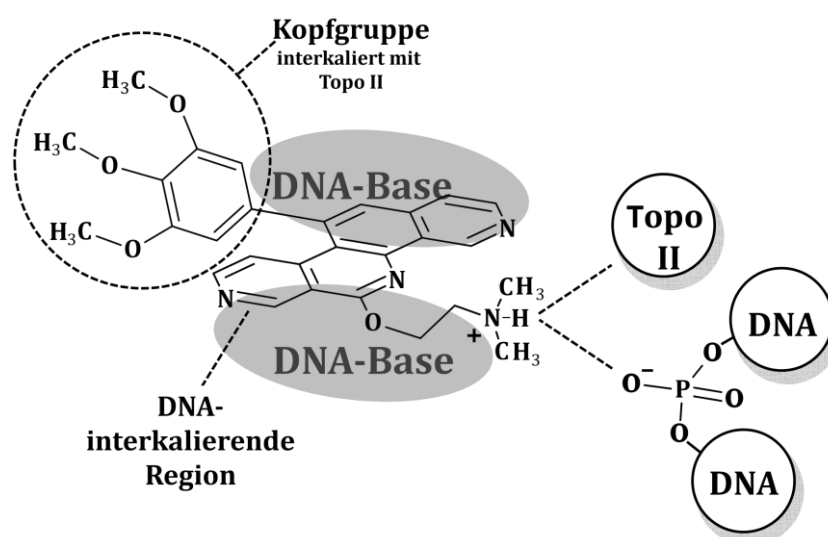
Zwar konnte durch die Einführung der Stickstoffe eine deutliche Erniedrigung der Lipophilie ( $\log D_{7.4}$ : 2,64) erzielt werden, jedoch konnte die Wasserlöslichkeit bei physiologischem pH-Wert nur minimal verbessert werden. Als weiterer Syntheseschritt folgte eine Diazotierung, um die 6-Amino- in eine 6-Oxo-Verbindungen zu überführen, sodass ein Lactam-Ring entstand. Die Verknüpfung des Lactamsauerstoffs mit einer basischen Seitenkette erfolgte durch die Mitsunobu-Reaktion mit einem  $\omega$ -Dimethylamino-alkylalkohol nach einer Vorschrift von KISELEV *et al.* (2011). Durch das Einführen dieser basischen Seitenkette verstärkten sich die zytotoxischen Effekte erneut. Das so



erhaltene P8-D6, welches durch Reaktion mit *N,N*-Dimethylaminoethanol entstand, besaß in *NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screening* einen  $GI_{50/60}$ -Wert von 49 nM. Der  $GI_{50/Ovarialkarzinom}$ -Wert lag bei 0,12  $\mu\text{M}$  und der  $GI_{50/Mammakarzinom}$ -Wert lag bei 0,13  $\mu\text{M}$ . Außerdem ist P8-D6 wasserlöslich (0,87 mM) und photostabil. In ersten *in vivo* Toxizitätsstudien an Nacktmäusen konnte eine MTD (maximal tolerierten Dosis) von 1 mg/kg Körpergewicht ermittelt werden. Bei einer Dosis von 5 mg/kg Körpergewicht zeigten die Mäuse erste toxische Anzeichen (Verlust von Körpergewicht), jedoch überlebten die Tiere die 14 tägige Studie und regenerierten sich (Meier, 2014; Meier *et al.*, 2017).

### 1.5.3 Wirkmechanismus von P8-D6

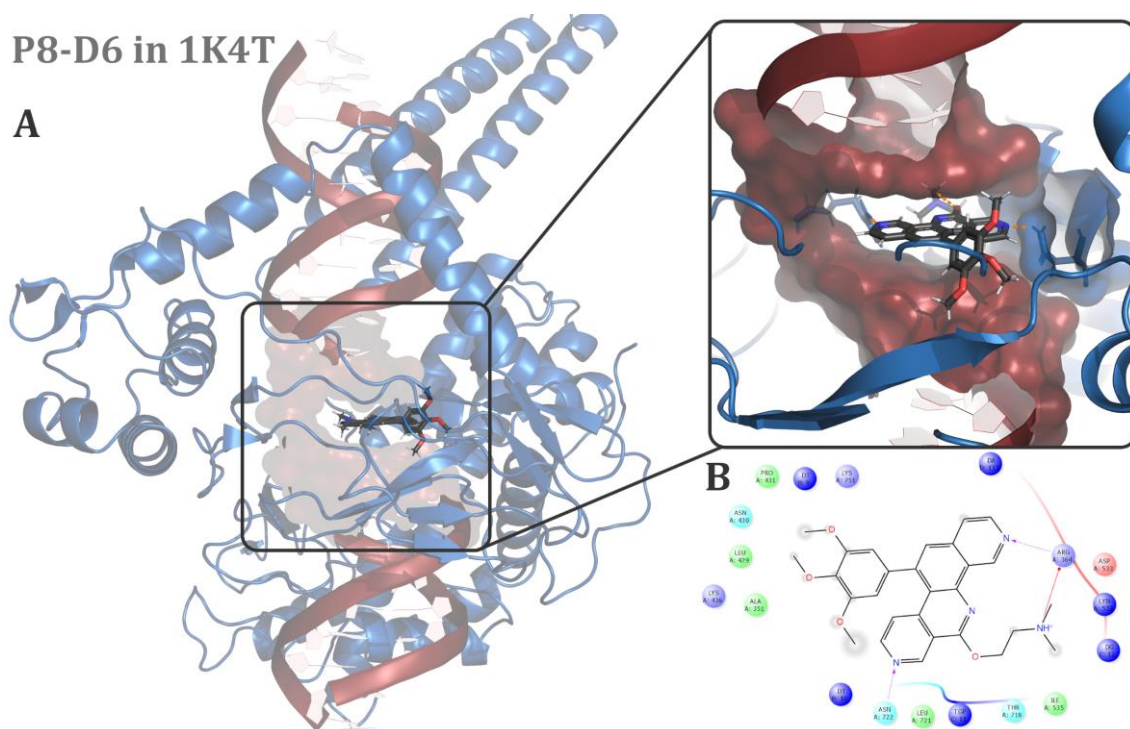
NCI-COMPARE-Studien zeigten große Ähnlichkeiten (Pearson'scher Korrelationskoeffizient: 0,9) von P8-D6 zu den Topo-Inhibitoren m-Amsacrin und Etoposid. Die Wirkung von m-Amsacrin als Topo II-Gift beruht dabei auf einer Kopfgruppe, die sterisch senkrecht zur DNA-interkalierenden Region steht (Ketron *et al.*, 2012). Untersuchungen für P8-D6 konnten zeigen, dass der 11-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)-Rest als Kopfgruppe in einer orthogonalen Position zum Pyrido[3,4-*c*][1,9]phenanthrolin-Grundgerüst, der DNA-interkalierenden Region, steht und so optimal die Topo II-Giftwirkung ausüben kann (Abb. 1.14). Das Relaxationsassay und Dekatenierungsassay für die Bestimmung der Hemmung der katalytischen Aktivität der Topo I und II $\alpha$  zeigten jeweils eine vollständige Hemmung bei 10  $\mu\text{M}$  (Meier, 2014).



**Abb. 1.14: Postulierte Ausrichtung und mögliche Interaktionen von P8-D6 mit Topo II**

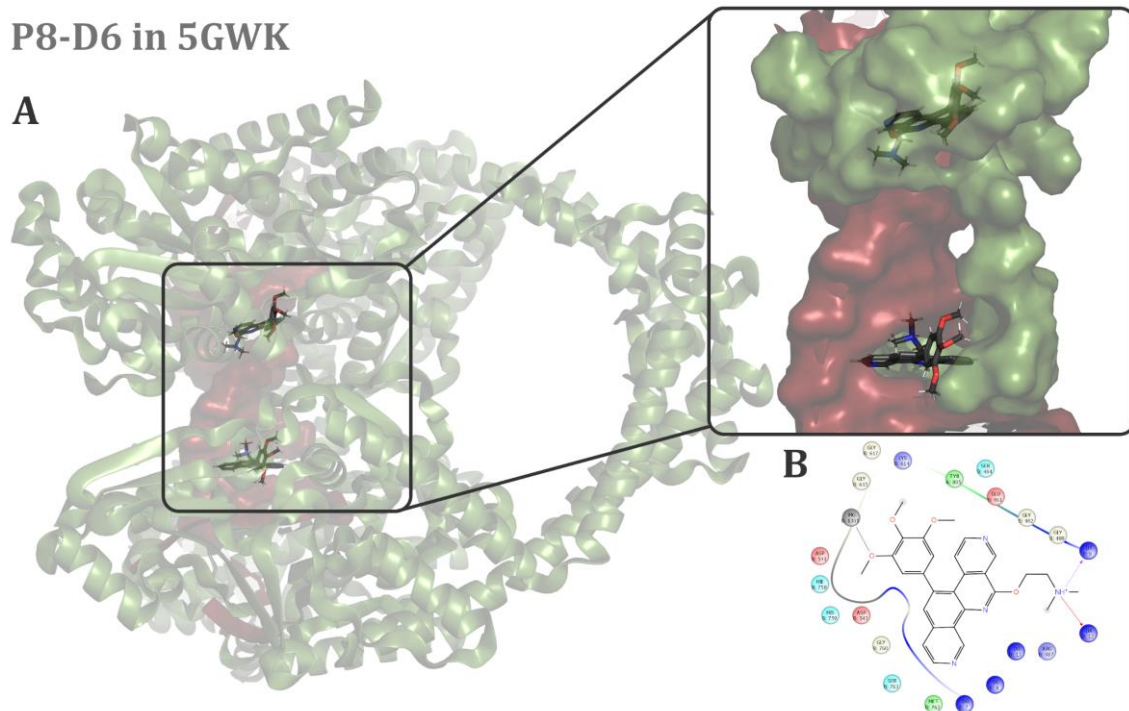
Anhand der sterischen Anordnung des P8-D6-Moleküls, ist eine Differenzierung in Kopfgruppe und eine DNA-interkalierende Region möglich. Die Kopfgruppe, welche mit der Topoisomerase interkaliert, ist dabei für die Giftwirkung auf die Enzymkomponente verantwortlich (modifiziert nach Meier, 2014).

Anhand bereits bekannter Kristallstrukturen der DNA-Topo-Enzymkomplexe mit Inhibitoren konnte P8-D6 mithilfe von Maestro 9.6 in diese DNA-Enzym-Strukturen gemodelt werden und Bindemöglichkeiten bestimmt werden. Diese Darstellungen zeigen theoretische Formationen, wie P8-D6 in der aktiven Bindetasche angeordnet sein könnte. Dabei lagert sich das Pyrido[3,4-c][1,9]phenanthrolin-Grundgerüst flach in die DNA-Bindetasche am Strangbruch ein und interkaliert durch seine Stickstoffe. Das zugehörige 2D-Interaktionsdiagramm zeigt mögliche Aminosäuren, die mit P8-D6 wechselwirken (Abb. 1.15; Abb. 1.16; Abb. 1.17).



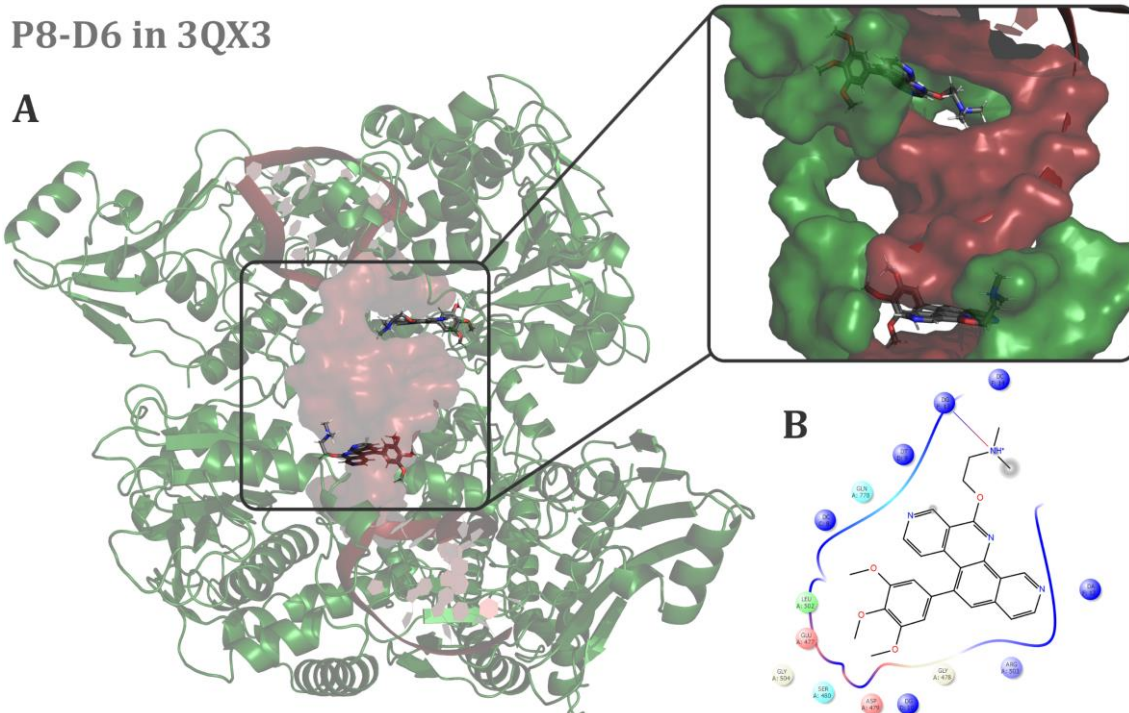
**Abb. 1.15: P8-D6 in der Bindetasche des DNA-Topo I -Komplexes (1K4T)**

Modulierung des 3D-Bindemodus von P8-D6 in den DNA-Topo I-Enzymkomplex (Modelling mit Maestro 9.6 durch Theo Rodat, Design mit PyMOL; Darstellung basierend auf dem PDB Code 1K4T). P8-D6 lagert sich in die Bindetasche der DNA am Strangbruch ein und interagiert den Aminosäuren 722 und 364 des Topo I-Enzyms (orange). A) 3D-Struktur des DNA-Enzymkomplex mit Bindetasche, B) 2D-Interaktionsdiagramm



**Abb. 1.16: P8-D6 in der Bindetasche des DNA-Topo II  $\alpha$ -Komplexes (5GWK)**

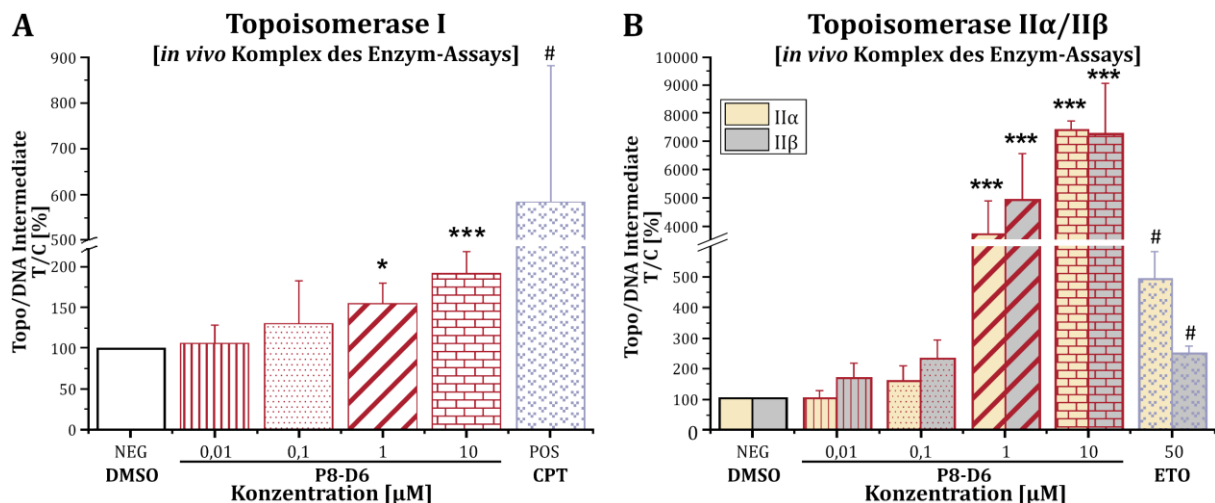
Modulierung des 3D-Bindemodus von P8-D6 in den DNA-Topo II-Enzymkomplex (Modelling mit Maestro 9.6 durch Theo Rodat, Design mit PyMOL; Darstellung basierend auf dem PDB Code 5GWK). P8-D6 lagert sich in die Bindetasche der DNA am Strangbruch ein und interagiert den Aminosäure 1301, 9 und 12 des Topo II $\alpha$ -Enzyms. A) 3D-Struktur des DNA-Enzymkomplex mit Bindetasche, B) 2D-Interaktionsdiagramm



**Abb. 1.17: P8-D6 in der Bindetasche des DNA-Topo II  $\beta$ -Komplexes (3QX3)**

Modulierung des 3D-Bindemodus von P8-D6 in den DNA-Topo II  $\beta$ -Enzymkomplex (Modelling mit Maestro 9.6 durch Theo Rodat, Design mit PyMOL; Darstellung basierend auf dem PDB Code 3QX3). P8-D6 lagert sich in die Bindetasche der DNA am Strangbruch ein und interagiert den Aminosäure 13 des Topo II  $\beta$ -Enzyms. A) 3D-Struktur des DNA-Enzymkomplex mit Bindetasche, B) 2D-Interaktionsdiagramm

In der weiteren Charakterisierung des Wirkmechanismus mittels ICE (*in vivo* complex of enzyme)-Assay (Subramanian *et al.*, 2001) erwies sich P8-D6 als dualer Topo-Inhibitor, der mittels Enzym-DNA-Intermediär-Stabilisierung als Topo-Gift fungiert (Aichinger *et al.*, 2020). Wie bereits beschrieben stabilisieren Topo-Gifte das kovalente Enzym-DNA-Intermediat während des DNA-Strangbruchs und führen so zu Störungen in Zellteilungsprozessen und leiten die Apoptose ein. P8-D6 ist bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  in der Lage signifikant die Topo I - (Abb. 1.18 A) und die Topo II $\alpha$ - und II $\beta$ -Aktivität (Abb. 1.18 B) durch Stabilisierung zu hemmen. Mittels ICE-Assay wurde an HT29 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen P8-D6, Camptothecin und Etoposid der Anteil an DNA-gebundener Topoisomerase mit einer Negativkontrolle verglichen. Sobald das Topo-DNA-Intermediat stabilisiert wird, liegt mehr Intermediat vor und kann nachgewiesen werden.



**Abb. 1.18: Wirkmechanismus von P8-D6 in Tumorzellen**

A) und B) ICE-Assay zur Testung der Topo-Giftung für Topo I, Topo II $\alpha$  und II $\beta$  in der humanen Colon Adenocarcinom Zelllinie HT29. HT29 Zellen wurden mit 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 oder Kontrollen (CPT: Camptothecin, ETO: Etoposid) inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurde der Anteil an DNA-gebundener Topo I (A) bzw. Topo II  $\alpha/\beta$  (B) im Vergleich zur Negativkontrolle (DMSO) und zur jeweiligen Positivkontrolle gemessen. (n=4, + SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001); St. t-test # (p < 0,05)) (Aichinger *et al.*, 2020).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die weitere präklinische Entwicklung des aza-analogen Benzo[c]-phenanthridins „P8-D6“ als Therapeutikum für die Behandlung von Ovarial- und Mammakarzinomen. Eine Arzneistoffentwicklung ist in mehrere Phasen gegliedert. Bevor ein Arzneistoff am Menschen angewendet werden darf, muss in präklinischen Studien in *in vitro* und *in vivo* Modellen gezeigt werden, dass der Wirkstoff eine ausreichende Wirksamkeit bei geringer Toxizität und geringem Nebenwirkungspotential besitzt (Abb. 1.19).

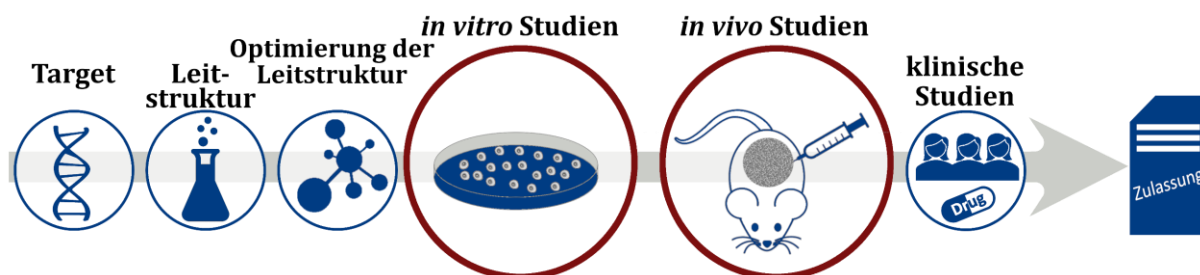


Abb. 1.19: Phase der Arzneistoffentwicklung

P8-D6 zeigte in Testungen am NCI ein hohes Potential gegenüber Tumoren der Gynäkologie. Dabei stellt Brustkrebs die häufigste und das Ovarialkarzinom die aggressivste Tumorentität in der gynäkologischen Onkologie dar.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit wurde auf folgende Fragestellungen gelegt:

- Bewirkt P8-D6 eine höhere Apoptoseinduktion im Vergleich zu Standardtherapeutika in behandelten gynäkologischen Tumorzellen und erzielt es dabei eine vollständige und andauernde Reduktion des Tumors?
- Welche Effekte verursacht P8-D6 an nicht-tumorassoziierten Zellen, um so das Nebenwirkungspotential abzuschätzen zu können?
- Zeigt P8-D6 anders als andere zuvor klinisch getestete duale Topoisomerase-Inhibitoren keine Hepatotoxizität?

Ein 2D-Modell ist nur begrenzt auf die *in vivo* Situation übertragbar, da *in vivo* verschiedene Zelltypen interagieren, kommunizieren und nach allen Seiten Zellkontakte ausüben.

- Erzielt P8-D6 dabei vergleichbare zytotoxische Effekte in der 2D-Kultur sowie im Co-Kultur-Modell und dem 3D-Modell?

Die detailliertere Wirkweise im Lebewesen mit Einschätzungen zur Pharmakokinetik und -dynamik kann jedoch nur durch *in vivo* Modelle wie dem Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell adäquat dargestellt werden.

- Kann das Wachstum/die Tumorlast des in die Maus injizierten humanen Tumors durch die *i.v.* Therapie mit P8-D6 im Vergleich zu Topotecan und zur Negativkontrolle (PBS) deutlich reduziert werden?

Patienteninnen - gerade in der Krebstherapie - sprechen sehr individuell auf die jeweilige Therapie an. Gründe dafür sind die große Diversität der Tumore. P8-D6 wird also sehr wahrscheinlich kein Wundermittel für alle Patientinnen mit Ovarialkarzinom sein, könnte Standardtherapeutikum aufweisen.

- Existieren Biomarker, die die Therapie mit P8-D6 induzieren können?

Das gesamte Projekt stellt eine wesentliche Möglichkeit dar, einen neuen innovativen Wirkstoff in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms zu etablieren und soll als Vortestung für die anschließenden klinischen Studien dienen.

## 2. MATERIALIEN UND GERÄTE

### 2.1 Zelllinien & Patientenzellen

Zelllinie/ Patientenzelle	Zelltyp	Firma
A2780	humanes Ovarialkarzinom	SigmaAldrich, Steinheim
HEY	humanes Ovarialkarzinom	B. M. Kacinski, New Haven, CT, USA
Igrov-1	humanes Ovarialkarzinom	American Type Culture Collection
OvCar8	humanes Ovarialkarzinom	American Type Culture Collection
SKOV-3	humanes Ovarialkarzinom	American Type Culture Collection
SKOV-3 luc	humanes Ovarialkarzinom	American Type Culture Collection
MDA-MB-231	humanes Mammakarzinom	T. Yoneda, Health Science Center®, San Antonio, Texas, USA
MCF-7	humanes Mammakarzinom	American Type Culture Collection
SK-Br3	humanes Mammakarzinom	American Type Culture Collection
HOSE	humane ovarial Oberflächen- epithelzellen	Innoprot, Bizkaia, Spanien
Detroit 551 (ATCC® CCL-110™)	humane dermale Fibroblasten	American Type Culture Collection

Patientenzelle	Zelltyp	Bezugsquelle
UF-169 T	humanes Ovarialkarzinom	Klinik für Gynäkologie und Geburts- hilfe, UKSH, Campus Kiel
UF-168 T	humanes Ovarialkarzinom	Klinik für Gynäkologie und Geburts- hilfe, UKSH, Campus Kiel
UF-167 As	humanes Ovarialkarzinom	Klinik für Gynäkologie und Geburts- hilfe, UKSH, Campus Kiel
UF-160 As	humanes Ovarialkarzinom	Klinik für Gynäkologie und Geburts- hilfe, UKSH, Campus Kiel
UF-182	humanes Mammakarzinom	Klinik für Gynäkologie und Geburts- hilfe, UKSH, Campus Kiel
U01	humane Hepatozyten	Abteilung für Chirurgie, Universi- tätsklinik Uppsala, Schweden
U02	humane Hepatozyten	Abteilung für Chirurgie, Universi- tätsklinik Uppsala, Schweden
U03	humane Hepatozyten	Abteilung für Chirurgie, Universi- tätsklinik Uppsala, Schweden

### 2.2 Medien und Mediensupplemente

Medien und Mediensupplemente	Firma
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ca <sup>2+</sup> - and Mg <sup>2+</sup> -free HBSS	Invitrogen, Carlsbad, USA

Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM with HEPES and 4.5 g/l Glucose	Invitrogen, Carlsbad, USA
DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
DMSO (D2650-5X10ML)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DPBS 10x, no calcium, no magnesium	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
DPBS, no calcium, no magnesium	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
EDTA BioUltra	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetal Bovine Serum, certified, US origin	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Hepatocyte isolation kit	VitaCyte, Indiana
Hepatocyte maintenance medium	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Insulin	Invitrogen, Carlsbad, USA
IST	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neomycin	Krankenhausapotheke, UKSH, Kiel
Ovarian Epithelial Cell Medium Kit (P60132)	Innoprot, Bizkaia, Spanien
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	Life Technologies GmbH, Carlsbad, USA
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-lysine hydrobromide	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (10x)	Biochrom, Berlin
VLE RPMI Medium 1640 500ml (FG1415)	Biochrom, Berlin

## 2.3 Puffer und Gele

<b>Lysispuffer, pH 8 (4°C)</b>
150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 50 mM Tris 1 EDTA-free Proteaseinhibitor Tablette

<b>Ladepuffer (4x):</b>	<b>Sammelgelpuffer (4x):</b>
0,2 M Tris 8 % (m/v) SDS 40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,02 % (m/v) Bromphenolblau ad Aqua bidest	0,25 M Tris, pH 6,8 0,4 % (m/v) SDS ad Aqua bidest
<b>Trenngelpuffer (4x): pH 8,8</b>	<b>Elektrophoresepuffer (10x):</b>
0,75 M Tris, pH 8,8 0,4 % (m/v) SDS ad Aqua bidest	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1 % (m/v) SDS ad Aqua bidest
<b>7,5% Trenngel (pH 8,8)</b>	<b>4% Sammelgel (pH 6,8)</b>
6 ml Aqua bidest. 3 ml Trenngelpuffer 3 ml 30% (m/v) Rotiphorese® 10 µl TEMED 30 80 µl 10% (m/v) APS-Lösung	2,4 ml Aqua bidest. 1 ml Sammelgelpuffer 0,6 µl 30% (m/v) Rotiphorese® 25 µl 10% (m/v) APS-Lösung 6 µl TEMED 30



Transferpuffer	Wasch-Puffer
25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol	10% (v/v) TBS-Puffer 0,1% (v/v) Tween® 20
	Blocking-Reagenz
	5% (m/v) Milchpulver in TBS-Puffer
ECL-Reagenz	
<u>Lösung A:</u> 0,25 g/l Luminol in 100 mM Tris, pH 8,6	2 ml Lösung A
<u>Lösung B:</u> 1,1 g/l p-Hydroxycoumarinsäure in DMSO	200 µl Lösung B
	2 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2.4 Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma
Anti-Topo I (sc-271285)	Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Topo II Alpha/beta (ab109524)	Kaninchen monoklonal	Abcam (Cambridge, Großbritannien)
Anti-β-Actin (sc-47778)	Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-HSP90α/β (sc-13119)	Maus monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Mouse m-IgGκ BP- HRP-conj (sc-516102)	Maus IgG kappa binding protein	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Mouse m-IgGκ BP- HRP-conj (E-AB-1003)	Kaninchen IgG kappa binding protein	Elabscience
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E Ki-67 (RM-9106-S)	Kaninchen monoklonal	Cell Signaling Technology
	Kaninchen monoklonal	Thermo Scientific™

## 2.5 Materialien und Reagenzien

Nicht gelistete Reagenzien wurden von Roth GmbH & Co KG oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Reagenzien	Firma
2-Propanol 70 %	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Aceton	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
AO/PI staining solution	Nexcelom, Lawrence, USA
ApoLive-Glo™ Multiplex Assay (G6410)	Promega GmbH, Mannheim
ApoTox-Glo™ Triplex Assay (G6320)	Promega GmbH, Mannheim
APS-Lösung	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega GmbH, Mannheim
CellTox™ Green Cytotoxicity Assay	Promega GmbH, Mannheim
CellTracker Deep Red Dye -	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
Cisplatin Teva®	Krankenhausapotheke, UKSH, Kiel

Collagen I	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, Schweiz
Dihydroethidium	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Domitor 1mg/ml	Pfizer, Karlsruhe
Doxo-cell	Krankenhausapotheke, UKSH, Kiel
Eto-GRY® Teva	Krankenhausapotheke, UKSH, Kiel
Fentanyl 0,05 mg/ml	Janssen-Cilag, Neuss
GelRed	BIOVENDIS Ltd., Mannheim
Glutardialdehyd 25 %	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Kadcyla®	Krankenhausapotheke, UKSH, Kiel
Ketamin	Aveco Pharmaceutical, IA
Luciferin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luminol	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Midazolam 1mg/ml	Roche, Grenzach-Wyhen
Milchpulver (Blotting grade)	Merck KGaA, Darmstadt
MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza Group Ltd, Schweiz
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Nonidet® P-40	BioChemica AppliChem GmbH, Darmstadt
Osmiumtetroxid Osmiumtetroxidlösung 2 %	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
p-Hydroxycoumarin-säure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pierce™ BCA-Protein-Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
Rotiphorese®	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
SDS	Merck KGaA, Darmstadt
Stripping Buffer	CANDOR Bioscience GmbH, Wangen
TBE Puffer (10x)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
TEMED 30	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Topotecan medac	Krankenhausapotheke, UKSH, Kiel
Tris	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Vectashield®	Vector Labs
Venor®GeM OneStep	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
<b>Material</b>	
Amersham Hyperfilm	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Corning® 96-Well Flat Clear Bottom White Polystyrene TC-Treated Microplates, with Lid, Sterile (Product #3903)	Corning, NY, USA

Corning® 96-Well spheroid microplate, black, clear bottom, round, Ultra-Low attachment surface, Sterile (Product #4520)	Corning, NY, USA
Corning® CellBIND® 24-Well (Product #3337)	Corning, NY, USA
Deckgläser	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe
Eppendorf Tubes	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon, diverse Größen, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filtropur V50 500ml 0,2µm 90mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Kryovials Biozym steril 2 ml	Biozym Scientific GmbH
Omnican40 Insulinspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pasteurpipetten	VWR
Pipettenspitze (diverse Größen mFilter)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen, 12x75 mm. PS, rund,	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
serologische Pipetten diverse Größen, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tek Chamber Slide w/Cover Glass, Steril ChamberSlides 177399	Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
ThinCert™ 12-Well, transluzente/transparente 0,4 µm Membran	Greiner Bio-One
Visionplate tm 24 -4ti0241 plate	4titude® Ltd
Well Platten, diverse Größen, steril	Greiner Bio-One
Whatman® Paper	GE Healthcare Amersham, Chalfont St Giles, UK
Zellkulturflasche T75, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

## 2.6 Geräte

Gerät	Bezeichnung / Firma
Absaugvorrichtung	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Autoklav	LTA32/25, Zirbus technology, Bad Grund
Brutschrank	Heraeus B5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus GmbH, Hanau Water-Jacketed CO <sub>2</sub> Incubators, Thermo Fisher Scientific, Pinneberg Heracell™, Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
Cellometer® Vision	Nexcelom, Lawrence, USA
Durchflusszytometer	Gallios 3L Flowcytometer, Beckman Coulter, Brea, USA
Elektrophoresekammer	Mini Trans-Blot® Cell, BioRad, Hercules, CA, USA
Entwicklungskammer	Cawomat 2000, Cawo Photochemisches Werk, Schrobenthausen
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Gefrierbehälter	Mr. Frosty™ Thermo Scientific, Waltham, USA
Laminar Air Flow	Scanlaf mars safety class 2, LaboGene A/S, Allerød, Dänemark Thermo Scientific Holten Laminar Air, Thermo Fisher Scientific, Pinneberg
Mikroskop	Zeiss axiovert 25, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Eclipse TS100, Nikon Instruments, Amsterdam, NL
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved, LO-Laboroptik Ltd., Lancing, UK
NightOWL LB 983	Berthold, Bad Wildbach

NYONE® PCR-Maschine Peq Power Supply 300 pH Messgerät	SYNENTEC, Elmshorn T100 THERMAL CYCLER, BioRad, Hercules, CA, USA PEQLAB Ltd., Sarisbury Green, UK inoLab® pH level 1, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weinheim Finnpipette™ F2 Pipette (10 µl, 100 µl, 1000 µl), Thermo Fisher Scientific, Pinneberg Eppendorf Research®/Reference® (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl), Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf Research pro Mehrkanalpipetten (20-300 µl), Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Pipetboy acu 2, INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Pipettierhilfe Platten-Reader	Infinite 200, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz Tecan safire2, Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg Phenom XL, Phenom-world; Eindhoven, Niederlande
Rasterelektronenmikroskopie	
Schüttelwasserbad	Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Thermomixer comfort	Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät	Vevo 770, FUJIFILM VisualSonics
Vortexer	RS-Va10, Phoenix Instrument, Garbsen
Waage	Kern EW2200-2NM, Kern Sohn GmbH, Balingen-Frommern CP225D, Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG
Zentrifuge	Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Kirchlingern Hettich Mikrozentrifuge 200, Andreas Hettich GmbH & Co KG, Kirchlingern

## 2.7 *In vivo* Experiment

Tiere	Bezeichnung / Firma
SCID/beige-Mäuse	Charles River Laboratories, Wilmington

## 2.8 Verwendete Software

Gerät	Bezeichnung / Firma
AxioVision	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Graph Pad Prism V8.4	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Magellan™ V6.5	Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
MS Office 365	Microsoft, Redmond, USA
Isis Version 5.8.8.	MetaSystems Hard & Software GmbH, Mannheim

## 3. EXPERIMENTELLE METHODEN

### 3.1 Identität und Stabilitätstestung von P8-D6

Vor der Herstellung der jeweiligen Stammlösungen wurde P8-D6 als Feststoff gelöst und in DMSO-*d*<sub>6</sub> mittels NMR auf die Identität hin geprüft. Das über einen Zeitraum von einem Jahr in PBS gelöste und bei 4°C gelagerte P8-D6 wurde zusätzlich nochmal mittels HPLC auf Stabilität und Zersetzungsprozesse untersucht (HPLC Methode: Meier, 2014).

### 3.2 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien und *ex vivo* Patientenzellen

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die humanen Ovarialkarzinomzelllinien A2780, HEY, Igrov-1, OvCar8, SKOV-3, SKOV-3 luc (Tab. 3.1) und die humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MDA-MB 231, Sk-Br 3 (Tab. 3.2) sowie als Vergleich die nicht-tumorassoziierten Ovarialkarzinomzellen (Tab. 3.3) HOSE verwendet. Außerdem wurden primäre *ex vivo* Patientenzellen aus der Klinik zur Verfügung gestellt.

**Tab. 3.1: Charakterisierung der verwendeten Ovarialkarzinomzellen**

(European Collection of Authenticated Cell Cultures.; Beaufort *et al.*, 2014; Sewell *et al.*, 2002; Stordal *et al.*, 2013; Montero *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2005; Bauerschlag *et al.*, 2015; Bauerschlag *et al.*, 2010; Ghahremani *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2018; Vassileva *et al.*, 2008; Denel-Bobrowska *et al.*, 2016)

OC-Zelllinie	Beschreibung
A2780	humanes Ovarialkarzinom, endometrioides Adenokarzinom am Ovar, adhären, epithelial; Cisplatin- und Doxorubicin-sensitiv, Her2-, geringe EGFR Expr. (ECACC), Generationszeit: 25 h.
HEY	humanes Ovarialkarzinom, serös papilläres Zystadenokarzinom am Ovar, adhären, epithelial; Cisplatin-sensitiv, hohe EGFR Expr., Generationszeit: 28 h.
Igrov-1	humanes Ovarialkarzinom, endometrioides Adenokarzinom am Ovar, adhären, epithelial; Platin-sensitiv, Her2-, mittlere EGFR Expr., Generationszeit: 21 h.
OvCar8	humanes Ovarialkarzinom, Adenokarzinom am Ovar, adhären, epithelial; Platin-sensitiv, Her2+, hohe EGFR Expr., Generationszeit: 26 h.
SKOV-3	humanes Ovarialkarzinom, Adenokarzinom am Ovar, adhären, epithelial; Cisplatin- und Doxorubicin-resistent, Her2+, hohe EGFR Expr., Generationszeit: 28 h.
SKOV-3 luc	humanes Ovarialkarzinom, stabile Luciferase-Expression und Neomycin Resistenzgen

**ex vivo OC-Patientenzellen**

UF-168 T.	humanes serös papilläres Ovarialkarzinom mit Peritonealkarzinose (CA125 erhöht), high grade, BRCA 1 u. 2 negativ
UF-169 T.	humanes invasives, muzinöses Adenokarzinom am Ovar (Infiltrate)
UF-160 As.	Pleurakarzinose eines high grad humanen, serösen Karzinoms am Ovar, sekundäre BRCA1-Mutation, CK7 und PAX8 positiv
UF-167 As.	humanes, gut differenziertes, mikrosatellitenstabiles, endometrioides Adenokarzinom am Ovar, ER+ u. PR+, CK20 u. p53 negativ.

**Tab. 3.2.: Charakterisierung der verwendeten Mammakarzinomzellen**

(Brooks *et al.*, 1973; Lukyanova *et al.*, 2009; European Collection of Authenticated Cell Cultures,; Costantino *et al.*, 1993; Adjei, 1999; Ren *et al.*, 2014; Osmak *et al.*, 1997)

BC-Zelllinie	Beschreibung
MCF-7	humane Mammakarzinomzelllinie, Brustdrüse (metastasierter Pleuraerguss), adhären, epithelial; Estrogen-sensitiv, Cisplatin-resistent, Verdopplungszeit: 31 h.
MDA-MB 231	humane Mammakarzinomzelllinie, Adenokarzinom, Brustdrüse (metastasierter Pleuraerguss), adhären, epithelial; TNBC, Insulin-resistent, Verdopplungszeit: 38 h.
Sk-Br 3	humane Mammakarzinomzelllinie, Adenokarzinom, Brustdrüse (metastasierter Pleuraerguss), adhären, epithelial; Her2/neu +, Doxorubicin-resistent, Verdopplungszeit: 30 h

**ex vivo BC-Patientenzellen**

UF-182	frühes, epipectoral gelegenes Inbrustrezidiv eines gering differenzier-ten metaplastischen Karzinoms der Brust, hochgradige Stadium 3, ER- u. PR-, Her2/neu -, Ki-67: 72%
--------	---

**Tab. 3.3: Charakterisierung des Normalzellen**

(Tsao *et al.*, 1995; Ölander *et al.*, 2018; Vildhede *et al.*, 2015)

Normalzellen	Beschreibung
HOSE	kubische Oberflächenepithelzellen (OSE) des menschlichen Eierstocks, schlecht differenziert, nicht-tumorigen, HPV-immortale Linie
Hepatozyten (U01-U03)	primäre Hepatozyten isoliert nach chirurgischen Leberresektion mittels Kollagenase-Perfusionstechnik
Fibroblasten	Detroit 551 ATCC® CCL-110™: humane Fibroblasten der Haut, adhären

Die primären *ex vivo* Patientenzellen wurden von Patienten der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel und der Abteilung für Chirurgie, Universitätsklinik Uppsala, Schweden isoliert. Bei den operativen Maßnahmen handelte es sich um Segmentektomien, Mastektomien oder Reduktionsplastiken. Ethische Zulassung Nr.: 2009/028 und 2011/037 (Uppsala); AZ: D578/20 (Kiel).

Primäre Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen wurden aus dem während der Operation entnommenen Aszites oder aus Tumorgewebe von Patientinnen mit

fortgeschrittenem Ovarialkarzinom oder Mammakarzinom isoliert. Aszites wurde bei 348 g, 10 min zentrifugiert und das Pellet in frischem, supplementierten RPMI-Medium resuspendiert und ausgesät. Primäre Tumorzellen wurden nach dem Protokoll von KURBACHER et al. (2011) aus dem Tumorgewebe extrahiert. Die primäre Hepatozyten wurden aus überschüssigem humanen Lebergewebe nach Leberresektion mittels einer zweistufigen Kollagenase-Perfusionstechnik (Lecluyse und Alexandre, 2010) isoliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte als adhärenter Einzelzellrasen in Kulturflaschen (T75) bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Kultivierung wurden folgende Nährmedien verwendet:

Tab. 3.4: Kulturmedium

	Zellen	Mediumzusammensetzung	
Ovarialkarzinom	A2780 HEY Igrov-1 OvCar8 SKOV-3 UF-168 T. UF-169 T. UF-160 As. UF-167 As. SKOV-3 luc	VLE-RPMI 1640 suppl. mit 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> (ohne L-glutamine), 10 % FBS, 60 IU (µg)/ml Pen/Strep  DMEM suppl. mit 10 % FBS, 800 µg/ml Neomycin	
	Mammakarzinom	MCF-7 MDA-MB 231 UF-182	VLE-RPMI 1640 suppl. mit 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> (ohne L-glutamine), 10 % FBS, 60 IU (µg)/ml Pen/Strep
		SK-BR-3	DMEM suppl. mit 10 % FBS, 60 IU (µg)/ml Pen/Strep
	Normalzellen	HOSE	Ovarian Epithelial Cell Medium suppl. mit 5 ml Ovarian Epithelial Cell Growth supplement (OEpiCGS), 100 IU (µg)/ml Pen/Strep; Beschichtung: Poly-L-lysine (2 µg/cm <sup>2</sup> , 24 h 37 °C)
		Hepatozyten	Auftaumedium: DMEM suppl. mit HEPES und 4.5 g/l Glucose (70 %), 90 % Percoll (30 %) Suspension- und Anhaftungsmedium (SAM) für 3 h: DMEM suppl. mit HEPES und 4.5 g/l Glucose, 5 % FBS, 100 IU (µg)/ml Pen/Strep, 4 µg/ml Insulin, 1 µM Dexamethason Kulturmedium nach 3 h SAM: Hepatocyte maintenance Medium suppl. mit 1 % ITS (10 µg/ml Insulin, 5,5 µg/ml Tranferrin, Selenium 5 ng/ml), 100 IU (µg)/ml Pen/Strep, 0,1 µM Dexamethason Beschichtung: Collagen I (12,5 µg/250 µl, 1 h 37 °C)
		Fibroblasten	DMEM suppl. mit 10 % FBS, 60 IU (µg)/ml Pen/Strep

Die verwendeten, adhärenen Zellen wurden 2-3 x pro Woche mit frischem Medium versorgt. Bei einer Konfluenz von >80 % erfolgte eine Passagierung. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend durch zehnmünütige Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05 %) von der Oberfläche gelöst. Dieser Vorgang wurde mit der doppelten Menge Medium gestoppt und die Zellsuspension für 10 min (HOSE: 5 min) bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit frischem Medium resuspendiert und gründlich vereinzelt, um die Zellen neu auszusäen. Zum Ausplattieren einer bestimmten Zellzahl wurde die Zellzahl der Suspension mikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Für alle Zellen wurden Mykoplasmentests (Venor®GeM OneStep, MycoAlert™) nach Herstellerangaben und STR-Marker Bestimmungen nach etabliertem Protokoll (Huang *et al.*, 2016) durchgeführt.

**Tab. 3.5: Medium für Langzeitlagerung (N<sub>2</sub>)**

Kryokonservierung	
Einfriermedium	90 % Medium, 10 % DMSO

Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und in einem Einfriercontainer mit 1 °C/min auf -80 °C gekühlt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Kryovials im 37 °C Wasserbad für max. 2 min getaucht, gefolgt von einer Resuspension in 30 ml Medium und einer Dichte-Zentrifugation (250 g; 10 min), um abgestorbene Zellen zu entfernen.

Die primären Hepatozyten wurden bei -150 °C gelagert und zum Auftauen nach 2 min bei 37 °C in Auftaumedium resuspendiert und bei 100 g für 10 min zentrifugiert. Nach erneuter Resuspendierung in Suspension- und Anhaftungsmedium (SAM) wurde die Zellzahl, Größe und Viabilität mit dem Cellometer Vision (Bild Zytometrie) gemessen und für die einzelnen Experimente auf Platten ausgebracht (Ölander *et al.*, 2018).

### 3.2.2 Mikroskopie adhärenter Zellen

Zur Bestimmung des proliferationshemmenden Effekts von P8-D6 wurden die oben aufgeführten Ovar- und Brustzellen (Tab. 3.1, Tab. 3.2, Tab. 3.3) in eine transparente 24-Well Platte ( $5 \times 10^3$  –  $1 \times 10^5$  Zellen/Well) für 24 h ausgesät. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit P8-D6 [1 µM, 10 µM], Cisplatin [1 µM], Etoposid [1 µM], Topotecan [1 µM] und PBS [Negativkontrolle] für 24 h und 48 h. Für die Dokumentation der visuell detektierbaren Effekte der verschiedenen Zytostatika wurden zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h



mikroskopische Bilder aufgenommen. Hierzu wurden Bilder mit einem inversen Mikroskop mit Phasenkontrast mit den Objektiven 10x und 20x erstellt.

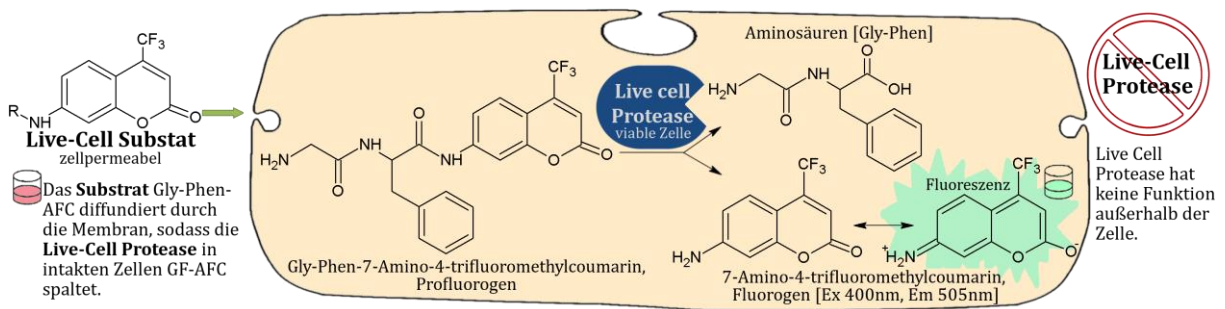
### 3.2.3 Viabilitäts- und Apoptose- Assays

P8-D6 ist durch seine zytotoxischen Eigenschaften in der Lage in humanen Zellen Apoptose zu induzieren (Meier *et al.*, 2017). Das Ausmaß dieser Zelltoxizität wurde in den Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen, sowie humanen ovariellen Oberflächenepithelzellen und Hepatozyten untersucht. Zur Verifizierung dienten zwei voneinander unabhängige Apoptose-Messmethoden.

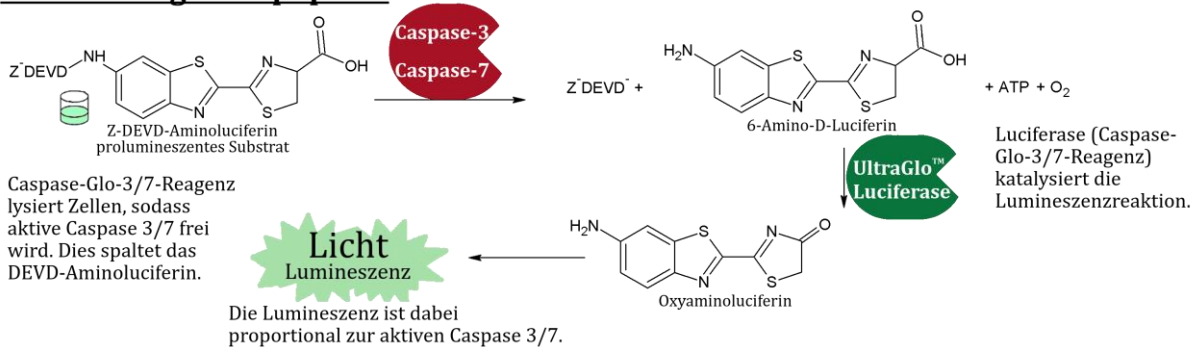
#### 3.2.3.1 ApoLive-Glo™ Multiplex Assays

Zur Messung der Viabilität und der Apoptose in Zellen wurde das ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay der Firma Promega verwendet. Dieses Assay ermöglicht die Messung der beiden Komponenten in demselben Versuchsansatz. Im ersten Schritt wurde die Zellviabilität über die Aktivität der sogenannten Live-Cell-Protease bestimmt, welche nur in intakten Zellen aktiv ist. Dabei spaltet die Live-Cell-Protease Aminosäuren (Gly-Phen) von 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin (Abb. 3.1), welches mittels Fluorimeter vermessen werden konnte. Die Apoptose-Messung basiert auf der Aktivitätsmessung der Caspasen 3 und 7. Durch Spaltung des pro-lumineszenten Substrates DEVD-Aminoluciferin entsteht Aminoluciferin, welches als Substrat für die UltraGlo-Luciferase dient, welches wiederum die Luciferase-Reaktion unter Entstehung eines Lichtsignals katalysiert (Abb. 3.1). Dieses Lichtsignal konnte mittels Luminometer detektiert werden und ist mit der Viabilität zu normalisieren.

## Bestimmung der Viabilität



## Bestimmung der Apoptose



### Abb. 3.1: Prinzip des ApoLive-Glo<sup>TM</sup> Multiplex Assays

Mittels einer Drei-Enzym-Reaktion erfolgt eine Viabilitäts- und Apoptose-Messung. Für die Viabilitätsbestimmung wird das Live-Cell-Substrat mit der Live Cell Protease, die nur in intakten Zellen aktiv ist, zum Fluorogen umgesetzt. Die Fluoreszenzmessung gibt Auskunft über die Anzahl an viablen Zellen. Auf diese Messung folgt eine Apoptosebestimmung mit einer Umsetzung des prolumineszenten Substrats durch Caspase 3 und 7. Die folgende Umsetzung durch UltraGlo Luciferase zu Oxyaminoluciferin generiert ein Lumineszenzsignal, das gemessen wird. Die Aktivität der Caspase 3 und 7 ist proportional zur Apoptoserate (modifiziert nach Promega, 2015).

Zur Bestimmung der Zellviabilität und Apoptose wurden  $1 \times 10^3$  –  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in lumineszenzfähigen weiße 96-Well Platten mit transparentem Boden ausgebracht. Nach 24 h erfolgte die Behandlung nach dem unten aufgeführten Behandlungsschema für 48 h (Tab. 3.6). Im Anschluss an die Behandlung wurde das Medium abgenommen und durch 25  $\mu$ l frisches Medium ersetzt. Anschließend wurden 20  $\mu$ l des Viabilitäts-Reagenzes (1 Teil Substrat, 200 Teile Assay Puffer, 599 Teile PBS) zu pipettiert und nach 30 min Inkubation bei RT vermessen ( $400_{\text{Ex}}/505_{\text{Em}}$ ). Im Folgenden wurde den Proben 25  $\mu$ l des Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Reagenzes zugefügt und für 1 h bei RT inkubiert, um im Anschluss die Caspase-Aktivität im Luminometer zu bestimmen. Um auszuschließen, dass die Autofluoreszenz einiger Zytostatika einen Einfluss auf die Viabilitäts-Messung hatte, wurde eine Validierung der Methode durchgeführt.

**Tab. 3.6: Behandlungsschema ApoLive-Glo™ Multiplex Assays**

Insgesamt wurden Dreifach-Bestimmungen für jede Konzentration der unterschiedlichen Zytostatika bzw. der Negativkontrolle durchgeführt. Die in schwarz aufgeführten Konzentrationen wurden für jede Apoptosemessung verwendet. Zusätzlich wurden mit den grauen Konzentrationen einfache Viabilitätsmessung zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte für Cisplatin, Etoposid und Topotecan durchgeführt.

Substanz	Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ]												
P8-D6	0,01	0,05	0,1	0,5	1	3	5	7	10	20	50	100	
Cisplatin			0,1		1		5		10	20	50	100	
Etoposid			0,1		1		5		10	20	50	100	
Topotecan			0,1		1		5		10	20	50	100	
Negativkontrolle (PBS)													

Eine Langzeitstudie über 72 h zur Testung der optimalen Behandlungszeit von P8-D6 wurde zusätzlich mit dem ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay durchgeführt. Hierfür wurden Igrov-1 und SKOV-3 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an P8-D6 [0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,05  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [5  $\mu\text{M}$ ] und PBS (Negativkontrolle) für 12 h; 24 h; 36 h; 48 h und 72 h behandelt. Die Messung der Viabilität und Apoptoserate erfolgte wie bereits beschrieben.

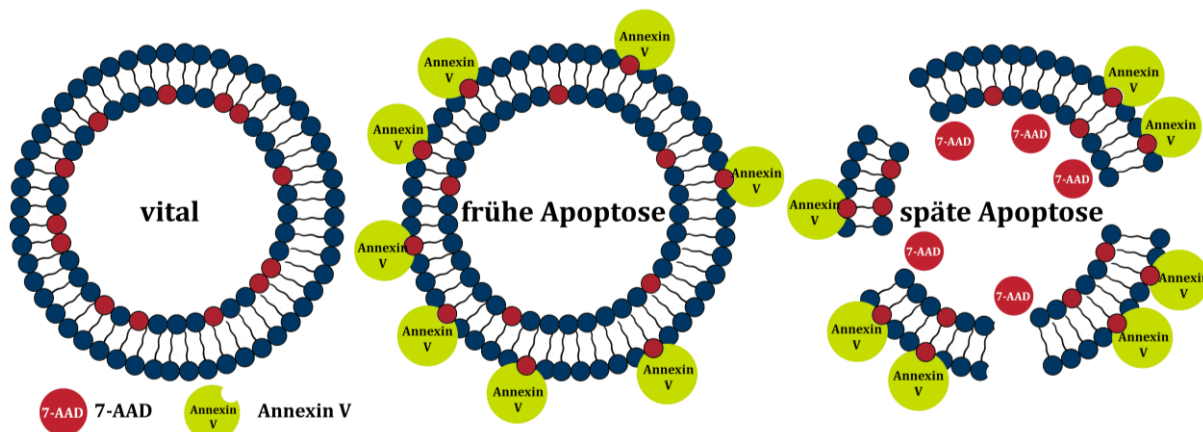
Zur Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde die Viabilität der behandelten Zellen auf die unbehandelten Zellen (PBS) bezogen. Aus diesen prozentualen Werten konnten anschließend mittels GraphPad Prism IC<sub>50</sub>-Kurven erstellt werden. Zur Auswertung der relativen Caspase-Aktivität wurden die Lumineszenzsignale mithilfe der Viabilität normalisiert. Anhand der ermittelten Caspase-Aktivitäten erfolgte eine one-way ANOVA-Testung zur Bestimmung der Signifikanzen in der Differenz der verschiedenen Zytostatika.

### 3.2.3.2 Durchflusszytometrische Analyse nach Annexin V-PE/7-AAD-Färbung

Die Durchflusszytometrie charakterisiert und unterscheidet Zellpopulationen bezüglich ihrer physikalischen und biochemischen Eigenschaften. Durch hydrodynamische Fokussierung (Hüllstrom) werden Partikel in einem Fluidstrom vereinzelt, sodass anschließend im Lichtfokus eine Quantifizierung der Lichtstreuung an diesen Zellen sowie eine Fluoreszenzmessung der Markerstoffe erfolgen kann. Mit dieser Technik können große Probenvolumina innerhalb kurzer Zeit auf Zellgröße (Vorwärtsstreulicht (FS)), Granularität (Seitwärtsstreulicht (SS)) und zelluläre Funktionen (Fluoreszenz-markierung) untersucht werden.

In früh-apoptotischen Prozessen kommt es in Zellen zum Verlust der Plasmamembran-Symmetrie und das Phosphatidylserin transloziert von der Innenseite der

Plasmamembran auf die Außenseite. Proteine wie Annexin V, die in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  mit einer hohen Affinität an Phosphatidylserin binden, eignen sich somit zum Nachweis.



**Abb. 3.2: Prinzip der Fluoreszenzmarkierung mit Hilfe der Farbstoffe Annexin V-PE und 7AAD**

Eine früh-apoptotische Zelle verliert im Vergleich zu der vitalen Zelle die Plasmamembran-Symmetrie, so dass Phosphatidylserin an die Außenseite externalisiert wird. Annexin V kann dann an der Zelle binden und detektiert werden. Verliert die Zelle ihre Membranintegrität, kann 7-AAD in die Zelle penetrieren, an die DNA binden und detektiert werden.

Die fortschreitende Apoptose führt in einer späteren Phase zum Verlust der Membranintegrität. 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) ist nur bei Verlust der Membranintegrität in der Lage, in die Zelle zu diffundieren. Dort interkaliert 7-AAD spezifisch zwischen Guanin und Cytosin in die DNA und verändert seine Fluoreszenzeigenschaften. Durch die Doppelfärbung mit Annexin V und 7-AAD kann zwischen viablen, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Für die Analyse der Apoptoserate von P8-D6 in Ovarialkarzinomzellen mittels Durchflusszytometrie wurde zur Färbung das PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen™ verwendet. Die hier entwickelte Methode ist an das von BD mitgelieferte Staining Protokoll angelehnt, wurde allerdings an die Zelleigenschaften angepasst.

Zunächst wurden die Zellen in transparente 6-Well Platten für 24 h ausgesät und für weitere 48 h nach dem folgendem Behandlungsschema (Tab. 3.7) kultiviert.

**Tab. 3.7: Behandlungsschema Durchflusszytometrie**

Es erfolgten drei Einzelbestimmungen für jede Konzentration der unterschiedlichen Zytostatika bzw. der Negativkontrolle.

Substanz	Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ]						
P8-D6	0,01	0,1	1	3	5	10	20
Cisplatin			1			10	
Etoposid			1			10	
Topotecan			1			10	
Negativkontrolle (PBS)							
Positivkontrolle (DMSO)							

Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 500 µl vorgewärmtem Trypsin/EDTA von der Oberfläche gelöst. Die Reaktion wurde mit frischem Medium gestoppt und sowohl das Kulturmedium als auch die Zellsuspension wurden gesammelt, so dass alle apoptotischen und toten losen Zellen mit analysiert werden konnten.

Die gesamte Zellsuspension wurde bei 250 *g* für 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 100 µl des Binding-Mediums resuspendiert, in ein Zytometer-Röhrchen überführt und mit 2 µl Apoptose-Fluoreszenzfarbstoff Annexin V-PE versetzt. Nach 10 min Inkubationszeit bei RT unter Lichtausschluss wurde den Proben 3 µl Avital-Farbstoff 7-AAD zugefügt und weitere 5 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Diese Reaktionen wurden mit 150 µl Binding-Medium gestoppt und die Röhrchen bis zur Vermessung auf Eis gelagert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte innerhalb einer Stunde. Die Zytometer-Einstellung und das Setzen der Gate-Grenzen erfolgten mit zwei unbehandelten Zellsuspensionen, in denen mit nur jeweils einem Farbstoff angefärbt wurde (Tab. 3.8). Die quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programm Kaluza 1.2 über Fluoreszenz-Dotplots (Annexin V-PE Fluoreszenz vs. 7-AAD Fluoreszenz).

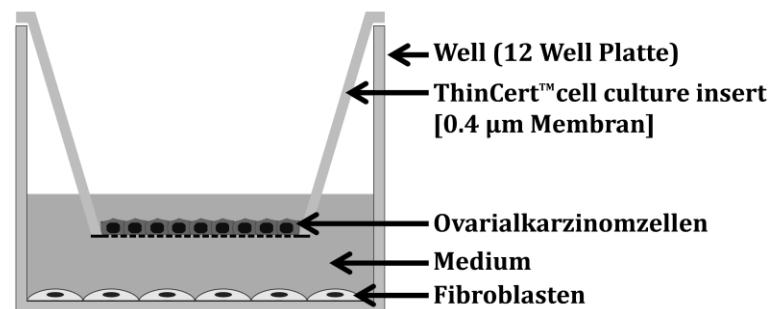
**Tab. 3.8: Zytometer-Einstellungen**

Zytometer Einstellungen:		
Exzitation:	blauer Laser, 488 nm	
Detektion:	FS	Voltage: 130; Gain:2,0
	SS	Voltage: 121; Gain:7,5
	FL2 (575 BP 30; Annexin V-PE)	Voltage: 350; Gain:1,0
	FL4 (695 BP 30; 7-AAD)	Voltage: 525; Gain:1,0
Stopp-Kriterium:	10.000 Events	
Spillover [%]:		
FL2:	16,63	
FL4:	1,0	
Akquisitionszeit	300 s	
Laufzeit	300 s	

### 3.2.4 Co-Kultur

Zellen unterschiedlichen Ursprungs können untereinander kommunizieren und interagieren. Dies diente als Grundlage, um eine Co-Kultur aus tumorassozierten und nicht-tumorassozierten Zellen zu bilden. Mit diesem Modell wurde dann untersucht, ob diese Symbiose die Apoptoserate der Tumorzellen, aber auch der nicht-tumorassozierten

Zellen beeinflusst. Bei der in dieser Arbeit entwickelten Co-Kultur handelt es sich um ein System aus Fibroblasten und Ovarialkarzinomzellen (A2780), die in zwei Ebenen als Monolayer kultiviert wurde (Methode modifiziert nach Snow und Langdon, 2004; Xu *et al.*, 2014). Am Boden der 12-Well Platte wurden die Fibroblasten ausgesät und auf einem Insert, das aus einer 0,4  $\mu\text{m}$  porigen Membran besteht, wuchsen die Ovarialkarzinomzellen (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Allgemeiner Aufbau der Co-Kultur**

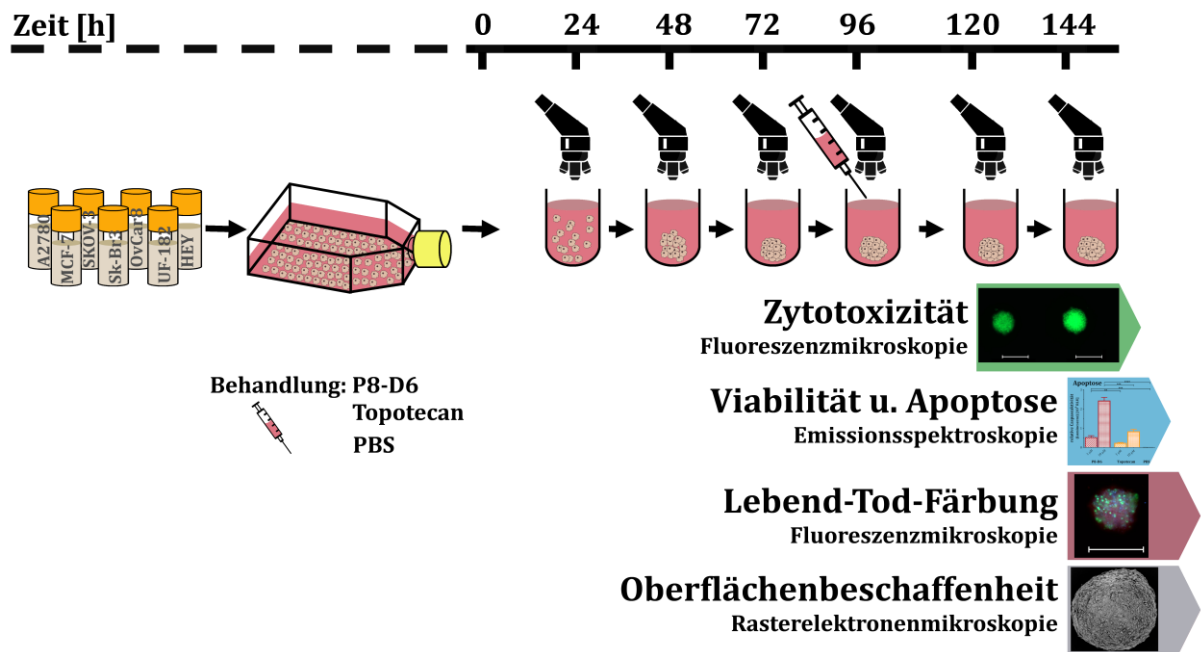
In einer 12-Well Platte wurden die Fibroblasten als Monolayer angesetzt. Mit Hilfe des ThinCert™ Inserts wurden die Ovarialkarzinomzellen auf einer 0,4  $\mu\text{m}$  Membran ausgesät und kultiviert. Durch diese porige Membran ist ein Austausch von Stoffwechselprodukten, aber kein Zellaustausch möglich.

Für diesen Versuch wurden die  $4 \times 10^4$  A2780 Zellen/Insert (180  $\mu\text{l}$ ) und  $4 \times 10^4$  Fibroblasten/Well (600  $\mu\text{l}$ ) ausgesät und für 24 h in RPMI Medium bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde in diesem Versuchsansatz nicht nur die Co-Kultur getestet, sondern auch die Co-Kultur mit den Monokulturen verglichen. Dafür wurden vier Wells/Inserts mit A2780 Zellen und Fibroblasten, vier Wells nur mit Fibroblasten und weitere vier Inserts nur mit A2780 Zellen besät. Das gesamte Medium der Proben wurde vor der Behandlung abgenommen und mit jeweils unterschiedlichem Zytostatika-haltigem Medium [10  $\mu\text{M}$  P8-D6, 10  $\mu\text{M}$  Etoposid, 10  $\mu\text{M}$  Topotecan oder Negativkontrolle] ersetzt und für 48 h bei 37 °C kultiviert. Zur Messung der Viabilität und Caspase-Aktivität wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von der Oberfläche gelöst, zusammen mit dem Überstand in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen gesammelt und bei 250  $g$  für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 25  $\mu\text{l}$  frischem Medium resuspendiert. Zur Vermessung wurde diese Zellsuspension dann in eine weiße 96-Well Platte mit transparentem Boden überführt und nach 30 min Inkubationszeit bei RT mit dem Viabilitäts-Reagenz des Apo-Live-Glo™ Multiplex-Assays vermessen ( $400_{\text{Ex}}/505_{\text{Em}}$ ). Die Vermessung der Caspase-Messung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben nach 1 h Inkubation mit Caspase-Reagenz bei RT im Luminometer. Zur Auswertung wurden die Caspase-Aktivitäten der Co-Kultur mit den Caspase-Aktivitäten der Monokulturen verglichen.

### 3.2.5 3D-Modell

Zur erfolgreichen Entwicklung vielversprechender Wirkstoffe werden zuverlässige und stabile Testsysteme benötigt. Die heutzutage typischen *in vitro* Modelle basieren häufig auf 2D-Monolayer-Systemen, in denen die Zellen auf einem festen Untergrund adhären und vom umgebenden Medium gleichmäßig mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt werden (Edmondson *et al.*, 2014). In der *in vivo* Situation sind Gewebe jedoch von anderen Zellen und extrazellulärer Matrix umgeben. Auch die Zellmorphologie kann in der 2D-Kultur verändert vorliegen, sodass es sogar zu Modifikationen der Genexpression und Proteinsynthese führen kann (Vergani *et al.*, 2004; Pampaloni *et al.*, 2007). In der 3D-Kultur können die Zellen vermehrt Zell-Zell- und Zell-ECM-Kontakte ausbilden, sodass Aggregate oder kompakte Sphäroide entstehen. Diese imitieren die natürliche Morphologie und das Verhalten vieler Zelltypen realistischer im Vergleich zur 2D-Kultur (Breslin und O'Driscoll, 2016).

Auf Grund dieser verbesserten Aussagekraft wurden zusätzlich 3D-Kultur Experimente durchgeführt, um die Situation *in vivo* besser nachzustellen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten 3D-Kultur wurden Aggregat-Konformationen und Sphäroide von Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen mit einer definierten Zellzahl (Tab. 3.9) in konvex geformten *Ultra Low Attachment* Sphäroid Platten mit normalen 2D-Medium hergestellt und für 96 h bei 37 °C kultiviert. Nach 96 h Entwicklungszeit besaßen die meisten Aggregate und Sphäroide einen Durchmesser von 400-600 µm. Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden für jede Zelllinie Vorexperimente durchgeführt. Nach der 96 h Kultivierung erfolgte die Behandlung nach dem Schema Tab. 3.10 für 48 h. Zur Auswertung wurden Testungen zur Zytotoxizität, Viabilität und Apoptose nach Behandlung mit P8-D6, Topotecan und PBS (Negativkontrolle) durchgeführt (Methode Abb. 3.4).

**Abb. 3.4: Schematische Übersicht der 3D-Methode**

Die Krebszellen werden nach dem Auftauen als Monoschicht kultiviert. Mit der Aussaat in 96-Well Ultra Low Attachment Sphäroid Platten bilden die Zellen selbstständig Aggregate, die Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Es konformieren sich abhängig der Zelllinie losere oder festere Aggregate bzw. Sphäroide. Im zeitlichen Verlauf werden alle 24 h mikroskopische Aufnahmen generiert. Nach 96 h beginnt die Behandlung mit P8-D6, Topotecan und PBS. Zeitgleich werden die Aggregate/Sphäroide mittels CellTox™ Green Cytotoxicity Assay auf Zytotoxizität hin untersucht. Nach 48 h Behandlung erfolgen die Endpunktmessungen zu Viabilität und Apoptose, sowie die Lebend-Tod-Färbung und die Rasterelektronenmikroskopie.

**Tab. 3.9: Schema Zellzahl 3D**

Zelllinie	Zellzahl
A2780	200 Zellen/Well in 200 $\mu$ l
SKOV-3	8.000 Zellen/Well in 200 $\mu$ l
OvCar8	1.000 Zellen/Well in 200 $\mu$ l
HEY	450 Zellen/Well in 200 $\mu$ l
MCF-7	1.000 Zellen/Well in 200 $\mu$ l
Sk-Br 3	1.000 Zellen/Well in 200 $\mu$ l
UF-182	20.000 Zellen/Well in 200 $\mu$ l

**Tab. 3.10: Behandlungsschema 3D**

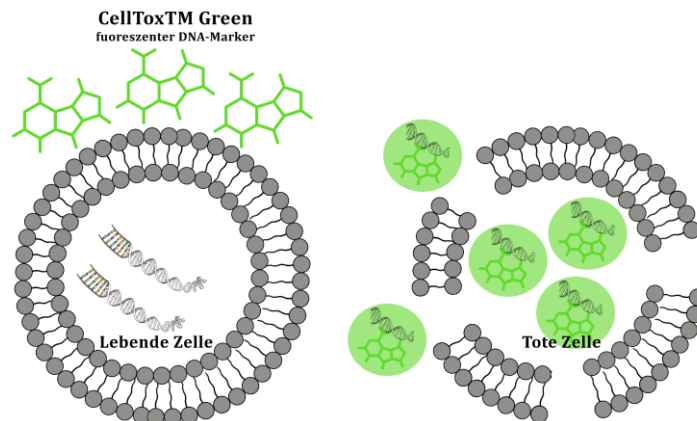
Insgesamt wurden drei Bestimmungen für jede Konzentration der unterschiedlichen Zytostatika bzw. der Negativkontrolle durchgeführt.

Substanz	Konzentrationen [ $\mu$ M]			
P8-D6	0,1	0,5	1	10
Topotecan			1	10
Negativkontrolle (PBS)				



### 3.2.5.1 Zytotoxizität

Die Zytotoxizität wurde durch gleichzeitige Zugabe vom CellTox™ Cytotoxicity Assay während der Behandlung gemessen. Das CellTox™ Cytotoxicity Assay basiert auf einen fluoreszenten DNA-Marker, welcher nicht membrangängig ist. Bei Verlust der Membranintegrität wird DNA freigesetzt, woran der Fluoreszenzfarbstoff binden kann (Abb. 3.5). Dies führt zur Zunahme des Fluoreszenzsignals, welches bei 485<sub>Ex</sub>/520<sub>Em</sub> vermessen werden kann.



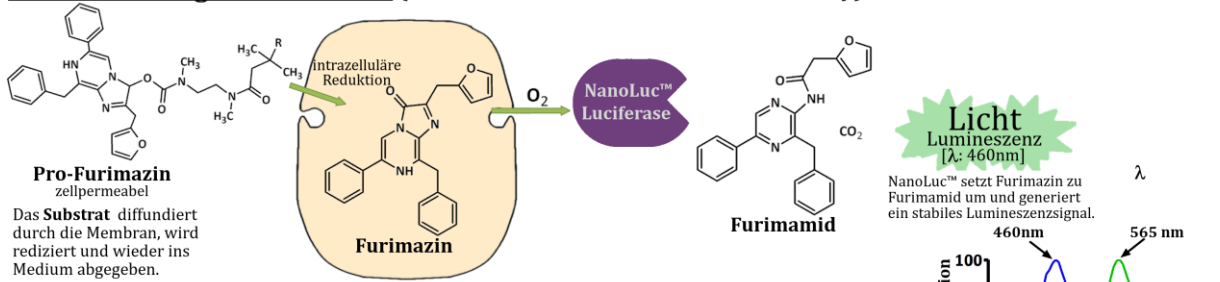
**Abb. 3.5: Prinzip des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays**

Das Prinzip des CellTox™ Green Cytotoxicity Assay basiert auf der Messung zytotoxischer Effekte mittels eines fluoreszenten DNA-Markers. Der Fluoreszenzfarbstoff ist nicht membrangängig. Er bindet an die DNA toter Zellen, die nach Verlust der Membranintegrität freigesetzt wird. Dies führt zu einer starken Zunahme des Fluoreszenzsignals bei erhöhter Zytotoxizität (modifiziert nach Promega, 2015).

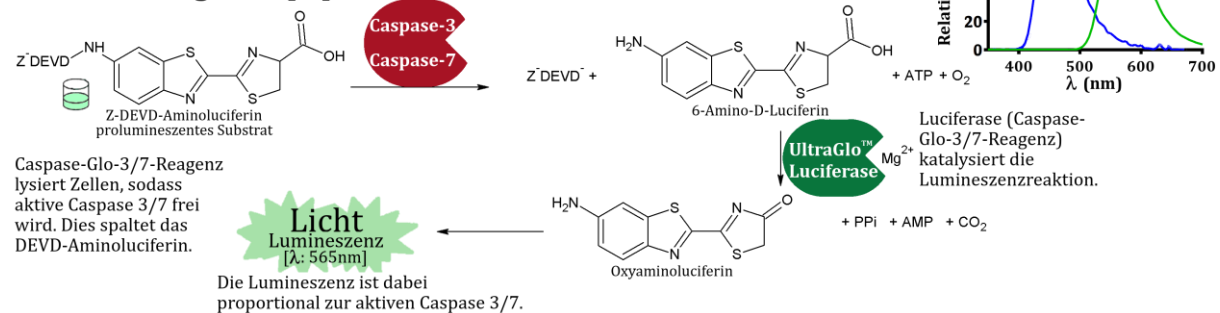
### 3.2.5.2 Viabilitäts- und Apoptose-Assay

Im Anschluss an die 48 h Behandlung wurde die Viabilität und Apoptoserate bestimmt. Hierfür diente das RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay zur Bestimmung der Viabilität und das Caspase-Glo® 3/7 Assay zur Bestimmung der Apoptoserate. Dabei basiert das RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay auf der Umsetzung eines Substrats mit der NanoLuc™ Luciferase. Das Substrat Pro-Furimazin wird in der viablen Zelle zu Furimazin reduziert und diffundiert ins Medium, wo es dann von der NanoLuc™ Luciferase zu Furimamid umgesetzt werden kann. Bei dieser Reaktion wird ein Lumineszenzsignal bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 460$  nm emittiert und kann gemessen werden. Die Caspase-messung, welche bereits in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben wurde, produziert bei Anwesenheit von Caspase 3 und 7 ebenso ein Lumineszenzsignal, das jedoch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 565$  nm Licht emittiert. Mittels moderner lumineszenzfähiger Multi-mode-Mikroplatten Reader, die spezielle optische Dichtefilter besitzen, können beide Signale unabhängig voneinander gemessen werden, was eine Kombination der beiden Assays möglich macht (Abb. 3.6).

### 1. Bestimmung der Viabilität (RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability)



### 2. Bestimmung der Apoptose (Caspase-Glo® 3/7 Assay)



#### Abb. 3.6: Prinzip des RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability und des Caspase-Glo® 3/7 Assay

Das RealTime-Glo™ Metabolic Cell Viability Assay enthält das Substrat Pro-Furimazin, welches membran-gängig ist und in der Zelle zu Furimazin reduziert wird. Anschließend wird Furimazin wieder aus der Zelle heraus transportiert. Die dem Medium zugesetzte NanoLuc™ Luciferase kann dann in Beisein von Sauerstoff die oxidative Umwandlung von Furimazin zu Furimamid katalysieren. Dabei emittiert es Lumineszenzsignale bei  $\lambda = 460$  nm, detektierbar unter Zuhilfenahme des Blue 2 NB Filter ( $\lambda$ -Bereich: 400 – 500 nm). Auf diese Messung folgt eine Umsetzung des prolumineszenten Substrats durch Caspase 3 und 7 und eine weitere Umsetzung durch UltraGlo Luciferase zu Oxyaminoluciferin und einem Lumineszenzsignal. Die Aktivität der Caspase 3 und 7 ist proportional zur Apoptoserate. Das Lumineszenzsignal bei  $\lambda = 565$  nm wird emittiert, welches mit Zuhilfenahme des Red NB Filter ( $\lambda$ -Bereich: >580 nm) detektiert werden kann. (modifiziert nach Promega, 2015).

Erweiternd zu diesen Messungen wurden Aussaaten und Behandlungen in transparenten konvex geformten Ultra Low Attachment Platten durchgeführt. Diese dienten zur visuellen Kontrolle des Wachstums der Sphäroide. Zusätzlich wurde in diesen Platten eine Dreifachfärbung mit Propidiumiodid [10  $\mu$ g/ml], Calcein [1mM] und Hoechst 33342 [0,001 %] durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Farbstoffe Propidiumiodid (303<sub>Ex</sub>/618<sub>Em</sub>), Calcein (493<sub>Ex</sub>/516<sub>Em</sub>) und Hoechst 33342 (353<sub>Ex</sub>/453<sub>Em</sub>) mit Hilfe des NYONES vermessen. Propidiumiodid interkaliert mit der DNA, ist jedoch nicht membran-gängig, sodass es nur tote Zellen rot anfärbt. Das Calcein lässt viable Zellen grün fluoreszieren, indem es durch Esterasen der intakten Zelle gespalten wird. Der membran-permeable Bisbenzimid Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 dient als spezifischer Farbstoff für den Zellkern, indem er sich an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Mit Hilfe dieser dreifach-Fluoreszenzfärbung können alle Zellkerne angefärbt werden und in viable und tote Zellen eingeteilt werden.

### 3.2.5.3 Rasterelektronenmikroskopie

Zur weiteren Charakterisierung der 3D-Aggregate und -Sphäroide wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurden die Sphäroide und Aggregate wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben kultiviert und für 48 h mit P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ ] und Negativkontrolle [PBS] behandelt. Anschließend erfolgte eine erste Fixierung der Sphäroide/Aggregate mit 2,5 % Glutaraldehyd [1 h RT] in der ULA Platte. Nach 3-maligem Waschen mit Aqua bidest. erfolgte die zweite Fixierung mit 1 % Osmiumtetroxid [1,5 h RT]. Vor der Dehydrierung mittels Alkoholreihe [Entwässerung mit 25 %, 50 %, 75 %, 96 %, 2x100 % Ethanol für je 30min], wurden die Sphäroide/Aggregate mit PBS gewaschen und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Eine Lufttrocknung mittels Hexamethyldisilazan wurde auf den Kohle-Stubs durchgeführt. Zur besseren Leitfähigkeit wurden die Sphäroide/Aggregate mit Gold beschichtet und anschließend mit dem Rasterelektronenmikroskop vermessen.

### 3.2.6 Hepatotoxizität

Für die Messung der Hepatotoxizität wurden primäre humane Hepatozyten verwendet. Nach dem Auftauvorgang für Hepatozyten, der in Abschnitt 3.2.1 beschrieben wurde, wurden für die weitere Untersuchung folgende Zellkonzentrationen in Collagen I-beschichtete Platten ausgesät und mit SAM Medium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> für 3 h inkubiert:

96-Well Platten	1x10 <sup>5</sup> Zellen/Well
24-Well Platten	3,25x10 <sup>5</sup> Zellen/Well

Anschließend wurde das SAM Medium durch das Kulturmedium ausgetauscht und die Zellen wurden nach dem folgenden Behandlungsschema (Tab. 3.11) für 48 h bei 37 °C behandelt. Nach 24 h und 48 h erfolgte eine mikroskopische Betrachtung der Zellen.

**Tab. 3.11: Behandlungsschema Hepatotoxizität**

Insgesamt wurden drei Einzelbestimmungen für jede Konzentration der unterschiedlichen Zytostatika bzw. der Negativkontrolle durchgeführt.

Substanz	Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ]		
P8-D6	0,1	1	10
Etoposid			10
Doxorubicin			10
Negativkontrolle (PBS)		25	50

Zur Erfassung der Hepatotoxizität wurden neben der mikroskopischen Begutachtung der Zellen die Apoptoserate und Viabilität bestimmt, sowie der oxidative Stress in den Zellen

ermittelt. Es wurden insgesamt drei verschiedene *ex vivo* Patientenzellen jeweils in dreifach-Bestimmung untersucht.

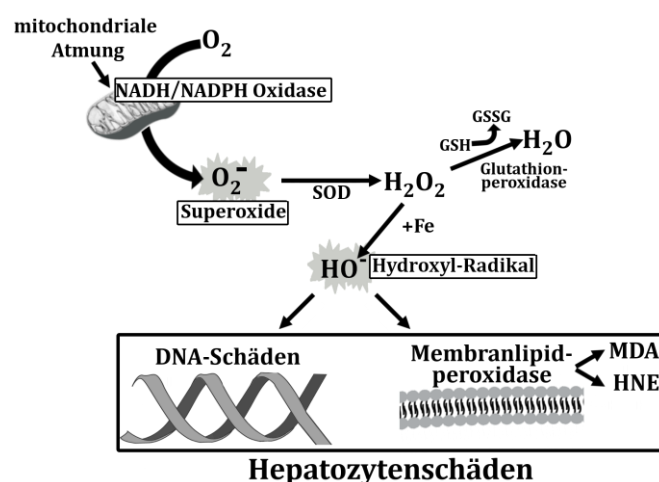
### 3.2.6.1 Apoptoserate in Hepatozyten

Die für die Viabilität und Caspase-Messung in 96-Well Platten ausgesäten Hepatozyten wurden nach der Behandlung mit P8-D6, sowie Etoposid und Doxorubicin (Positiv-Kontrolle) und PBS (Negativ-Kontrolle) (Tab. 3.11) für 48 h inkubiert und anschließend vermessen. Zu diesem Zwecke wurde das ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay der Firma Promega verwendet, welches bereits in Abschnitt 3.2.3.1 Anwendung fand und analog verwendet wurde.

### 3.2.6.2 Oxidativer Stress in Hepatozyten

Oxidativer Stress ist ein Zustand, bei dem der Körper mehr freie Radikale, wie Superoxid ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikal ( $HO^\cdot$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) produziert als abbaut. Diese reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen durch Atmung oder andere natürliche Prozesse, Antioxidantien dienen als Abwehr (Halliwell und Gutteridge, 2007).

Wasserstoffperoxid ist physiologisch wesentlich für die intrazelluläre Signalübertragung. Wird es jedoch in ein Hydroxylradikal umgewandelt, kann dies die Struktur oder Funktion einer Zelle irreversibel verändern und zum Zelltod führen (Abb. 3.7) (Shimizu *et al.*, 2012). Geringere ROS-Werte können zur nichtletalen Oxidation führen und so mutagene Effekte triggern, die das Fortschreiten der Onkogenese fördern (Wojtala *et al.*, 2014; Gomez-Lechon *et al.*, 2010)



**Abb. 3.7: Mechanismus des oxidativen Stresses in humanen Hepatozyten**

Eine häufige Folge von oxidativem Stress ist häufig die Zellschädigung. Eine Quelle für die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist die mitochondriale NADPH / NADH-Oxidase. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wird erzeugt und anschließend zu einem hochreaktiven Hydroxylradikal umgesetzt. Dies ist Auslöser vieler Zellschädigungsmechanismen (modifiziert nach Shimizu *et al.*, 2012). Beispielsweise werden die Endprodukte der Lipidperoxidation (Malondialdehyd MDA und 4-Hydroxynonenal HNE) bei Zellschädigung in den Disse'sche Raum abgegeben.

Um den möglichen Schaden in Leberzellen nach Behandlung mit P8-D6 zu bewerten, wurde der oxidative Stress in humanen Hepatozyten unter Verwendung des Fluoreszenzmarkers Dihydroethidium (DHE) zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies analysiert (Wojtala *et al.*, 2014). Zur Vorbereitung dieser Messung wurden schwarze, flache, transparente 24-Well Platten mit Collagen I beschichtet und Hepatozyten ausgesät. Nach 3 h Inkubation in SAM Medium und Austausch zu Kulturmedium wurden die Zellen nach dem in Tab. 3.11 angegebenen Behandlungsschema therapiert. Der ROS Marker DHE wurde in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  45,5 h nach der Behandlung den Proben zugefügt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Mikroplatten-Reader (500<sub>Ex</sub>/580<sub>Em</sub>).

### 3.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Aufgrund seiner chemischen Struktur besteht P8-D6 aus mehreren kondensierten Ringen, die räumlich planar angeordnet sind und über ein konjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem und eine Aromatizität verfügen. Infolgedessen besitzt P8-D6 eine Autofluoreszenz (462<sub>Ex</sub>/530<sub>Em</sub>). Diese Eigenschaft wurden in der Fluoreszenzmikroskopie genutzt, um die Lokalisation von P8-D6 in der Zelle zu bestimmen. Hierfür wurden zwischen  $1 \times 10^4$ - $2,0 \times 10^4$  Zellen/Well auf ein „Glas-4well-Chamber Slide“ gebracht und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit P8-D6 [500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS (Negativkontrolle) für 30 min behandelt. Nach dem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 150  $\mu\text{l}$  Aceton für 10 min bei RT fixiert. Nach dem erneuten Waschen erfolgte die Anfärbung der Zellmembran mit CellTracker™ Deep Red Dye [5  $\mu\text{M}$ ] bei 37 °C für 15 min. Zuletzt erfolgte ein weiterer Waschschriff bevor der „Chamber“ entfernt, der Objektträger getrocknet und die Zellen mit DAPI (Antifade (Vectashield), Counterstain (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI)) gedeckelt wurden. Die Aufnahme erfolgte über eine dreifach-Aufnahme mit DAPI- (350<sub>Ex</sub>/470<sub>Em</sub>), FITC- (490<sub>Ex</sub>/525<sub>Em</sub>) und Cy5- (649<sub>Ex</sub>/670<sub>Em</sub>) -Filter mit einem 63x Objektiv. Mit dem DAPI Filter konnte die DAPI-Färbung, die den Zellkern markiert, aufgenommen werden. Mit dem FITC Filter erfolgte die Aufnahme von P8-D6 über seine Autofluoreszenz. Außerdem konnte die Zellmembran durch den Farbstoff CellTracker™ Deep Red Dye, einen Fluoreszenzfarbstoff, der ungehindert die Zellmembran passieren und in der Zelle zu einem zellimpermeable Reaktionsprodukte umgewandelt wird, markiert und über den Cy5 Filter aufgenommen werden.

## 3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und anschließend bei 250 *g* für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in einem Lysispuffer (Abschnitt 2.3) resuspendiert und bei 4 °C eine Stunde geschüttelt.

Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 2.000 *g* wurden die Überstände mit der von SMITH et al. (1985) beschriebenen Bicinchoninsäure (BCA)-Methode vermessen.

Es wurde das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce gemäß Herstellerangaben verwendet. Um störende Einflüsse der Begleitstoffe zu vermeiden, wurden die Proben dabei zunächst mit dem Compat-Able™ Kit der Firma Pierce gefällt. Das erhaltene Pellet wurde anschließend mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und 30 min bei 37 °C auf dem Plattenshaker (100 rpm) inkubiert. Durch die anschließende Lagerung bei 4 °C wurde die Reaktion gestoppt und die Proben bei 562 nm photometrisch vermessen. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin. Die Methode basiert dabei auf der alkalischen Reduktion von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> durch Proteine, welche dann mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildeten.

### 3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen wurde nach dem von (Laemmli, 1970) beschriebenen diskontinuierlichen Verfahren durchgeführt.

Die Proteinproben wurden zunächst mit Ladepuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung für 6 min bei 95 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2.000 *g* für 5 min wurden die Proben (25 µg Gesamtprotein) und der Molekulargewichtsmarker (PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder) in einem Acrylamid-Gel (4 % Sammelgel/7,5 % Trenngel) aufgetragen. Die Fokussierung im Sammelgel erfolgte bei 4-5 V/cm für 20 min. Die anschließende Trennung nach Molekulargewicht erfolgte bei 6-7 V/cm für 50 min. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine mittels Western Blot zur Immunodetektion auf eine Trägermembran aufgebracht.

### 3.3.3 Western Blot Analyse

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran mittels Nassblotverfahren transferiert. Dieser zweistündige Vorgang

wurde in einer Elektrophoresekammer in Transferpuffer bei 90 V unter Kühlung durchgeführt. Die verwendeten Puffer und Entwicklungsreagenzien sind in Abschnitt 2.3 beschrieben. Im Anschluss an das Blotting wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mittels Blocking-Reagenz 1 h bei RT unspezifisch blockiert. Zur Immunodetektion wurde diese Membran dann mit dem primär-Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die primär-Antikörper wurden dafür mit dem Blocking-Reagenz versetzt, sodass folgende Verdünnungen entstanden: Anti-Topo I 1:500, anti- $\beta$ -Actin 1:500, anti-Hsp90 1:10000, Anti-Topo II  $\alpha/\beta$  1:10.000. Nach dem anschließenden Waschschrift in Waschpuffer (3 x 5 min) wurde die Membran in IgG $\kappa$  BP-HRP-gekoppelten sekundär-Antikörper (1:2.000) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem erneuten Waschen (3 x 5 min) wurde die Proteine mit Hilfe eines ECL-Plus Western Blot Detektions System detektiert. Die Visualisierung der Chemilumineszenz wurden in einer Dunkelkammer unter Zuhilfenahme von Röntgenfilmen (Hyperfilms™ ECL) bei unterschiedlichen Expositionszeiten sowie durch den ChemoStar Touch ECL and Fluorescence Imager durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte über die ImageJ Software.

### 3.4 Tierexperimentelle Methoden

Ziel der Tierversuche war ein *in vivo* Nachweis der antitumoralen Effektivität von P8-D6 im Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell im Vergleich zu Topotecan und PBS mittels molekularem *in vivo* Imaging zu führen. Dabei lag der Fokus dieser Untersuchung im Bereich der Pharmakodynamik, sowie der Untersuchung der Toxikologie.

Die Tierversuche erfolgten gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und wurden durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Tierversuchsnr.: V 242-11613/2019 (33-3/19) intern 1170).

Für den allgemeinen Versuchsaufbau wurde auf ein bereits 2007 etabliertes Modell zurückgegriffen (Tierversuchsantrag: V 312-72241.121-10 (53-5/06)/Bauerschlag *et al.*, 2010). Dennoch erfolgte nach der ersten Behandlungsstudie eine erneute Etablierung zur Erfassung der optimalen zu applizierenden Zellzahl und des optimalen Therapiebeginns bevor die zweite Behandlungsstudie durchgeführt wurde.

#### 3.4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche SCID/beige-Mäuse der Firma Charles River mit einem Körpergewicht von ca. 20 g nach ein- bis zweiwöchiger Eingewöhnungszeit im Alter von

sieben bis acht Wochen verwendet. Die Tierhaltung erfolgte unter kontrollierten Außenbedingungen und regulierten Tag- und Nachtzyklen in den Räumen des MOIN CC und des Tierhauses der CAU Kiel. Entkeimtes Trinkwasser sowie pelletiertes Trockenfutter standen den Mäusen nach Belieben zur Verfügung. Die Tiere standen während gesamten Versuchszeit unter tierärztlicher Kontrolle.

Bei Erreichen eines Abbruchkriteriums (Erreichen der kritischen Tumorgroße, Verhaltensauffälligkeiten, Kachexie, gesträubtes Haarkleid, Ulzerationen, Abszesse) wurden die Tiere aus der Studie genommen und die Euthanasie (zervikale Dislokation) durchgeführt. Das Studienende wurde am Tag 90 bzw. Tag 70 nach Injektion der Tumorzellen erreicht. An diesem Studienende wurde bei allen verbliebenen Tieren die Euthanasie durchgeführt. Im Anschluss an die jeweilige zervikale Dislokation erfolgte die Sektion der toten Mäuse. Hierbei wurden die Tumore für weitere Untersuchungen entnommen.

### 3.4.2 Erste Behandlungsstudie

Für die *in vivo* Ovarialkarzinom-Xenograft-Behandlungsstudie mit P8-D6, Topotecan und PBS wurden 36 weibliche SCID/beige-Mäuse verwendet. Diesen Mäusen wurden am Tumorzellen-Applikationstag (Tag 0)  $5 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen intraperitonealen (*i.p.*) appliziert (Abb. 3.8). Für die Applikation der Tumorzellen wurden diese zuvor mit Trypsin aus der T75-Flasche gelöst und bei 250 *g* zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Suspension wurde dann auf die definierte Zell-Konzentration eingestellt und mittels Omnican40 Insulinspritzen *i.p.* paramedian innerhalb von 1 h in das untere Bauchdrittel injiziert.

Die Messung des Tumorwachstums erfolgte erst vierzehntägig und bei Behandlungsbeginn einmal wöchentlich. Für die Vermessung der Tumorgroße mittels Biolumineszenz wurden die Mäuse mit Fentanyl / Midazolam / Medetomidin narkotisiert (Dosierung 0,05 mg/kg KG; 5 mg/kg KG; 0,5 mg/kg KG) (Bauerschlag *et al.*, 2010; Thal und Plesnila, 2007; Fleischmann *et al.*, 2016; Kirschner *et al.*, 2015). Während der Narkose erfolgte die Luciferingabe *i.p.* (150 mg/kg KG in 100  $\mu$ l isotonischer Kochsalzlösung). Innerhalb von 15 min wurden Aufnahmen mit dem NightOWL LB 983 der Firma Berthold angefertigt. Dabei wurden als Einstellung Low Gain, Belichtungszeit 180 s und 1x1-Binning gewählt. Die Behandlung mit P8-D6, Topotecan und PBS begann an Tag 28. Hierfür wurde das Körpergewicht der Mäuse ermittelt und anhand dieses Parameters die Zytostatika-Dosis eingestellt. Zweimal wöchentlich für 8 Wochen sollten 12 Mäuse *i.v.* mit 2 mg/kg KG P8-D6, weitere 12 Mäuse mit je 2 mg/kg KG Topotecan und weitere 12 Mäuse mit PBS



behandelt werden (Tab. 3.12). Die finale zervikale Dislokation sollte für alle Tiere an Tag 90 stattfinden, solange diese bis dahin kein Abbruchkriterium erreicht hatten. Bei Erreichen der definierten Abbruchkriterien wurden diese Tiere direkt aus dem Versuch genommen.

Tab. 3.12: Applikationsschema Behandlungsstudie

Versuch	Gruppen (à 12 Mäuse)			gesamt = 36
II	1	2	3	Anzahl
Substanz	P8-D6	Topotecan (Referenzgruppe)	Vehikel-Kontrolle	je 12 Mäuse
Dosierung (i.v.)	2 mg/kg (16x)	2 mg/kg (16x)	PBS (16x)	alle Dosen je 50 µl (PBS)

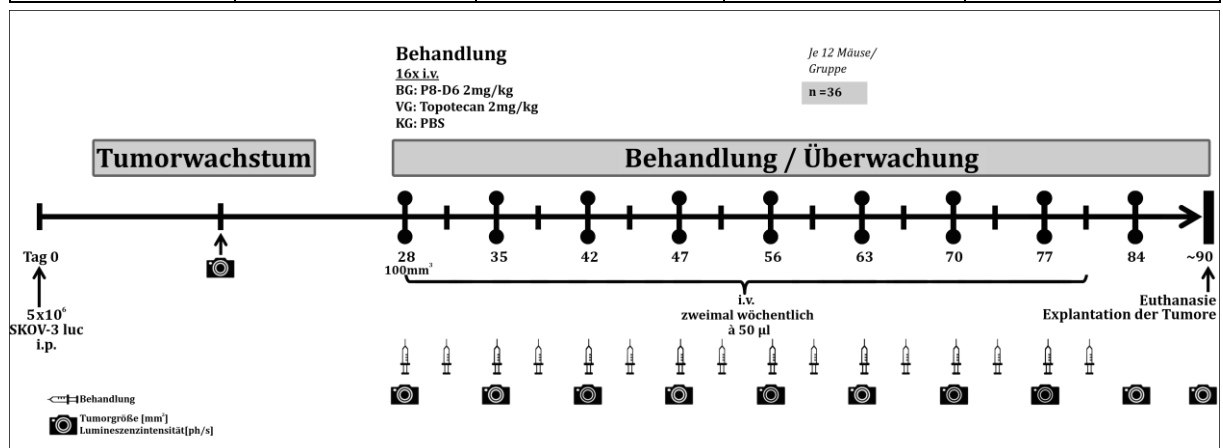


Abb. 3.8: Schema zur Behandlungsstudie des *in vivo* Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodells

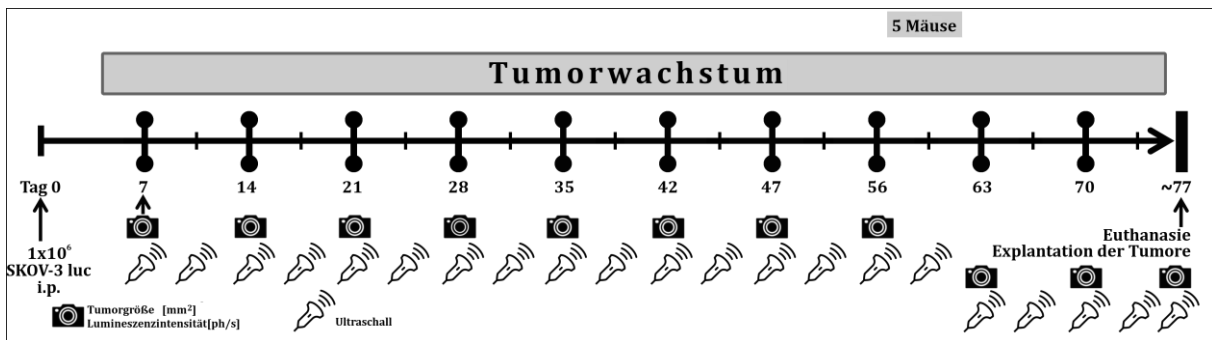
7-8 Wochen alte SCID/beige-Mäuse wurden *i.p.* 5x10<sup>6</sup> SKOV-3 luc Zellen injiziert. Danach folgte eine Wachstumskontrolle des Tumors durch *in vivo* Biolumineszenzmessung. Am Tag 28 begann die *i.v.* Behandlung mit 2 mg/kg KG P8-D6, 2 mg/kg KG Topotecan oder PBS für 8 Wochen 2x wöchentlich.

### 3.4.3 Methodenvalidierung

Die erneute Etablierung der zu applizierenden Zellzahl und des Therapiebeginns wurde mit fünf weiblichen SCID/beige-Mäusen durchgeführt. Fünf Mäusen wurden am Tumorzellen-Applikationstag (Tag 0) 1x10<sup>6</sup> SKOV-3 luc Tumorzellen in 100 µl (PBS) *i.p.* appliziert (Abb. 3.9). Die Zellkultivierung und -zählung und Applikation wurden analog zu Abschnitt 3.4.2 durchgeführt.

Die Messung des Tumorwachstums erfolgte wöchentlich mittels Ultraschalles und Lumineszenzmessung. Außerdem erfolgte alle 2 bis 3 Tage eine Untersuchung des Allgemeinzustands der Tiere (Fellstruktur, Gewicht der Tiere etc.). Für die Ultraschallmessung wurde das Gerät Vevo 770 der Firma FUJIFILM VisualSonics verwendet, welches über Schallköpfe mit mechanischem Design verfügt, bei denen ein Sender und Empfänger

mit Frequenzen bis zu 70 MHz hin und her schwingt. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit Ketamin / Medetomidin (Dosierung 80 mg/kg; 0,5 mg/kg *i.p.* Applikation max. 125 µl) Für die Ultraschallmessung wurde die untersuchte Hautstelle der Tiere enthaart. Bei der Untersuchung wurden sowohl die Tumorgröße als auch der ödematöse Zustand der umliegenden Gewebe und die Aszitesbildung beurteilt. Das Vorgehen der Lumineszenzmessung wurde bereits in Abschnitt 3.4.2 detailliert beschrieben.



**Abb. 3.9: Schema zur Etablierung des *in vivo* Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodells**

11 Wochen alten SCID/beige-Mäusen wurden *i.p.*  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert. Danach folgte eine wöchentliche Wachstumskontrolle des Tumors durch *in vivo* Biolumineszenzmessung und Ultraschall.

### 3.4.4 Zweite Behandlungsstudie

Für die *in vivo* Ovarialkarzinom-Xenograft-Behandlungsstudie mit P8-D6, Topotecan und PBS wurden 24 weibliche SCID/beige-Mäuse verwendet. Diesen Mäusen wurden am Tumorzellen-Applikationstag (Tag 0)  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen *i.p.* appliziert (Abb. 3.10). Für die Applikation der Tumorzellen wurde die Zellsuspension zuvor mit Trypsin aus der T75-Flasche gelöst und bei 250 g zentrifugiert. Danach wurde in PBS resuspendiert und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Suspension wurde auf die definierte Zell-Konzentration eingestellt und mittels Omnican40 paramedian innerhalb von 1 h in das untere Bauchdrittel *i.p.* injiziert.

Die Messung des Tumorstadiums erfolgte wöchentlich ab Tag 7 mittels Ultraschall und Lumineszenzmessung. Außerdem erfolgte alle 2 bis 3 Tage eine Untersuchung des Allgemeinzustands der Tiere. Die Ultraschallmessung wurde äquivalent zur in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Durchführung der Lumineszenzmessung wurde in Abschnitt 3.4.2 beschrieben.

Die Behandlung mit P8-D6, Topotecan und PBS begann an Tag 8. Hierfür wurde das Körpergewicht der Mäuse ermittelt und anhand dieses Parameters die Zytostatika-Dosis eingestellt. Zweimal wöchentlich für 8 Wochen wurden 8 Mäuse *i.v.* mit 0,5 mg/kg KG P8-D6, weitere 8 Mäuse mit je 0,5 mg/kg KG Topotecan und weitere 8 Mäuse mit PBS behandelt (Tab. 3.13). An Tag 60 erfolgte die letzte *i.v.* Behandlung. Im Anschluss wurden die

Tiere weitere 11 Tage beobachtet und untersucht, bevor die finale zervikale Dislokation durchgeführt wurde. Bei Erreichen eines Abbruchkriteriums wurden diese Mäuse mittels zervikaler Dislokation aus der Studie genommen.

Tab. 3.13: Applikationsschema Behandlungsstudie

Versuch	Gruppen (à 8 Mäuse)			gesamt = 24
II	1	2	3	Anzahl
Substanz	P8-D6	Topotecan (Referenzgruppe)	Vehikel-Kontrolle	je 8 Mäuse
Dosierung (i.v.)	0,5 mg/kg (16x)	0,5 mg/kg (16x)	PBS (16x)	alle Dosen je 50 µl (PBS)

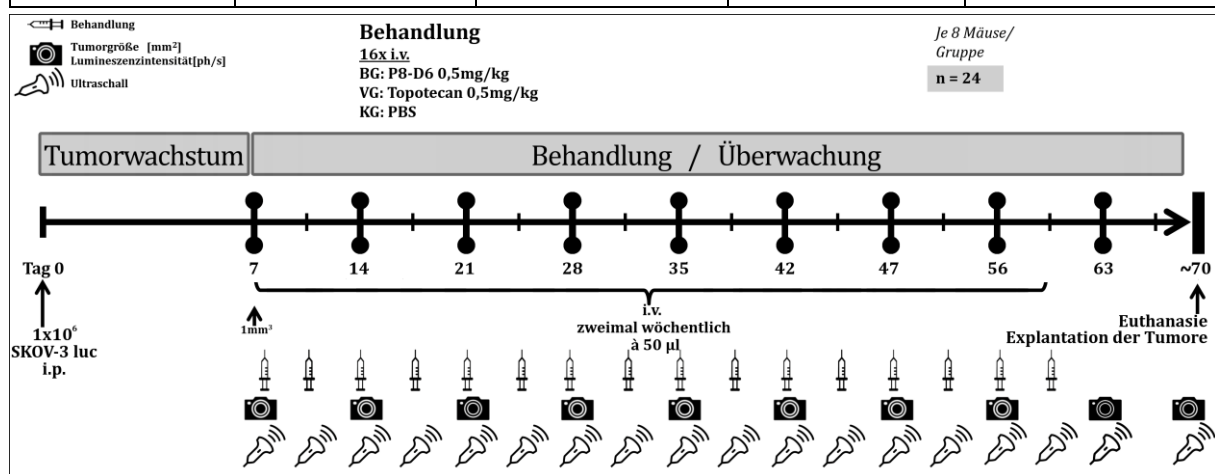


Abb. 3.10: Schema zur Behandlungsstudie des *in vivo* Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodells

7-8 Wochen alten SCID/beige-Mäusen wurden *i.p.*  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert. Danach folgte eine wöchentliche Wachstumskontrolle des Tumors durch *in vivo* Biolumineszenzmessung und Ultraschall. Am Tag 8 begann die *i.v.* Behandlung mit 0,5 mg/kg KG P8-D6, 0,5 mg/kg KG Topotecan oder PBS für 8 Wochen 2x wöchentlich.

### 3.4.5 Sektion der Versuchstiere

Nach der zervikalen Dislokation wurden die Mäuse für die Sektion in Rückenlage mit Nadeln auf einer Unterlage fixiert und mit Ethanol das Fell befeuchtet. Zunächst erfolgte die Inzision der Haut mit einem Skalpell vom Brustbein bis zum Schambein. Bei anfallendem Aszites wurde dies zuerst mittels einer Spritze abgesaugt. Ein erneuter Schnitt durch die Unterhaut ermöglichte die Präparation. Als erstes wurde der Tumor vorsichtig präpariert, in isotonischer Kochsalzlösung schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Im Anschluss erfolgte die detaillierte visuelle Untersuchung der Organe und Gewebe auf toxische Veränderungen. Hierbei lag der Fokus auf der Untersuchung der Leber, Nieren und Milz. Der entnommene Tumor wurde nach Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  zur weiteren Verarbeitung in Paraffinblöcken gelagert.

### 3.4.6 Histologische Präparation

Die Tumore und die Gewebe (Pankreas, Leber, Milz), die zur Fixierung für die Langzeitlagerung zuerst für 24 h in 4% gepuffertes Formalin gegeben wurden, kamen zur Entwässerung in eine Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration im Institut für Pathologie (UKSH). Die Einbettung in Paraffin und das Aufblocken erfolgte ebenfalls im Institut für Pathologie. Nach der Kühlphase erfolgte das Schneiden der Paraffinblöcke mittels Mikrotoms in einer Schichtdicke von 3  $\mu\text{m}$ . Die Präparate wurden nach dem Schneiden im Wasserbad geglättet und dann auf die Objektträger aufgezogen. Im Anschluss wurden sie über Nacht im Inkubator bei 37°C getrocknet. Zur HE Färbung wurden die Objektträger zunächst mit Xylol vom übrigen Paraffin entfernt und mit absteigender Alkoholreihe wieder rehydriert.

Für die Anfärbung des Zellkerns wurde die Probe erst für 3 min in Hämatoxylinlösung und anschließend für 2 s in 0,1 %-ige wässrige Salzsäure gegeben. Anschließend erfolgte ein Waschschrift unter fließendem Leitungswasser für 3-5 min. Für die rosa Bindegewebsfärbung wurde das Präparat in 0,1 %-iger wässriger Eosinlösung gelagert und erneut unter fließendem Leitungswasser für 30 s gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine weitere Entwässerung des Präparats mit unterschiedlichen Konzentrationen an Alkohol [70 % - 70 % - 96 % - 96 % - 100 % - 100 %] für jeweils 1 min, ein zweifacher Waschschrift mit Xylol für 5 min und das Eindeckeln in Entellan.

Die nicht HE gefärbten Schnitte wurden dehydriert und anschließend mittels Färbeautomaten und folgenden Antikörpern angefärbt: Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb #9664; Ki-67, Rabbit mAb # RM-9106-S.

## 3.5 Datenanalyse

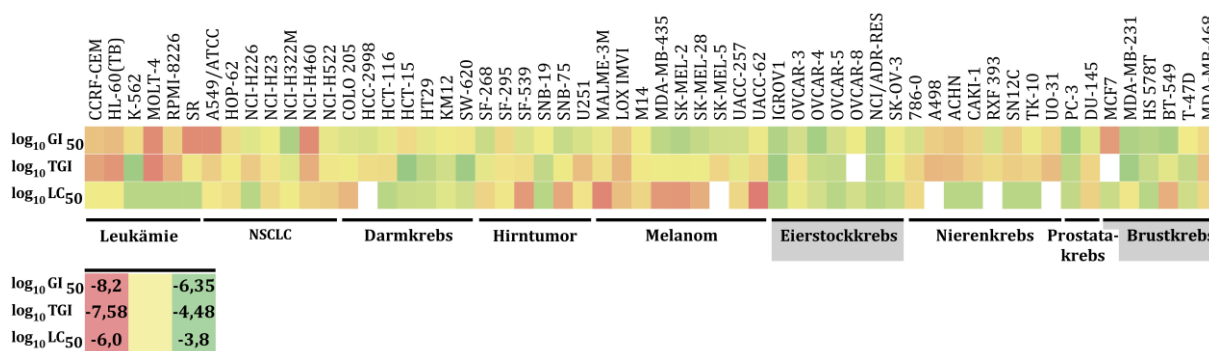
Alle experimentellen Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben.

Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung der Software Graph Pad Prism V8.4 (GraphPad Software Inc.). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz von Differenzen wurde die *one-way* ANOVA Testung durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % wurde als signifikant angesehen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 P8-D6: Entitätsübergreifender antitumoraler Effekt

Mit Hilfe der in Abschnitt 1.5.2 beschriebenen Synthese gelang es MEIER (2014) P8-D6 synthetisch herzustellen. In der Arbeit wurden zusätzlich physikochemische Eigenschaften und die Photostabilität von P8-D6 weiter untersucht. Aufgrund guter Resultate dieser Untersuchungen wurde das National Cancer Institut beauftragt für P8-D6 Zytotoxizitäts-Screenings durchzuführen. In diesem *NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screenings* wurde die Wirkung von P8-D6 erst in einem sogenannten „one dose assay“ [10  $\mu$ M] und weiter zweifach in einem „five dose assay“ an 60 humanen Tumorzelllinien unterschiedlicher Entitäten untersucht. Anhand dieser Ergebnisse konnte dann der  $GI_{50}$ -Wert (*growth inhibition 50 %*), TGI-Wert (*total growth inhibition*) und der  $LC_{50}$ -Wert (*lethal concentration 50 %*) für alle getesteten Zelllinien bestimmt werden. Zusätzlich wurde der  $GI_{50}$ -Werte von P8-D6 mit Referenzsubstanzen verglichen.



**Abb.4.1: antiproliferative Aktivität von P8-D6 im NCI-60-Screening**

Proliferationshemmung von P8-D6 im *NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screening – five dose assay* unter Verwendung dreier Parameter (wachstumshemmende Wirkung,  $GI_{50}$ ; zytostatische Wirkung, TGI; zytotoxische Wirkung,  $LC_{50}$ ; Konzentration in M). Die Farben repräsentieren die Aktivität auf der angegebenen kontinuierlichen Farbskala basierend auf log 10-transformierten Werten.

Die Abb.4.1 veranschaulicht das zytotoxische Potential von P8-D6. Umso kleiner der logarithmische Wert (kontinuierliche Farbskala), desto höher ist die zytotoxische Wirkung von P8-D6 auf die Zellen. Dabei ist zusehen, dass P8-D6 bei geringen Konzentrationen in Leukämie- und NSCL-Zellen bereits stark zytotoxisch wirkt. Doch P8-D6 besitzt auch im Ovarialkarzinom im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika wie Topotecan, Etoposid, Doxorubicin, Intoplicin oder Cisplatin mit 0,12  $\mu$ M einen relativ geringen  $GI_{50}$ -Wert (Tab. 4.1).

**Tab. 4.1: NCI-60 screening Daten der DTP-NCI Datenbank**

NCI-60 screening data set von 08/2018: Mittelwert der wachstumshemmenden Konzentration 50% ( $GI_{50}$ ) aller 60 getesteten Krebszelllinien und  $GI_{50}$  aller getesteten Zelllinien eines Tumortyps (Ovarialkarzinom und Mammakarzinom) für die Topoisomerase-Inhibitoren Topotecan, Etoposid, Doxorubicin, P8-D6 und Intoplicin, sowie das Alkylanz Cisplatin.

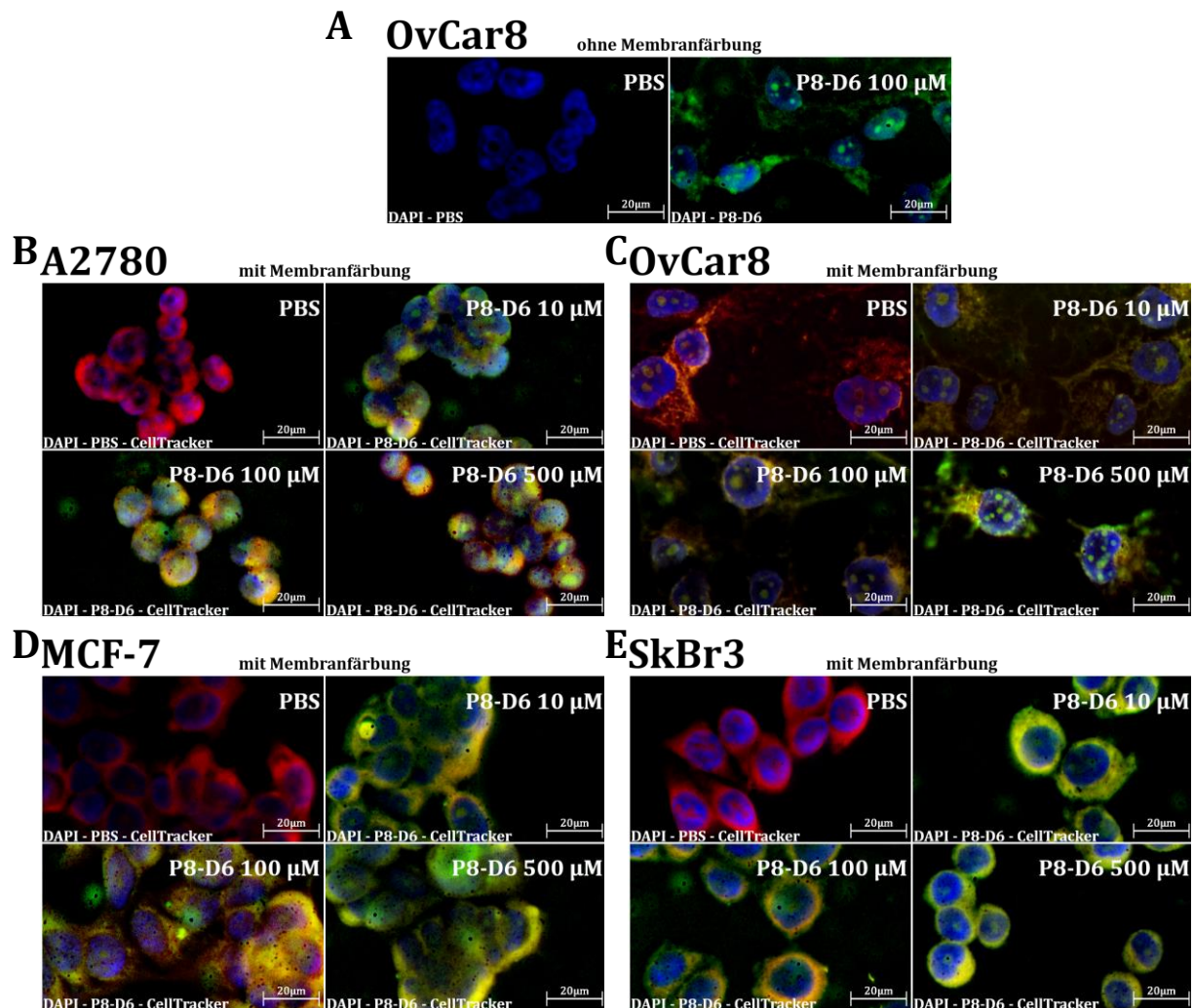
Zytostatika	$\Sigma GI_{50/60}$	$\Sigma GI_{50}$ Ovarialkarzinom	$\Sigma GI_{50}$ Mammakarzinom
<b>Topoisomerase I Inhibitor</b>			
Topotecan	0,04 $\mu\text{M}$	0,23 $\mu\text{M}$	0,07 $\mu\text{M}$
<b>Topoisomerase II Inhibitor</b>			
Etoposid	6,77 $\mu\text{M}$	33,23 $\mu\text{M}$	1,39 $\mu\text{M}$
Doxorubicin	0,14 $\mu\text{M}$	0,40 $\mu\text{M}$	0,13 $\mu\text{M}$
<b>Dualer Topoisomerase I/II Inhibitor</b>			
<b>P8-D6</b>	<b>0,05 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0,12 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0,13 <math>\mu\text{M}</math></b>
Intoplicin	0,55 $\mu\text{M}$	0,67 $\mu\text{M}$	0,58 $\mu\text{M}$
<b>Alkylanz</b>			
Cisplatin	15,25 $\mu\text{M}$	15,66 $\mu\text{M}$	23,55 $\mu\text{M}$

Dies ist ein Nachweis über die entitätsübergreifende antitumorale Wirksamkeit P8-D6 durch eine externe Organisation.

## 4.2 Wirkort: DNA und Topoisomerasen

Durch die Bestätigung des Wirkmechanismus von P8-D6 durch die Gruppe von Prof. Marko (Aichinger *et al.*, 2020) konnte aufgeklärt werden, dass P8-D6 als dualer Topo-Inhibitor das Enzym-DNA-Intermediär stabilisiert. Ein Topoisomerase-Inhibitor kann jedoch nur dann seine Wirkung entfalten, solange dieser die Eigenschaft besitzt die Zellkernmembran zu passieren, da in einer intakten Zelle die Entspiralisierung der DNA durch Topoisomerasen im Zellkern passiert. Nun stellte sich die Frage, ob P8-D6 in Ovarialkarzinom und Mammakarzinomzellen durch Diffusion oder Transportmechanismen seinen erwünschten Wirkort erreichen kann.

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie erfolgte ein bildbasierter Nachweis, indem sowohl das autofluoreszierende P8-D6 als auch der mit DAPI angefärbte Zellkern und die mit Cell Tracker Deep Red™ angefärbte Zellmembran detektiert wurden. Als Negativkontrolle diente PBS (Methode: Abschnitt 3.2.7). In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Abb.4.2 sind die Zelllinien A2780 und OvCar8 als Ovarialkarzinomzellen und MCF-7 und Sk-Br3 als Mammakarzinomzellen untersucht worden. Die alleinige Anfärbung des Zellkerns mit DAPI und die zuvor durchgeführte Behandlung mit PBS (Negativkontrolle) und P8-D6 in OvCar8 Zellen veranschaulichen deutlich die Autofluoreszenz-Eigenschaften von P8-D6 in grün. Außerdem kann anhand dieser Aufnahme bereits erkannt werden, dass P8-D6 nach Behandlung und Inkubation im Zellkern lokalisiert ist (Abb.4.2A).



**Abb.4.2: Detektion der Penetration in den Zellkern via Fluoreszenzmikroskopie**

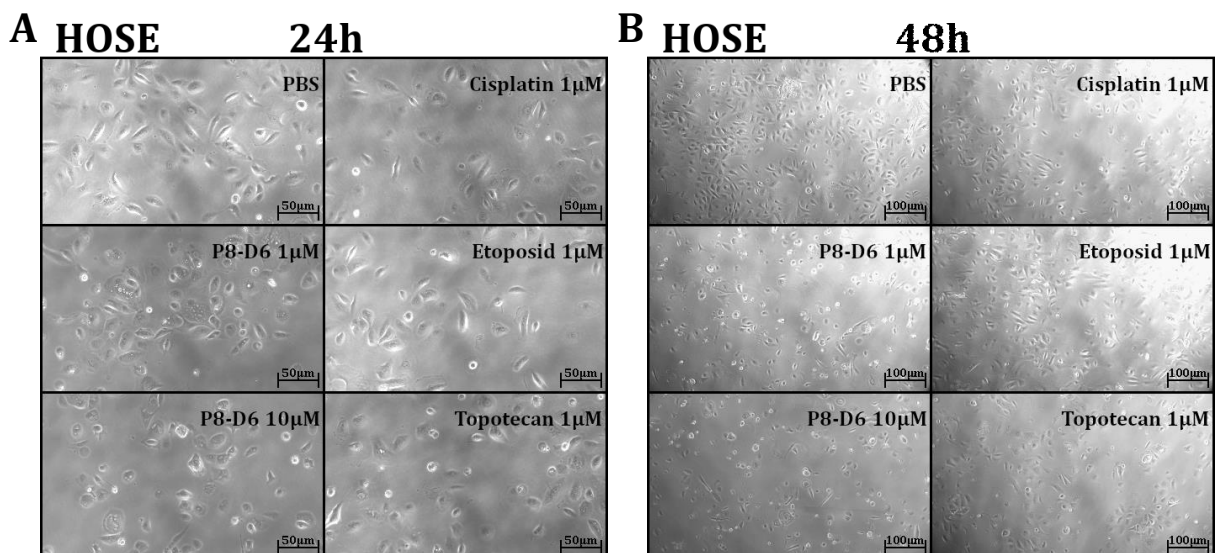
Adhärente Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen wurden nach 30 min Behandlung mit PBS und P8-D6 [10 µM, 100 µM, 500 µM] mit Aceton fixiert. Anschließend wurden sie mit **A**: DAPI oder **B, C, D, E**: CellTracker™ Deep Red Dye und DAPI angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die restlichen Aufnahmen zeigen den Vergleich zwischen der Negativkontrolle (PBS) und den P8-D6 [10 µM, 100 µM, 500 µM]-Behandlungen nach anschließender Zellkern- und Zellmembranfärbung. Dabei fällt auf, dass bereits bei einer Konzentration von 10 µM P8-D6 in allen getesteten Zelllinien ein deutliches grünes Fluoreszenzsignal in der Zellkernregion zu detektieren war (Abb.4.2B-E). Diese Erkenntnis korreliert mit der Annahme, dass P8-D6 seinen Wirkort in der Zelle erreicht und so seine komplette Wirkung entfalten kann. Zusätzlich konnte anhand der Western Blot Untersuchungen zur Findung eines Biomarkers (Abb.4.51) nachgewiesen werden, dass alle untersuchten Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen Topo I, Topo II  $\alpha$  und Topo II  $\beta$  exprimieren. Diese waren somit eine Bestätigung dafür, dass das P8-D6 Target in allen Zellen vorhanden war.

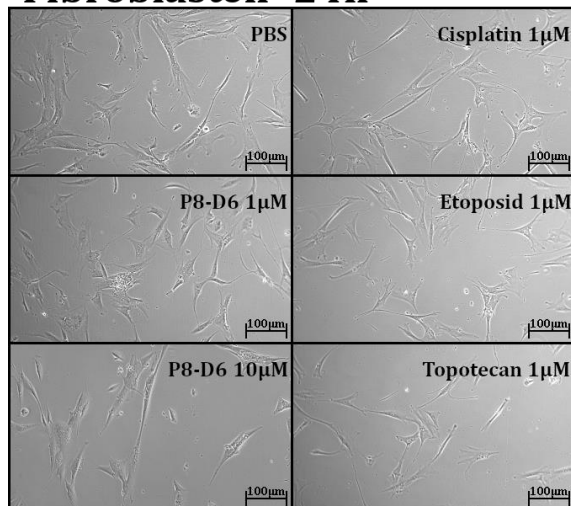
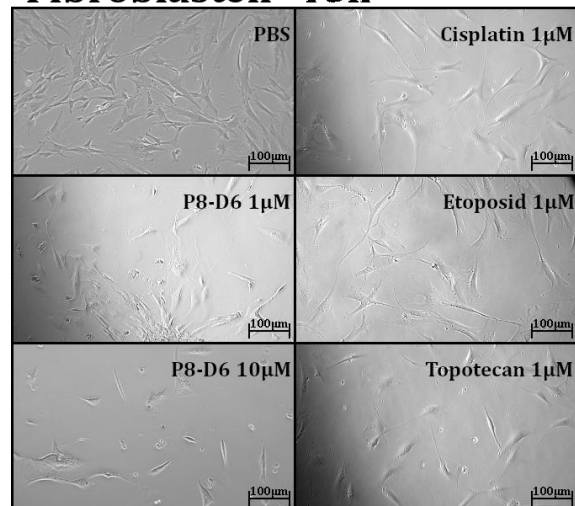
## 4.3 Abschätzung des Nebenwirkungspotentials

### 4.3.1 Effekte auf nicht-tumorassoziierte Zellen

Das Ziel der Chemotherapie ist die vollständige und andauernde Eliminierung aller malignen Tumorzellen mit möglichst geringer Beeinträchtigung der gesunden Zellen, um das Nebenwirkungspotential gering zu halten. Das Nebenwirkungspotential trägt wesentlich zum Therapieerfolg bei, da es eng mit der Compliance und der Lebensqualität vernetzt ist. Aus diesem Grund wurde P8-D6 sowohl an nicht-tumorassoziierte humane ovariale Oberflächenepithelzellen (HOSE) als auch an Fibroblasten getestet. Die mikroskopischen Aufnahmen diagnostizieren, dass die Behandlung von P8-D6 auf HOSE-Zellen sowohl einen geringen Effekt auf die Morphologie der Zellen als auch auf das Wachstumsverhalten der Zelle hat (Abb.4.3 A, B). Hierfür wurden die Konzentrationen Cisplatin [1  $\mu\text{M}$ ], Etoposid [1  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ ] und P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] für die Behandlung verwendet (Methode: Abschnitt 3.2.2). Das äquivalente Schema wurde auch für Fibroblasten gewählt. Für diese nicht-tumorassoziierten Zellen konnte ein recht ähnliches Bild generiert werden (Abb.4.3 C, D). Die Beeinträchtigung nach 24 h ist für beide Konzentrationen [1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ] mikroskopisch nicht detektierbar. Nach 48 h ist für die HOSE Zellen eine leichte Wachstumshemmung (Reduktion um  $\sim 25\%$ ) erkennbar, die aber vergleichbar mit Topotecan (Reduktion um  $\sim 20\%$ ) ist. Für die Fibroblasten ist nach 48 h eine leicht erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu den Referenzen sichtbar.

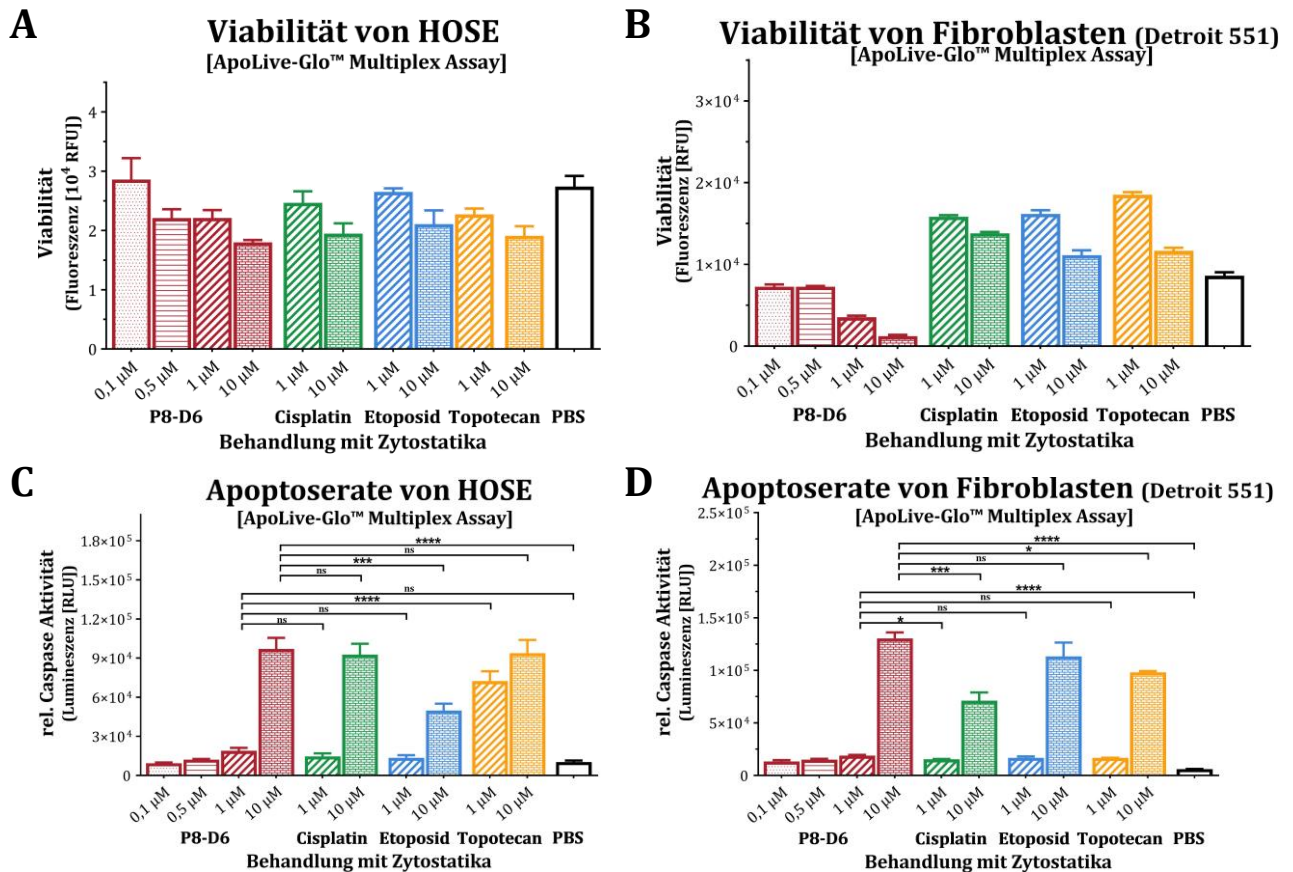




**C Fibroblasten 24h****D Fibroblasten 48h****Abb.4.3: Mikr. Aufnahmen von nicht-tumorassoziierten Zellen nach Behandlung**

Adhärente nicht-tumorassoziierte Ovarialzellen und Fibroblasten wurden nach der Aussaat für 24 h und 48 h mit P8-D6 [1 µM, 10 µM] und Cisplatin-, Etoposid-, Topotecan- [1 µM] und PBS-Kontrollen behandelt. Anschließend wurden visuell der proliferationshemmende Effekt und morphologische Veränderungen beurteilt. **A:** HOSE 24 h, **B:** HOSE 48 h, **C:** Fibroblasten 24 h, **D:** Fibroblasten 48 h

Zudem wurde die Apoptoserate nach der 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM], Cisplatin [1 µM, 10 µM], Etoposid [1 µM, 10 µM] und Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS (Negativkontrolle) ermittelt (Methode: Abschnitt 3.2.3.1). Hierbei konnte gezeigt werden, dass es in diesen Zellen kaum zu signifikanter Beeinträchtigung der Zellintegrität kommt. Die HOSE Zellen zeigen bei der Viabilitäts-Untersuchung zytostatikaübergreifend ein konstantes Signal. Fibroblasten sind bei der Testung der Viabilität durch die 10 µM P8-D6 Behandlung sichtbar beeinträchtigt (Abb.4.4 A, B). Für 1 µM und geringere Konzentrationen P8-D6 ist kein Effekt zu verzeichnen. Die relative Apoptoserate in HOSE Zellen nach Behandlung mit 1 µM P8-D6 Wirkstofflösung hatte selbst im Vergleich zur Negativkontrolle keinen signifikanten Einfluss auf die gesunden Ovarialzellen. Die höhere Dosis von 10 µM P8-D6 ist vergleichbar zu den Standardtherapeutika (Abb.4.4 C, D). Die Fibroblasten zeigen hingegen für beide Vergleichskonzentrationen [1 µM, 10 µM] eine signifikant höhere Apoptoserate gegenüber der Negativkontrolle und der Referenzen. Der IC<sub>50</sub>-Wert, bemessen an der Viabilität, konnte in dem detektierten Bereich zwischen 0,01 µM und 100 µM für HOSE Zellen nicht detektiert werden. Der IC<sub>50</sub>-Wert definiert die mittlere inhibitorische Konzentration 50 %, also die Wirkstoffkonzentration, bei der 50 % viable und 50 % tote Zellen vorliegen.



**Abb.4.4: Viabilität und Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in nicht-tumorassoziierten Zellen**

Nach 48 h Behandlung der HOSE Zellen und Fibroblasten mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Cisplatin [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Etoposid [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS wurden die Viabilität und Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (HOSE: n=2 + SD; Fibroblasten n=1 + SD one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,001)). **A:** Viabilität HOSE, **B:** Viabilität Fibroblasten, **C:** Apoptose HOSE, **D:** Apoptose Fibroblasten

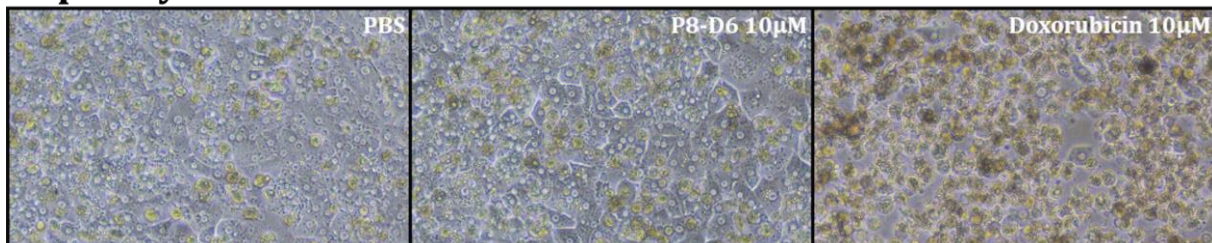
### 4.3.2 Hepatotoxizität

Hepatotoxizität ist eine intensive Schädigung von Leberzellen, die z.B. durch bestimmte Arzneimittel verursacht wird. Es handelt sich dabei um eine unerwünschte Arzneimittelwirkung, die selten, aber schwerwiegend verlaufen kann (Berger und Mertelsmann, 2017). Es ist lange bekannt, dass unterschiedliche Krebstherapeutika Veränderung der Leberfunktion und Leberschädigungen hervorrufen können. Auch für Topo II-Inhibitoren, wie Doxorubicin und dosisabhängig Etoposid konnte eine hepatotoxische Wirkung nachgewiesen werden (King und Perry, 2001). Der für diese Arbeit wesentlichste Grund für die Untersuchung der Hepatotoxizität von P8-D6 war jedoch, dass in klinischen Studien bei dualen Topo-Inhibitoren wie Intoplicin oder Pyrazoloacridin starke unerwünschte Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität auftraten, weshalb keine Zulassung erfolgte (Grem *et al.*, 1996; van Gijn *et al.*, 1999). Der Fokus dieser Untersuchungen lag im Nachweis von oxidativem Stress und der Apoptoserate nach 48 h nach der P8-D6 Behandlung. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen, der oxidativen Stressmessung mittels

Dihydroethidium (reaktive Sauerstoffspezies Marker) und der Apoptosemessung sollten Veränderung im Vergleich zu PBS oder Doxorubicin detektiert werden (Methode: Abschnitt 3.2.6).

Die mikroskopischen Aufnahmen der primären humanen Hepatozyten nach 48 h Behandlung zeigen für die PBS Gruppe einen soliden annähernd 100 % konfluenten Monolayer. Primäre Hepatozyten sind allgemein relativ stresssensibel. Leichte Beeinträchtigungen können direkt zur Abnahme der Konfluenz oder zur Produktion von Absonderungsprodukten führen (Ölander *et al.*, 2018). Beim Vergleich der 10  $\mu$ M P8-D6 behandelten Hepatozyten mit den Zellen, die mit PBS oder Doxorubicin behandelt wurden, ist wie auch bei der PBS Gruppe eine nahezu 100 %ige Konfluenz mit wenig Sekretbildung zu erkennen. Hingegen sind die Zellen, die mit 10  $\mu$ M Doxorubicin behandelt wurden, beeinträchtigt. Diese Zellen zeigen eine Abnahme der Konfluenz und deutliche Produktion von Absonderungsprodukten (Abb.4.5, detaillierte Aufzeichnung Anhang Abb. I). Diese Aufnahmen visualisieren somit die Veränderungen der Zellen nach unterschiedlicher Behandlung.

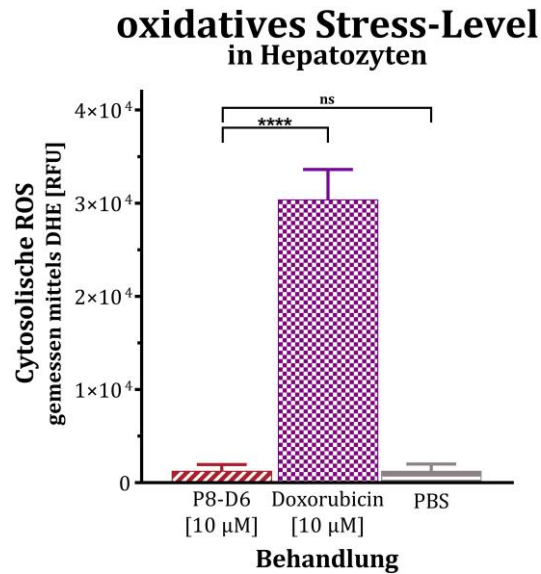
### Hepatozyten 48 h



#### Abb.4.5: Mikr. Aufnahmen von primären humanen Hepatozyten nach Behandlung

Adhärente primäre humane Hepatozyten wurden nach der Aussaat 48 h mit P8-D6 [10  $\mu$ M], Doxorubicin [10  $\mu$ M] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurde visuell begutachtet, ob die Zellen durch die Behandlung Stress ausgesetzt waren und wie sich dabei die Konfluenz verändert hat.

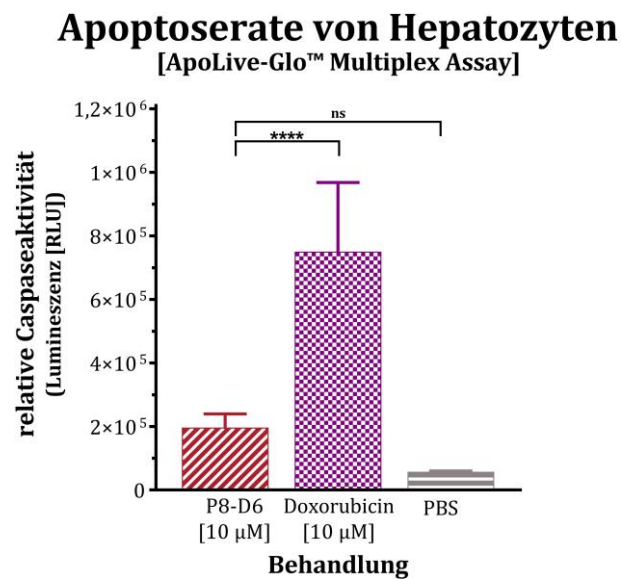
Zusätzlich zu den mikroskopischen Aufnahmen wurde das oxidative Stresspotential von P8-D6 [10  $\mu$ M], Doxorubicin [10  $\mu$ M] und PBS behandelten Zellen vermessen. Das oxidative Stressniveau von P8-D6 behandelten Zellen weist keinen signifikanten Unterschied zu den PBS behandelten Zellen auf (Abb.4.6). Im Unterschied dazu konnte bei den mit Doxorubicin behandelten Zellen ein deutliches und signifikant höheres Signal ( $p < 0,001$ ) detektiert werden. Dieses demonstriert, dass P8-D6 in humanen primären Hepatozyten keinen oxidativen Stress induziert.



**Abb.4.6: Oxidatives Stresspotential in humanen primären Hepatozyten**

Adhärente primäre humane Hepatozyten wurden nach der Aussaat 48 h mit P8-D6 [10 µM], Doxorubicin [10 µM] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurde der oxidative Stress der Zellen gemessen (+ SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\*\*\* (p < 0,001)).

Weiterhin wurde auch die induzierte Apoptoserate der primär, humanen Hepatozyten nach Behandlung bestimmt. Ähnlich zu den oxidativen Stress-Ergebnissen erzeugt P8-D6 kein signifikant höheres Apoptose-Signal im Vergleich zu PBS (Abb.4.7). Eine Doxorubicin-Behandlung bewirkt hingegen in Hepatozyten eine signifikant höhere Apoptoseinduktion im Vergleich zu P8-D6. Somit beeinträchtigt P8-D6 die Zellintegrität von humanen nicht-tumor-assoziierten Hepatozyten nur geringfügig und zeigt damit *in vitro* keine hepatotoxischen Effekte.



**Abb.4.7: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in humanen Hepatozyten**

Adhärente primäre humane Hepatozyten wurden nach der Aussaat 48 h mit P8-D6 [10 µM], Doxorubicin [10 µM] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurde die Viabilität und Apoptoserate bestimmt (+ SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\*\*\* (p < 0,001)).

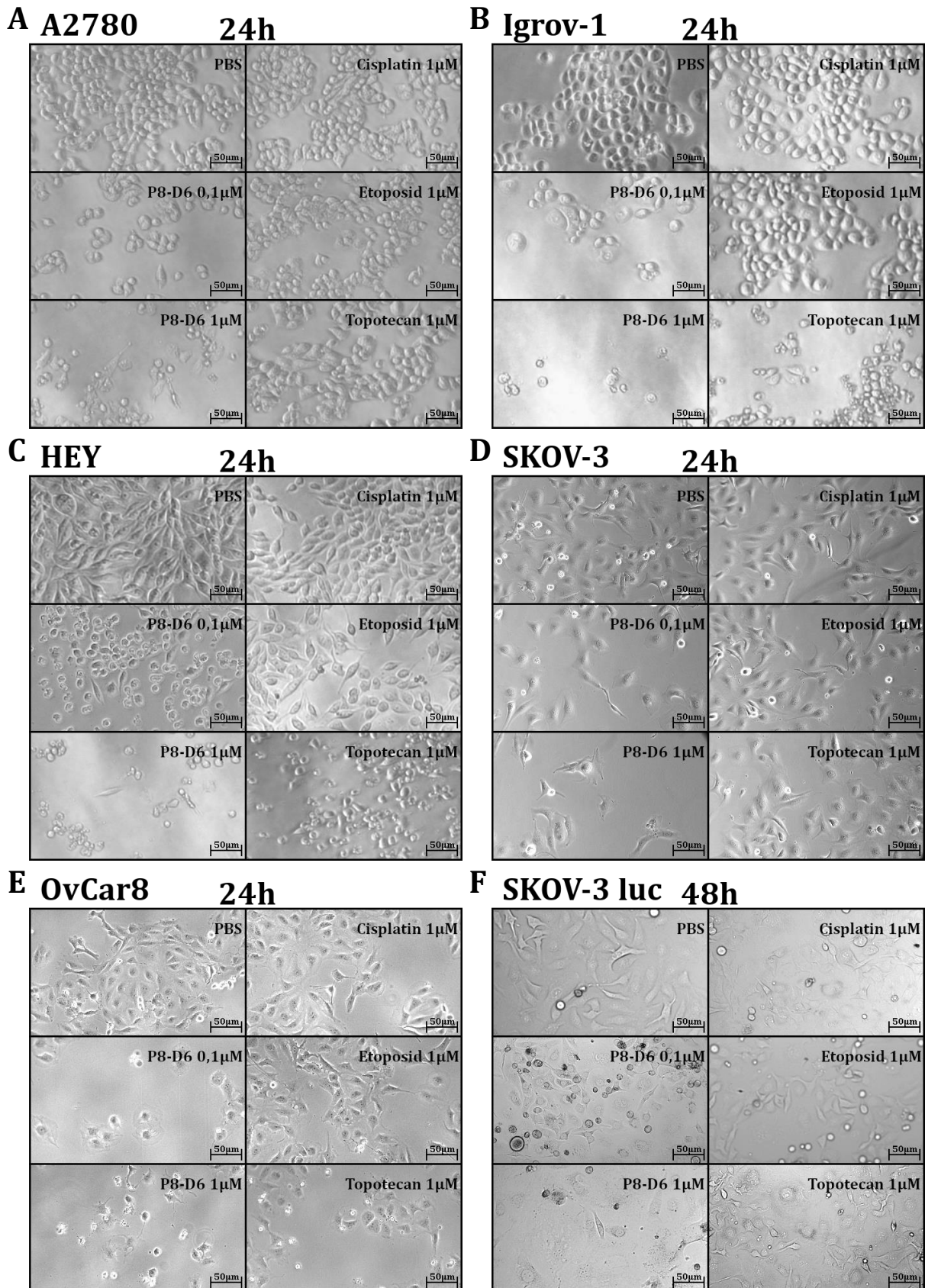
## 4.4 Zielgewebe: gynäkologische Tumore

Zur weiteren Charakterisierung des zytotoxischen Potentials des Wirkstoffs P8-D6 wurden weitere *in vitro*-Untersuchungen an unterschiedlichen Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien und im translationalen Ansatz an *ex vivo*-Primärkulturen durchgeführt. Zur Ermittlung unterschiedlicher Parameter des antitumoralen Potentials der getesteten Vergleichszytostatika und P8-D6 wurden die in Abschnitt 3.2.2 und Abschnitt 3.2.3 beschriebenen Methoden verwendet. Die für diese Untersuchungen verwendeten Zellen wurden in Abschnitt 3.2.1 im Detail vorgestellt.

### 4.4.1 2D-Kultur

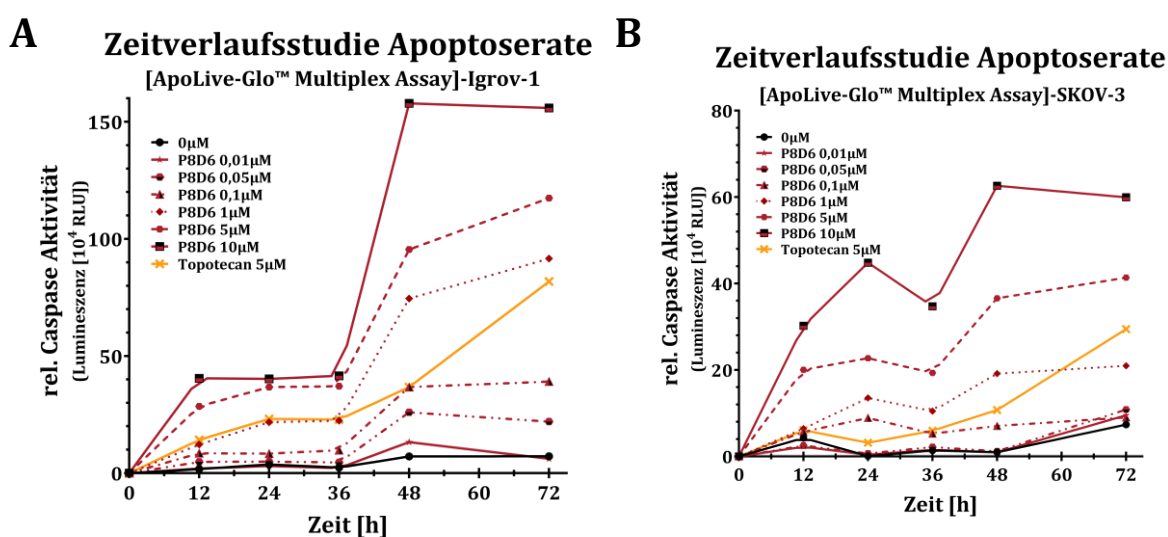
#### 4.4.1.1 Ovarialkarzinom-Zelllinien

Um den zytotoxischen Einfluss und die Sensibilität von P8-D6 auf die Ovarialkarzinomzellen zu untersuchen, wurden die verwendeten Zellen A2780, Igrov-1, HEY, SKOV-3, SKOV-3 luc und OvCar8 nach 24 h und 48 h Behandlung mit PBS, P8-D6, Cisplatin, Etoposid und Topotecan mikroskopisch begutachtet. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen kann der proliferationshemmende Effekt dieser Zytostatika im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS) abgeschätzt werden (Abb.4.8). Dabei wurden morphologische Veränderungen sowie Unterschiede in der Konfluenz zur Beurteilung herangezogen. In allen Zelllinien konnte in der PBS-Kontrolle ein relativ (~90 %) konfluenten Monolayer registriert werden. Die Cisplatin- und Etoposid-Kontrolle zeigen eine Konfluenz von etwa 60 %-70 %. Der Effekt von Topotecan auf diese Zelllinien war unterschiedlich. In A2780-SKOV-3 und SKOV-3 luc Zellen lag die Konfluenz nach Behandlung bei etwa 60 %, hingegen betrug die Konfluenz in Igrov-1-, HEY- und OvCar8-Zellen zwischen 30 %-40 %. Im Vergleich dazu betrug die Konfluenz der Proben, die mit 1  $\mu$ M P8-D6 behandelt wurden, < 20 % und es waren vermehrt kugelförmige, tote Zellen zu beobachten. Auch eine Konzentration von 0,1  $\mu$ M P8-D6 bewirkte einen solchen proliferationshemmenden Effekt mit einer Konfluenz von ~20 % in Igrov-1, OvCar8, SKOV-3, HEY und A2780 Zellen, jedoch eine Konfluenz von ~65 % in SKOV-3 luc Zellen. Für die 1  $\mu$ M P8-D6 behandelten Zellen konnte eine deutliche Reduktion der adhärennten Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. Visuell ist die Konfluenz von 0,1  $\mu$ M P8-D6 gleich oder geringer als die der 1  $\mu$ M Referenz-Kontrollen. Daran lässt sich eine um den Faktor 10 höhere Effektivität von P8-D6 auf Tumorzellen erahnen.



**Abb.4.8: Mikr. Aufnahmen von Ovarialkarzinomzelllinien nach Behandlung**  
 Adhärenzte Ovarialkarzinomzellen wurden nach der Aussaat für 24 h bzw. 48 h mit P8-D6 [0,1 µM, 1 µM], Cisplatin-, Etoposid-, Topotecan- [1 µM] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurden visuell das Wachstumsverhalten und die Zellmorphologie beurteilt. **A:** A2780, **B:** Igrov-1, **C:** HEY, **D:** SKOV-3, **E:** OvCar8, **F:** SKOV-3 luc

Wichtige Merkmale für die Effektivität eines Zytostatikums sind die Viabilität bzw. Zytotoxizität und die Induktion der Apoptose. Je mehr programmierter Zelltod in Tumorzellen induziert wird, umso erfolgreicher ist die Krebsbehandlung mit diesem Wirkstoff. Die Wirkung ist dabei von mehreren Faktoren abhängig. Sowohl die Inkubationszeit als auch die Behandlungskonzentration sind dabei entscheidend. Zur Festlegung der optimalen Behandlungszeit von P8-D6 in Ovarialkarzinomzellen wurde eine Zeitverlaufsstudie zur Apoptoseinduktion durchgeführt. Hierfür wurden die ausgesäten Igrov-1 und SKOV-3 Zellen für 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h mit P8-D6 [0,01  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M], PBS oder Topotecan [5  $\mu$ M] behandelt. Nach der jeweiligen Behandlungsdauer wurden eine Viabilität- und Apoptosemessung nach der in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Methode durchgeführt und die Zellen hinsichtlich ihrer apoptotischen Population verglichen. Anhand der Kurvenverläufe in Abb.4.9 zeigte sich, dass sich für die P8-D6 Behandlung nach 48 h ein Plateau einstellt. Der Behandlungserfolg von 48 h besaß im Vergleich zu 36 h einen deutlichen Mehrnutzen, jedoch konnte zwischen 48 h und 72 h kaum ein weiterer Anstieg der Apoptose detektiert werden. Aus diesem Grund wurde für die weitere *in vitro*-Testung eine Behandlungsdauer von 48 h gewählt.

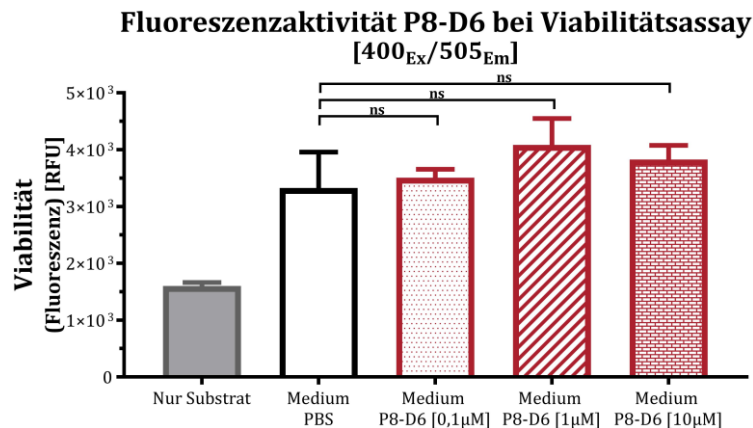


**Abb.4.9: Zeitverlaufs-Behandlungsstudie von P8-D6 in Ovarialkarzinomzellen**

Ovarialkarzinomzellen wurden ausgesät und anschließend für 12 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h mit P8-D6 [0,01  $\mu$ M, 0,05  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], PBS oder Topotecan [5  $\mu$ M] behandelt. Die Vermessung der Viabilität erfolgte über Fluoreszenz- und der Caspaseaktivität über Lumineszenzsignale mit dem ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay (n = 3, MW). **A:** Igrov-1, **B:** SKOV-3:

Außerdem wurde überprüft, ob die Autofluoreszenz von P8-D6 einen Einfluss auf die Viabilitätsmessung mittels Fluoreszenz hatte. Die Abb.4.10 zeigt deutlich, dass sich bei der gemessenen Wellenlänge von 400<sub>Ex</sub>/505<sub>Em</sub> keine detektierbarer Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen PBS im Medium und P8-D6 im Medium ergab. Somit eignet sich die in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebene Methode zur Messung der Viabilität von P8-D6

behandelten Zellen. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Messung der Viabilität mittels Fluoreszenz und der Caspaseaktivität mittels Lumineszenz im selben Versuchsansatz.

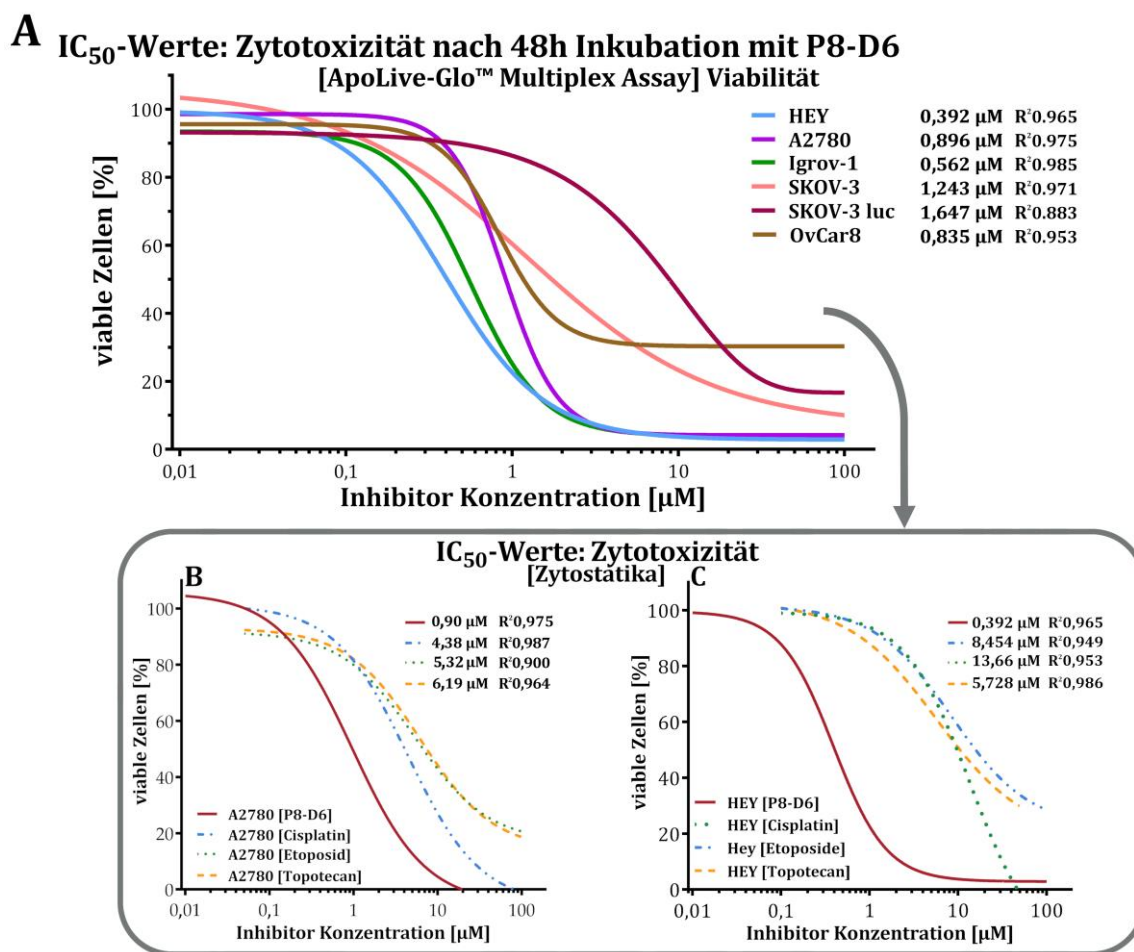


**Abb.4.10: Fluoreszenzaktivität von P8-D6 im Viabilitäts-Assay**

Medium wurde mit PBS oder P8-D6 [0,1 µM, 1 µM, 10 µM] gemischt und dann mit Viabilitätslösung versetzt (n = 3, MW +SD one-way ANOVA, \* (p <0,05), ns: nicht signifikant). Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Proben vermessen und Unterschiede detektiert.

Die Erfassung der Viabilität mittels ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay (Abschnitt 3.2.3.1) nach 48 h Behandlung mit P8-D6 wurde für sechs Ovarialkarzinomzelllinien (Charakterisierung der Zelllinien Abschnitt 3.2.1) durchgeführt. Mit Hilfe der Viabilitätsdaten konnte dann eine IC<sub>50</sub>-Kurve für jede dieser Zelllinien erstellt werden. Der IC<sub>50</sub>-Wert ist die mittlere inhibitorische Konzentration 50 %. Je geringer dieser Wert, umso effektiver ist der Wirkstoff. Für den Wirkstoff P8-D6 zeigten HEY Zellen hierbei den geringsten IC<sub>50</sub>-Wert mit 392 nM, Igrov-1 Zellen besitzen einen IC<sub>50</sub>-Wert von 562 nM und den höchsten Wert für P8-D6 erzielten die SKOV-3 luc Zellen mit 1,647 µM (Abb.4.11A). Im Vergleich dazu wurden zusätzlich die IC<sub>50</sub>-Werte für Cisplatin, Topotecan und Etoposid in HEY und A2780 ermittelt. In HEY Zellen zeigte Topotecan hierbei den geringsten IC<sub>50</sub>-Wert der getesteten Referenzsubstanzen mit 5,728 µM (Abb.4.11B). In A2780 Zellen besaß Cisplatin die höchste Referenzsensitivität mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 4,38 µM. Topotecan ist als potenter Wirkstoff in der Therapie des Ovarialkarzinoms bereits gut etabliert. Im Vergleich hierzu ist P8-D6 dennoch deutlich (~ 7-fach; p-Wert <0.001) potenter in diesen Zellkulturversuchen.



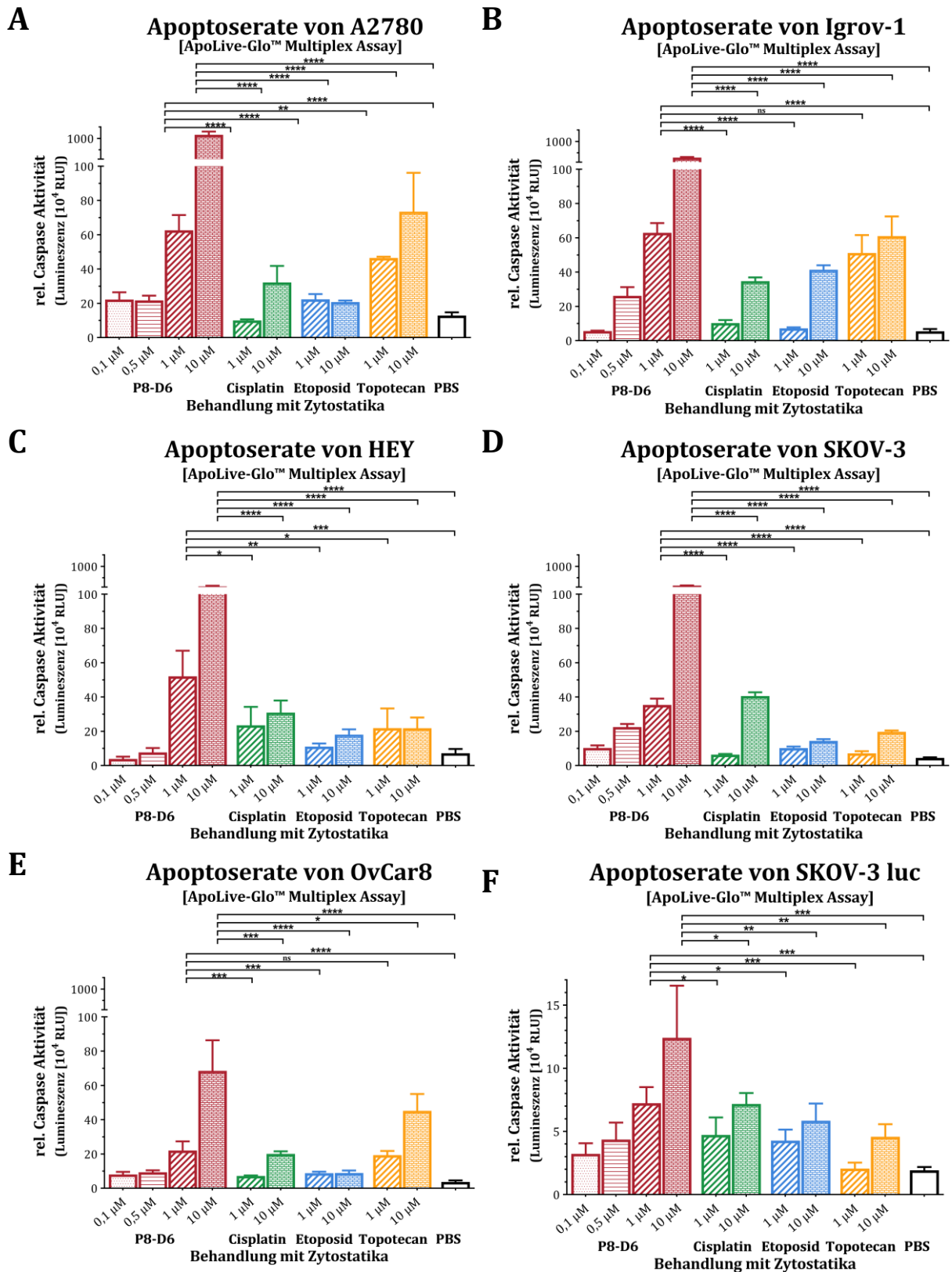


**Abb.4.11: IC<sub>50</sub>-Kurven von Ovarialkarzinomzelllinien nach Behandlung**

Proliferationshemmender Effekt von P8-D6, Cisplatin, Topotecan und Etoposid in unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zytostatika behandelt und die Viabilität (400<sub>Ex</sub>/505<sub>Em</sub>) nach 48 h gemessen. **A:** IC<sub>50</sub> Kurve der unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien, die mit P8-D6 behandelt wurden. **B:** Vergleich der Proliferationshemmung der Referenzsubstanzen mit P8-D6 für A2780. **C:** Vergleich der Proliferationshemmung der Referenzsubstanzen mit P8-D6 für HEY.

Somit zeigt P8-D6 einen verstärkt proliferationshemmenden Effekt in Ovarialkarzinomzelllinien im Vergleich zu momentan in der Klinik verwendeten Standardtherapeutika.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit eines neuen Zytostatikums müssen unterschiedliche Messmethoden der Apoptoseinduktion durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden mit dem ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay (Viabilität u. Apoptose) und der Annexin V-PE/7-AAD-Durchflusszytometrie Analyse zwei voneinander unabhängige Apoptose-Assays etabliert. Die Methode des ApoLive-Glo™ Multiplex-Assay wurde im Detail in Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben. Zur Durchführung wurden die Ovarialkarzinomzelllinien A2780, Igrov-1, HEY, SKOV-3, OvCar8 und SKOV-3 luc für 48 h mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM], Cisplatin [1 µM, 10 µM], Etoposid [1 µM, 10 µM] und Topotecan [1 µM, 10 µM] sowie mit PBS behandelt (Abb.4.12).

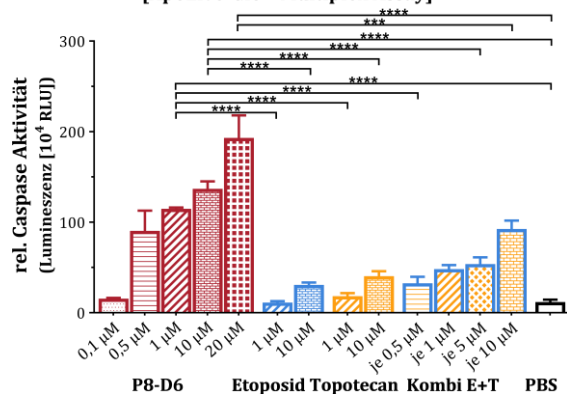


**Abb.4.12: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in Ovarialkarzinomzelllinien**

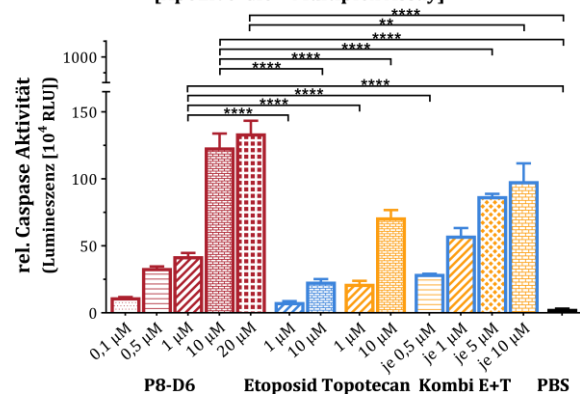
Nach 48 h Behandlung unterschiedlicher Ovarialkarzinomzelllinien mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM] Cisplatin [1 µM, 10 µM], Etoposid [1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,001)). A: A2780, B: Igrov-1, C: HEY, D: SKOV-3, E: OvCar8, F: SKOV-3 luc

Zur Datenbewertung und Vergleichbarkeit wurden one-way ANOVA-Testungen zur Ermittlung der Signifikanz durchgeführt. Dabei zeigte sich für die 10  $\mu\text{M}$  Behandlung, dass P8-D6 im Vergleich zu PBS, Cisplatin, Etoposid und Topotecan in allen getesteten Ovarialkarzinomzelllinien signifikant höhere Apoptoseraten bewirkt. Für die 1  $\mu\text{M}$  Behandlung zeigten sich für P8-D6 auch signifikant höhere Apoptoseraten im Vergleich zu Cisplatin und Etoposid sowie in den meisten Zelllinien für Topotecan. Ausnahmen sind hier Igrov-1 und OvCar8 Zellen, wo nur geringe Unterschiede detektiert werden konnten. Allgemein begründet eine erhöhte Apoptoserate einen vermehrten Zelltod der getesteten Population. Da die Frage bestand, ob die Hemmung beider Topoisomerasen (Topo I und Topo II) die deutlich erhöhte Apoptoserate begründen könnte, und somit eine Kombination bereits etablierter Topo-Inhibitoren eine Therapielösung bedeuten könnten, wurde eine Testung durchgeführt, bei der die Wirkung von P8-D6 im Vergleich zu den Mono-Topo-Inhibitoren Topotecan (Topo I) und Etoposid (Topo II) und deren Kombination untersucht wurde. P8-D6 behandelte Zellen zeigen dabei im Vergleich zur Topotecan-Etoposid-Kombination auch eine signifikant höhere Apoptoserate. Somit liegt die Effektivität von P8-D6 viel mehr in der erhöhten Wirkstärke als einfach nur in der Hemmung beider Topoisomerasen (Abb.4.13).

### A Apoptoserate von A2780 Kombi E+T [ApoLive-Glo™ Multiplex Assay]



### B Apoptoserate von Igrov-1 Kombi E+T [ApoLive-Glo™ Multiplex Assay]

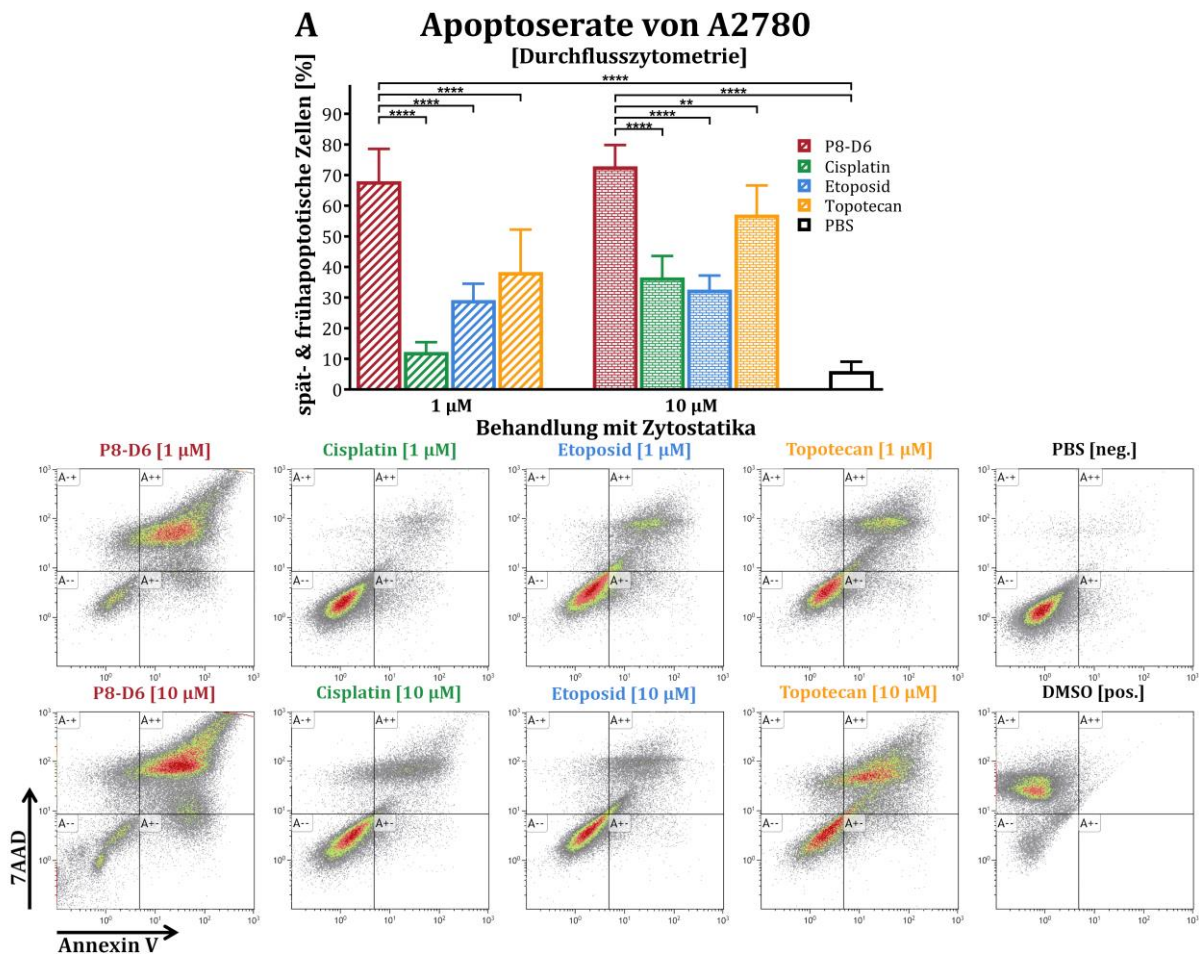


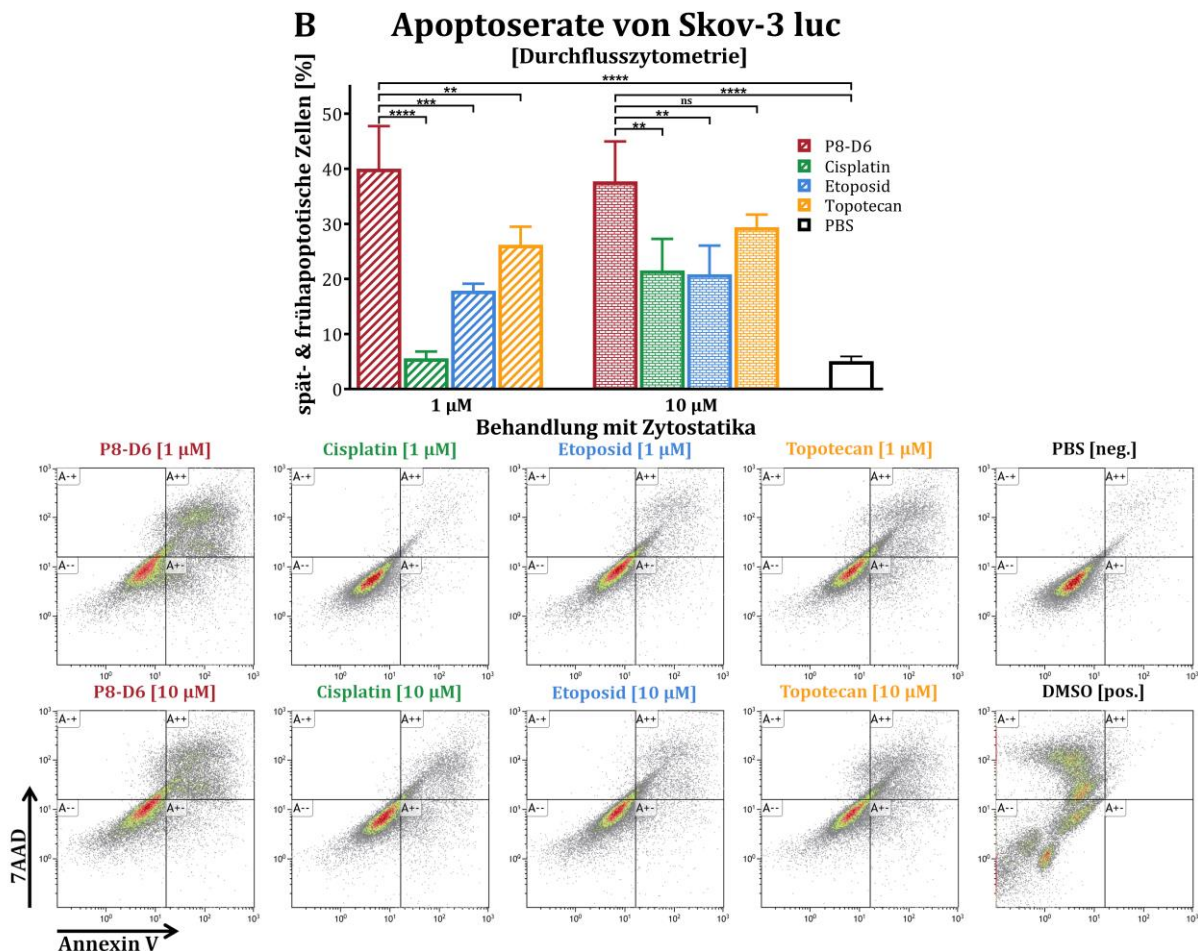
**Abb.4.13: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) von P8-D6 versus Etoposid-Topotecan Kombination**  
Nach 48 h Behandlung von A2780 und Igrov-1 (Ovarialkarzinomzellen) mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] Cisplatin [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Kombination von Cisplatin und Topotecan [0,5  $\mu\text{M}$  + 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  + 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  + 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  + 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD one-way ANOVA, \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,001$ )). A: A2780, B: Igrov-1

Darüber hinaus wurde eine weitere Methode etabliert, die mittels Durchflusszytometrie den Status der Apoptose nachweisen kann. Dies diente der Verifizierung der bereits mit Emissionsspektroskopie erhobenen Daten. Die Zellen wurden dafür 48 h mit P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Cisplatin [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Etoposid [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ]

sowie PBS behandelt. Anschließend wurden die Zellen abgelöst und zur Detektion für diese durchflusszytometrische Analyse mit dem Apoptose-Fluoreszenzfarbstoff Annexin V-PE und dem Avital-Farbstoff angefärbt (Abschnitt 3.2.3.2).

In den Balkendiagrammen der Abb.4.14 sind die prozentualen Anteile an apoptotischen Zellen nach Behandlung mit Zytostatika aufgeführt. Erfolgt die Inkubation mit P8-D6 in A2780 Zellen, so wurden in allen Fällen signifikant ( $\geq p$ -Wert  $< 0,01$ ) mehr früh- und spätapoptotische Zellen im Vergleich zu allen anderen Kontrollen detektiert. In SKOV-3 luc Zellen zeigen alle Vergleiche außer der 10  $\mu$ M Topotecan diesen Trend. Repräsentativ sind in Abb.4.14 zusätzlich die Dotplots einer Messung aufgeführt. Mittels dieser Darstellung kann zwischen später (A++) und früher (A+-) Phase der Apoptose in den Zellen unterschieden werden. Dabei fällt bei den mit 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M P8-D6, sowie 10  $\mu$ M Topotecan behandelten Zellen der Anteil an spätapoptotischen Zellen am größten aus. P8-D6 zeigt sich in diesem Vergleich somit als der stärkste und schnellste Induktor der späten Apoptose in Tumorzellen.





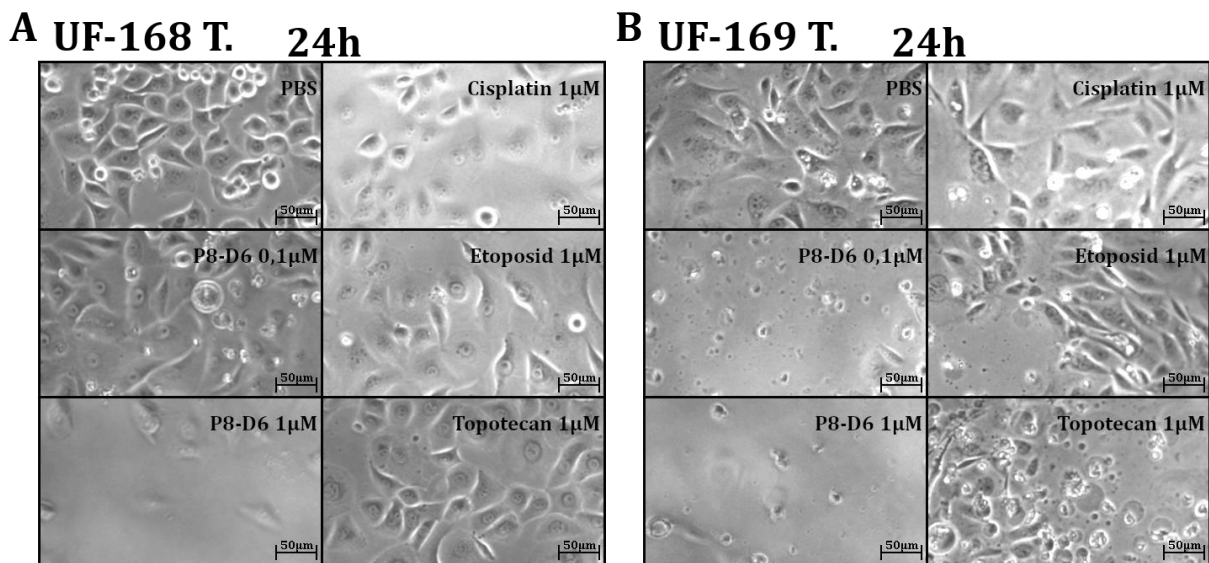
#### Abb.4.14: FACS-Analyse nach Annexin V-PE/7-AAD Färbung der Ovarialkarzinomzelllinien

Die Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und SKOV-3 luc wurden für 48 h mit P8-D6 [1 µM, 10 µM], Cisplatin [1 µM, 10 µM], Etoposid [1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS behandelt. Anschließend erfolgte eine Anfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD zur Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen nach Behandlung (n=3 + SD one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,0001)). A--: viable Zellen, A+- frühe Apoptose, A++ späte Apoptose, A+- Nekrose; A: A2780, B: SKOV-3 luc.

#### 4.4.1.2 Translatiionaler Ansatz mit *ex vivo*-Ovarialkarzinom-Patientenzellen

Das Wachstumsverhalten des Tumors und das Ansprechen auf Therapeutika werden durch eine starke Variabilität/Individualität geprägt. Darüberhinaus können sich permanente Karzinomzelllinien durch selektive Teilung verändern. Um eine homogene Aussage zum Ansprechen von P8-D6 auf Patientenmaterial zu generieren, wurde die Apoptoserate verschiedener Zytostatika analog zu den Untersuchungen mit den Zelllinien an *ex vivo*-Patientenzellen durchgeführt. Das sogenannte *ex vivo*-Drug-Response-Profilieren in Patientenproben kann eine wirksame Identifizierung der Empfindlichkeit und des Resistenzstatus unterstützen, beschränkt sich jedoch vorerst auf die Forschung und besitzt einen begrenzten klinischen Nutzen. Die Ergebnisse dieser Testungen mit Patientenmaterial zeigt ein ähnliches Bild wie auch schon die Untersuchungen an Ovarialkarzinomzelllinien (Abb.4.15). Bei den getesteten Patientenzellen wird zwischen aus

Tumorgewebe (T.) oder Aszites (As.) isolierten Tumorzellen unterschieden. Die mit PBS behandelten Tumorzellen bildeten bereits nach 24 h einen Monolayer mit einer Konfluenz nahe 90 %. Die Cisplatin, Etoposid, Topotecan [1  $\mu\text{M}$ ] und P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ ] behandelten UF-268 T. Zellen wiesen nach 24 h noch eine Konfluenz von etwa 70 % auf. Im Vergleich dazu betrug die Konfluenz für die mit P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ ] behandelte Probe <30 %. Die UF-169 T. reagierten sogar noch sensibler auf die P8-D6 Behandlung. Für diese Zellen konnte ein deutlicher Effekt für beide P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ] Konzentrationen detektiert werden. Jedoch zeigten auch die mit Topotecan behandelten Zellen ein verstärktes Zell-todverhalten.

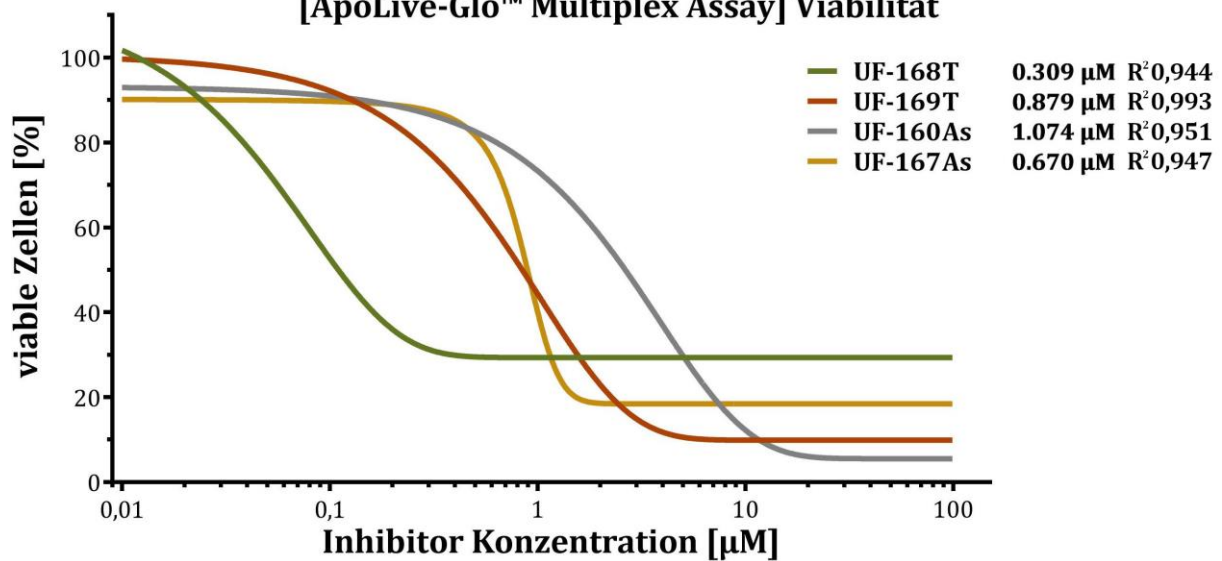


**Abb.4.15: Mikr. Aufnahmen von *ex vivo*-Ovarialkarzinom-Patientenzellen nach Behandlung**

Adhärente *ex vivo*-Ovarialkarzinom-Patientenzellen wurden nach der Aussaat für 24 h mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ] und Cisplatin-, Etoposid-, Topotecan- [1  $\mu\text{M}$ ] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurde visuell das Wachstum behandelt und der proliferationshemmende Effekt beurteilt. **A:** UF-168 T., **B:** UF-169 T.,

Zur Vergleichbarkeit wurde auch hier der  $\text{IC}_{50}$ -Wert anhand der Viabilitätsdaten bestimmt. Diese  $\text{IC}_{50}$ -Werte sind ähnlich zu den Ovarialkarzinomzelllinien mit einem Bereich zwischen 0,3  $\mu\text{M}$  und 1,08  $\mu\text{M}$  und liegen leicht höher als die beim NCI gemessenen Daten (Abb.4.16). Trotzdem ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit P8-D6 ovarialkarzinomübergreifend einen deutlichen Effekt mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten im höheren nanomolaren Bereich liefert.

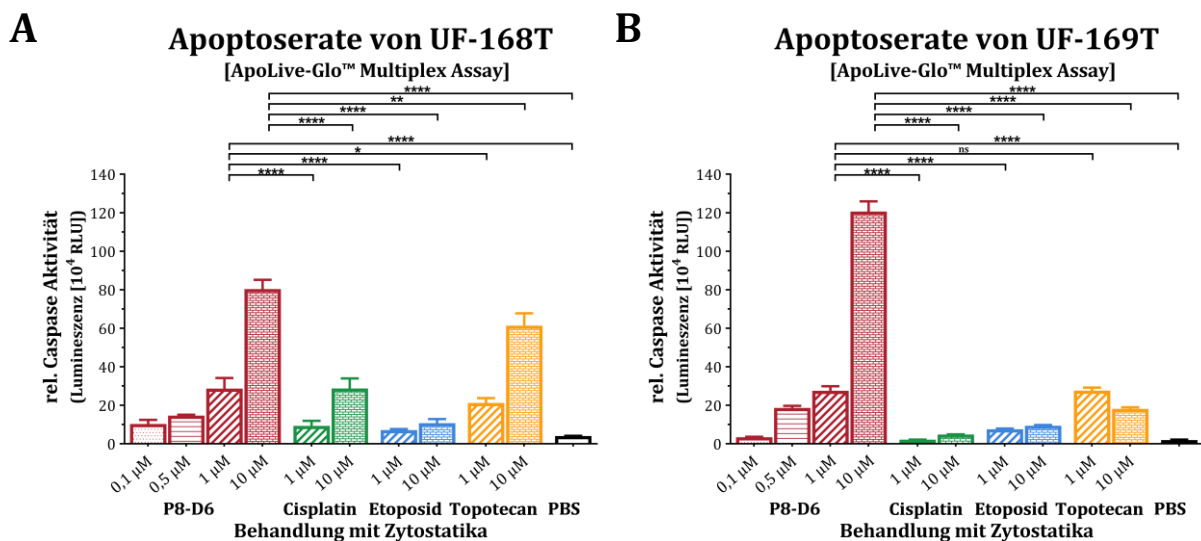
## IC<sub>50</sub>-Werte: Zytotoxizität nach 48h Inkubation mit P8-D6 [ApoLive-Glo™ Multiplex Assay] Viabilität

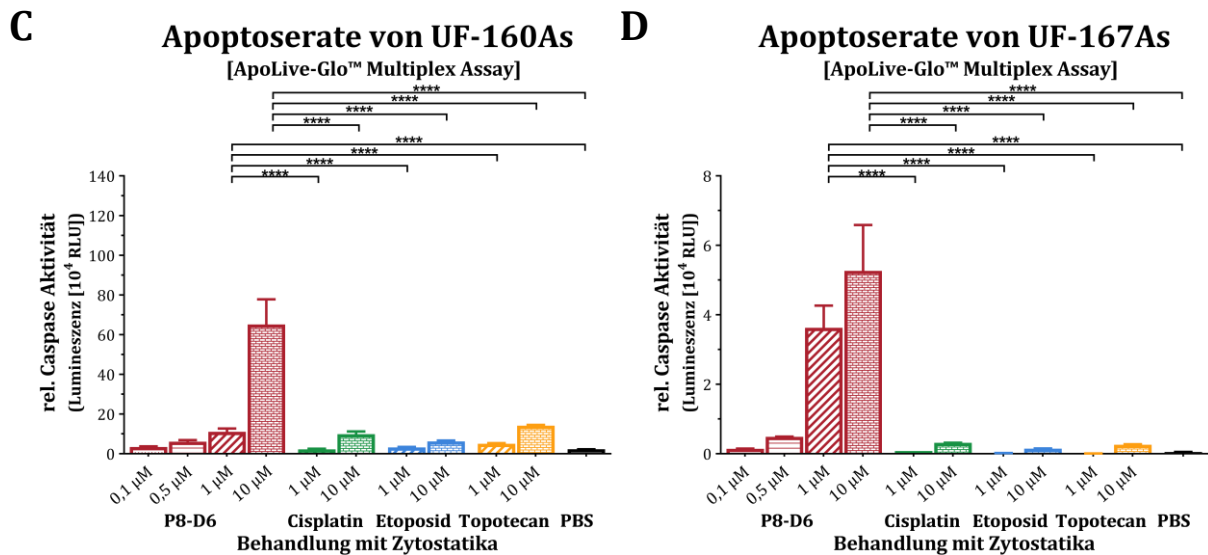


**Abb.4.16 IC<sub>50</sub>-Kurven von *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen nach Behandlung**

Proliferationshemmender Effekt von P8-D6 in unterschiedlichen *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen (Tumorzellen aus Tumor und Ascites). Die Zellen wurden mittels P8-D6 Konzentrationsreihe behandelt und die Viabilität ( $400_{Ex}/505_{Em}$ ) nach 48 h gemessen.

Die Kernaussage zur Wirksamkeit an Tumorzellen liefert die Messung der Apoptoserate in den verschiedenen Zellproben. Hierfür wurden die *ex vivo* Patientenzellen mit P8-D6, sowie Cisplatin, Etoposid, Topotecan und PBS behandelt. Auch die Ergebnisse für diese Testung zeigen eine signifikant höhere Apoptoserate in P8-D6 behandelten Zellen im Vergleich zu den Referenzsubstanzen (Abb.4.17). Dabei fällt auf, dass die 10 µM P8-D6 Behandlung in UF-168T, UF-169T und UF-160As im Vergleich zu kleineren Konzentrationen derselben Substanz nochmal einen deutlichen Anstieg zeigt. Bei der UF-167As Probe ist dieser Sprung schon bei 1 µM zu erkennen.

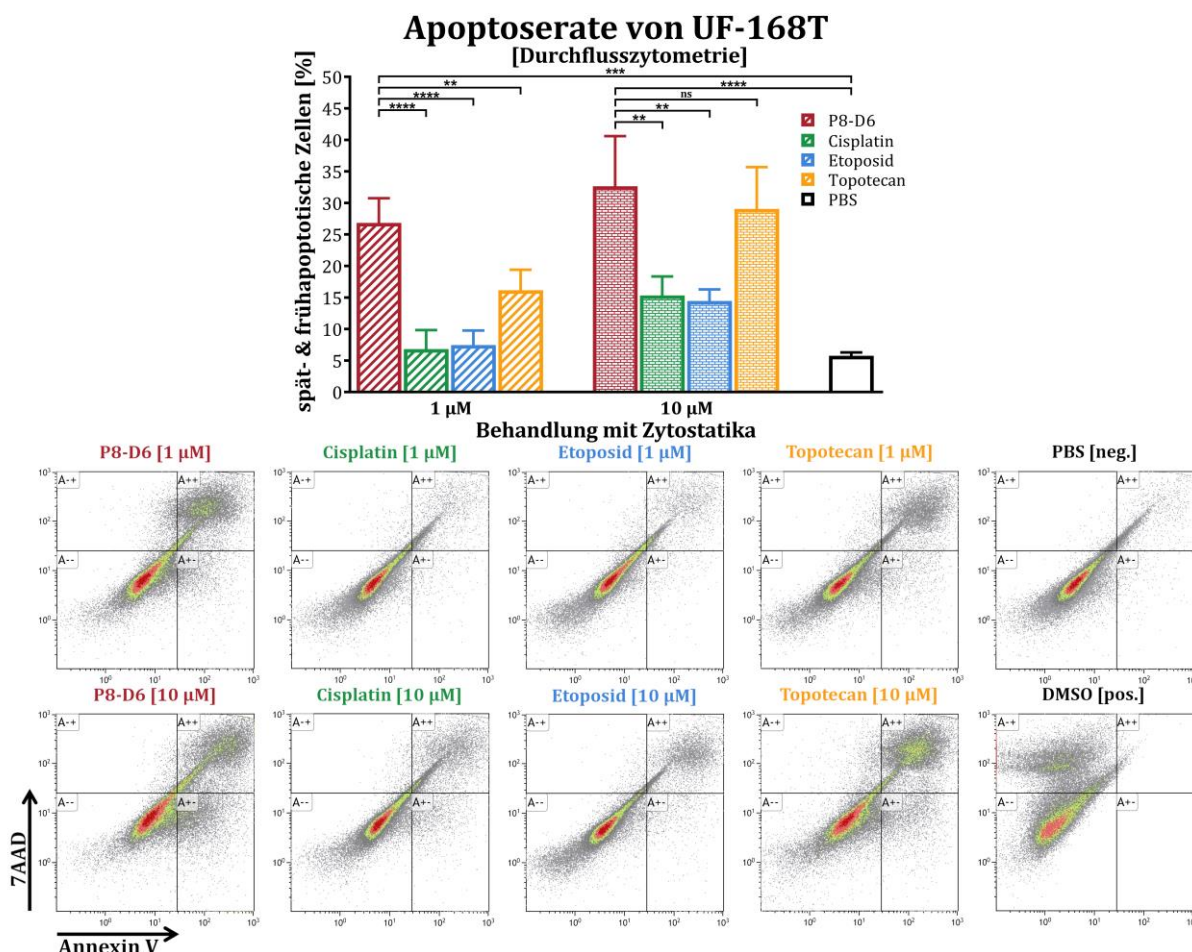




**Abb.4.17: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen**  
Nach 48 h Behandlung unterschiedlicher *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] Cisplatin [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Etoposid [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD, one-way ANOVA, \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,001$ )). **A:** UF-168T, **B:** UF-169T, **C:** UF-160As, **D:** UF-167As

Zur Verifizierung der Ergebnisse der Apoptoserate mittels Emissionsspektroskopie wurde die *ex vivo* Patientenprobe UF-168T auch mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die erhaltenen Dot-Plots zeigen, dass die Patientenprobe im Vergleich zu den Zelllinien etwas resistenter auf die Zytostatika reagiert (Abb.4.18). Nichtsdestotrotz lässt sich eine größere apoptotische Zellpopulation in P8-D6 [1  $\mu$ M, und 10  $\mu$ M] behandelten Proben im Vergleich zu Cisplatin, Etoposid und Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] bestimmen. Die one-way ANOVA Analyse zeigt signifikante Unterschiede zwischen P8-D6 [1  $\mu$ M] und Cisplatin, Etoposid, Topotecan [1  $\mu$ M], PBS, sowie P8-D6 [10  $\mu$ M] und Cisplatin, Etoposid [10  $\mu$ M] und PBS. P8-D6 [10  $\mu$ M] und Topotecan [10  $\mu$ M] zeigen Unterschiede, welche in dieser Testung aber nicht signifikant sind.





**Abb.4.18: FACS-Analyse nach Annexin V-PE/7-AAD Färbung der *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen**

Die *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen UF-168T wurden für 48 h mit P8-D6 [1 µM, 10 µM], Cisplatin [1 µM, 10 µM], Etoposid [1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS behandelt. Anschließend erfolgte eine Anfärbung mit Annexin V-PE und 7-AAD zur Bestimmung des Anteils an apoptotischer Zellen nach Behandlung (n=3 + SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,001)). A--: viable Zellen, A+- frühe Apoptose, A++ späte Apoptose, A++ Nekrose. UF168T

Die Ergebnisse an Ovarialkarzinomzellen zeigen probenübergreifend ein hohes Potential von P8-D6 als Zytostatikum für diese Entität. Dabei ist auch zu vermerken, dass Topotecan unter den Referenzsubstanzen am sensibelsten auf ein Ovarialkarzinom reagiert, jedoch nicht an die Wirkung von P8-D6 herankommt.

#### 4.4.1.3 Mammakarzinom-Zelllinien

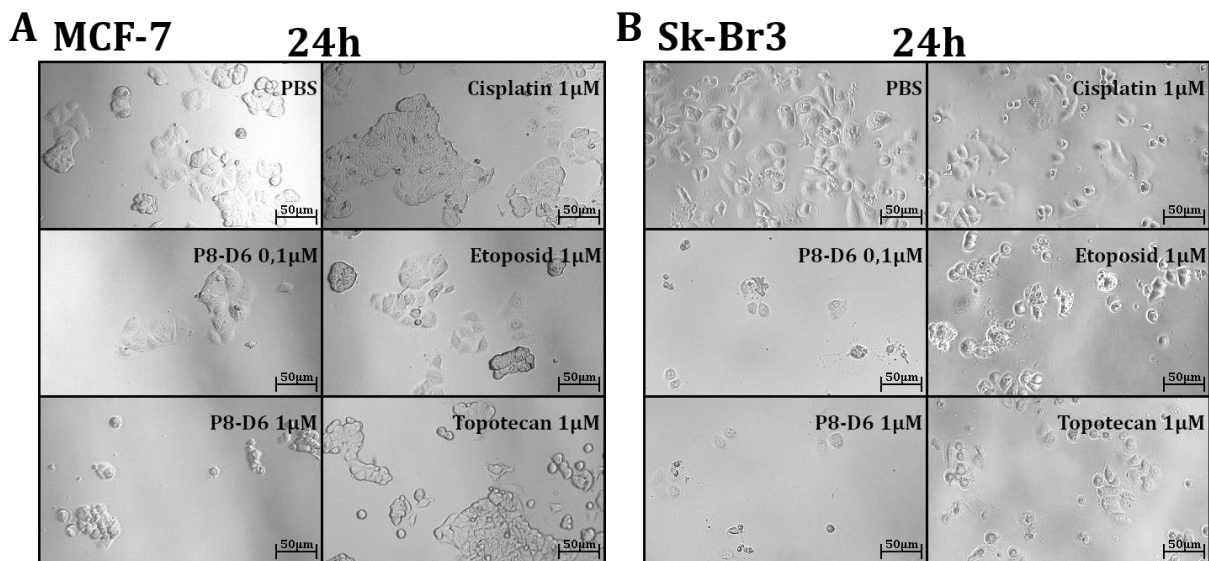
Neben dem aggressiven Ovarialkarzinom besitzt das Mammakarzinom eine enorme Anzahl an Neuerkrankungen und daraus resultierend eine hohe Anzahl an Todesfällen. Da P8-D6 beim Ovarialkarzinom zelltypübergreifend eine hohe Wirksamkeit aufgewiesen hat, sollte nun nachgewiesen werden, ob P8-D6 auch an anderen Entitäten, wie dem Mammakarzinom mit den oben beschriebenen Testmethoden (Abschnitt 3.1) eine gute Wirksamkeit liefert.

Brustkrebs ist relativ heterogen im Auftreten unterschiedlicher Zelleigenschaften. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an drei Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, MDA-MB 231, Sk-Br 3) mit unterschiedlichen Zelleigenschaften durchgeführt (Tab. 4.2). Charakteristisch für die triple negativen Tumore ist, dass sowohl Östrogen- als auch Progesteron- sowie HER2/neu-Rezeptoren fehlen. Dies macht die Behandlung dieser eher aggressiven Tumorart sehr schwierig, weil viele bisher zugelassene, zielgerichtete Therapien nicht ansprechen.

**Tab. 4.2: Zelleigenschaften Mammakarzinom**  
(Mota *et al.*, 2017)

	Östrogenrezeptor	Progesteronrezeptor	HER2/neu-Rezeptor
MCF-7	+	+	-
MDA-MB 231	-	-	-
Sk-Br 3	+	+	+

Bereits anhand der mikroskopischen Aufnahmen nach 24 h Behandlung mit P8-D6 zeigt sich ein deutlich proliferationshemmender Effekt (Abb.4.19). Sowohl in den mit 1  $\mu\text{M}$  behandelten MCF-7, als auch in den Sk-Br3 Zellen ist dieser Effekt detektierbar.



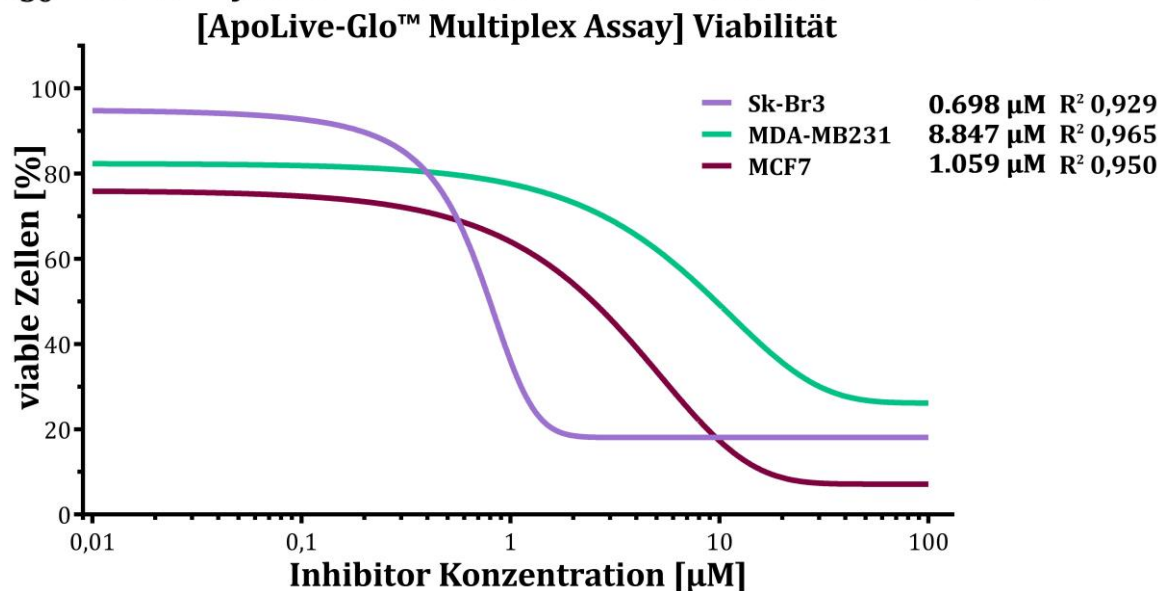
**Abb.4.19: Mikr. Aufnahmen von Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung**

Adhärenente Mammakarzinomzelllinien wurden nach der Aussaat für 24 h mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ] und Cisplatin-, Etoposid-, Topotecan- [1  $\mu\text{M}$ ] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurde visuell das Wachstum beobachtet und der proliferationshemmende Effekt beurteilt. **A:** MCF-7, **B:** Sk-Br3,

Anhand der  $\text{IC}_{50}$ -Werte bezogen auf die Viabilität der Zellen nach Behandlung können Vergleiche durchgeführt werden. Hier lässt sich beobachten, dass MCF-7 und Sk-Br3 Zellen im ähnlichen nanomolaren Bereich wirken wie die zuvor getesteten Ovarialkarzinomzellen (Abb.4.20). MDA-MB 231 zeigen eine Wirkung durch P8-D6, diese liegt jedoch im mikromolaren Bereich. MDA-MB-231 ist ein tripple negativer Tumor, der

oft durch ein rasches und aggressives Wachstum charakterisiert ist und nur schwer therapierbar ist, da er auf antihormonelle Behandlung oder eine Therapie mit HER2-Antikörpern nicht anspricht. Deshalb ist die Chemotherapie hier Mittel der ersten Wahl.

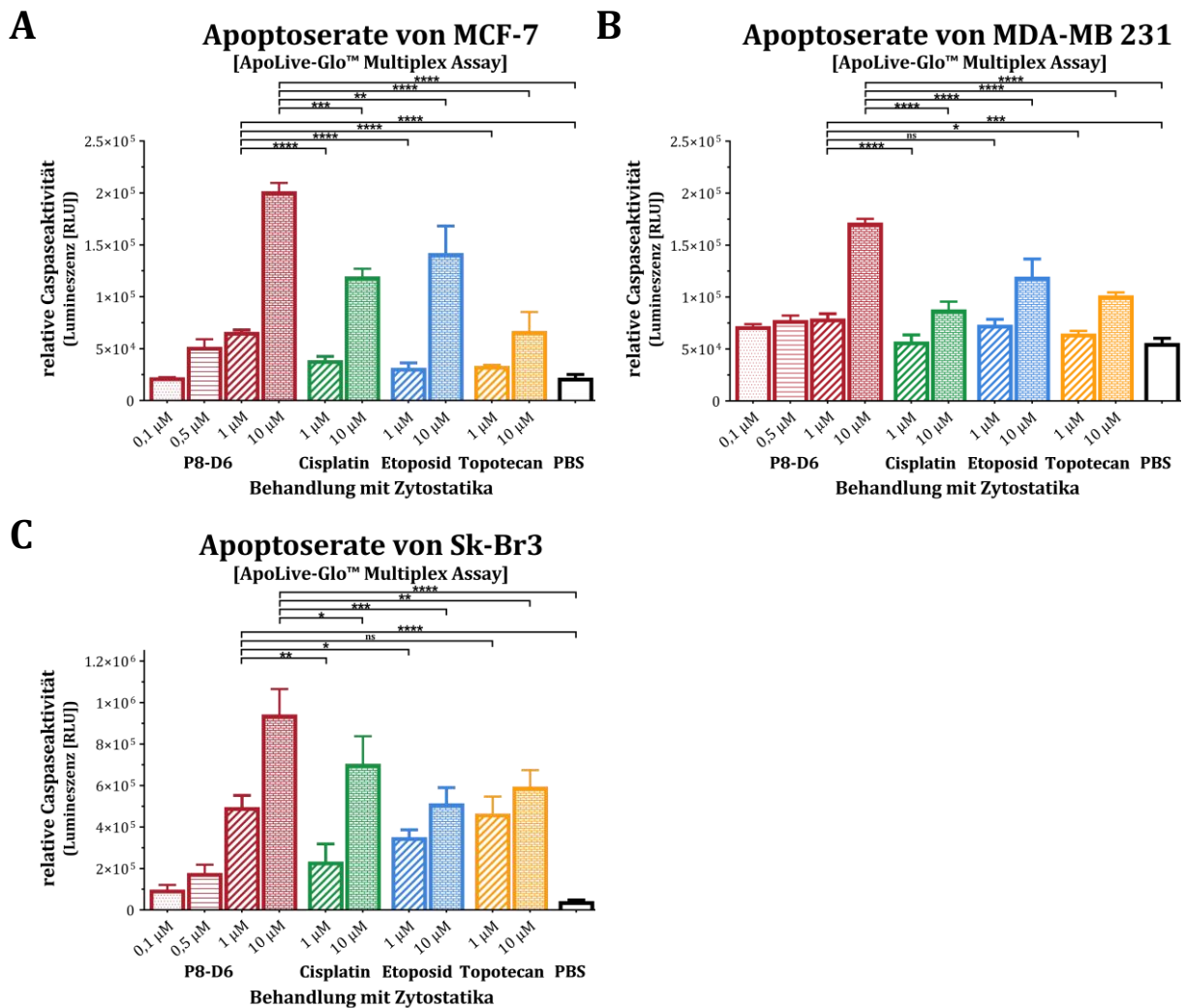
### IC<sub>50</sub>-Werte: Zytotoxizität nach 48h Inkubation mit P8-D6



**Abb.4.20: IC<sub>50</sub>-Kurven von Mammakarzinomzelllinien nach Behandlung**

Proliferationshemmender Effekt von P8-D6 in unterschiedlichen Mammakarzinomzelllinien. Die Zellen wurden mittels P8-D6 Konzentrationsreihe behandelt und die Viabilität (400<sub>Ex</sub>/505<sub>Em</sub>) nach 48 h gemessen.

Die Apoptoserate der P8-D6 [1 µM, 10 µM] behandelten Zellen weist viele signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Referenzsubstanzen auf (Abb.4.21). MDA-MB231 Zellen zeigen nach Behandlung mit Etoposid [1 µM] keinen signifikant niedrigeren Apoptoseeffekt auf als nach der Behandlung mit P8-D6 [1 µM]. Topotecan [1 µM] weist in Sk-Br3 Zellen ähnliche Effekte auf wie P8-D6 [1 µM]. Alle anderen Vergleiche, somit die deutliche Überzahl, zeigen, dass P8-D6 unabhängig vom zellulären Subtyp eine signifikant höhere Apoptoserate als Referenzsubstanzen induziert. Somit haben Mammakarzinom-Zelleigenschaften keinen Einfluss auf das Ansprechen für P8-D6 *in vitro*. Außerdem weisen diese Ergebnisse nach, dass P8-D6 auch am Mammakarzinom gute zytotoxische Effekte erzielt.



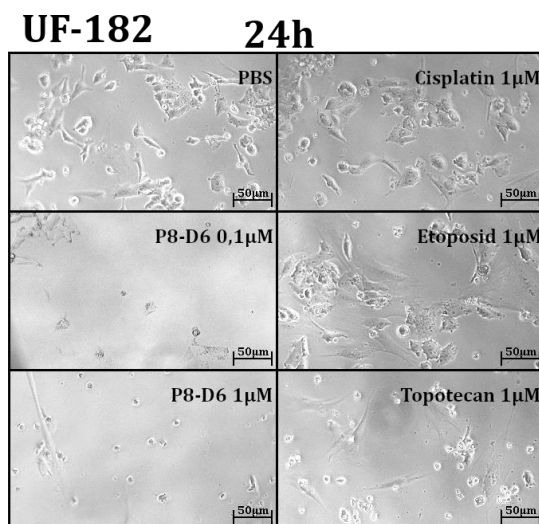
**Abb.4.21: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in Mammakarzinomzelllinien**

Nach 48 h Behandlung unterschiedlicher Mammakarzinomzelllinien mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] Cisplatin [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Etoposid [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,001)). A: MCF-7, B: MDA-MB 231, C: Sk-Br3

#### 4.4.1.4 Translatiionaler Ansatz mit *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen

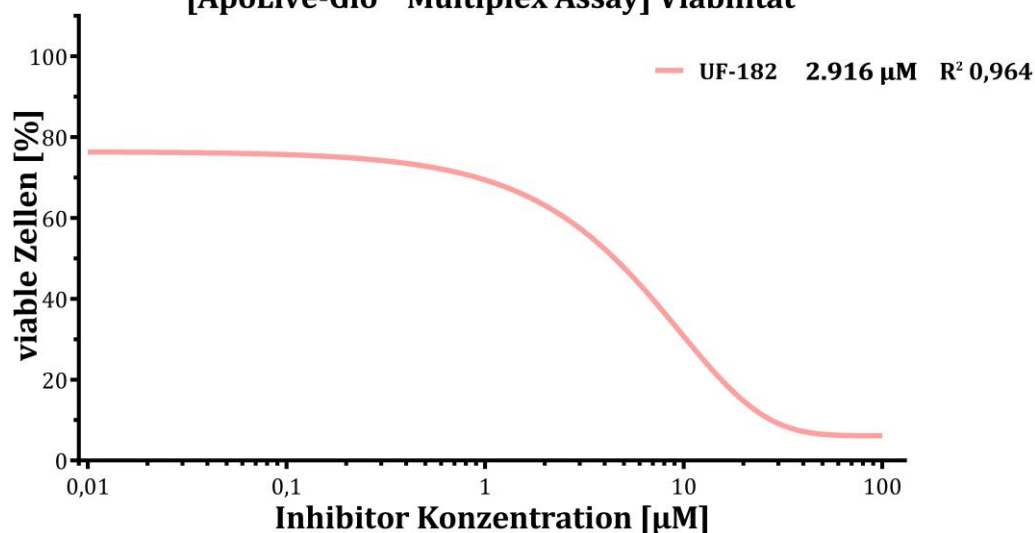
Wie bereits im Kapitel Translatiionaler Ansatz mit *ex vivo*-Ovarialkarzinom-Patientenzellen (4.4.1.2) beschrieben, zeigen sich auch bei den Mammakarzinom-Patientinnen individuelle Ansprechraten und Therapierbarkeiten. Zelllinien sind dabei aus Patientennmaterial insolierte Zellen, welche gute Eigenschaften, bezogen auf die Robustheit sich weiter zu teilen und homogene *in vitro*-Ergebnisse zu liefern, besitzen. Dabei sind nur bestimmte Zellen geeignet Zelllinien zu generieren. Um jedoch auch Aussagen zum Ansprechen der anderen Tumorzellen zu erlangen, wurde P8-D6 auch an *ex vivo*-Mammakarzinom-Patientenzellen untersucht. Kurz nach der Isolierung wurden die UF-182 Zellen bereits mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M], Cisplatin, Etoposid, Topotecan [1  $\mu$ M] und PBS behandelt. Mikroskopisch ist zu erkennen, dass P8-D6 bereits bei einer

Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  deutliche zytotoxische Effekte erzielt (Abb.4.22). Auch Topotecan zeigt einen proliferationshemmenden Effekt, ist jedoch nicht vergleichbar mit der Wirkstärke von P8-D6. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert liegt hier bei 2,92  $\mu\text{M}$  und ist damit leicht oberhalb der  $\text{IC}_{50}$ -Werte der *ex vivo* Ovarialkarzinom-Patientenzellen (Abb.4.23). Dennoch zeigt es eine gute Wirksamkeit von P8-D6.



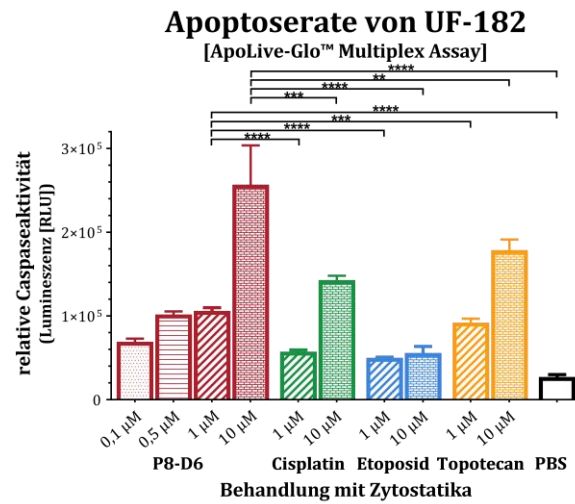
**Abb.4.22: Mikr. Aufnahmen von *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen nach Behandlung**  
Adhärente *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen wurden nach der Aussaat für 24 h mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ] und Cisplatin-, Etoposid-, Topotecan- [1  $\mu\text{M}$ ] und PBS-Kontrolle behandelt. Anschließend wurde visuell das Wachstum behandelt und der proliferationshemmende Effekt beurteilt. UF-182

### **$\text{IC}_{50}$ -Werte: Zytotoxizität nach 48h Inkubation mit P8-D6 [ApoLive-Glo™ Multiplex Assay] Viabilität**



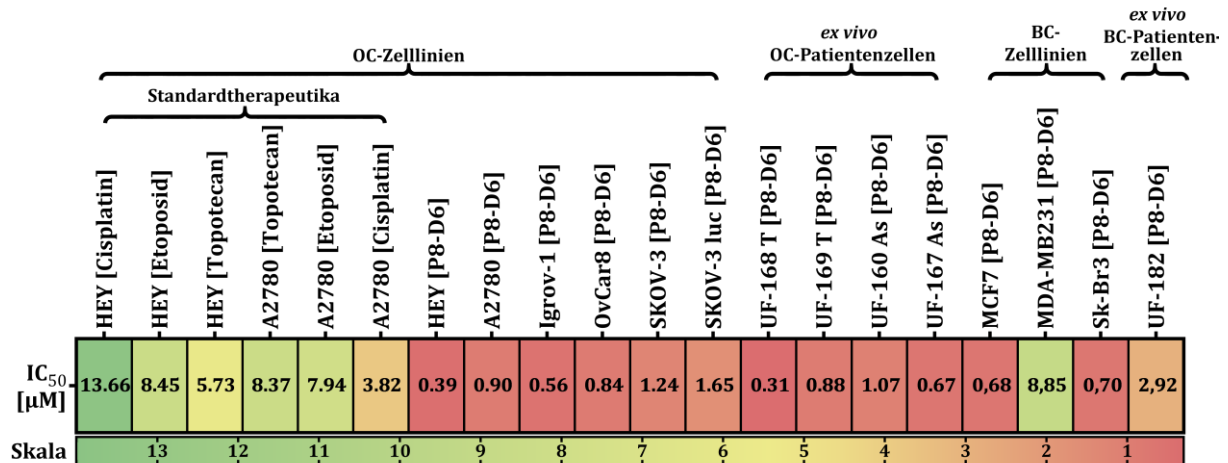
**Abb.4.23:  $\text{IC}_{50}$ -Kurve von *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen nach Behandlung**  
Proliferationshemmender Effekt von P8-D6 in *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen. Die Zellen wurden mittels P8-D6 Konzentrationsreihe behandelt und die Viabilität ( $400_{\text{Ex}}/505_{\text{Em}}$ ) wurde nach 48 h gemessen.

Mit dem Vergleich der Apoptoserate der UF-182 Zellen, die mit P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] behandelt wurden, und der der Zellen, die mit den Referenzsubstanzen [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] behandelt wurden, ist auch hier eine signifikant stärkere Apoptoseinduktion durch P8-D6 nachweisbar (Abb.4.24).



**Abb.4.24: Apoptoseinduktion (ApoLive-Glo™) in *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen**  
 Nach 48 h Behandlung unterschiedlicher *ex vivo* Mammakarzinom-Patientenzellen mit P8-D6 [0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 10 μM], Cisplatin [1 μM, 10 μM], Etoposid [1 μM, 10 μM], Topotecan [1 μM, 10 μM] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,001)).

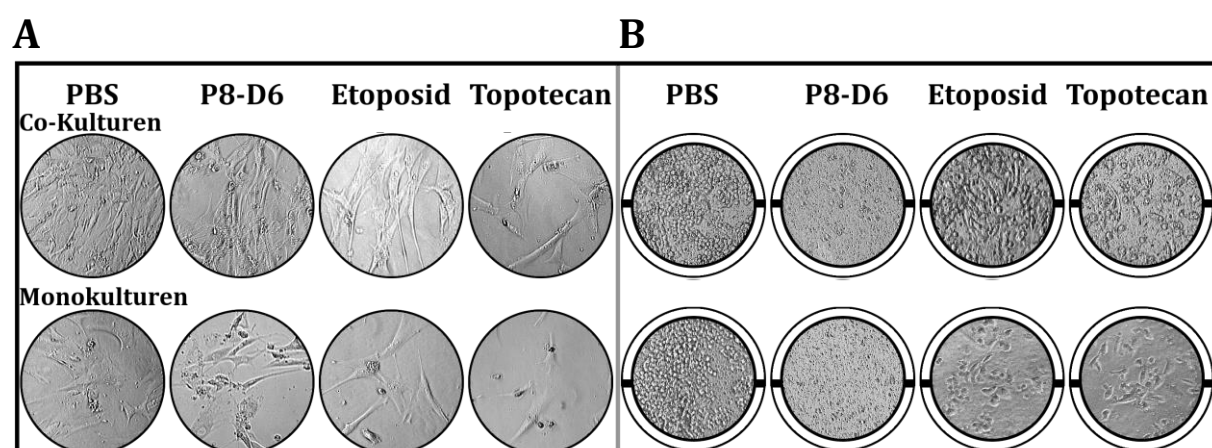
Beim Zusammenfügen der Ergebnisse zur Apoptoseinduktion aller getesteter Zelltypen fällt auf, dass P8-D6 versus der Referenzsubstanzen häufig bei 10-fach kleinerer Konzentration eine ähnliche Wirksamkeit entwickeln kann. Dies spiegeln auch die IC<sub>50</sub>-Werten der Abb.4.25 bezogen auf die Viabilität wider. Abb.4.25 zeigt dabei die IC<sub>50</sub> -Werte aller getesteten Zellkulturen.



**Abb.4.25: Heatmap der IC<sub>50</sub>-Werte von Ovarialkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen**  
 Proliferationshemmender Effekt von P8-D6, Cisplatin, Topotecan und Etoposid in unterschiedlichen Ovarialkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen. Zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zytostatika behandelt und die Viabilität (400<sub>Ex</sub>/505<sub>Em</sub>) nach 48 h gemessen. Diese Daten dienen zur Erstellung der Heatmap.

#### 4.4.2 Co-Kultur

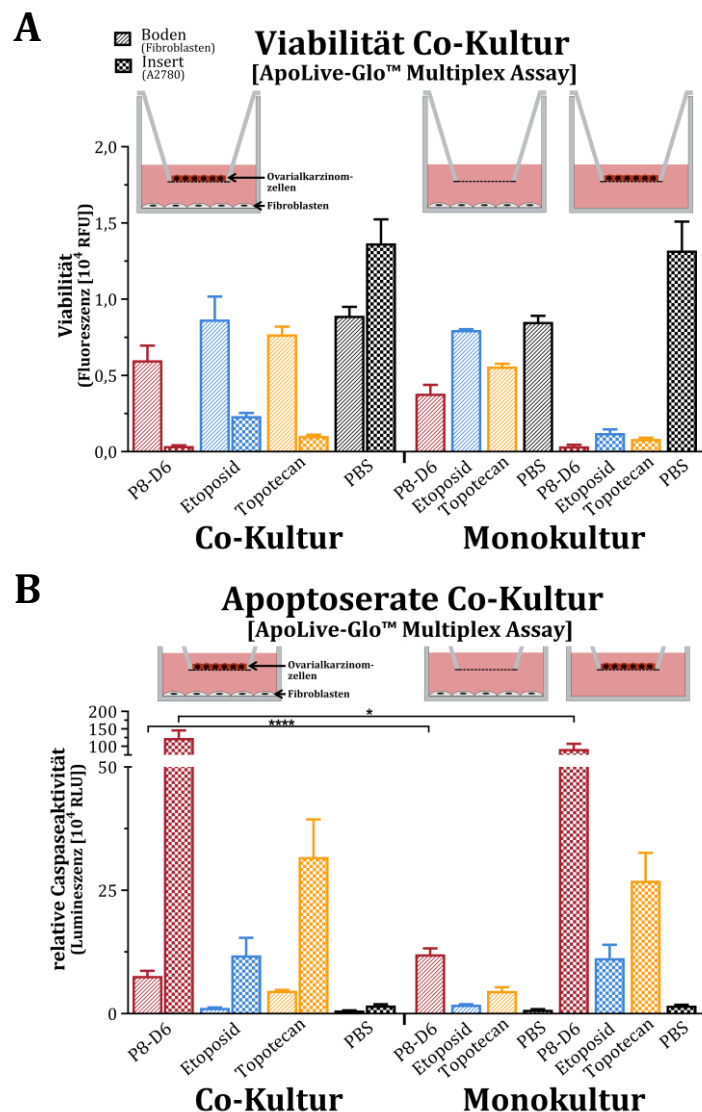
In der *in vivo* Situation sind Zellen von anderen Zelltypen umgeben und kommunizieren untereinander. Das beschriebene 2D-Modell beinhaltet nur eine Testung einer spezifischen Tumorsubpopulation. Um die Effekte von nicht-tumorassoziierter Zellen und Ovarialkarzinomzellen während der Behandlung zu charakterisieren, wurden beide Zelltypen kombiniert kultiviert und behandelt. Dabei erfolgte eine räumliche Trennung mittels semipermeabler Membran, welche jedoch für Substrate, Wirkstoffe und Wachstumsfaktoren durchlässig war (Methode Abschnitt 3.2.4). Die visuelle Betrachtung zeigt für die A2780 Zellen ein bereits häufig beschriebenes Bild. Die PBS behandelten Zellen bilden einen konfluenten Zellrasen (Konfluenz ~95 %). Für die Etoposid- und Topotecan-Behandlung kann ein proliferationshemmender Effekt detektiert werden (Konfluenz Etoposid ~70 %, Topotecan ~50 %). Im Vergleich mit den Effekten der P8-D6 Behandlung (Konfluenz ~8 %) ist dieser jedoch deutlich geringer. Nach der P8-D6 Behandlung können kaum vitale Zellen ausgemacht werden (Abb.4.26). Dabei ist visuell mittels Mikroskops kein Unterschied zwischen Mono- und Co-Kultur zu erkennen. Die Fibroblasten zeigen auch leichte proliferationshemmende Effekte durch Zytostatika-Behandlung im Vergleich zur PBS-Probe. Durch die P8-D6 Behandlung veränderten sich die Fibroblasten in der Monokultur morphologisch leicht und es konnten mehr Zellfragmente und nicht-adhärenente Zellen detektiert werden. Die Zytostatika untereinander besitzen im Vergleich zu den Ovarialkarzinomproben jedoch bei den Fibroblasten keine manifesten Unterschiede in der Zytotoxizität.



**Abb.4.26: Mikr. Aufnahmen der Co-Kultur nach Behandlung**

Adhärenente Fibroblasten und Ovarialkarzinomzellen (A2780) wurden in einer Co-Kultur mittels Zellkultureinsätzen und jeweils in Monokulturen kultiviert. Dabei wurden die Fibroblasten auf dem Grund der 12-Well-Platte und die A2780 Zellen im Zellkultureinsatz ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch P8-D6 [10  $\mu$ M] und Etoposid-, Topotecan- [10  $\mu$ M] und PBS-versetztes Medium ersetzt und für 48 h behandelt. Anschließend wurden visuell die Effekte durch die Behandlung in der Co-Kulturen mit den Monokulturen verglichen. **A:** Fibroblasten vom Wellboden -, **B:** A2780 vom Zellkultureinsatz

In der Viabilität unterscheiden sich die P8-D6 behandelten A2780-Zellen in der Co-Kultur nur geringfügig von der Monokultur. Die Behandlungen mit Topotecan und Etoposid hatten einen leicht erhöhten zytotoxischen Effekt auf die Monokultur. Die mit P8-D6 behandelten Fibroblasten zeigen ein erhöhtes Überleben in der Co-Kultur im Vergleich zur Monokultur. Dieser Effekt ist auch in den Ergebnissen der relativen Caspaseaktivität als signifikant detektierbar (Abb.4.27). Bei gleicher Effektivität auf A2780 Zellen zeigt die Co-Kultur eine leicht protektive Wirkung auf Fibroblasten in der P8-D6 Behandlung. Für die anderen Zytostatika konnte keine signifikante Beeinträchtigung der Zellintegrität auf A2780 Zellen für die Co-Kultur im Vergleich zur Monokultur gezeigt werden. Geringe Effekte sind auch bei Topotecan zu verzeichnen, jedoch sind diese nicht signifikant.



**Abb.4.27: Behandlungseffekte in der Co-Kultur**

Nach 48 h Behandlung der A2780/Fibroblasten Co-Kultur, sowie der Monokulturen mit P8-D6 [10  $\mu$ M], Etoposid [10  $\mu$ M], Topotecan [10  $\mu$ M] und PBS wurde die Viabilität und relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (n=3 + SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\*\*\* (p < 0,001)). Die Ergebnisse zeigen einen unterschiedlichen Effekt auf Fibroblasten und Ovarialkarzinomzellen. Dabei erfolgte ein Vergleich der Co-Kultur mit der Monokultur. **A:** Viabilität **B:** Apoptoserate



### 4.4.3 3D Kultur

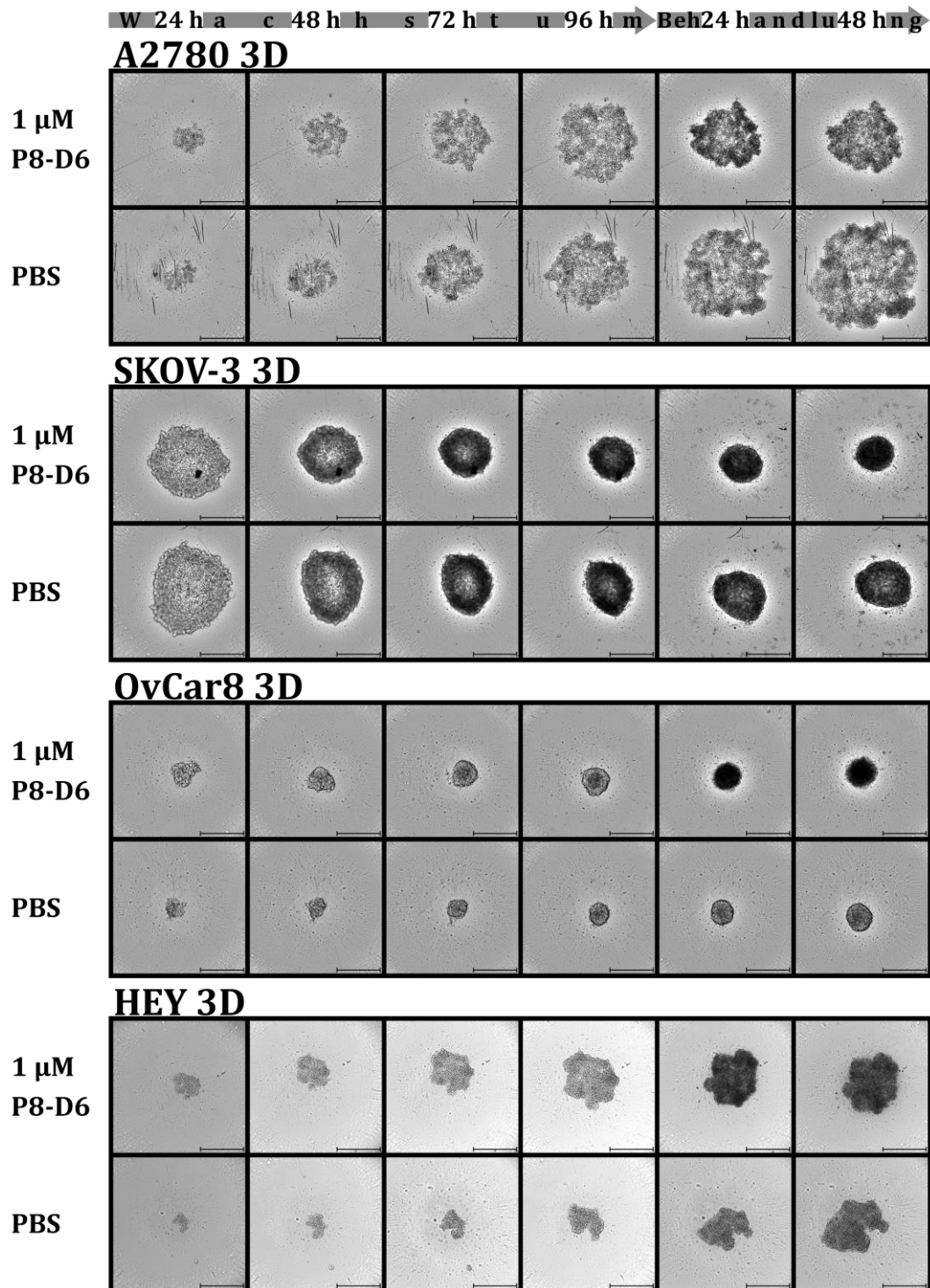
Dreidimensionale Zellkulturen werden als Brückenschlag-Experiment für *in vivo* Versuche angesehen, da räumliche Zell-Zell-Kontakte und die verstärkte Kommunikation innerhalb des Zellverbands als kritische Punkte für die Wirksamkeit von neuen Substanzen gelten. Hierfür wurden aus Ovarialkarzinomzellen und Mammakarzinomzellen durch Kultivierung in speziellen Ultra Low Attachment Sphäroid Platten mit Rundboden nach 96 h Sphäroide/Aggregate gebildet, welche dann für 48 h behandelt werden konnten. Dabei ist allgemein auffällig, dass für jeden Zelltyp ganz unterschiedliche, spezifische 3D Formationen entstanden sind. Die verwendeten Methoden sind in Abschnitt 3.2.5 beschrieben.

#### 4.4.3.1 Ovarialkarzinom-Zelllinien

Für die 3D-Testung am Ovarialkarzinom wurden die Zelllinien A2780, OvCar8, SKOV-3 und HEY verwendet. Die Wachstumsentwicklungen dieser Zellen sind in Abb.4.28 gezeigt. Hierfür wurden alle 24 h mikroskopische Aufnahmen der Sphäroide/Aggregate gemacht. Nach 96 h wurde wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben die 3D Kultur weitere 48 h unterschiedlich behandelt. Anhand dieser mikroskopischen Aufnahmen sind die Vielfältigkeit und Individualität der Sphäroide/Aggregate zu erkennen.

Die A2780 sind schnellteilende Ovarialkarzinomzellen, die in der 3D Kultur eher losere Aggregate mit leichtem Zell-Zell-Kontakt bilden. Diese Aggregate lassen sich durch mittleren mechanischen Druck bereits in kleinere Verbände trennen. Der Unterschied zu der typischen kompakten Sphäroid-Struktur mit proliferierenden Zellen, ruhenden Zellen und dem nekrotischen Zellkern ist der geringere Anteil an nekrotischen Kern, sowie eine leichtere Penetration von Medium und Zytostatika durch die Aggregatschichten und den für A2780 deutlich zu erkennende Größenzuwachs während der Wachstumsphase. Die A2780 Aggregate besitzen vor der Behandlung einen Durchmesser von ca. 800  $\mu\text{m}$ . Mit PBS-behandelte A2780 Aggregate wachsen nach 48 h Behandlung auf eine Größe von ca. 1150  $\mu\text{m}$  an. Die mit Zytostatika-behandelten Aggregate stagnieren in ihrer Größe von ca. 800  $\mu\text{m}$ . Ein ähnliches Bild des Zellverbands liefern die HEY in der 3D-Kultur. Auch hier ist der Begriff Aggregat zutreffender, da auch diese Zellen einen Größenzuwachs innerhalb der 96 h Kultivierung zeigen und auch hier kein typischer nekrotischer Kern zu erkennen ist. An Tag 4 besitzen HEY-Aggregate einen Durchmesser von etwa 500  $\mu\text{m}$ . Im Vergleich zu den A2780 besitzen die HEY jedoch eine in sich festere Struktur. Die Wachstumsentwicklung über 144 h veranschaulicht die Abb.4.29A. Aufgrund der Unterschiede

in der Größenentwicklung und der Stabilität werden die A2780 und HEY als Aggregate bezeichnet, hingegen handelt es sich bei den OvCar8 und SKOV-3 um Sphäroide.



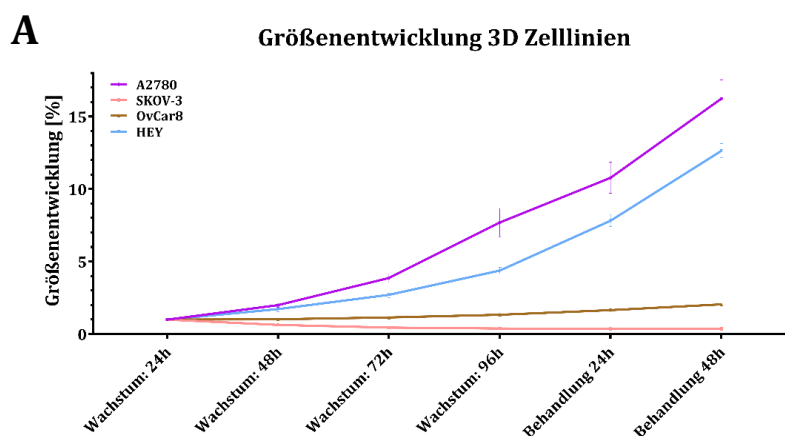
**Abb.4.28: Repräsentative Phasenkontrastbilder von Ovarialkarzinom-Sphäroiden**

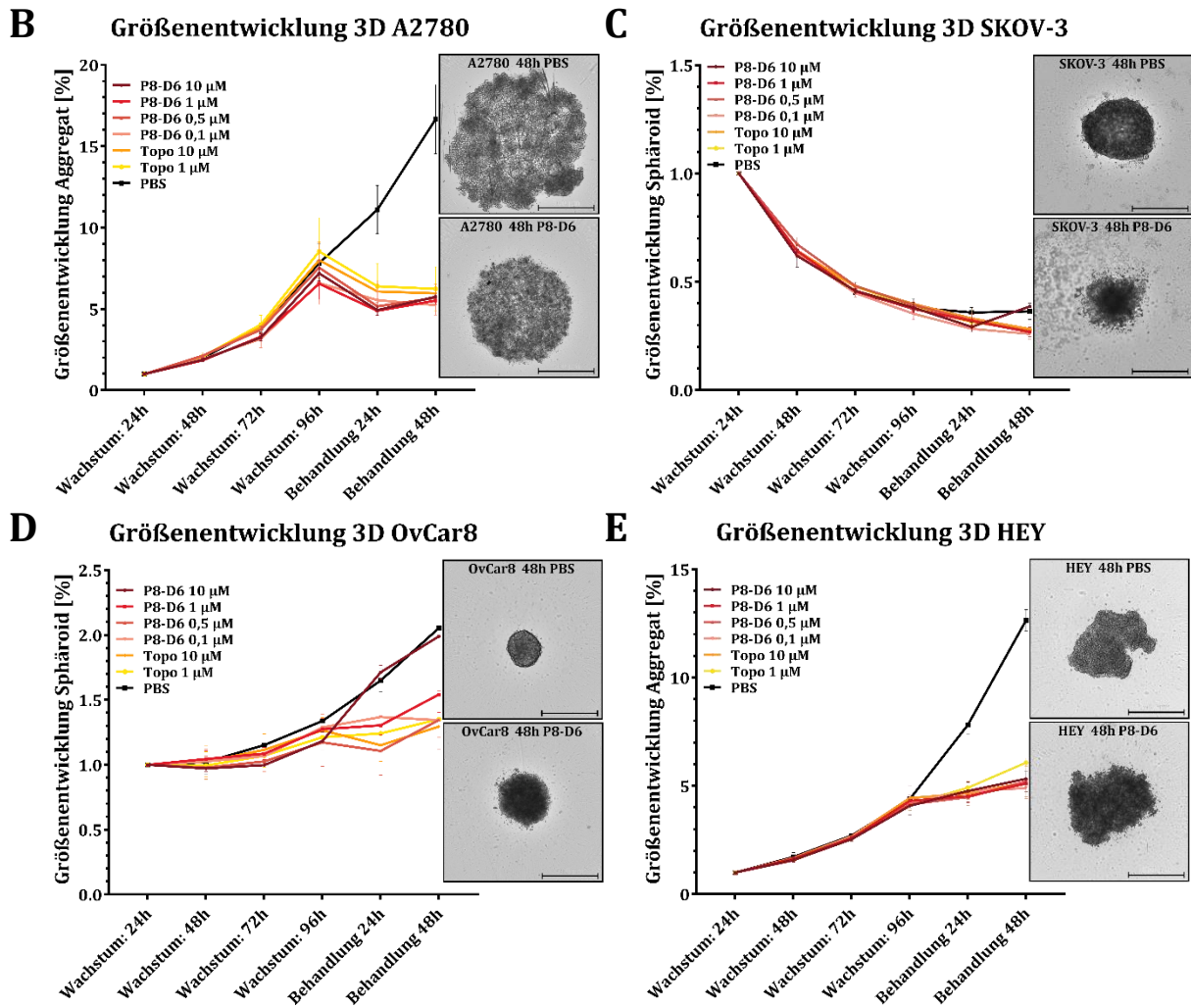
Die Ovarialkarzinomzellen A2780, SKOV-3, OvCar8 und HEY wurden für 96 h in Ultra Low Attachment Sphäroid Platten mit normalem Medium kultiviert. Alle 24 h wurden mikroskopische Aufnahmen von diesen Sphäroiden/Aggregaten gemacht. Anschließend wurden die Sphäroide/Aggregate für weitere 48 h mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS behandelt. Detaillierte Ausführung siehe Anhang, Skala entspricht 500  $\mu$ m

Die OvCar8 zeichnen sich hierbei durch ihre gleichbleibende Größe von etwa 400  $\mu$ m aus. Dabei ist jedoch anhand der mikroskopischen Aufnahmen gut erkennbar, dass sich die

Sphäroide im Laufe der 96 h komprimieren. Zwar sieht man anhand der Aufnahmen nicht auf Anhieb den nekrotischen Kern, jedoch verändert sich die äußere Oberfläche der OvCar8 Sphäroide. Anfangs sind im Zellerbund die einzelnen Zellen voneinander abgrenzbar. Dies ändert sich und eine relativ glatte Oberflächenstruktur entsteht. Dies ist sehr charakteristisch für die OvCar8 Sphäroide, die in sich ein sehr kompaktes und sehr stabiles Gebilde bilden. SKOV-3 bilden gut sichtbar die in der Literatur beschriebenen Sphäroide mit dem typischen Aufbau Proliferationszone, Ruhezone und Nekrotischem Kern (Nath und Devi, 2016). Bereits nach 24 h entstehen stabile 3D Gebilde, welche im Laufe des Wachstums kleiner und kompakter werden und gut die Zonenbildung zeigen. Nach 96 h Kultivierung erreichen die SKOV-3 Sphäroide einen Durchmesser von ca. 500  $\mu\text{m}$ . Optisch ähneln die in dieser Arbeit generierten Sphäroide/Aggregate in ihrer Kompaktheit und Formation den bereits in der Literatur publizierten. (Heredia-Soto *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2017; Raghavan *et al.*, 2016).

Fokus dieser Arbeiten lag jedoch nicht nur in der Generierung unterschiedlicher Sphäroide/Aggregate, sondern die Untersuchung des Effekts von P8-D6 auf diese. Dafür wurden die Zellen erst für 96 h kultiviert, um anschließend für 48 h behandelt zu werden. Die Größenentwicklung von A2780 und HEY Aggregaten zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den behandelten Proben und den mit PBS versetzten Aggregaten. Zytostatika- und konzentrationsübergreifend konnte eine Größenstagnation festgestellt werden. Die PBS behandelten Zellen zeigten einen weiteren Anstieg der Größe (Abb.4.29B, E). Bei den OvCar8-Sphäroiden ist ein leichter Anstieg der Größe in den mit PBS sowie 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 behandelten Sphäroiden zu sehen. Die mikroskopischen Bilder zeigen jedoch sehr deutlich, dass die Morphologie dieser beiden Behandlungen sehr unterschiedlich ist (Abb.4.29D). Die SKOV-3 Sphäroide können im Größenvergleich keine großen Unterschiede verzeichnen, jedoch ist auch hier zu sehen, dass die Morphologie sich durch die Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 stark verändert (Abb.4.29C).



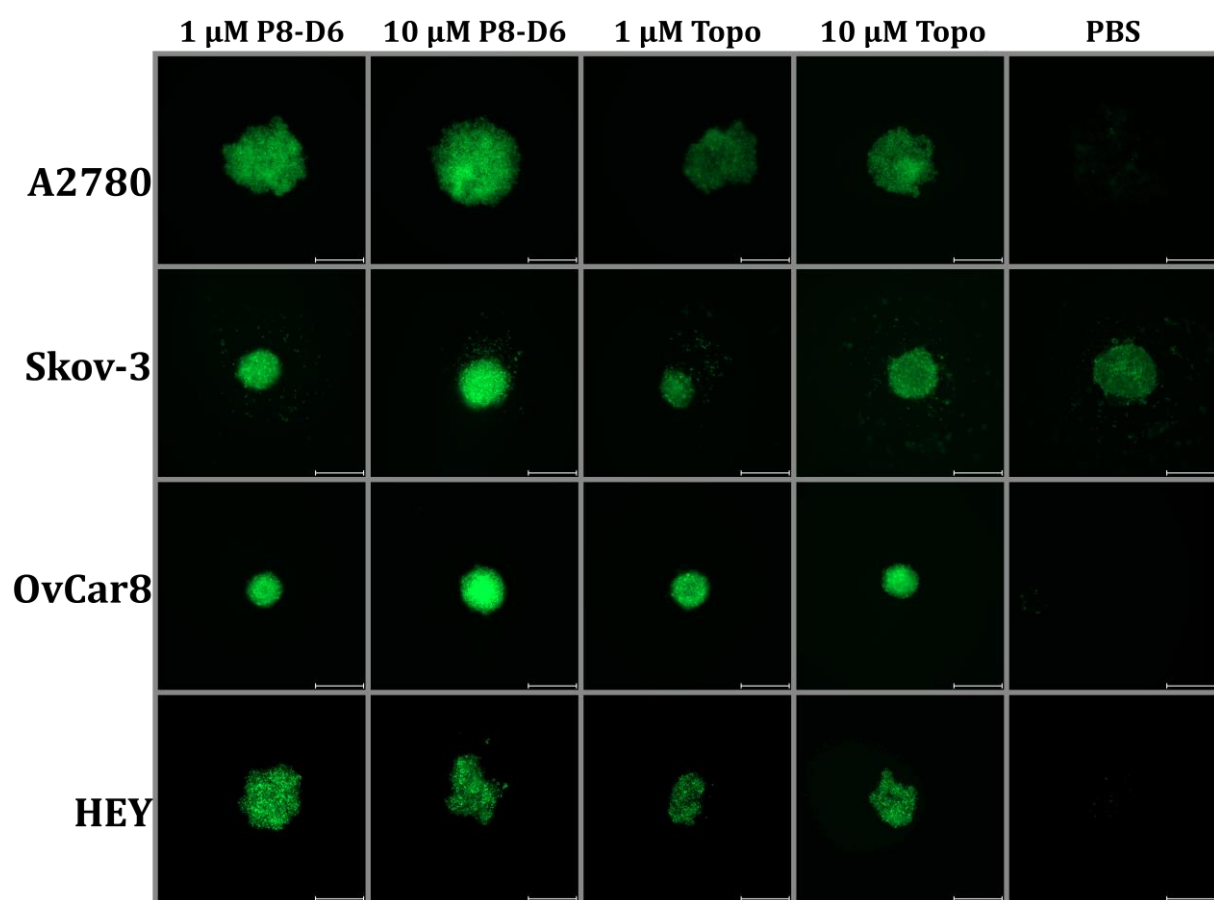


**Abb.4.29: Größenentwicklung der Ovarialkarzinom Sphäroide/Aggregate**

Nach 96 h Kultivierung wurden die Sphäroide/Aggregate für weitere mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS behandelt. Die Größe der Sphäroide/Aggregate wurde mit Hilfe von ImageJ bestimmt und analysiert. Die Größeentwicklung wurde gegenüber der Zeit aufgetragen. **A:** Größenentwicklung verschiedener Zelllinien nach Behandlung mit PBS. **B:** A2780, **C:** SKOV-3, **D:** OvCar8, **E:** HEY Größenentwicklung nach unterschiedlicher Behandlung. Zusätzlich sind mikroskopische Aufnahmen von 48 h PBS und 10 µM P8-D6 behandelten Sphäroiden/Aggregaten dargestellt. Diese verdeutlichen die morphologische Veränderung aufgrund der Behandlung. Skala entspricht 500 µm

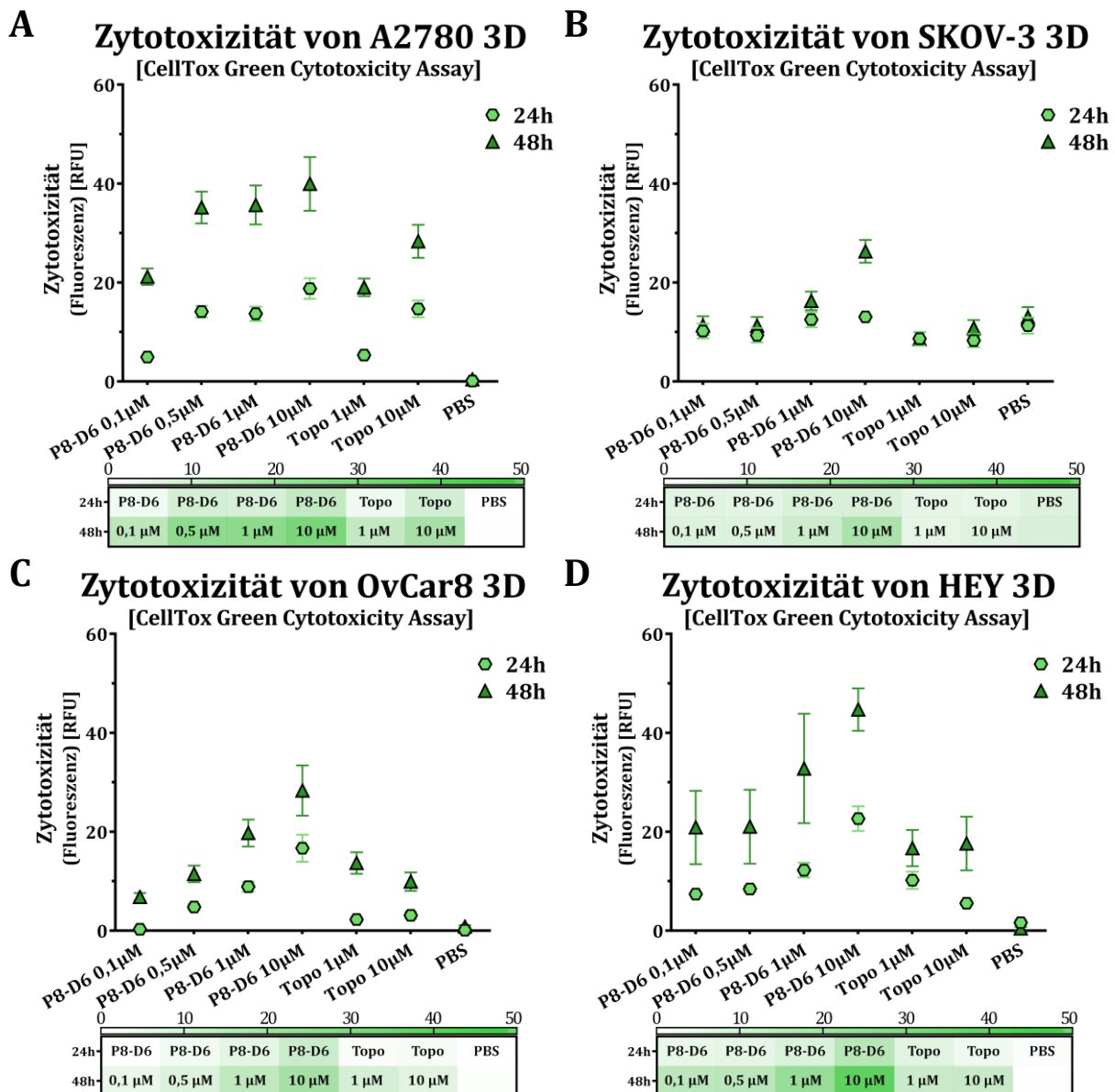
Um diesen Effekt der Behandlungen besser zu untersuchen, wurde die Zytotoxizität dieser Sphäroide/Aggregate nach Behandlung mittels CellTox Green Cytotoxicity Assay bestimmt. Hierfür wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt (Abb.4.30, detaillierte Aufzeichnung siehe Anhang Abb. II, Abb. III, Abb. IV, Abb. V), die anschließend quantifiziert wurden (Abb.4.31). Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte nach 24 h und nach 48 h. Bezogen auf die Sphäroid-/Aggregatgröße besitzen die mit 10 µM P8-D6 behandelten Zellen zelllinienübergreifend die höchste Fluoreszenzintensität und somit die höchste Zytotoxizität. Bei den Untersuchungen fällt auf, dass die Aggregate A2780 und HEY, sowie die OvCar8-Sphäroide einen ausgeprägteren Effekt von behandelten im Vergleich zu unbehandelten Proben verzeichnen. Die mit PBS behandelten Zellen bleiben in diesen

Proben auf Nullniveau. Die mit 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 behandelten Proben weisen höhere Zytotoxizitäten auf als die mit 10  $\mu\text{M}$  Topotecan behandelten Sphäroide/Aggregate. Wie schon bei der Charakterisierung der mikroskopischen Aufnahmen erwähnt, kann nur für die SKOV-3 Sphäroide der typische nekrotische Kern in den Phasenkontrastbildern der mit PBS behandelten Proben gesehen werden. Dieses spiegelt sich auch in den Zytotoxizitätsdaten wider. Die SKOV-3 Sphäroide zeigen bereits bei PBS Behandlung ein hohes, nahezu vergleichbares Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den mit Zytostatika behandelten Proben. In dieser Zelllinie sticht nur die 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 behandelte Probe mit erhöhten Signalen hervor.



**Abb.4.30: Mikr. Aufnahmen der Zytotoxizität von Ovarialkarzinom-Sphäroiden/Aggregaten**

Unterschiedliche Ovarialkarzinom-Sphäroide/Aggregate wurden mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS für 48 h behandelt und die Zytotoxizität wurde mittels CellTox Green Cytotoxicity Assay bestimmt. Skala entspricht 500  $\mu\text{m}$

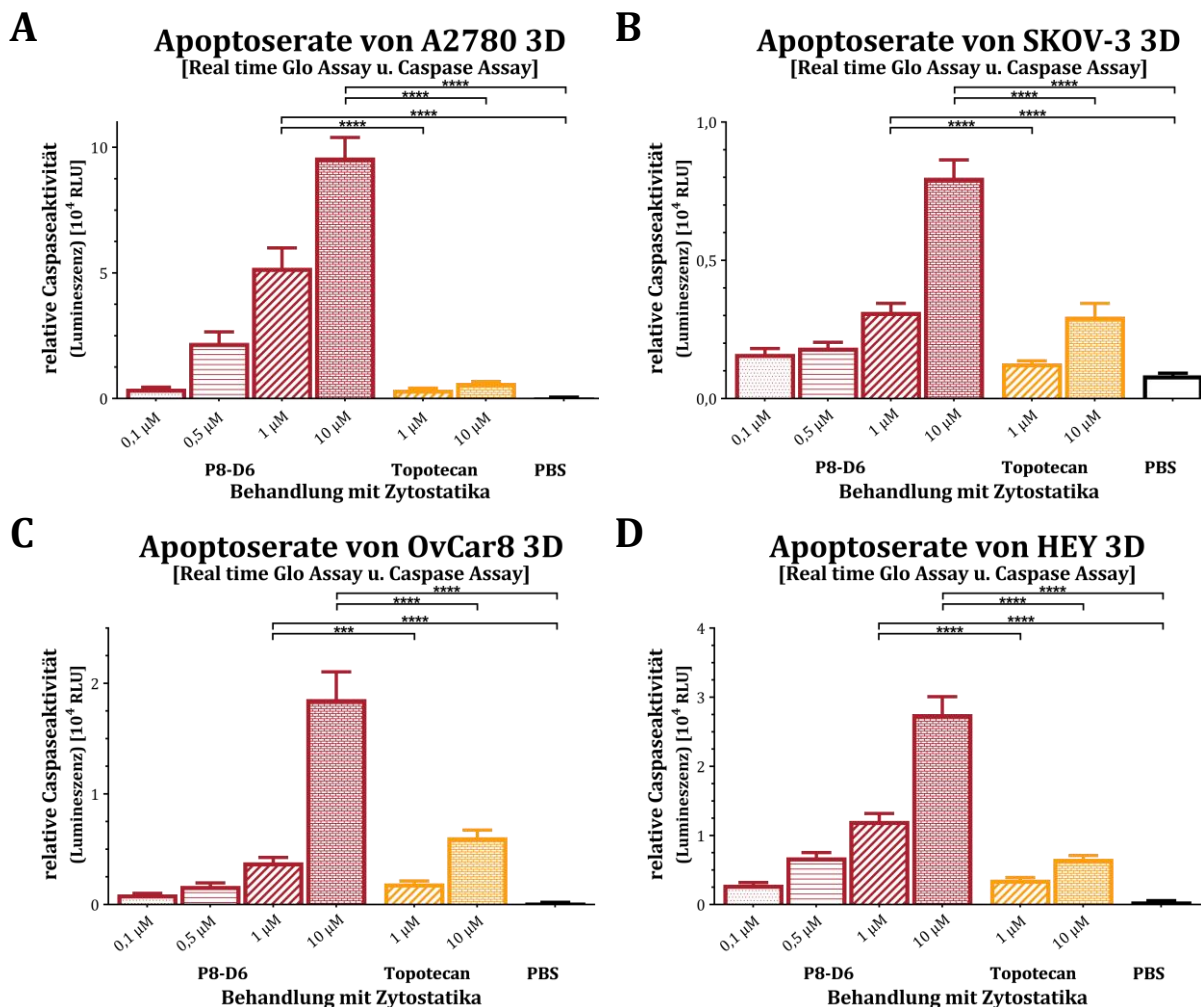


**Abb.4.31: Zytotoxizität von Ovarialkarzinom-Sphäroiden/Aggregaten nach Behandlung**

Nach 24 h und 48 h Behandlung unterschiedlicher Ovarialkarzinom-Sphäroide/Aggregate mit P8-D6 [0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM, 10 μM, Topotecan [1 μM, 10 μM] und PBS wurde die Zytotoxizität mittels CellTox Green Cytotoxicity Assay bestimmt. (n=3 +/- SEM). **A:** A2780, **B:** SKOV-3, **C:** OvCar8, **D:** HEY

Die größte Aussage zur Effektivität eines Wirkstoffs in der Onkologie bietet die relative Caspaseaktivität, die ein Wert für die Apoptoseinduktion darstellt. Hierfür diente die in Abschnitt 3.2.5 beschriebene Methode der Messung mittels RealTime-GloTM Metabolic Cell Viability und des Caspase-Glo® 3/7 Assay. Die Viabilität und anschließend die Caspaseaktivität wurde für 48 h behandelte Sphäroide/Aggregate bestimmt. Dabei konnte in den Messungen nachgewiesen werden, dass die 1 μM und 10 μM P8-D6 in allen Zelllinien signifikant die Apoptose induziert. PBS behandelte Proben weisen ein Nullniveau in den A2780 und HEY Aggregaten sowie in den OvCar8 Sphäroiden auf. Die SKOV-3 Sphäroide hingegen zeigen auch bei PBS Behandlung bereits Caspaseaktivität. Nichtsdestotrotz ist

die relative Caspaseaktivität in mit P8-D6 behandelten SKOV-3 Sphäroiden signifikant höher im Vergleich zu PBS und Topotecan (Abb.4.32B). Dieses Phänomen ist bereits aus Abb.4.28, Abb.4.30 und Abb.4.31 bekannt.

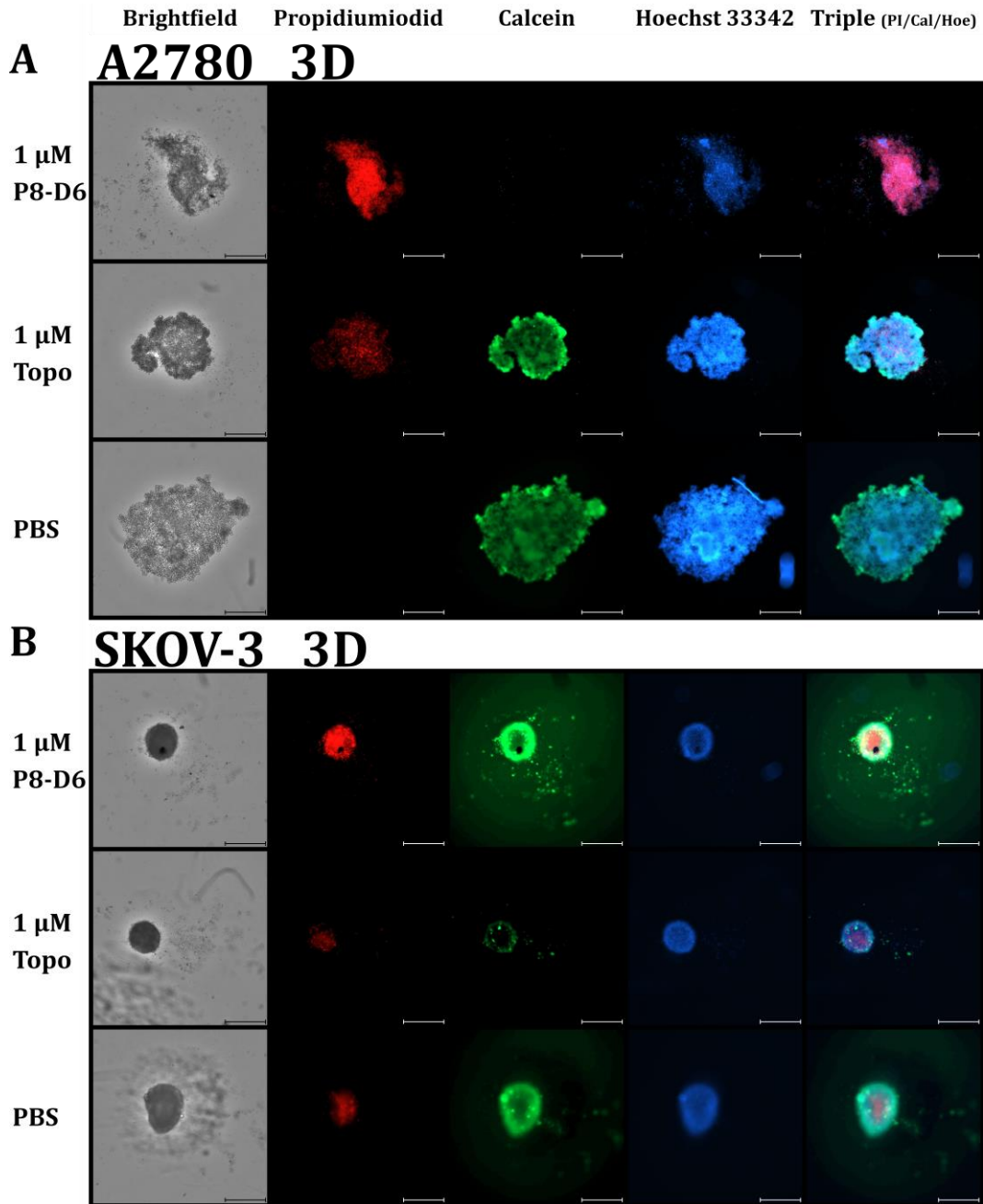


#### Abb.4.32: Apoptoseinduktion in Ovarialkarzinom-Sphäroiden/Aggregaten

Nach 48 h Behandlung unterschiedlicher Ovarialkarzinom-Sphäroide/Aggregate mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissionsspektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD, one-way ANOVA, \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,001$ )). A: A2780, B: SKOV-3, C: OvCar8, D: HEY

In Abb.4.33 und Abb.4.34 sind die Aggregate und Sphäroide der Zelllinien A2780, HEY, OvCar8 und SKOV-3 gezeigt, die nach Behandlung mit P8-D6 und Topotecan anschließend mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) angefärbt wurden. Dabei zeigt sich für die A2780-Aggregate bei einer Dosierung von 1 µM deutlich, dass in der mit P8-D6 behandelten Probe mehr tote Zellen vorhanden sind als in der mit Topotecan behandelten Probe. In der PBS behandelten Probe sind kaum tote Zellen zu detektieren. Auch lassen sich anhand der Phasenkontrastbilder wesentliche Veränderungen in den P8-D6 behandelten Proben nachweisen. Die Aggregate werden deutlich mechanisch instabiler. Die HEY Aggregate präsentieren ein ähnliches Bild. Zwar

ist der Unterschied zwischen der 1  $\mu\text{M}$  P8-D6 Probe und der 1  $\mu\text{M}$  Topotecan Probe nicht so deutlich wie bei A2780 Zellen, dennoch ist ein Unterschied erkennbar. Eine ausführliche Darstellung aller verwendeten Behandlungskonzentrationen ist im Anhang (Abb. IX, Abb. XII) beigefügt.



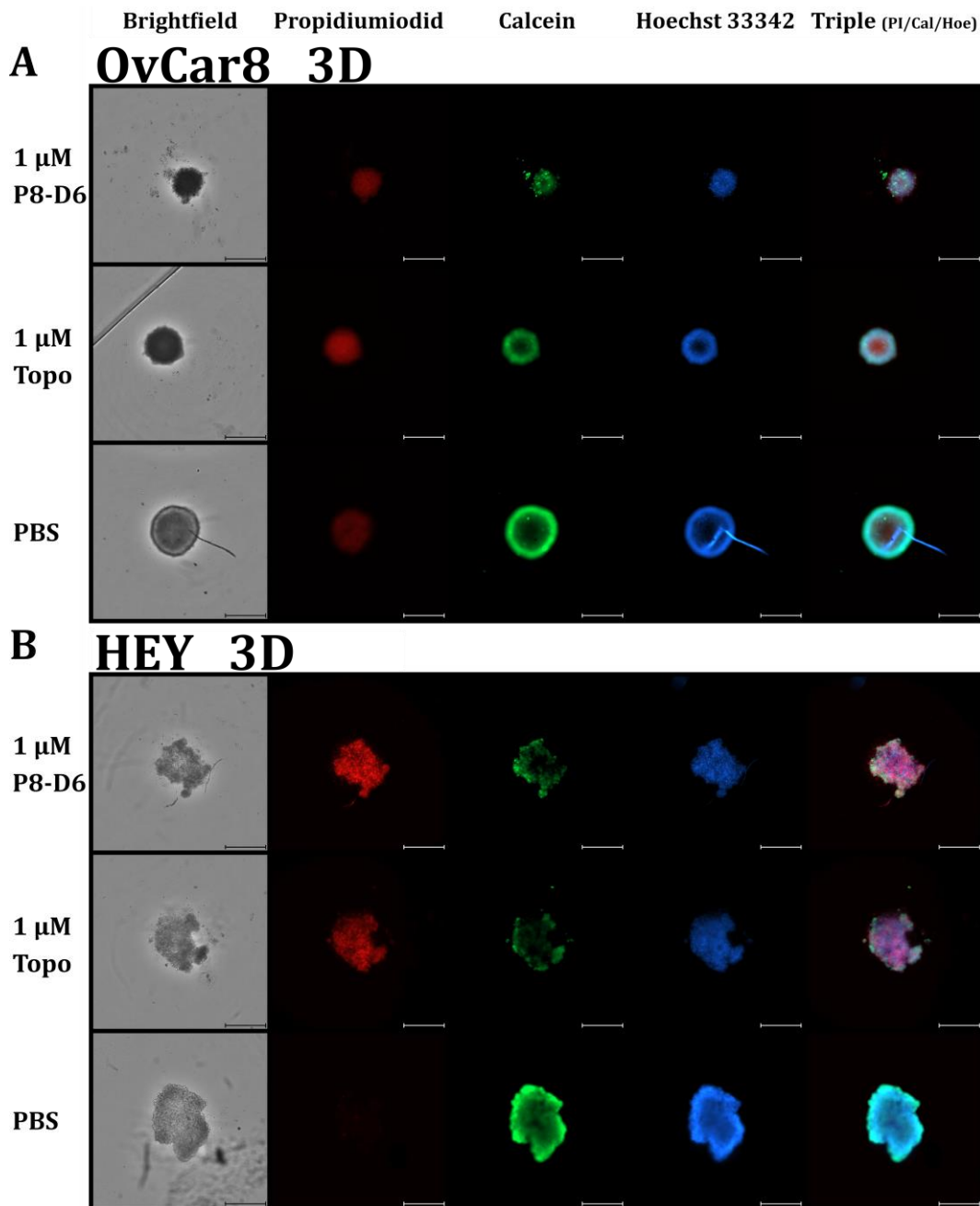
**Abb.4.33: Lebend-Tot-Diskriminierung von Ovarialkarzinom-Aggregaten nach Behandlung**

Nach 48 h Behandlung der Ovarialkarzinom Aggregate A2780 und HEY mit P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ ] und PBS wurden die Zellen mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) angefärbt und mikroskopisch vermessen. **A:** A2780, **B:** SKOV-3, Skala entspricht 500  $\mu\text{m}$

Anders sind die Ergebnisse für OvCar8 Zellen in dieser Färbung. In den OvCar8 Zellen ist das Propidiumiodidsignal für 1  $\mu\text{M}$  Topotecan höher als für 1  $\mu\text{M}$  P8-D6. In Abb. XI (Anhang) zeigt sich das 1  $\mu\text{M}$  Topotecan Signal für den Zelltod sogar stärker als in der 10  $\mu\text{M}$

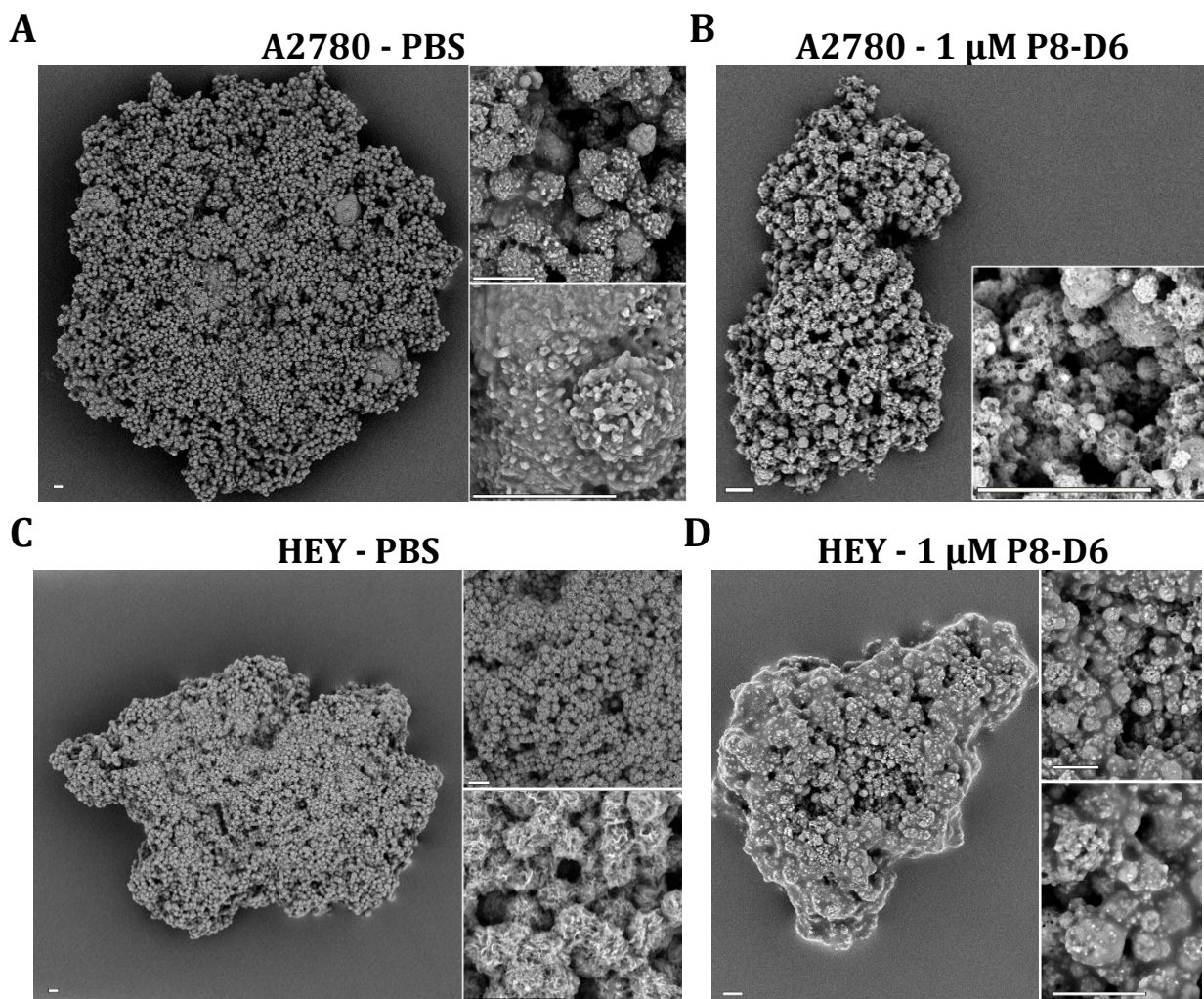


Topotecan Probe. Auch lassen sich die Ergebnisse nochmal im Bereich Phasenkontrastbilder abgrenzen. Hier scheint die 1  $\mu\text{M}$  P8-D6 Probe etwas mechanisch instabiler zu sein als das mit 1  $\mu\text{M}$  Topotecan behandelte Sphäroid. Für die SKOV-3 Sphäroide zeichnet sich bei einer 1  $\mu\text{M}$  P8-D6 Behandlung eine deutliche Zersetzung des Sphäroids ab. Das Propidiumiodidsignal ist aufgrund der Größenunterschiede der Sphäroide kaum noch zu vergleichen. Dennoch zeigt die Abb.4.34B einen wesentlichen Effekt von P8-D6 auf die SKOV-3 Sphäroide (Details Anhang Abb. X).



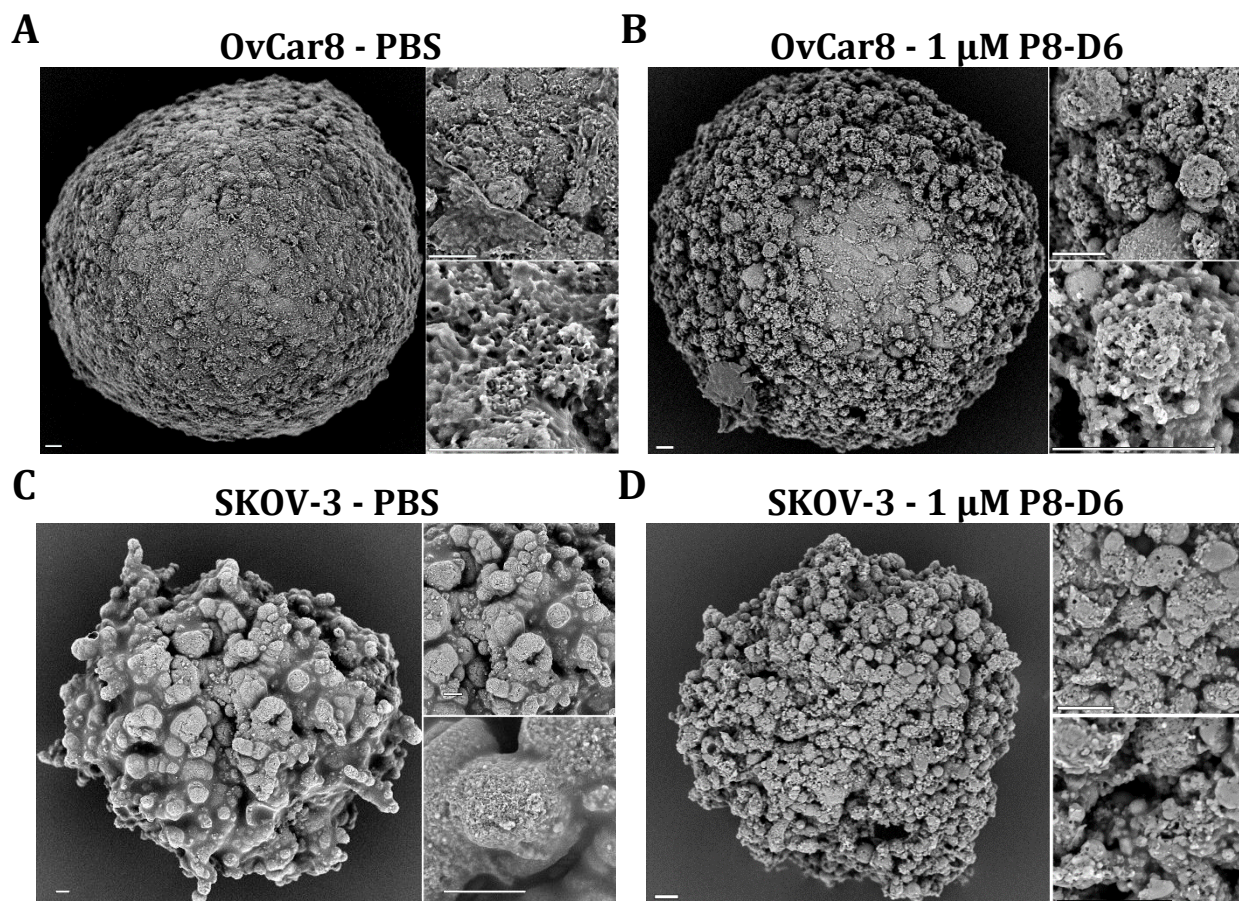
**Abb.4.34: Lebend-Tot-Diskriminierung von Ovarialkarzinom-Sphäroiden nach Behandlung**  
 Nach 48 h Behandlung der Ovarialkarzinom Sphäroide SKOV-3 und OvCar8 mit P8-D6 [1  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ ] und PBS wurden die Zellen mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) angefärbt und mikroskopisch vermessen. **A:** OvCar8, **B:** HEY, Skala entspricht 500  $\mu\text{m}$

Die mikroskopische Untersuchung mittels Nyone zeigte bislang nur eine grobe Auflösung der Zellverbandoberfläche der Sphäroide und Aggregate. Detaillierte Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit dieser 3D-Gebilde und die Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit durch Behandlung mit P8-D6 konnte mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht werden (Abb.4.35; Abb.4.36). Dafür mussten die Sphäroide/Aggregate fixiert, dehydriert, getrocknet und mit Gold besprüht werden (Abschnitt 3.2.5.3). Die Ergebnisse zeigen für die A2780 Aggregate eindrucksvoll eine dreidimensionale Struktur. Aus den mikroskopischen Nahaufnahmen wird deutlich, dass die Zellen untereinander Zellkontakte bilden und so ein Zellverband entsteht. Die Fläche an Zell-Zell-Kontakten ist für die A2780 Aggregate geringer, sodass einzelne Zellen noch charakteristisch wahrgenommen werden können.



**Abb.4.35: REM Aufnahmen von behandelten und unbehandelten Ovarialkarzinom-Aggregaten**  
Die Ovarialkarzinom-Aggregate A2780 und HEY wurden für 96 h Wachstumsphase für weitere 48 h mit P8-D6 [1 µM] und PBS behandelt. Anschließend erfolgten eine Fixierung und Dehydrierung, Trocknung und Goldbeschichtung. Im Anschluss erfolgte die Rasterelektronenmikroskopische Vermessung. **A, B:** A2780, **C, D:** HEY, Skala entspricht 20 µm

Anders ist es bei den unbehandelten OvCar8 Sphäroiden, bei denen eine glatte Oberflächenstruktur während der Wachstumsphase entstanden ist. Es scheint, dass die Zellen relativ stark ineinander vernetzt sind und eine Einheit bilden. Durch die Behandlung mit P8-D6 werden diese 3D-Strukturen angegriffen, Zellen werden durch die Behandlung apoptotisch und das Gebilde wirkt optisch im Mikroskop porös. Die A2780 Aggregate sind nach der Behandlung deutlich kleiner, sind trotz Fixierung deutlich instabiler und in der Nahaufnahme lassen sich durchlöchernte Zellen erkennen. Auch die OvCar8 Sphäroide zeigen keine glatte Oberflächenstruktur mehr. Auf der Oberfläche sind ähnlich zu den A2780 Aggregaten die einzelnen Zellen erkennbar. Zudem wirken auch diese Strukturen poröser und deutlich verändert.

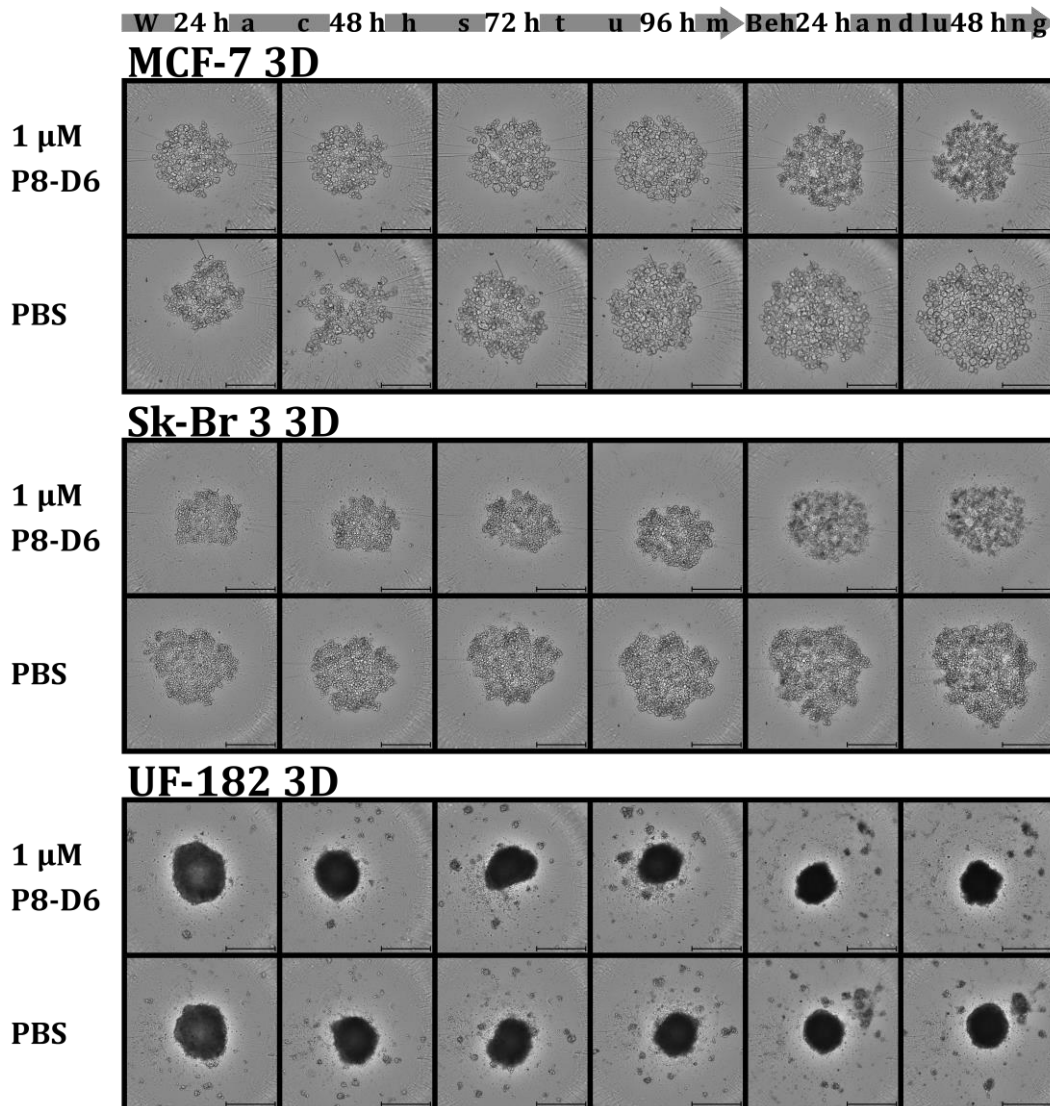


**Abb.4.36: REM Aufnahmen von behandelten und unbehandelten Ovarialkarzinom-Sphäroiden**  
Die Ovarialkarzinom-Sphäroide OvCar8 und SKOV-3 wurden für 96 h Wachstumsphase für weitere 48 h mit P8-D6 [1 µM] und PBS behandelt. Anschließend erfolgten eine Fixierung und Dehydrierung, Trocknung und Goldbeschichtung. Im Anschluss erfolgte die Rasterelektronenmikroskopische Vermessung. **A, B:** OvCar8, **C, D:** SKOV-3, Skala entspricht 20 µm

#### 4.4.3.2 Mammakarzinom-Zelllinien

Wie bereits für das Ovarialkarzinom beschrieben ist auch die Bildung der Mammakarzinom-Sphäroide bzw. -Aggregate individuell für Zelltypen. Die MCF-7 Zellen bilden ähnlich

zu den Sk-Br 3 Zellen eher Aggregate. Im Vergleich dazu bilden die UF-182 Zellen kompakte Sphäroide mit nekrotischem Kern (Abb.4.37). Nach Behandlung wirken die UF-182 Sphäroide in den Phasenkontrastaufnahmen relativ unverändert. Die MCF-7 und Sk-Br 3 Aggregate sind im Vergleich dazu porös und mechanisch instabil geworden. Auch die Morphologie der einzelnen Zellen ist durch die P8-D6 Behandlung deutlich verändert.

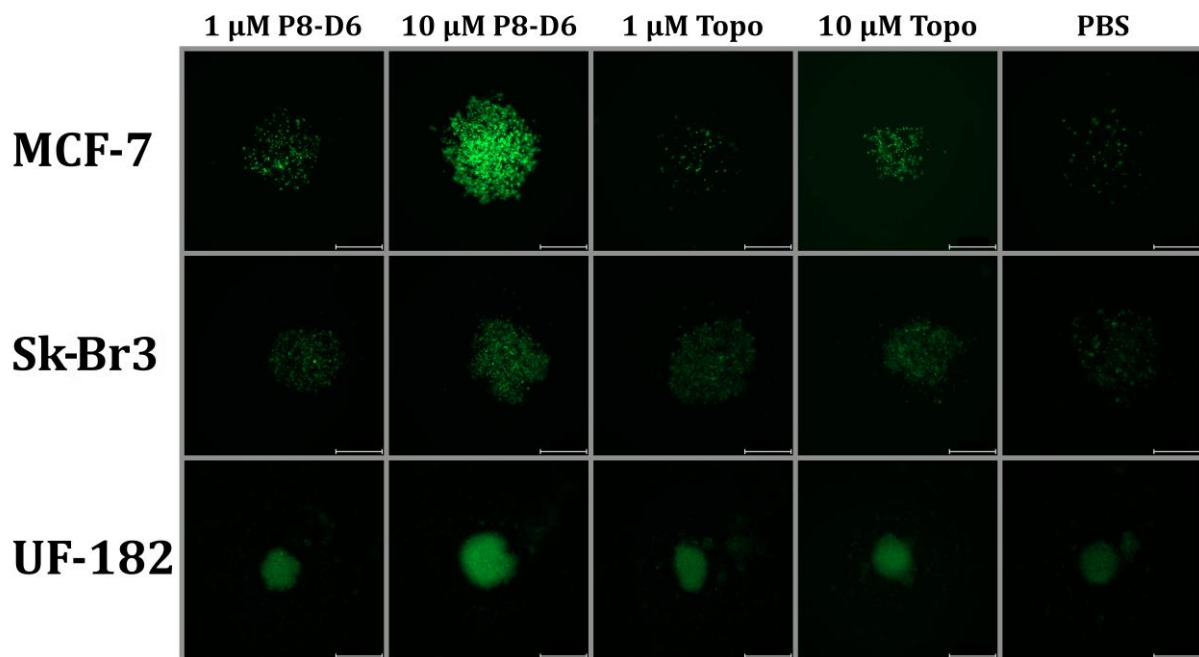


**Abb.4.37: Repräsentative Phasenkontrastbilder von Mammakarzinom-Sphäroiden**

Die Mammakarzinomzellen MCF-7, Sk-Br 3 und UF-182 wurden für 96 h in Ultra Low Attachment Sphäroid Platten mit normalem Medium kultiviert. Alle 24 h wurden mikroskopische Aufnahmen von diesen Sphäroiden/Aggregaten gemacht. Anschließend wurden die Sphäroide/Aggregate für weitere 48 h mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS behandelt. Detaillierte Beschreibung siehe Anhang, Skala entspricht 500  $\mu$ m

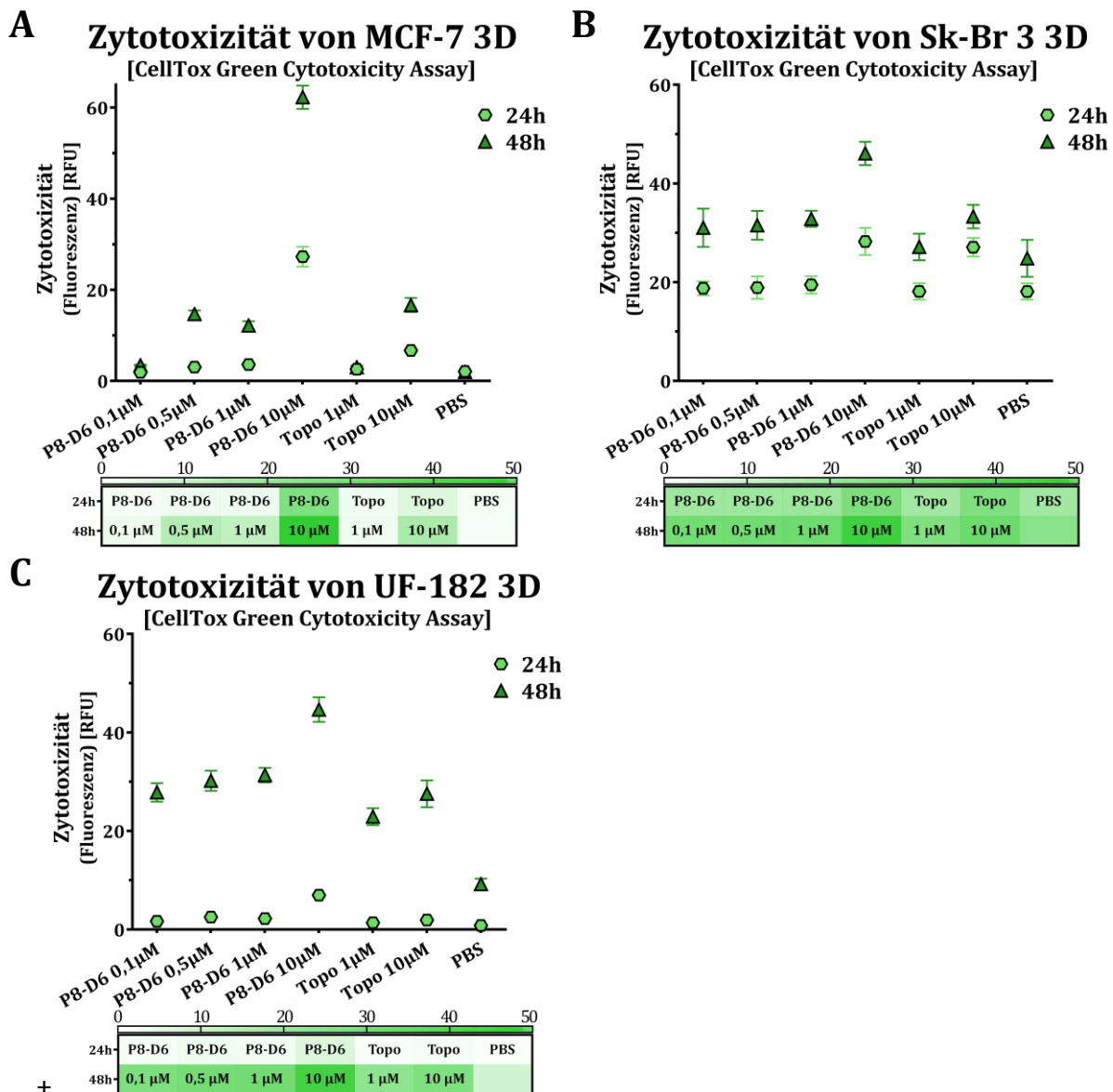
Zur Ermittlung der zytotoxischen Wirkung von P8-D6 gegenüber 3D- Sphäroiden/Aggregate des Mammakarzinoms wurde die in Abschnitt 3.2.5 beschriebenen Methode angewendet. Die mikroskopischen Aufnahmen nach 48 h Behandlung und CellTox Green Cytotoxicity Assay Inkubation zeigen in MCF-7 Aggregaten und UF-182-Sphäroiden

eindeutig verstärkte Fluoreszenzsignale für 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 Proben. Für Sk-Br3 Aggregate ist die erhöhte Zytotoxizität durch P8-D6 visuell kaum erkennbar (Abb.4.38).



**Abb.4.38: Mikr. Aufnahmen der Zytotoxizität von Mammakarzinom-Sphäroiden/Aggregaten**  
 Unterschiedliche Mammakarzinom-Sphäroide/Aggregate wurden mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS für 48 h behandelt und die Zytotoxizität mittels CellTox Green Cytotoxicity Assay bestimmt Skala entspricht 500  $\mu\text{m}$

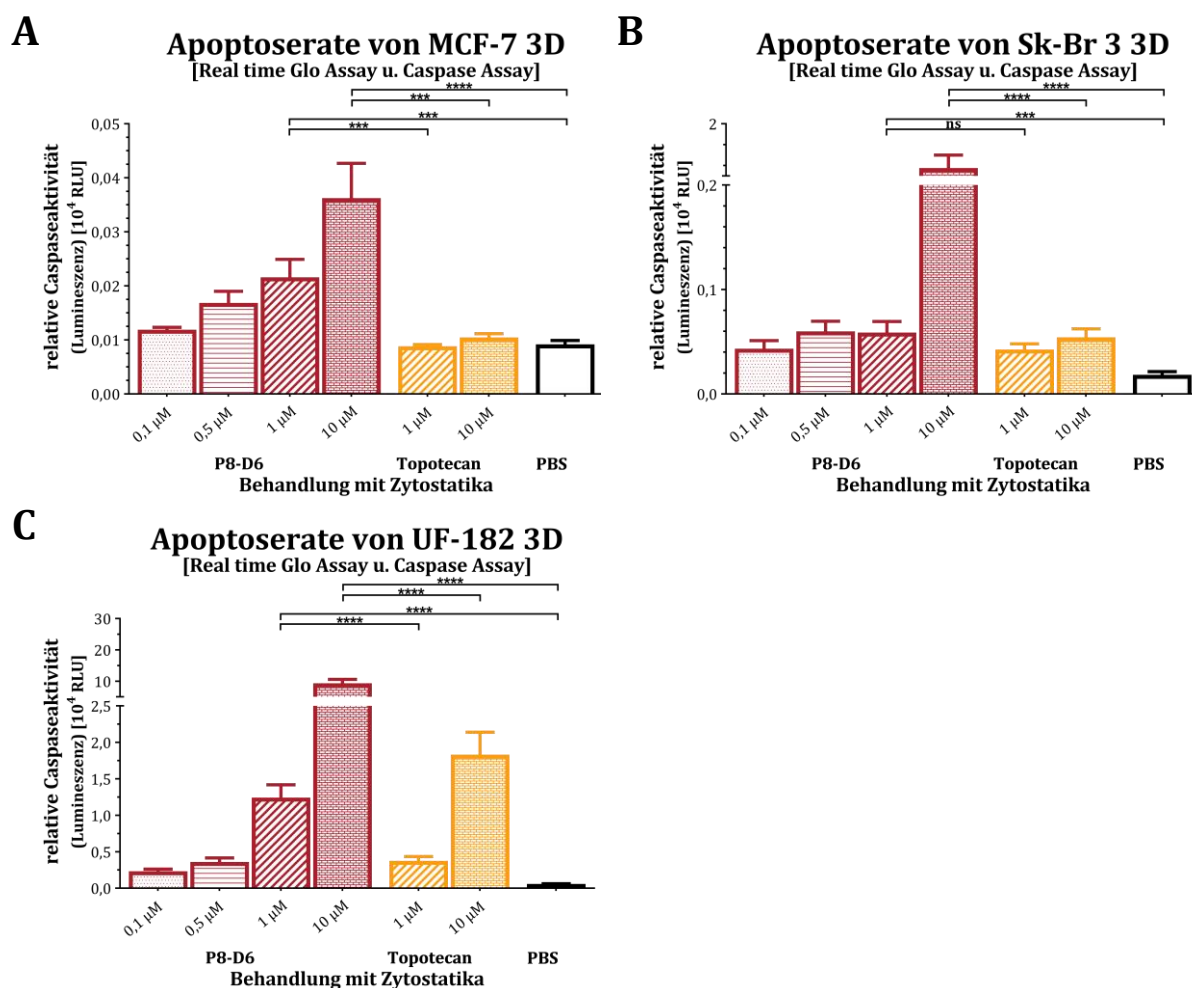
Dennoch zeigt die Quantifizierung auch hier nach 48 h ein verstärktes Fluoreszenzsignal in Sk-Br 3 Zellen im Vergleich zur Topotecan oder PBS Behandlung (Abb.4.40). Anhand der quantifizierten Ergebnisse wird nochmal sichtbar, dass die 48 h mit 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 Behandlungen in den getesteten Mammakarzinomzellen einen deutlichen Effektivitätsgewinn bewirken. Dies ist nicht nur im Vergleich zu Topotecan, sondern auch zu den weiteren getesteten P8-D6 Konzentrationen sichtbar. Die detaillierten Auflistungen der Fluoreszenzaufnahmen und Phasenkontrastbilder für 24 h und 48 h sind im Anhang Abb. VI Abb. VII und Abb. VIII aufgeführt.



**Abb.4.39: Zytotoxizität von Mammakarzinom-Sphäroiden/Aggregaten nach Behandlung**

Nach 24 h und 48 h Behandlung unterschiedlicher Mammakarzinom-Sphäroide/Aggregate mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS wurde die Zytotoxizität mittels CellTox Green Cytotoxicity Assay bestimmt. (n=3 +/- SEM). **A:** MCF-7, **B:** Sk-Br 3, **C:** UF-182

Die Apoptoseraten in den Sphäroiden und Aggregaten zeigen zellenübergreifend für die P8-D6 Behandlung auch hier eine hohe Effektivität und einen signifikanten Unterschied verglichen zur Topotecan-Behandlung und PBS Kontrolle (Abb.4.40). Ausgenommen ist die Behandlung mit 1 µM P8-D6 in den Sk-Br 3 Zellen im Vergleich mit Topotecan. Damit zeigt P8-D6 auch in der 3D Kultur fürs Mammakarzinom seine erhöhte Effektivität im Vergleich zu Standardtherapeutika.



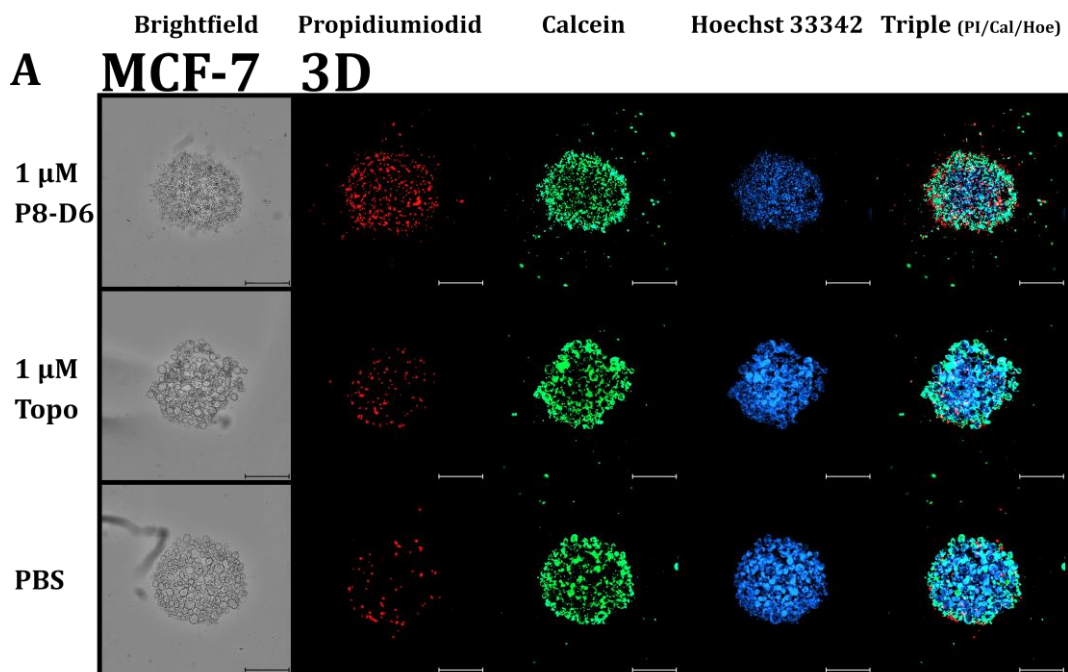
#### Abb.4.40: Apoptoseinduktion in Mammakarzinom-Sphäroiden/Aggregaten

Nach 48 h Behandlung unterschiedlicher Mammakarzinom-Sphäroide/Aggregate mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS wurde die relative Caspase 3/7-Aktivität mittels Emissions-Spektroskopie in den Zellen gemessen. (+ SD, one-way ANOVA, \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), \*\*\*\* (p < 0,0001)). A: MCF-7, B: Sk-Br 3, C: UF-182

Zur Verifizierung der Aufnahmen zur Zelltoxizität wurden weitere Lebend-Tot-Färbungen durchgeführt (Abb.4.41). Anhand der Lebend-Tot-Färbung ist erkennbar, dass alle getesteten Mammakarzinom-Aggregate/Sphäroide eine höhere Intensität an Propidiumiodidsignal als in der PBS und Topotecan-Kontrolle besitzen. Für die Sk-Br 3 Zellen sind diese Unterschiede weniger ausgeprägt als für MCF-7 und UF-182 Zellen. Mithilfe der Brightfield-Aufnahmen zeigt sich, dass durch die Behandlung das Konstrukt instabilisiert wurde und einzelne apoptotische Zellfragmente im Überstand verteilt sind. Diese Argumentation wird auch durch das verminderte Hoechst 33342 nochmal bestätigt. (Details Anhang Abb. XIIIAbb. XIVAbb. XV)

Ein weiterer Faktor, welcher durch Behandlung verändert sein kann, ist die Oberflächenbeschaffenheit der Sphäroide/Aggregate. Wie auch für die Ovarialkarzinom-Aggregate/Sphäroide beschrieben, scheint die Behandlung von P8-D6 eine gewisse Porosität der Strukturen zu bewirken (Abb.4.42). Diese Veränderungen sind auch für die

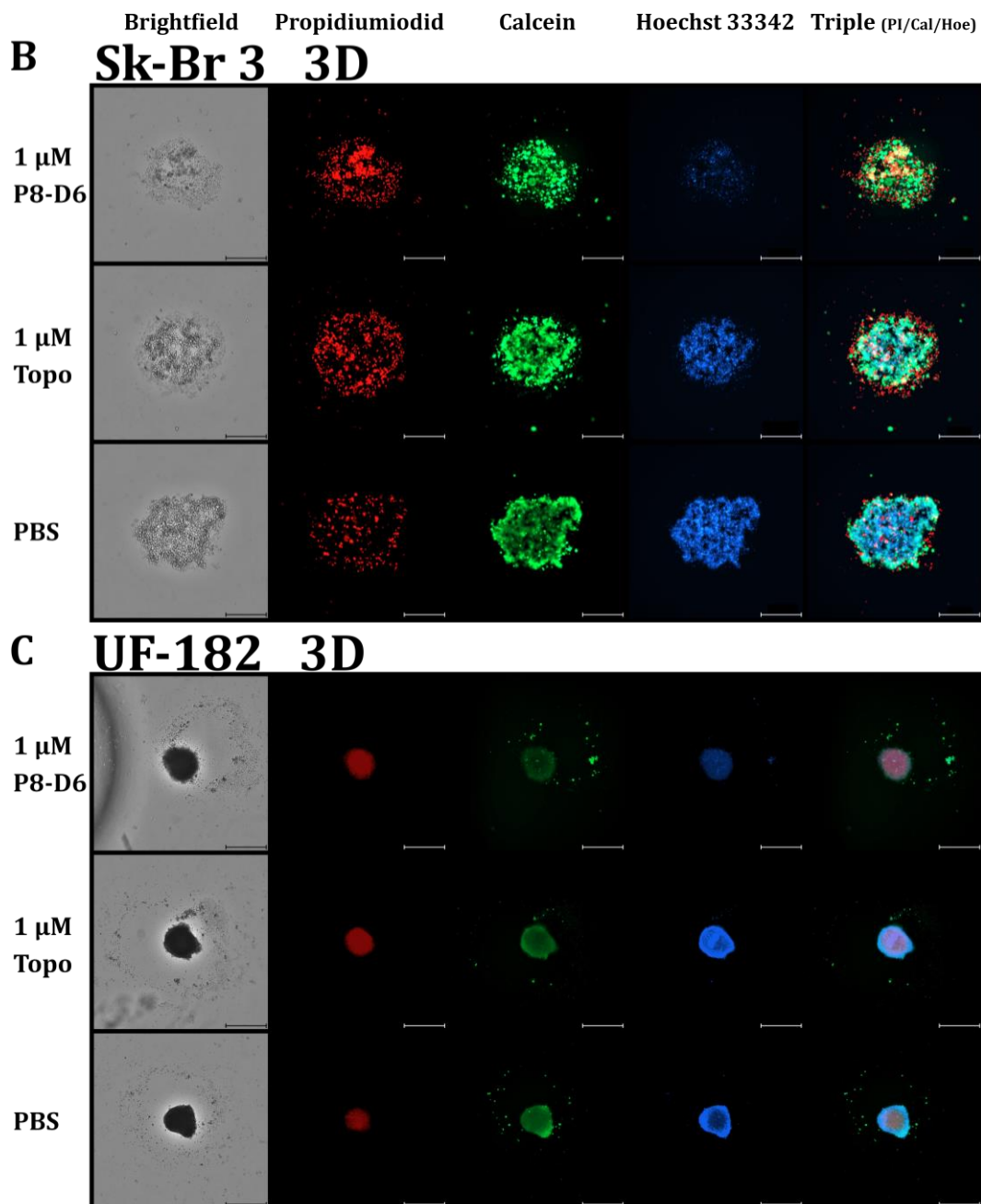
Sk-Br 3-Aggregate und UF-182-Sphäroide zu verzeichnen. Aufgrund der Instabilität der MCF-7 Aggregate konnte keine Fixierung und anschließende Vermessung mittels REM erfolgen. Sk-Br 3 Proben zeigen eine deutliche Veränderung der Struktur nach Behandlung. Die mit PBS als Negativkontrolle behandelten Aggregate weisen runde aneinandergelagerte Zellstrukturen auf. Die Größe der einzelnen Zellen ist relativ homogen, wie bereits in der Literatur für Sk-Br 3 Zellen beschrieben (Colone und Kaliappan, 2016). Auch sind in den Nahaufnahmen feste runde Strukturen sichtbar. Zwar ist keine Verschmelzung wie bei den Sphäroiden zu erkennen, trotzdem sind die Zell-Zell-Kontakte detektierbar. Für die mit P8-D6 behandelten Aggregate ist eine deutliche Veränderung in der Porosität zu erkennen. Auch verändert sich die Größenverteilung hin zu vermehrt kleineren Zellfragmenten.



**Abb.4.41: Lebend-Tot-Diskriminierung von Mammakarzinom-Sphäroiden nach Behandlung**

Nach 48 h Behandlung der Mammakarzinom Sphäroide MCF-7, Sk-Br 3 und UF-182 mit P8-D6 [1  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M] und PBS wurden die Zellen mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) angefärbt und mikroskopisch vermessen. **A:** MCF-7 **B:** Sk-Br 3 **C:** UF-182, Skala entspricht 500  $\mu$ m

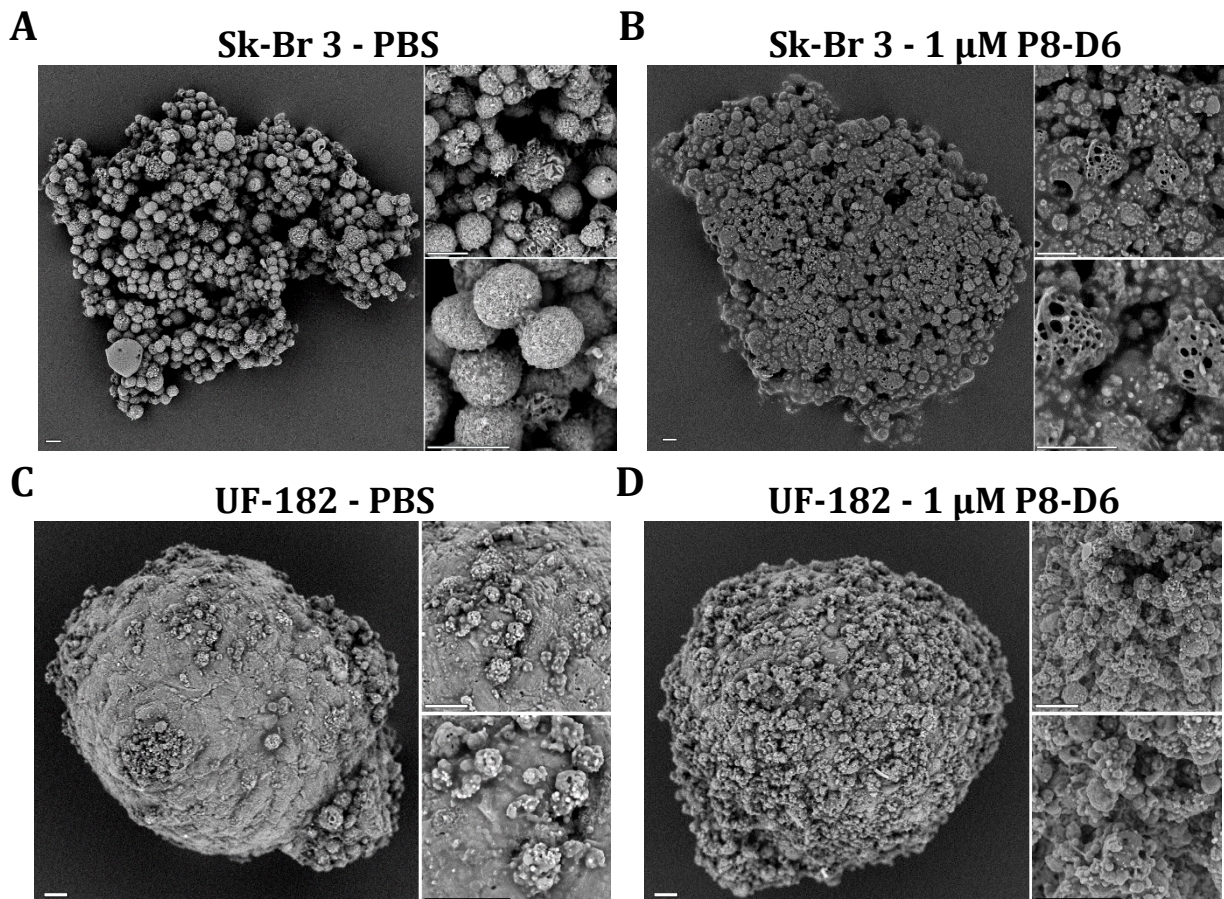




**Abb.4.41: Lebend-Tot-Diskriminierung von Mammakarzinom-Sphäroiden nach Behandlung**  
 Nach 48 h Behandlung der Mammakarzinom Sphäroide MCF-7, Sk-Br 3 und UF-182 mit P8-D6 [1  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M] und PBS wurden die Zellen mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) angefärbt und mikroskopisch vermessen. A: MCF-7 B: Sk-Br 3 C: UF-182, Skala entspricht 500  $\mu$ m

Für die UF-182 Zellen, die bereits anhand der Phasenkontrastaufnahmen als Sphäroide charakterisiert wurden, kann diese Klassifizierung bestätigt werden. Die REM-Aufnahmen zeigen eine deutliche Netzbildung. Diese Sphäroide lassen wie auch schon für die OvCar8 Zellen beschrieben keine Einzelzellstruktur mehr erkennen, sondern scheinen ineinander zu verschmelzen. Dadurch entsteht eine sehr kompakte und glatte Oberfläche. Durch die P8-D6 Behandlung verlieren die UF-182-Sphäroide diese glatte Oberfläche. Das Zytostatikum greift die Zellen an, sodass diese apoptotisch und porös werden. Anhand der

Nahaufnahmen wird auch deutlich, dass sich Zellfragmente bilden, welche sich dann langsam von der Oberfläche ablösen können. Zusammenfassend zeigen die REM-Untersuchungen, dass die P8-D6-Behandlung zellenübergreifend einen deutlichen Effekt auf die 3D-Struktur und vor allem auf die Oberflächenbeschaffenheit hat. Diese entstehende Porosität zeigt ein Absterben der Zellen innerhalb der 3D-Struktur.



**Abb.4.42: REM Aufnahmen von behandelten und unbehandelten Mammakarzinom-Sphäroiden**  
Die Mammakarzinom-Aggregate/Sphäroide Sk-Br 3 und UF-182 wurden für 96 h Wachstumsphase für weitere 48 h mit P8-D6 [1 µM] und PBS behandelt. Anschließend erfolgten eine Fixierung und Dehydrierung, Trocknung und Goldbeschichtung. Im Anschluss erfolgte die Rasterelektronenmikroskopische Vermessung. **A, B:** Sk-Br 3, **C, D:** UF-182, Skala entspricht 20 µm,

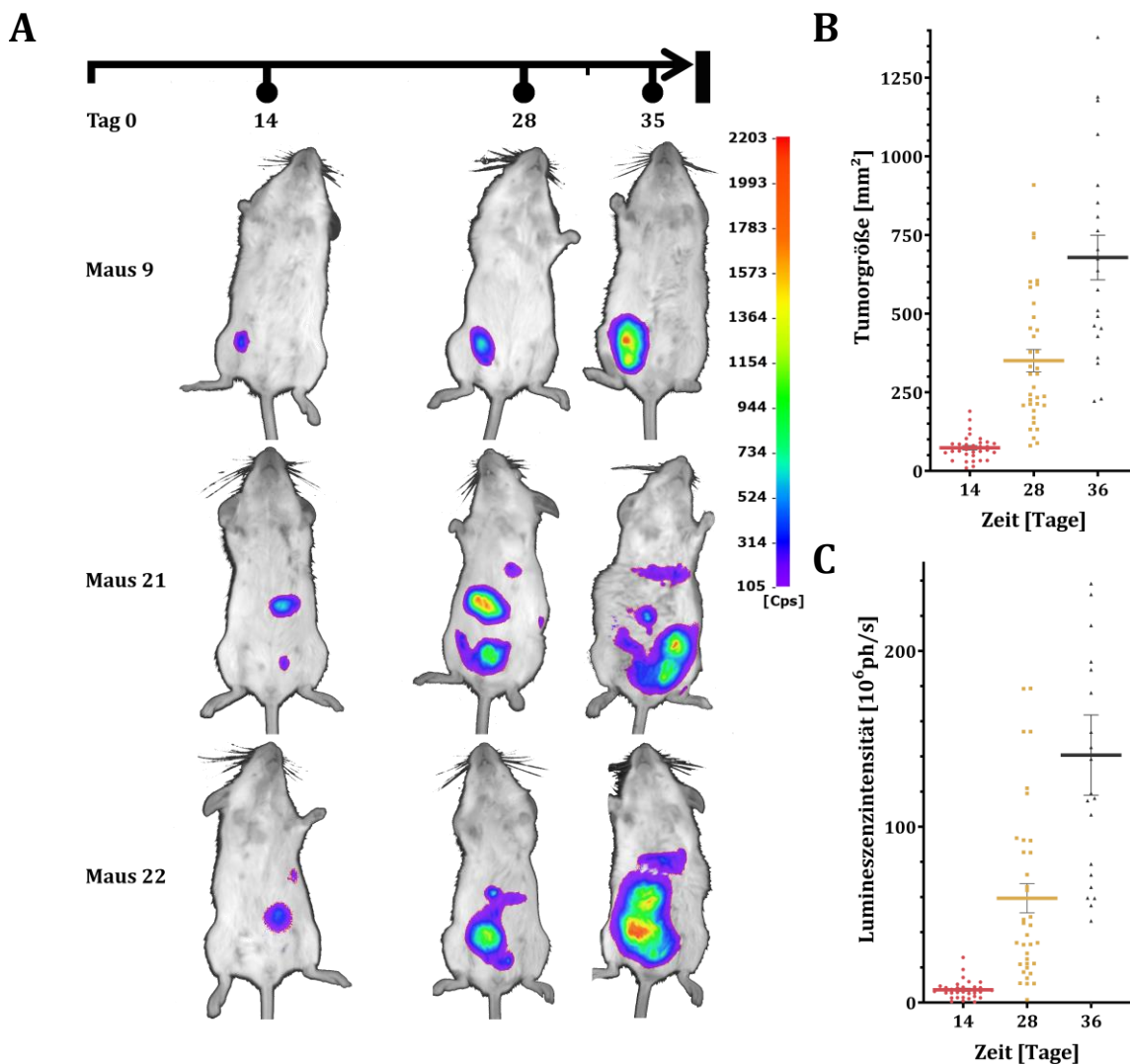
## 4.5 *In vivo* Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell

Tierversuche zur Arzneistofftestung liefern unerlässliche Daten zu Prozessen des Wirkstoffs im lebenden Organismus. Für die Entwicklung und Zulassung von Arzneimitteln, gerade in der Onkologie, sind diese Arten von Tierversuchen vorgeschrieben, um Wirksamkeit, Verträglichkeit, Sicherheit und Qualität neuer Medikamente zu untersuchen. Um die Wirksamkeit und Toxizität von P8-D6 weiter auf *in vivo* Ebene zu untersuchen, wurden Experimente mit SCID/beige-Mäusen, die humane Ovarialkarzinome injiziert bekommen haben, durchgeführt. Die Studiendesigns sind in Abschnitt 3.4 detailliert beschrieben

### 4.5.1 Erste Behandlungsstudie

Das Studiendesign der zuerst durchgeführten Behandlungsstudie mit 36 SCID/beige-Mäusen basierte auf dem 2010 von Bauerschlag *et al.*, publizierten Versuchsschema. Hierfür wurden den Mäusen je  $5 \times 10^6$  SKOV-3 luc-Zellen injiziert. Es erfolgte eine Messung zur Kontrolle des Tumorwachstums an Tag 14. An Tag 28 wurde erneut das Lumineszenzsignal zur Ermittlung der Tumorgröße bestimmt. Anschließend erfolgte Lumineszenzmessung mit Narkotisierung 1x wöchentlich. In Abb.4.43 A ist beispielhaft der Wachstumsverlauf der Tumore von drei Mäusen gezeigt. Das Biolumineszenzsignal wurde von den Tumorzellen nach Gabe von Luciferin generiert und konnte gemessen werden. Aus diesen Daten wurde dann die Tumorgröße und die Lumineszenzintensität ermittelt (Abb.4.43 A, B). Trotz der geringen Anzahl an Messpunkten scheint die Tumorgröße einen linearen Wachstumsanstieg zu verzeichnen. Für die Lumineszenzintensität wäre auch ein exponentieller Verlauf denkbar, jedoch sind hierfür zu wenige Messpunkte erfasst worden.

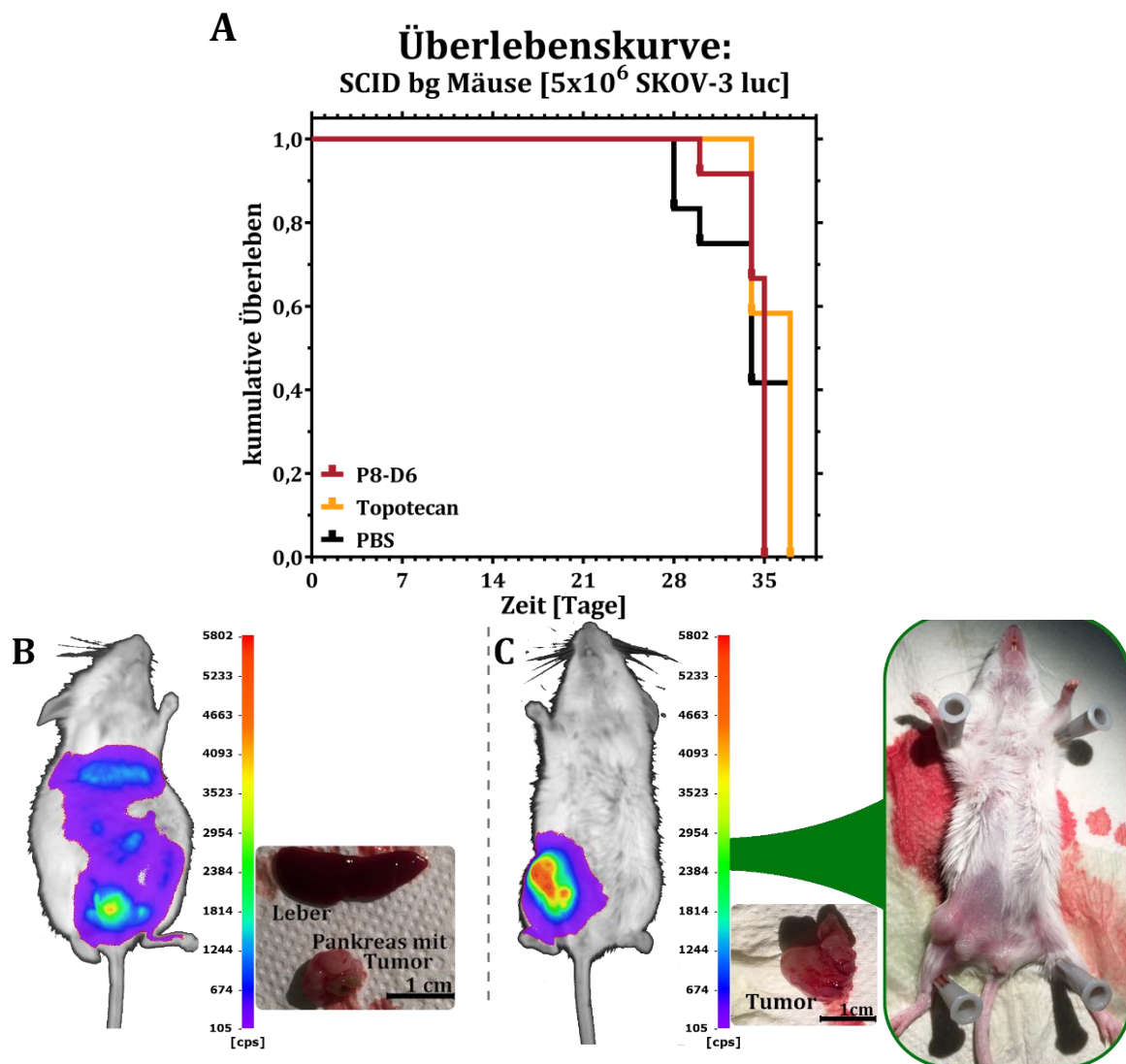
An Tag 28 wurde dann die erste der 16 geplanten Behandlungen durchgeführt. Bereits bis Tag 28 mussten vier Mäuse aufgrund einer möglichen Exulzeration des Tumors aus dem Versuch genommen werden. Für die restlichen 32 Tiere wurde die Zytostatika-Therapie an Tag 28 und Tag 30 durchgeführt. Alle im Versuch verbliebenen 32 Tiere mussten aufgrund der Belastung durch das Tumorwachstum innerhalb der nächsten 9 Tage euthanasiert werden (Abbruchkriterien) oder verstarben auf Grund des massiven Wachstums trotz intensiver Kontrollen (Abb.4.44 A). Die Überlebenskurve ermittelt hier einen p-Wert von 0,3660 (Statistische Testung: Logrank test for trend) (Abb.4.43 A). Gründe für die Euthanasie (zervikale Dislokation) bzw. das Versterben dieser Mäuse waren entweder eine große blutbeigemengte perakute Aszitesbildung oder ein intramuskulärer Tumor, welcher an einer der beiden Flanken lokalisiert war und zu einer möglichen Tumorexulzeration hätte führen können (Abb.4.44 B, C). Während der Sektion und mittels der Lumineszenzaufnahmen konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen sich entweder im Pankreas oder im Muskelgewebe der Flanke angesiedelt haben. Die Lokalisation des intramuskulären Tumors kann nicht durch fehlerhafte Injektion erklärt werden.



**Abb.4.43: Tumorwachstum der ersten *in vivo* Behandlungsstudie**

36 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $5 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 14, Tag 28 und Tag 36 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. **A:** Lumineszenzmessungen der Maus 9, Maus 21, Maus 22 (alle PBS Behandlung) zur Detektion des Tumors. **B:** Verteilung der Tumorgröße für Tag 14, Tag 28 und Tag 36 für alle 36 SCID/beige-Mäuse. **C:** Lumineszenzintensität für Tag 14, Tag 28 und Tag 36 für alle 36 SCID/beige-Mäuse.

Da das Modell vor einigen Jahren mit SCID/beige-Mäusen und SKOV-3 luc Zellen in der Arbeitsgruppe Bauerschlag etabliert wurde, war mit dem massiven Tumorwachstum mit starker Aszitesbildung und intramuskulären Tumoren nicht zu rechnen. Die Ergebnisse zeigen, dass die zweifache Gabe der Zytostatika nicht der Grund für das Erreichen der Abbruchkriterien war, da alle Mäuse aus allen Behandlungsgruppen betroffen waren. Die Vermutung legt nahe, dass die Tumorzellen aus ungeklärter Ursache (Kultivierungsbedingungen; Unterschiede in der Mauslinie durch genetischen Drift oder Shift) deutlich aggressiveres Anwachsen bzw. Aszites ausbildet als in der 2010 publizierte Studie. Aus diesem Grund wurde das Modell erneut etabliert (Methodenetablierung Abschnitt 3.4.3), um anschließend eine leicht veränderte Behandlungsstudie durchzuführen (Abschnitt 4.5.3).



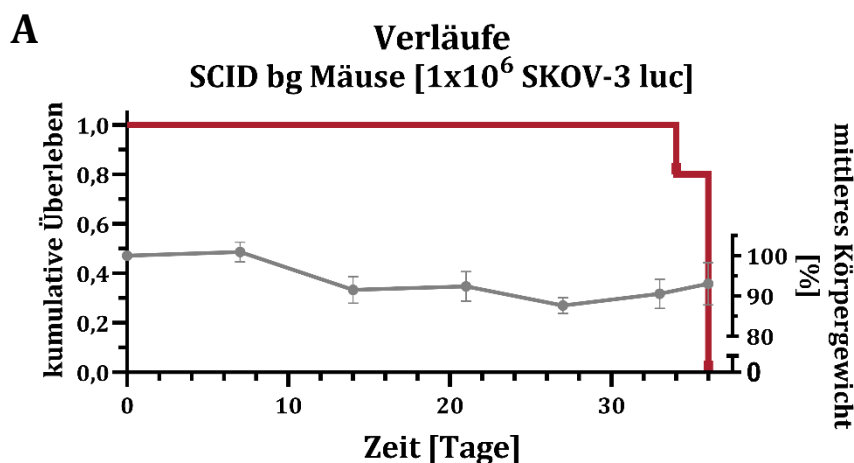
#### Abb.4.44: Überlebenskurve

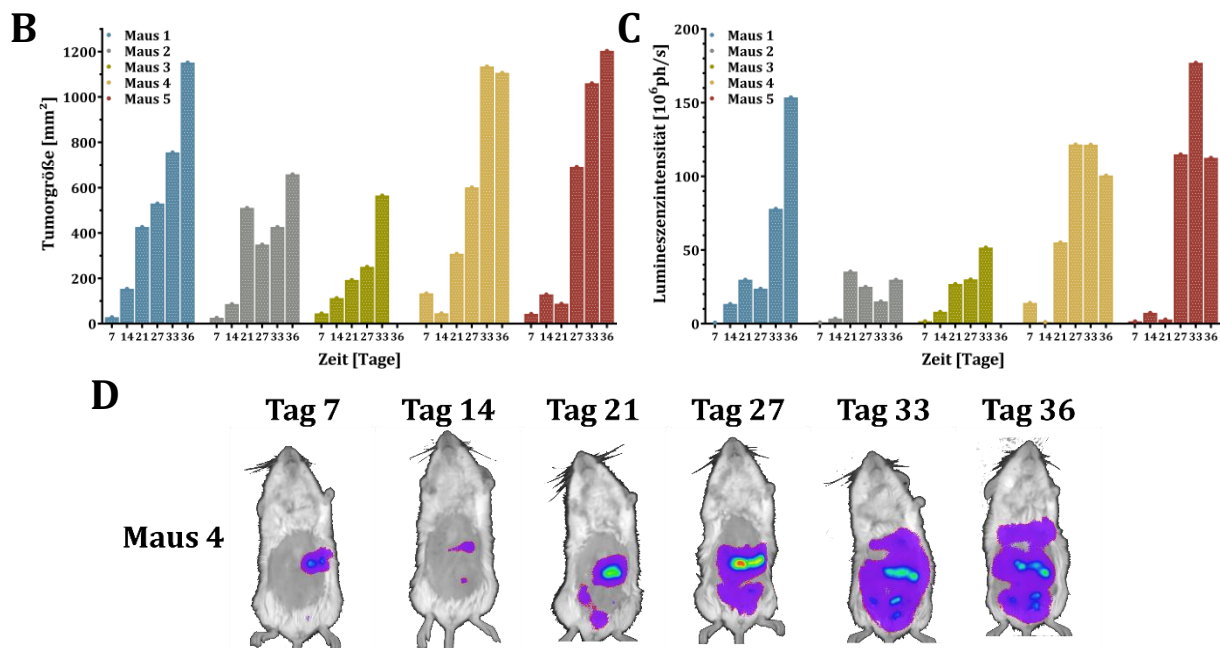
36 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0  $5 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert. Bis zum Tag 37 wurden alle Tiere aus dem Versuch genommen. **A:** Überlebenskurve: Vergleich der Behandlungsgruppen P8-D6, Topotecan, PBS im Überleben (2x Behandlung) p-Wert: 0,3660 **B:** Maus 7 zervikale Dislokation wegen perakuter Aszitesbildung, Sektion der Leber und des Pankreas mit Tumor. **C:** Maus 30 zervikale Dislokation wegen intramuskulärem Tumor und möglicher Tumorexulzeration.

### 4.5.2 Methodvalidierung

Aufgrund des schweren Verlaufs der Behandlungsstudie in Abschnitt 4.5.1 wurde der *in vivo* Mausversuch erneut mit 5 SCID/beige-Mäusen etabliert, bevor eine weitere Behandlungsstudie begonnen werden konnte. Den 5 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen *i.p.* injiziert. Anschließend erfolgte eine wöchentliche Messung der Tumorgöße mittels Lumineszenz und Ultraschall sowie die Körpergewichtsbestimmung. Das minimale Körpergewicht der Mäuse lag dabei bei 85 % verglichen zum Zeitpunkt der Tumordinjektion (Abb.4.45 A). Ab der ersten Messung an Tag 7 konnten in allen Tieren Minitumore sowohl mittels Ultraschalles als auch mit Lumineszenzmessung detektiert werden. Exemplarisch von einem Tier ist der wöchentliche Lumineszenz-

Verlauf des Tumorwachstums dargestellt (Abb.4.45 D). Die Tumorzellen haben sich dabei nach der Injektion vermehrt in Pankreasnähe angesiedelt. Im weiteren Verlauf des Versuches wurde der Tumor auch in der Nähe der Leber lokalisiert. Außerdem konnte ein weiterer kleiner Tumor leicht unterhalb der Einstichstelle lokalisiert werden (Tab. 4.3). In der täglichen Kontrolle des Allgemeinzustands der Tiere wurde an Tag 34 eine Maus gefunden, die laut Obduktion einer Tierärztin wahrscheinlich an Herzversagen verstarb. Dies geschah sehr wahrscheinlich unabhängig von dem durchgeführten Tierversuchsvorhaben. In der wöchentlichen Lumineszenz- und Ultraschallmessung am Tag zuvor war kein Abbruchkriterium erreicht worden. An Tag 36 wurden die weiteren 4 Tiere aufgrund einer Größe des Tumors von 1 cm (Abbruchkriterium) und leichter Aszitesbildung aus dem Versuch genommen. Die vier Mäuse wurden vor Versuchsende nochmal mittels Ultraschall- und Lumineszenzmessung untersucht. Anschließend erfolgten die zervikale Dislokation und die Sektion der Tumore sowie bestimmter Organe. Die Überlebenskurve in Abb.4.45 A zeigt den zeitlichen Verlauf des Experiments. Die Messung der Lumineszenzsignale der Tumoren zeigt einen deutlichen Anstieg der Tumorgröße und des Lumineszenzsignals im Verlaufe der Studie. Einzelne Messungen zeigen ein schrumpfen des Tumors (Abb.4.45 B), welches durch die Ultraschallmessung jedoch widerlegt werden konnte (Abb.4.46). Das bedeutet, dass auch die Lumineszenzmessung eine gewisse Ungenauigkeit aufweist. Auch ein linearer Anstieg kann nicht deutlich herausgearbeitet werden.





**Abb.4.45: Tumorwachstum der *in vivo* Methodenentwicklung**

5 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und ab Tag 7 wöchentlich das Tumorwachstum mittels Lumineszenzmessung bestimmt, sowie der Allgemeinzustand der Tiere begutachtet. **A:** Überlebenskurve, Gewichtsveränderungen im Verlauf der Studie. **B:** wöchentliche Veränderungen der Tumorgroße pro Maus. **C:** wöchentliche Veränderungen der Lumineszenzintensität pro Maus. **D:** Lumineszenzmessungen der Maus 4 zur Detektion des Tumors.

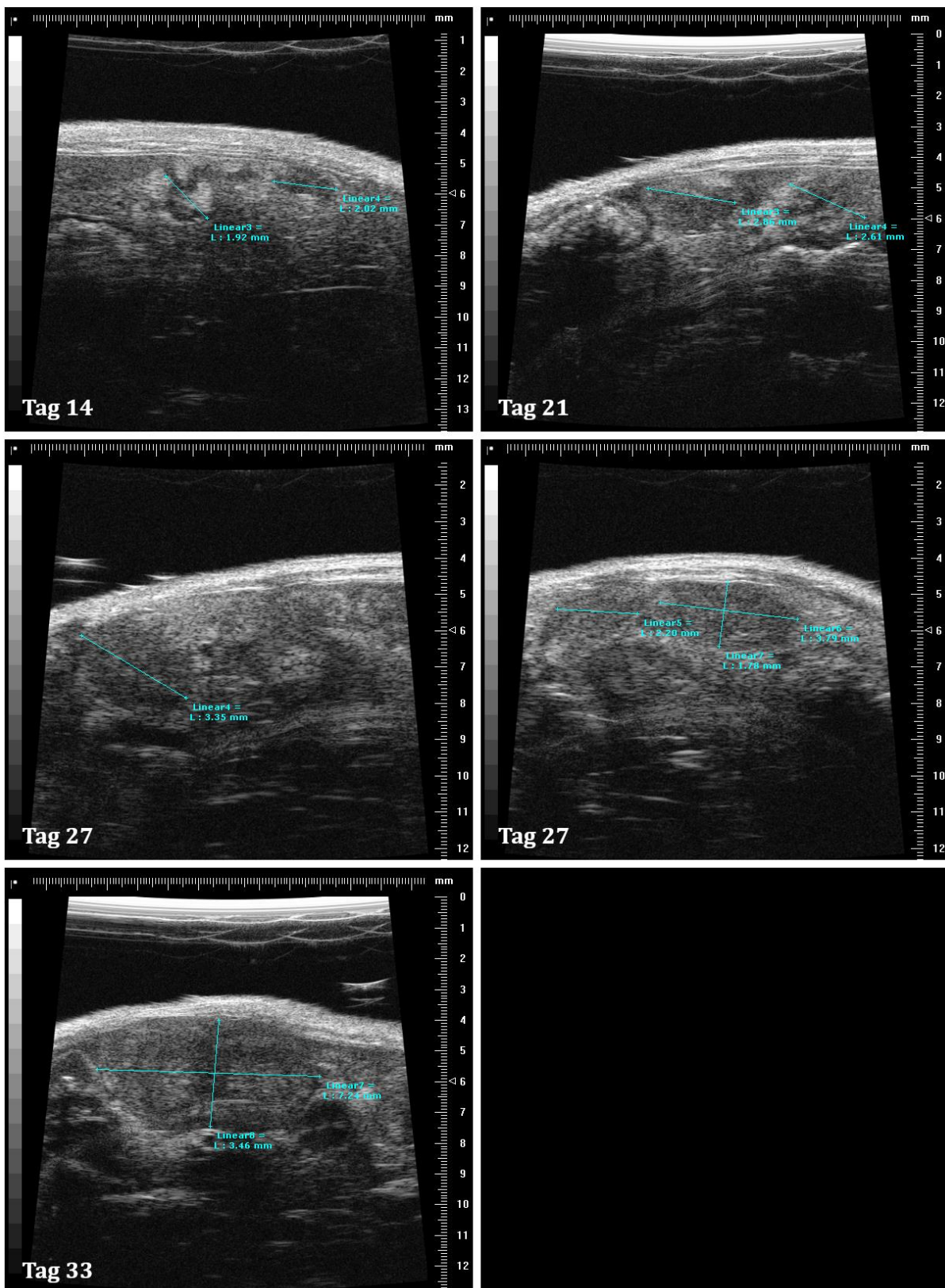
Um weitere Kontrolldaten neben der Lumineszenzmessungen zu nutzen, wurden die Mäuse während der Narkose auch per Ultraschall untersucht. Diese Untersuchungsmethode lieferte eine Abschätzung der Tumorgroße. Wie bereits beschrieben konnten bereits am Tag 7 Tumore  $<1\text{mm}$  in allen 5 Mäusen detektiert werden. Der Verlauf der Größenentwicklung gemessen mit Ultraschall ist in Tab. 4.3 dargelegt. Anhand der Ultraschallaufnahmen konnte auch die genaue Lokalisation des Tumors detektiert werden. Auffallend ist, dass in allen Mäusen ein Primärtumor kranial am Pankreas lokalisiert ist. Abb.4.46 zeigt die zugehörige, wöchentliche Ultraschalldokumentation der Maus 4 über den gesamten Versuchsverlauf.

Tab. 4.3: Ultraschalluntersuchung während der Methodenetablierung

Ultraschall	Tumorgröße (Pankreas kran.)	Lokalisation	
<b>Maus 1</b>	Tag 7	Ø 0,5-0,8 mm	
	Tag 14	Ø 1 mm	
	Tag 21	Ø 1 mm	<b>Pankreas (kranial)</b> Applikationsstelle Abdomina (kaudal)
	Tag 27	Ø 5,1 mm	
	Tag 33	5,8 mm x 2,8 mm	
	Tag 36	7,5 mm x 3,2 mm	
Sektion	primär: kran. Pankreas, sekundär: Leber; Aszites		
<b>Maus 2</b>	Tag 7	Ø 0,9 mm	
	Tag 14	Ø 1 mm	
	Tag 21	Ø 2,5 mm	<b>Pankreas (kranial u. kaudal)</b> Abdomina (kaudal, sinister) Leber (infra)
	Tag 27	Ø 4,4 mm	
	Tag 33	8,8 mm x 5,9 mm (Pankreas kaudal)	Harnblase
	Tag 36	6 mm x 5 mm (unter Leber); 2,9 mm x 2,4 mm (Harnblase)	
Sektion	primär: kran. Pankreas, multiple Tumore (Milz, Leber); Aszites		
<b>Maus 3</b>	Tag 7	Ø 0,5 mm; Ø 0,3 mm	
	Tag 14	Ø 2,5 mm	
	Tag 21	Ø 3,5 mm	<b>Pankreas (kranial)</b>
	Tag 27	6 mm x 2,5 mm	
	Tag 33	8 mm x 3,5 mm	
	Sektion	Tot an Tag 34 – Herzversagen; Aszites (hämor.)	
<b>Maus 4</b>	Tag 7	Ø 1 mm	
	Tag 14	2x Ø 2 mm	
	Tag 21	2,8 mm x 2,6 mm	<b>Pankreas (kranial)</b> Milz (kranial)
	Tag 27	Ø 3,4 mm; 2,2 mm x 1,5 mm; 3,8mm x 1,8mm	
	Tag 33	7,2 mm x 3,5 mm; Aszites	
	Tag 36	10 mm Länge; Aszites	
Sektion	primär: kran. Pankreas, multiple Tumore (Milz, Leber); Aszites (hämor.)		
<b>Maus 5</b>	Tag 7	Ø 0,8 mm	
	Tag 14	Ø 1 mm	
	Tag 21	3x Ø 2 mm	<b>Pankreas (kranial u. kaudal)</b> Abdomina (Eierstock)
	Tag 27	Ø 4 mm; Ø 3 mm;	
	Tag 33	5,6 mm x 3,3 mm; 5 mm x 3 mm	
	Tag 36	12 mm Länge	
Sektion	primär: kran. Pankreas, multiple Tumore (Milz, Leber); Aszites (hämor.)		



## Maus 4

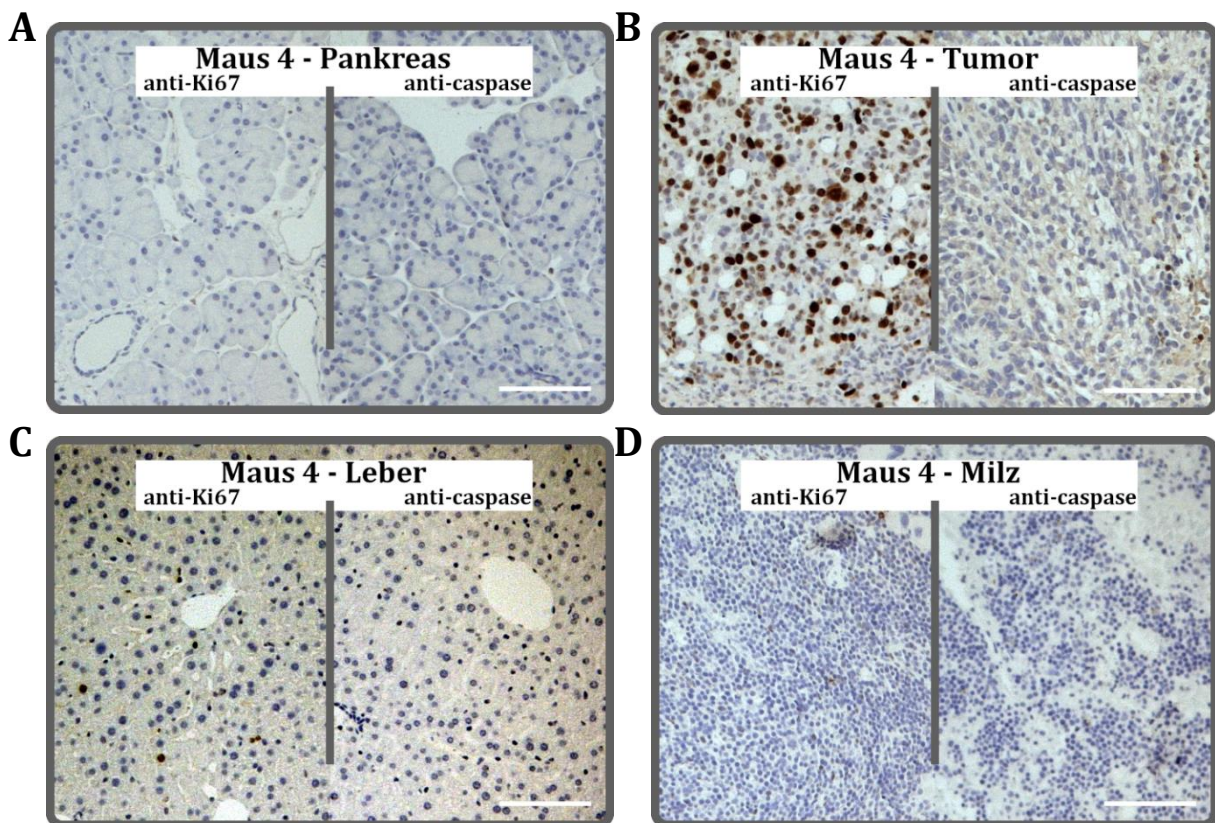


**Abb.4.46: Tumorwachstum der ersten *in vivo* Behandlungsstudie**

Während der Methodenetablierung wurden zusätzlich zu den Biolumineszenzmessungen auch Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Mithilfe dieser Methode konnte ohne invasiven Eingriff das Tumorwachstum beobachtet und mit den Messungen der Biolumineszenz verglichen werden. Die Ultraschallaufnahmen zeigen repräsentativ die Messungen an Tag 14, Tag 21, Tag 27 und Tag 33 für die Maus 4.

Durch die deutliche Verminderung der Zellzahl von  $5 \times 10^6$  auf  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen und die deutlich frühere Detektion der Tumore konnte das Tumorstadium besser kontrolliert werden. Deshalb wurde diese Methodenentwicklung als Grundlage für die zweite Behandlungsstudie gewählt.

Zudem wurden für die Gewebe und Tumore aus der Methodenentwicklung erste immunhistologische Färbungen angefertigt (Abb.4.47). Hierbei wurden HE-Färbungen, Cleaved Caspase-3 und Ki-67 Antikörper-Färbungen durchgeführt. Diese Untersuchung diente der Etablierung der Färbungen für die nachfolgende Behandlungsstudie. Die immunhistologischen Schnitte zeigen deutlich, dass der Proliferationsmarker Ki67 die vermehrte Zellteilung im Tumorgewebe detektieren kann. Zudem konnten kleine Areale nachgewiesen werden, in denen die Caspase leicht erhöht war. Da keine Behandlung mit Zytostatika durchgeführt wurde, war jedoch auch keine erhöhte Caspaseaktivität zu erwarten.



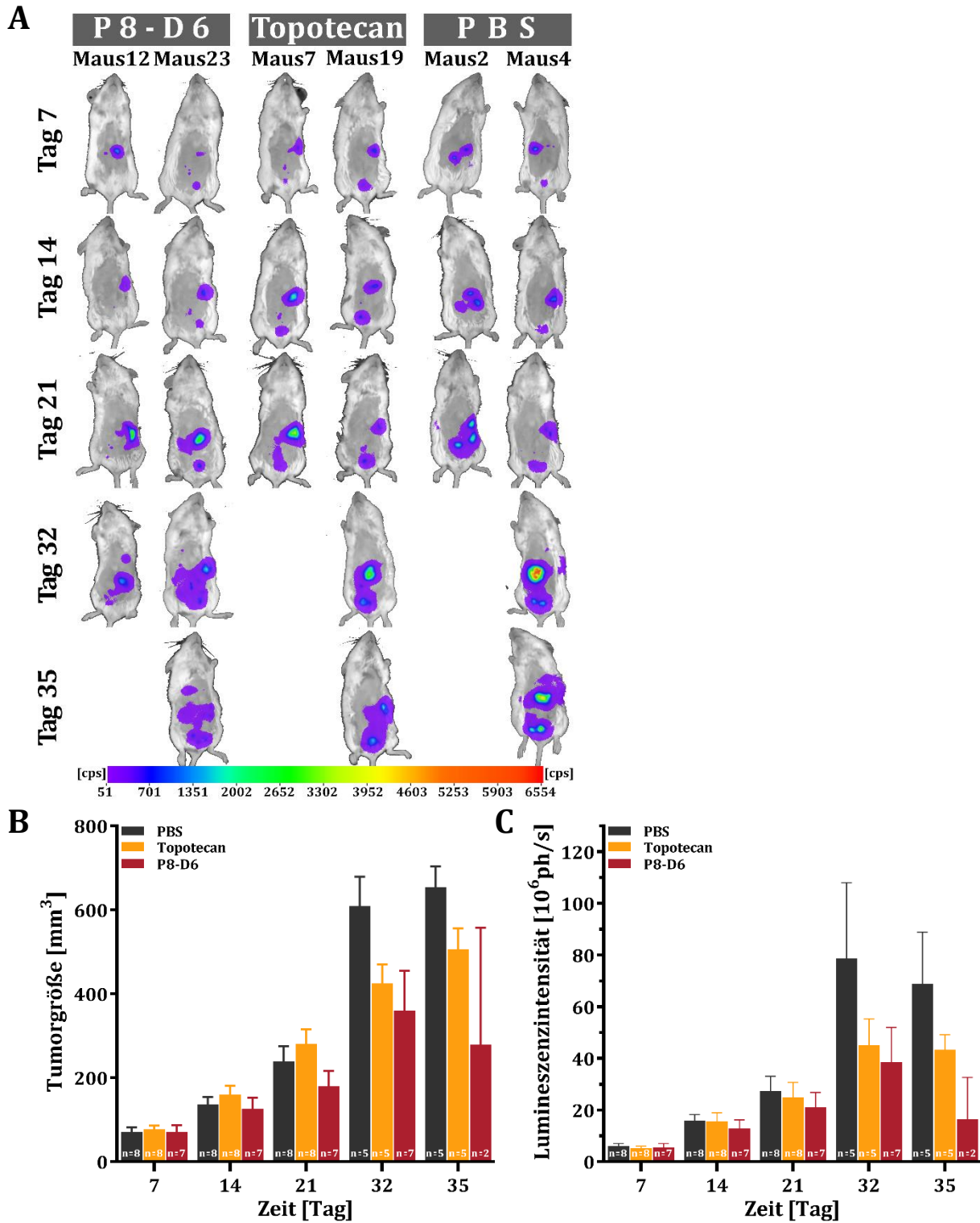
**Abb.4.47: Immunhistologische Untersuchungen unterschiedlicher Gewebe der Maus nach Methodenentwicklung**

Nach Erreichen der Abbruchkriterien (Tag 36) während der Methodenentwicklung wurden den Mäusen Gewebeprobe entnommen. A-E zeigen repräsentative histologische Schnitte durch Pankreas, Tumor, Leber und Milz eines Versuchstieres nach Färbung von Ki67 und Cleaved Caspase-3.

### 4.5.3 Zweite Behandlungsstudie

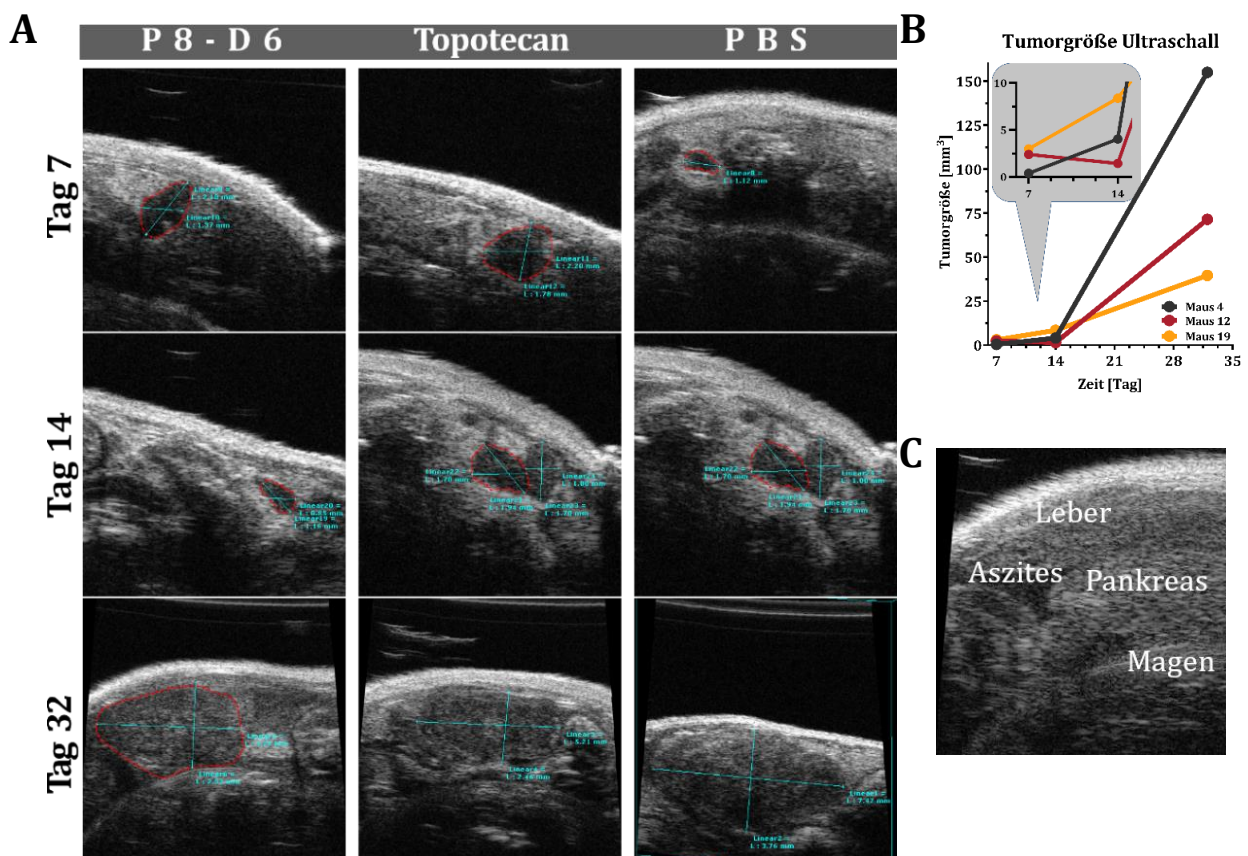
Aufbauend auf den Erkenntnissen der ersten Behandlungsstudie mit 36 SCID/beige-Mäusen mit einem unkontrollierten Tumorwachstum und der anschließend durchgeführten Etablierungsstudie mit 5 Mäusen, wurde eine leicht abgewandelte zweite Behandlungsstudie durchgeführt. Wie den Methoden in Abschnitt 3.4.4 zu entnehmen ist, wurde in dieser zweiten Behandlungsstudie die Menge der injizierten SKOV-3 luc Tumorzellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Maus (*i.p.*) reduziert. Zudem erfolgte die Kontrolle des Tumorwachstums via Biolumineszenz- und Ultraschallmessung ab Tag 7 und die Behandlung ab Tag 8. Darüber hinaus erfolgte eine Reduktion der Behandlungsdosis auf 0,5 mg/kg KG aufgrund von weiteren Erkenntnissen der AG Peipp zur Toxizität in SCID/beige-Mäusen. Die AG Peipp berichtete von einer MTD in SCID/beige-Mäusen von 1 mg/kg KG bei einer 4-fach *i.v.* Gabe.

Nach Injektion der humanen Ovarialkarzinomzellen, konnte bereits an Tag 7 in 23 Mäusen ein gutes Tumorsignal detektiert werden. Die Behandlung ab Tag 8 erfolgte *i.v.* in 3 Gruppen, P8-D6 [0,5 mg/kg KG], Topotecan [0,5 mg/kg KG] und PBS, zweimal wöchentlich. Neben der Wachstumskontrolle des Tumors via Biolumineszenz und Ultraschall wurde eine Gewichtskontrolle durchgeführt. In der Abb.4.48 A sind die Biolumineszenzaufnahmen von Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 32 und Tag 35 für zwei exemplarisch Mäuse aus jeder Gruppe aufgeführt (detaillierte Aufzeichnung Anhang Abb. XVIII). Es erfolgte aufgrund von technischen Problemen mit dem Messgerät keine Messung an Tag 28. Aus den Aufnahmen von Tag 7 und den Auswertungen der Tumorgröße und der Signalstärke des Biolumineszenzsignals (Abb.4.48 B, C) ist zu entnehmen, dass die Tumormenge pro Maus zum ersten Messpunkt (Tag 7) relativ konstant in allem Mäusen war. Nach den ersten beiden Behandlungen an Tag 8 und Tag 11 erfolgte eine weitere Messung des Tumorsignals an Tag 14. Für diese Messung lässt sich eine leichte Tendenz der besseren Tumorwachstumshemmung durch P8-D6 zeigen. Dieser Effekt verstärkt sich im Laufe der Zeit. Dies sind erste *in vivo* Hinweise für eine antitumorale Wirkung von P8-D6 bei der Therapie des Ovarialkarzinoms.



**Abb.4.48: Tumorstadium der zweiten *in vivo* Behandlungsstudie – Biolumineszenz**  
 24 SCID/beige-Mäuse wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 32, Tag 35, Tag 39 und Tag 42 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. Die Tiere wurden zweimal-wöchentlich mit P8-D6, Topotecan oder PBS behandelt. **A:** Exemplarische Lumineszenzmessungen der Maus 12 und Maus 23 aus der P8-D6-Gruppe, der Maus 7 und Maus 19 aus der Topotecan-Gruppe und der Maus 2 und Maus 4 aus der PBS-Gruppe zur Detektion des Tumors und Menge an Tumormaterial. Verteilung der Tumorstadium (**B**) und der Lumineszenzintensität (**C**) aller Mäuse für Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 32, Tag 35 und Tag 39 bezogen auf die jeweilige Behandlung.

Neben den Biolumineszenzuntersuchungen wurde die Tumorgröße auch per Ultraschall vermessen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die schnelle Erkennung von Aszites. Die Abb.4.49 A zeigt exemplarisch für jede Behandlungsgruppe den Verlauf des Tumorzustands einer Maus von Tag 7 zu Tag 14 und Tag 32. Die Aufnahmen können zeigen, dass an Tag 7 die Tumore relativ gleichgroß waren. PBS zeigt einen etwas kleineren Tumor verglichen zu Topotecan oder P8-D6. An Tag 14 konnte P8-D6 eine Tumorreduktion verursachen, hingegen zeigte die Kontrollen ein Tumorzustand. Eine deutliche Raumforderung der Tumorzellen konnte in der PBS-Kontrolle an Tag 32 vermessen werden. Verglichen dazu zeigen P8-D6 und Topotecan an diesem Messpunkt eine deutliche Zustandsreduktion des Tumors. Dabei liegt Topotecan noch sichtlich unter der Zustandsreduktion von P8-D6. Die Vermessung erfolgte mittels 3D-Ultraschall, sodass diese Ergebnisse quantifiziert werden konnten und in Abb.4.49 B dargestellt sind.



**Abb.4.49: Tumorzustand der zweiten *in vivo* Behandlungsstudie – Ultraschall**

24 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und ab Tag 7 erfolgte zweimalwöchentlich eine Ultraschalluntersuchung und eine Behandlung mit P8-D6 und Kontrollen ab Tag 8. **A:** Exemplarische Ultraschallmessung der Maus 12 [P8-D6], Maus 19 [Topotecan] und der Maus 4 [PBS] zur Detektion des Tumorzustand von Tag 7 zu Tag 14 und Tag 32. **B:** Quantifizierung der Tumorzustand (3D Ultraschall) der Maus 4, Maus 12 und Maus 19 **C:** Ultraschallaufnahme der Maus 12 an Tag 32, die ein im Ultraschall detektierbares Aszites gebildet hat.

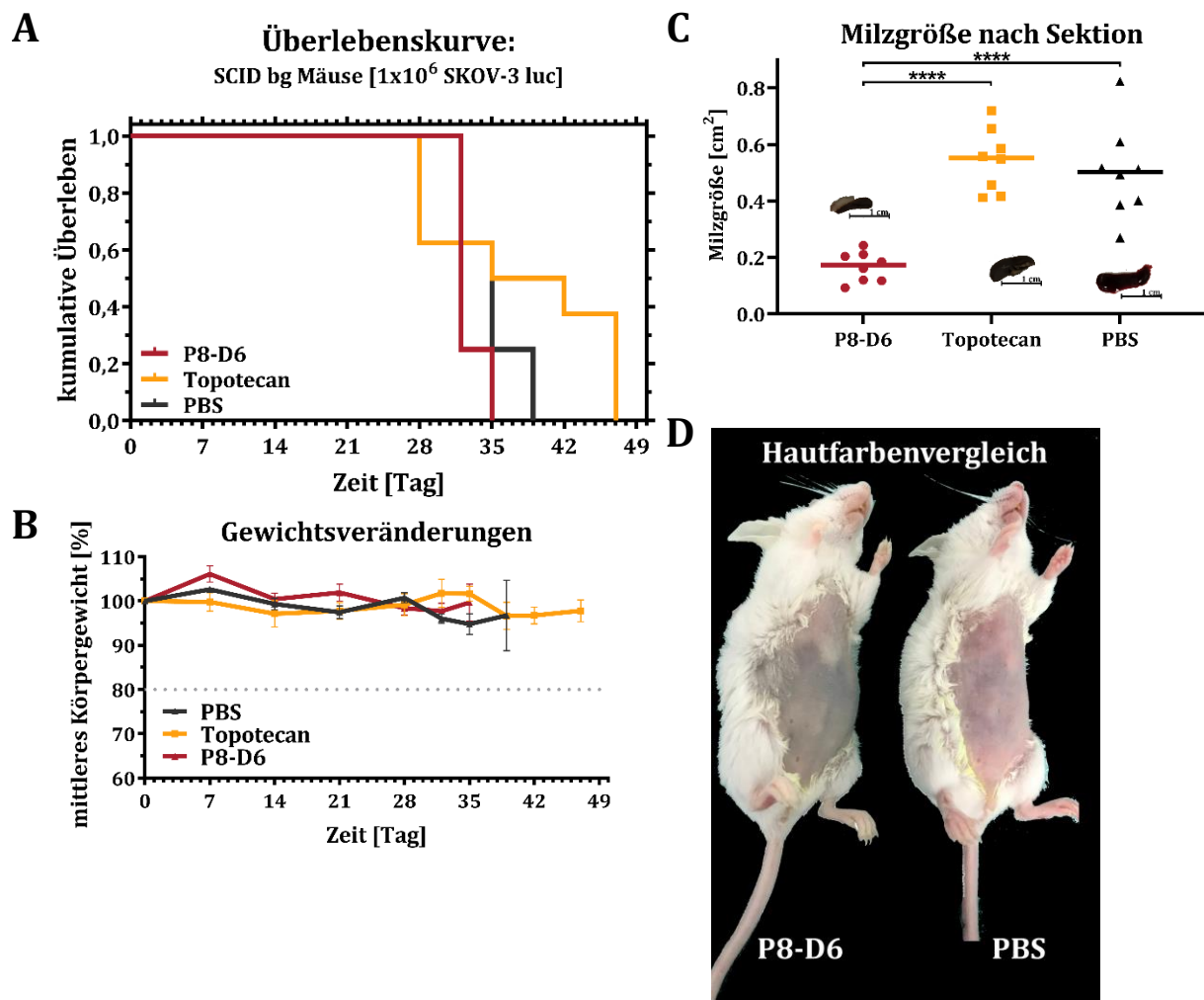
Im Laufe der Studie zeigte sich bei der P8-D6 behandelten Kohorte eine hämatologische Toxizität. In Abb.4.49 C ist zu erkennen, dass die Maus 12 an Tag 32 eine solche Aszites

ausgebildet hat. Außerdem zeigt diese Aufnahme die Leber, den Pankreas und den Magen. Eine *in vivo* Xenograft-Mausmodell dient nicht nur zur Generierung von Daten zur Wirksamkeit eines Wirkstoffes, sondern zeichnen meist auch den Überlebensvorteil auf und liefern Daten zur Toxizität eines Wirkstoffs im untersuchten System. Während der gesamten Studie wurden Gewichtsveränderungen dokumentiert. Keine Maus erreichte dabei den ethisch kritischen Wert von 20% Gewichtsreduktion (Abb.4.50 B).

Im Verlauf der ersten Behandlungsstudie zeigte sich das Tumorwachstum von SKOV-3 luc Zellen in SCID/beige-Mäusen bereits als sehr aggressiv. Der Tumor wurde jeweils *i.p.* in den Bauchraum injiziert und siedelte sich relativ schnell im Bereich des Pankreas an. Die Sektionen aller durchgeführter Studien konnte eine starke Metastasenbildung im Bereich des Diaphragmas und häufig auch kleine Metastasen an der Leber nachweisen. Zudem entwickelten die Tiere häufig kurz vor der Euthanasie eine mittelstarke Aszites.

Für die zweite Behandlungsstudie ist die Überlebenskurve in Abb.4.50 A gezeigt. Nach der Euthanasie wurden alle Tiere seziiert und die Tumore, die Milz, die Leber, die Niere und der Pankreas wurden für weitere Untersuchungen in Paraffinblöcke eingebettet.

Während dieser Studie verstarben an Tag 28 je drei Mäuse aus der PBS und der Topotecan-Gruppe in der Narkose an Herzkreislaufversagen aufgrund eines schlechten Allgemeinzustands. Während der Sektion war erkennbar, dass das Ovarialkarzinom, welches sich vermehrt im Pankreas ansiedelt auch das Diaphragma befallen hat und dort vermutlich so die Atemmuskulatur beeinträchtigt wurde. Zudem litten die PBS Mäuse an einer leichten Aszites. Im weiteren Verlauf mussten alle P8-D6 Mäuse an Tag 32 bzw Tag 35 euthanasiert werden, da bei diesen Tieren eine hämatologische Toxizität auftrat. Die Abb.4.50 D zeigt links eine mit P8-D6 behandelte Maus an Tag 35 im Vergleich zu rechts einer PBS behandelten Maus. Dieses Bild soll verdeutlichen, dass durch die Behandlung mit P8-D6 das blutbildende System angegriffen wurde. Diese Mäuse weisen eine auffällig weiße Hautfärbung auf, sodass die Tierärztin einen Erstickungstod befürchtete und die Tiere aus dem Versuch nahm. Bei der Sektion der Tiere wurde in allen P8-D6 behandelten Mäusen eine deutlich verkleinerte Milz obduziert, weshalb für alle Mäuse die Milzgröße nach Sektion bestimmt wurde und in Abb.4.50 C dargestellt ist. Die restlichen Tiere wurden an Tag 35, Tag 39, Tag 42 bzw. Tag 47 euthanasiert, nachdem sie eine Aszites ausgebildet haben. Die Überlebenskurve zeigt, dass Topotecan, aufgrund der auftretenden hämatologischen Toxizität und einhergehenden Aszitesbildung, in diesem System einen Überlebensvorteil im Vergleich zu P8-D6 besitzt.



**Abb.4.50: Überlebenskurve und Veränderungen durch P8-D6-Behandlung**

**A:** Überlebenskurve der 24 SCID/beige-Mäuse, die ab Tag 8 zweimal-wöchentlich mit P8-D6, Topotecan oder PBS behandelt wurden. **B:** Gewichtsveränderungen der Mäuse während der Studie zur Kontrolle des Allgemeinzustandes. **C:** Milzgröße nach Sektion. **D:** Hämatologische Toxizität der P8-D6 behandelten Mäuse wurde obduziert und durch Hautfarbenvergleich mit PBS behandelten Mäusen verglichen (Maus 23 versus Maus 4)

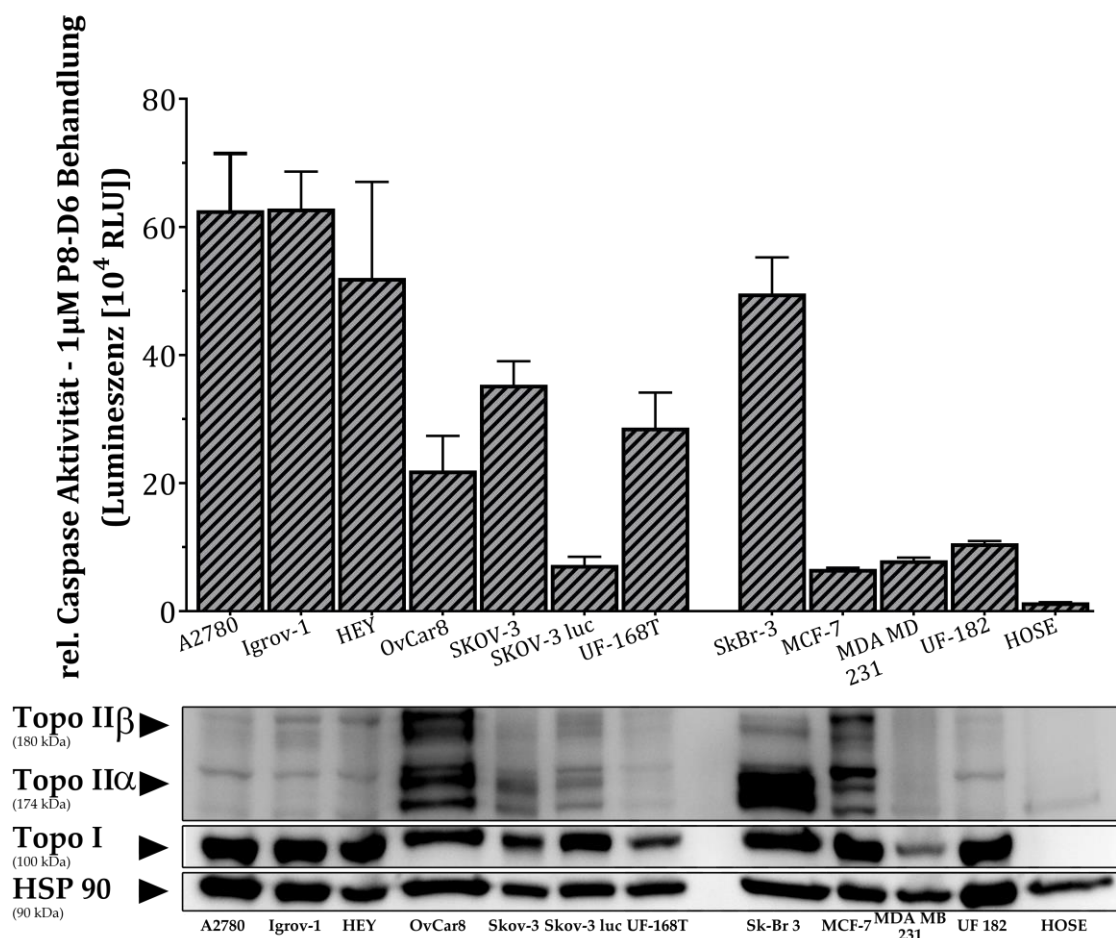
## 4.6 Biomarker

Ein individuelles Ansprechen von Patientinnen auf die Krebstherapie wurde bereits mehrfach thematisiert. Neue, innovative und hochwirksame Wirkstoffe sind wichtige Werkzeuge, um für Patientinnen, die auf die Standardtherapie nicht ansprechen, weitere Therapieoptionen zu ermöglichen. Durch die hohe Diversität der Tumore sind nicht alle Wirkstoffe gleich effektiv für jede Patientin. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Topo I- oder Topo II-Expression ein Biomarker für die Therapie mit P8-D6 darstellen könnte. Dafür wurden die Expressionseigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Zellen ohne Behandlungseinfluss mittels SDS-Page und Western Blot untersucht. Die Detektion der Topo I und Topo II-Expressionslevel erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Zur Vergleichbarkeit wurden die Gesamtproteinmengen äquivalent gewählt. Die

Untersuchung zeigt, dass eine hohe Topo I-Expression in allen getesteten Tumorzellen vorliegt. Im Vergleich dazu zeigen die HOSE Zellen eine kaum detektierbare Topo I-Expression. Die Detektion der Topo II-Expression war deutlich schwieriger durchzuführen, da die meisten getesteten Topo II-Antikörper eine geringe Spezifität aufwiesen. Auch kann am repräsentativen Blot in Abb.4.51 verdeutlicht werden, dass in den meisten Zellen nur eine geringe Topo II-Expression zu finden ist. Ausgenommen sind hier OvCar8-Zellen mit einer hohen Expression an Topo II  $\alpha$  und  $\beta$ . Für die Ovarialkarzinomzellen konnte in allen Zellen eine Topo II  $\alpha$ - und  $\beta$ -Expression detektiert werden. Am geringsten war dieser Wert für UF-168T Zellen. Bei den Mammakarzinomzellen weisen Sk-Br 3 Zellen eine große Menge an Topo II  $\alpha$  Enzymen auf, die Topo II  $\beta$  Expression ist vergleichsweise gering. MCF-7 zeigen für beide Enzyme eine deutliche Bande. MDA-MB 231 und UF-182 Zellen weisen auch Banden auf, jedoch mit einem geringeren Expressionsprofil. Für die HOSE Zellen kann bei deutlicher Kontrasterhöhung bzw. Verlängerung der Expositionszeit eine Topo II  $\alpha$  und  $\beta$  Bande detektiert werden. Die Expression ist jedoch deutlich geringer als die der Tumorzellen.

Um einen Biomarker zu finden, muss das Expressionslevel eines bestimmten Enzyms mit der Effektivität in Tumorzellen korrelieren. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abb.4.51 die relativen Caspaseaktivitäten (1  $\mu$ M P8-D6 Behandlung) und ein repräsentativer Western Blot aufgeführt. Es ist leicht zu erkennen, dass keine starke Korrelation der Effektivität mit den einzelnen Expressionsmustern zu detektieren ist. Einzige Aussage aus diesem Vergleich ist, dass mit sehr deutlich niedriger Expression aller Topoisomerasen, wie in den nicht-tumorassozierten HOSE Zellen, kaum eine Wirksamkeit des Zytostatikums zu detektieren ist. Dies könnte jedoch auch an anderen Faktoren, wie der deutlich verringerten Generationszeit liegen.





#### Abb.4.51: Charakterisierung der Expression von Topo I und II

Für die verwendeten Mammakarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien wurden die Topo I und II Expressionen ohne Behandlungseinfluss untersucht. Der repräsentative Western Blot zeigt die Topo I und Topo II  $\alpha$  u.  $\beta$  Expression und die Ladekontrolle mit HSP 90. Gegenübergestellt wurde die Effektivität von P8-D6 (relative Caspase Aktivität bei 1  $\mu$ M P8-D6 Behandlung), um eine Korrelation der Expression mit der Effektivität (Biomarker) erkennen zu lassen.

## 5. DISKUSSION UND AUSBLICK

---

Die Entwicklung und weitere Untersuchung innovativer zytotoxischer Verbindungen mit geeigneten physikochemischen Eigenschaften für eine Therapie unterschiedlicher gynäkologischer Tumore besitzt hohe klinische Relevanz. Dabei stellt Brustkrebs in der gynäkologischen Onkologie den häufigsten und Ovarialkarzinom den aggressivsten Tumor da. Bezogen auf das Ovarialkarzinom haben sich in den vergangenen Jahren die Erfolgsquoten durch die Kombination aus chirurgischer Behandlung und Chemotherapie zwar wesentlich verbessert, dennoch ist die Rezidivrate weiterhin sehr hoch und viele Patientinnen versterben. Resistenzentwicklungen und schwere Nebenwirkungen während der Therapie sind dabei Gründe für einen unzureichenden Behandlungserfolg. Die in der AG Clement in Kiel entwickelte Substanz P8-D6 ist ein wirksamer Induktor der Apoptose in schnellteilenden Tumorzellen, indem es als dualer Topoisomerase-Inhibitor wirkt.

Um das Ziel, die Etablierung von P8-D6 als potenziellen Arzneistoffkandidat für die Therapie des fortgeschrittenen Ovarial- und Mammakarzinoms, weiter voranzubringen, wurde die Wirksamkeit und Toxizität von P8-D6 auf präklinischer Ebene intensiv untersucht. Die präklinische Arzneimittelentwicklung untergliedert sich in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. Nach erfolgreicher Testung der Wirksamkeit und Toxizität eines Arzneistoffs auf zellulärer Ebene, erfolgt die Testung im lebenden Organismus, um für den Wirkstoff sowohl die Pharmakodynamik als auch die Pharmakokinetik genauer zu bestimmen.

Entitätsübergreifende Untersuchungen an Tumorzellen zeigten bereits die hohe Leistungsstärke von P8-D6 als potenziellen Wirkstoff in der Krebstherapie. Die vom NCI erhobenen Daten ermöglichen eine Früherkennung des Potentials eines neuen Krebsmedikaments, indem das NCI über eine große getestete Substanzbibliothek verfügt und mit derselben Methode Wirkstoffe testet. So entsteht eine sehr gute Vergleichbarkeit der Wirksamkeit und Zelllinienempfindlichkeit auf Tumorzellen zu anderen Standardtherapeutika oder anderen, neuen innovativen Wirkstoffen. Außerdem wird in der Untersuchung nachgewiesen, ob der Wirkstoff ein einzigartiges Profil der Zelltötung, einen einzigartigen Wirkmechanismus besitzt oder es keinen Resistenzmechanismus mit etablierten Wirkstoffen teilt (Paull *et al.*, 1989; Shoemaker, 2006; Chabner, 2016). Die Ergebnisse wiesen nach, dass P8-D6 als Topoisomerase-Inhibitor eine wachstumshemmende Wirkung ( $GI_{50}$ ) bei  $0,05 \mu\text{M}$  in 60 humanen Tumorzellen besitzt

und sich in den Ovarialkarzinomzellen im Vergleich zu Standardtherapeutika, wie Topotecan ( $GI_{50}$ :  $0,23 \mu\text{M}$ ) oder Cisplatin ( $GI_{50}$ :  $15,66 \mu\text{M}$ ) mit einem  $GI_{50}$ -Wert von  $0,12 \mu\text{M}$  potenter präsentierte. Für Mammakarzinome erreichte P8-D6 einen  $GI_{50}$  von  $0,13 \mu\text{M}$ . 2019 wurden von MILLER die NCI 60-Ergebnisse für ein neuartiges 11-substituiertes Ellipticin, einen Topo II-Inhibitor, publiziert. Die Substanz NSC 762123 zeigte im „five dose assay“ dabei in den Nierenkarzinomzellen A498 die höchste Potenz mit  $386 \text{ nM}$ . Verglichen damit besitzt P8-D6 in den A498 Zellen einen  $GI_{50}$  Wert von  $20 \text{ nM}$  und zeigt sich deutlich potenter.

## 5.1 Targetkontrolle

Nach erfolgreicher Aufklärung des Wirkmechanismus von P8-D6 als duales Topoisomerase-Inhibitor durch AICHINGER et al. (2020) in Kolonkarzinomzellen, sollten weitere Wirksamkeits- und Toxizitätsstudien in Kiel am Ovarialkarzinom und Mammakarzinom erfolgen. Die Wirksamkeit hängt jedoch stark vom Erreichen seiner intrazellulären Zielstruktur - Topo I und II - ab, die beide im Kern der Zelle lokalisiert sind. Aus diesem Grund wurde zusätzlich zu den bereits getesteten Kolonkarzinomzellen eine Zielkontrolle an verschiedenen Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen durchgeführt, die verdeutlichte, dass P8-D6 bereits bei geringer Behandlungskonzentration in den Zellkern diffundiert und sein Zieltarget in Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomzellen erreicht. Eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Wirkung einer Verbindung ist die Präsenz bzw. Expression des Targets in dem getesteten System. Topoisomerasen spielen eine Schlüsselrolle bei der DNA-Replikation und sind Ziel mehrerer Chemotherapeutika. Während Topo I den Einzelstrangbruch induziert, ist Topo II für den Doppelstrangbruch verantwortlich. Allgemein ist bekannt, dass Topo I und Topo II  $\beta$  konstitutiv während des gesamten Zellzyklus in allen Geweben exprimiert werden (Baker et al., 1995; Ng et al., 1997), Topo II  $\alpha$  hingegen ein zellzyklusabhängiges Expressionsmuster aufweist (Isaacs et al., 1996). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die getesteten Tumorzellen eine deutliche Überexpression von Topo I im Vergleich zu den nicht-tumorassoziierten Zellen aufweisen (Abschnitt 4.6). Es wurde bereits vermehrt die Topo-Expression in verschiedenen Tumorentitäten untersucht (Heestand et al., 2017; Kostopoulos et al., 2009; Braun et al., 2008). Die Studien konnten zeigen, dass eine erhöhte Topo I Expression und TOP2A-Amplifikation bei mehreren malignen Erkrankungen vermehrt vorhanden ist (Heestand et al., 2017). Zudem wurde bereit publiziert, dass Patienten mit Topo I Überexpression

einen ersichtlichen Therapienutzen bei einer Behandlung mit Topo I Inhibitoren haben und Topo I als prädiktiver Biomarker fungieren kann (Braun *et al.*, 2008; Kostopoulos *et al.*, 2009). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten Tumorzellenübergreifend ein signifikantes Ansprechen auf die P8-D6 Therapie. Die Topo II Expressionslevel der getesteten Zellen variierten hingegen deutlich voneinander. Hier zeigen OvCar8, Sk-Br 3 und MCF-7 eine deutliche Überexpression, die anderen Tumorzellen eine leichte Überexpression, die jedoch nicht mit einem verbesserten Ansprechen in OvCar8, Sk-Br 3 und MCF-7 Zellen assoziiert werden kann. Allgemein ist aus den Aufzeichnungen des *Human Proteinatlas* zu entnehmen, dass Topo I im Vergleich zu Topo II auch in nicht-tumorassoziierten Gewebe vermehrt exprimiert wird (Uhlén *et al.*, 2015).

Obwohl Chemotherapeutika im Allgemeinen Patienten ohne Auswahl von Biomarkern verabreicht werden, wäre es nach Sichtung der Literatur empfehlenswert, Topo I und Topo II weiter auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, das Ansprechen vorherzusagen und so als Biomarker fungieren. Dafür sind weitere Untersuchungen erforderlich, die beispielsweise ein Vergleich zwischen verringerter Topo I Expression und dem Ansprechen zeigen.

## 5.2 Keine Wirkung ohne Nebenwirkung

*„Wenn behauptet wird, dass eine Substanz keine Nebenwirkung zeigt, so besteht der dringende Verdacht, dass sie auch keine Hauptwirkung hat.“ (Gustav Kuschinsky, deutscher Pharmakologe, 1904–1992)*

Gerade im Bereich der Onkologie treten Nebenwirkungen als Folge einer spezifischen Tumorthherapie, insbesondere nach der Chemotherapie, auf. Sie stellen neben dem Ansprechen auf den Tumor und der Lebenserwartung den wichtigsten Endpunkt in onkologischen Therapiestudien dar, da sie wesentlich die Lebensqualität eines Tumorpatienten beeinflussen. Neben der Untersuchung auf Wirksamkeit einer Substanz sind Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen und tolerierbare Dosisbereiche im Menschen eine weitere wichtige Säule der präklinischen Arzneistoffentwicklung. Da P8-D6 in Zellteilungsprozesse eingreift, die nicht nur spezifisch für Tumorzellen sind, wurde die Wirkung von P8-D6 auch auf nicht-tumorassoziierten Zellen getestet. Hierfür wurden humane ovariale Oberflächenepithelzellen und humane Fibroblasten auf morphologische, proliferative und apoptotische Veränderungen durch die Behandlung untersucht (Abschnitt 4.3.1). Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass es in HOSE Zellen zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Zellintegrität kommt. Die Apoptosemessungen

zeigten, dass die mit 1  $\mu\text{M}$  P8-D6 behandelten Zellen keinen signifikanten Effekt verglichen zur Negativkontrolle besaßen. Der Effekt der 10  $\mu\text{M}$  P8-D6 Behandlung war adäquat zu etablierten Standardtherapeutika. Für die schnellteilenden Fibroblasten sind leichte morphologische Veränderungen und Effekte auf die Viabilität erst nach 48 h detektierbar, die identisch zu den Referenzen ausfielen. Die Apoptosemessung zeigte hingegen einen wahrnehmbaren Effekt auf die Fibroblasten, als dieser in HOSE Zellen und Lymphozyten nachgewiesen wurde. Die Effekte auf Lymphozyten wurden in einem deutlich geringeren Konzentrationsbereich getestet (Meier *et al.*, 2017). Die verstärkten Effekte auf Fibroblasten könnten durch die erhöhte Teilungsrate erklärt werden. Durch die vermehrten Replikationsvorgänge werden mehr Topoisomerasen benötigt, welche wiederum verstärkt durch die Behandlung inhibiert werden.

Diese Testung von P8-D6 an gesunden Zellen ermöglicht eine Abschätzung von schädigenden Effekten auf gesundes Gewebe und stellt somit eine Vortestung für das Nebenwirkungspotential dar. Hierbei ließ P8-D6 sowohl in Lymphozyten und HOSE Zellen als auch in Fibroblasten keine Anzeichen für starke Nebeneffekte erkennen. Bezieht man Wirksamkeits- und Toxizitätsstudien auf die klinische Therapie, so induziert P8-D6 deutlich ( $\sim$  um den Faktor 10) stärker Apoptose in Krebszellen und könnte potenziell in geringeren Dosen eingesetzt werden als die Standardtherapeutika, um denselben Effekt zu erzielen. Schlussfolgernd, wenn die Ergebnisse an nicht-tumorassoziierten Zellen mit einbezogen werden, sollte P8-D6 entsprechend weniger Nebenwirkungen verursachen.

In der Literatur sind kaum Studien zur Untersuchung der Effekte von dualen Topo-Inhibitoren auf gesundes Gewebe im *in vitro* Modell bekannt. Für die etablierten Zytostatika Etoposid und Cisplatin wurden Testungen an normalen Lungengewebe durchgeführt. Diese konnten für Etoposid einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 4,36  $\mu\text{M}$  und für Cisplatin einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 8,63  $\mu\text{M}$  nach 48 h ermitteln (Davou *et al.*, 2019). Da die BEAS-2B Zellen jedoch andere Charakteristika als die HOSE Zellen aufweisen, ist ein wirklicher Vergleich hier schwer durchzuführen. Auf *in vivo* Ebene liegen bereits Daten zu toxischen Effekten von dualen Topo-Inhibitoren vor. 2004 beschrieben JONGE *ET AL.*, dass der duale Topo-Inhibitor XR11576 in Tieren vorwiegend Knochenmark- und Magen-Darm-Toxizität hervorruft. Erste klinische Daten zeigten jedoch keine auffällige hämatologische Toxizität. Dabei sind die wichtigsten dosislimitierenden Toxizitäten von Topo-Inhibitoren weitgehend hämatologisch (Seiter, 2005). In einer klinischen Studie an 92 Patientinnen traten nach der Behandlung mit Topotecan bei mehr als 50 % der Ovarialkarzinompatientinnen Leukozytopenien oder Neutropenien Grad 3/4 auf (Creemers *et al.*, 1996). Auch in

klinischen Studien mit dualen Topo-Inhibitoren, wie Pyrazoloacridin und TAS-103, kam es vermehrt zu starke hämatologische Nebenwirkungen (Ewesuedo *et al.*, 2001; Ramaswamy *et al.*, 2011; Salerno *et al.*, 2010; van Gijn *et al.*, 2000).

Ein wesentlicher Vorteil eines dualen Topo-Inhibitors liegt in der geringeren Resistenzentwicklung, durch Inhibition beider Topoisomerasen. Die Hemmung nur eines der beiden Enzyme bewirkt die kompensatorische Hochregulierung des jeweils anderen Enzyms (van Gijn *et al.*, 2000; Aronson, 2004; Skok *et al.*, 2020). Die Wirksamkeit dualer Topo-Inhibitoren auf solide Tumore wurde bereits klinisch durch andere Substanzen (z.B. Intoplicin oder TAS-103) untersucht, jedoch trat neben der bereits beschriebenen hämatologischen Toxizität auch die Hepatotoxizität auf, weshalb keine Zulassung erfolgte (van Gijn *et al.*, 1999; Aichinger *et al.*, 2020; Abigerges *et al.*, 1996; van Gijn *et al.*, 2000). Die präklinische Untersuchungen von Intoplicin zeigten keinen Fokus auf den Nachweis von Hepatotoxizität (Riou *et al.*, 1993; Bissery *et al.*, 1993; Poddevin *et al.*, 1993). Aus diesem Grund und aufgrund von häufigerem Auftreten von Leberschädigungen in der Chemotherapie (King und Perry, 2001) wurden Untersuchungen zur Hepatotoxizität von P8-D6 *in vitro* an primären humanen Hepatozyten durchgeführt (Abschnitt 4.3.2). Der Fokus dieser Untersuchungen lag im Nachweis von oxidativem Stress und der Apoptoserate nach 48 h P8-D6 Behandlung. Bekannt ist, dass der wesentliche Auslöser für Hepatotoxizität in der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies liegt (Shimizu *et al.*, 2012; Gomez-Lechon *et al.*, 2010). Die Ergebnisse konnten eindrucksvoll zeigen, dass im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS) weder apoptotische Veränderungen noch eine Induktion von oxidativen Stresssignalen feststellbar waren. Für die mitgeführte Positivkontrollen (Doxorubicin), die laut Literatur hepatotoxische Effekte fördern, wurden ein deutlicher Effekte an den humanen Hepatozyten nachgewiesen (Rudolfová *et al.*, 2014; Pugazhendhi *et al.*, 2018; King und Perry, 2001). Da oxidativer Stress als wesentlicher Marker für Hepatotoxizität dient, weisen diese *in vitro* Ergebnisse auf keine durch P8-D6 induzierte Hepatotoxizität hin. Zudem sind primäre humane Hepatozyten sehr sensibel im Umgang und stressempfindlich. Treten in solchen Zellen nicht vermehrt oxidative Spezies auf, kann davon ausgegangen werden, dass P8-D6 nicht primär den oxidativen Stress in humanen Zellen fördert. Diese Studienergebnisse liefern demnach auch übergreifend Auskunft über die Induktion von oxidativem Stress durch die Behandlung mit P8-D6.

Ein nächster logischer Schritt in der Validierung ist die Überprüfung der *in vivo* Toxizität, da *in vitro* Untersuchungen nur begrenzt Aussagekraft für die *in vivo* Situation im Menschen besitzen. Hierbei sollte ein vermehrter Fokus auf der Hepatotoxizität liegen.

Allgemein liefern diese Ergebnisse jedoch gute erste Anhaltspunkte, um folglich teurere und aus ethischen Gründen beschränkte *in vivo* Studien durchzuführen.

### 5.3 Das Tumorwachstum in der Petrischale bremsen

Einen wesentlichen Kern der Arzneimittelzulassung und damit der Arzneimittelentwicklung bilden die Trias: Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit (§ 1 AMG). Die Qualität wird durch das Synthese- bzw. Herstellungsverfahren mit anschließender Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsprüfung gewährleistet. Die Unbedenklichkeit bezieht sich bei Arzneistoffen auf ihr Nebenwirkungspotential, welches durch verschiedene Toxizitätsuntersuchungen abgeschätzt werden kann und im Abschnitt 5.2 bereits ausgiebig diskutiert wurde. Da die Wirksamkeit für den Entwicklungs- und später auch den Therapieerfolg eines Wirkstoffes zwingend notwendig ist, lag ein wesentlicher Fokus dieser Arbeit im Nachweis der Wirksamkeit von P8-D6. Hierfür wurden unterschiedliche Ovarial- und Mammakarzinomzelllinien sowie im translationalen Ansatz *ex vivo* Primärkulturen zur Testung herangezogen. Allgemein stellt die Zellkultur ein vereinfachtes, aber unverzichtbares Werkzeug zur Verbesserung des Verständnisses von biologischen Prozessen, metabolischen Vorgängen und der Arzneimittelwirkung dar, die durch CARREL (1912) seinen Ursprung findet, da es unter optimal kontrollierbaren Bedingungen einen direkten Zugang zu spezifischen Funktionen von Zellen erlaubt. Beginnend mit der 2D Kultur, diente diese Methode der ersten Abschätzung der Wirkstärke von P8-D6. Erste Voruntersuchungen zeigten, dass das Optimum für die Behandlungsdauer von P8-D6 bei 48 h lag (Abschnitt 4.4.1.1). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde P8-D6 im Vergleich zu etablierten Standardtherapeutika, wie Topotecan, Etoposid und Cisplatin auf die Effektivität an sechs unterschiedlichen etablierten Ovarialkarzinomzelllinien getestet (Abschnitt 4.4.1.1). Mit Topotecan und Etoposid wurden Zytostatika mit einem ähnlichen Wirkmechanismus ausgewählt. Cisplatin und Topotecan sind etablierte Therapeutika in der fortgeschrittenen Ovarialkarzinomerkrankung. Diese Untersuchungen konnten eine starke Proliferationshemmung und signifikant erhöhte Apoptoseinduktion nach Behandlung mit P8-D6 im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen. Als Beispiel besaßen P8-D6 in A2780 Zellen einen  $IC_{50}$  Wert von  $0,9 \mu\text{M}$  und zeigte sich damit um den Faktor  $> 5$  potenter als Cisplatin ( $IC_{50}$ :  $4,38 \mu\text{M}$ ) in diesen Zellen. Der Effekt in HEY Zellen war in diesen Testungen noch ausgeprägter mit einer Differenz um den Faktor  $> 10$ . In der Literatur werden methodenabhängig für Cisplatin in A2780 Zellen nach 48 h Inkubation  $IC_{50}$  Werte von  $2,14 \mu\text{M}$  (Sarkhosh-Inanlou *et al.*, 2020) oder  $13,20 \mu\text{M}$  (Ma *et al.*, 2016) gelistet. Diese

im Vergleich zu den Kontrollen überragende anti-proliferativen Effekte von P8-D6 spiegeln sich auch in dem pro-apoptotischen Potenzial wider. Die Messung der Apoptoseinduktion mittels Emissionsspektroskopie zeigte in allen Zellen signifikant höhere Signale verglichen zu den Kontrollen. Dabei lagen oftmals die 1  $\mu\text{M}$  P8-D6 Ergebnisse auf demselben Niveau mit den 10  $\mu\text{M}$  Referenzen. Dieser Faktor  $\sim 10$  zeigte sich bereits in den  $\text{IC}_{50}$  Werten der Testung mit HEY Zellen. Zur Verifizierung dieser Aussage wurden zusätzliche Testungen mit der wissenschaftlich etablierten Methode der Durchflusszytometrie durchgeführt. In den getesteten A2780 und SKOV-3 luc Zellen konnte P8-D6 sein starkes antitumorales Potential erneut bestätigen. 2017 wurden bereits von MEIER et al. Daten publiziert, die die Wirkstärke von P8-D6 gegenüber Etoposid und Pyrazoloacridin mittels Durchflusszytometrie bestimmten. In diesen Ergebnissen konnte gemessen werden, dass P8-D6 [1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ] in HeLa Zellen nach 24 h  $\sim 80\%$  der Zellen in Apoptose führt. Verglichen dazu lag der Anteil an apoptotischen Zellen nach Etoposidbehandlung nur bei  $\sim 30\%$ . Diese Verhältnisse stimmen mit den hier in der Arbeit ermittelten Durchflusszytometrie-Daten überein und zeigen eindrucksvoll den entitätsübergreifenden antitumoralen Effekt von P8-D6 verglichen zu den momentanen Standardtherapeutika. Bereits klinisch getestete duale Topo-Inhibitoren wurden zuvor auch präklinisch in *in vitro* Modellen an Tumorzellen untersucht. 2002 verglichen MISTRY *ET AL.* das neuartige Phenazin XR11576 mit TAS-103 und Topotecan in verschiedenen Entitäten. In den MCF-7 Zellen (BC) besaß XR11576 einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 46,7 nM, TAS-103 einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 123,1 nM und Topotecan einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 112 nM. Gleichzeitig wurden die Substanzen auch am Ovarialkarzinom (Zelllinie : A1847) getestet. Hier lagen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte für XR11576 bei 16,5 nM, für TAS-103 bei 9,2nM und für Topotecan bei 11,9nM. Ein direkter Vergleich mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten dieser Arbeit ist nur begrenzt möglich, da ich Inkubationszeiten in der Arbeit von MISTRY *ET AL.* zwischen 4-6 Tagen lagen und eine andere Zelllinien für das Ovarialkarzinom verwendet wurde. Da in beiden Studien jedoch Topotecan als Referenz verwendet wurde, erleichtert dies die Vergleichbarkeit. In den A2780 Zellen zeigte P8-D6 verglichen zu Topotecan einen  $\sim 10$ -fach höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert. Vergleich man TAS-103 oder XR11576 mit Topotecan in A1847 Zellen, so ist TAS-103 1,2fach potenter und XR11576 ist um den Faktor 0,72 aktiv. Eine weitere Studie von AOYAGI *ET AL.* untersuchte 1999 TAS-103 auf die Wirksamkeit an unterschiedlichen Tumoren. Hier lag der  $\text{IC}_{50}$ -Wert zwischen 0,0030  $\mu\text{M}$  - 0,23  $\mu\text{M}$ . 2000 erschien eine weitere Studie zur *in vitro* Wirksamkeit von dualen Topo-Inhibitoren. Hier lagen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte nach 72 h Inkubation für TAS-103 zwischen 0,05  $\mu\text{M}$  - 0,08  $\mu\text{M}$  und für Intoplicin zwischen 0,27  $\mu\text{M}$



und 1,20  $\mu\text{M}$  (Etiévant *et al.*, 2000). An diesen Daten kann allgemein eine gute Wirksamkeit für duale Topo-Inhibitoren abgelesen werden.

Um zu zeigen, dass P8-D6 eine neuartige Substanz ist, die über die einfache Kombination der Inhibition von Topo I und Topo II hinausgeht, wurden eine Kombinationstherapie von Etoposid und Topotecan mit P8-D6 Behandlung verglichen. Es zeigt sich eine signifikant höhere Apoptoserate in P8-D6 behandelten Zellen im Vergleich zur Kombinationstherapie mit Etoposid und Topotecan. Dieses zeigt das außerordentliche Potential von P8-D6 in Ovarialkarzinomzellen. Die Ergebnisse weisen einen Nutzen der Kombinationstherapie aus Etoposid und Topotecan nach, jedoch kommt dieser bei weitem nicht an das Potential von P8-D6 in denselben Konzentrationsbereichen heran.

Bereits publizierte, experimentelle Daten zur gleichzeitigen Anwendung von Topo I- und Topo II-Inhibitoren weisen unterschiedliche Erfolge vor. Einige Studien beschreiben einen geringeren antitumoralen Effekt für die Kombinationstherapie verglichen zu Monotherapie (Kaufmann, 1991). Andere Studien wiederum weisen einen additiven oder synergistischen Effekt der Kombination nach (Bertrand *et al.*, 1992). Dabei hängt die Wirksamkeit nicht ausschließlich von den eingesetzten Wirkstoffen ab, sondern auch von dem Konzentrationsverhältnis und der Applikationsart. Eine sequentielle Applikation scheint dabei der zeitgleichen Applikation überlegen zu sein (Camacho *et al.*, 2015; van Gijn *et al.*, 2000). Diese antagonistische Wirkung bei Simultangabe konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine bereits 2006 durchgeführte klinische Studie, die die Kombination von Etoposid und Topotecan gegenüber der Monotherapie mit Topotecan an Patientinnen mit rezidiertem Ovarialkarzinom untersuchten, konnten keinen klinischen Nutzen der Kombinationstherapie feststellen (Sehouli *et al.*, 2006).

Die Verwendung von primären Patientenzellen als Testsystem besitzt den wesentlichen Vorteil, dass *in vitro* viele der Eigenschaften, wie Permeabilität, Kommunikation oder Expression von Enzymen, erhalten bleiben, die die Zellen *in vivo* besitzen, sodass biologische Prozesse besser nachgebildet werden können. Zudem ist das Wachstumsverhalten des Tumors und das Ansprechen auf Therapeutika in der Klinik durch eine starke Diversität charakterisiert, weshalb ein größeres Screening mehr Individualfaktoren in der Untersuchung abdecken kann.

Ein ökonomischer Nachteil der Primärzellen ist die begrenzte (nicht-Immortalisierung) Kultivierung der Zellen. Aufgrund der Verbesserung der repräsentativen Aussage zur Wirksamkeit durch Verwendung von Primärzellen wurden in dieser Arbeit auch primäre *ex vivo* Patientenzellen zur Untersuchung herangezogen (Abschnitt 4.4.1.2). Die

Untersuchungen zeigen, dass neben P8-D6, Topotecan die zweithöchste Effektivität in der Induktion von Apoptose in Ovarialkarzinomzellen besitzt, diese sich jedoch signifikant von P8-D6 unterscheidet. P8-D6 zeigt zellenübergreifend mit zwei unterschiedlichen Methoden deutlich die höchste Apoptoseinduktion im Vergleich zu den Referenzen. Die Auswahl von Topotecan als Vergleichssubstanz ist einerseits durch den sehr ähnlichen Wirkmechanismus der Topo I Inhibition und andererseits durch die Relevanz in der Ovarialkarzinomtherapie begründet. Topotecan ist ein etabliertes Therapeutikum zur Behandlung von rezidivierendem Ovarialkarzinomen und hat sowohl bei platinresponsiven als auch bei platinnonresponsiven Patientenpopulationen eine signifikante Antitumoraktivität gezeigt (ten Bokkel *et al.*, 1997; ten Bokkel *et al.*, 2004; Leitlinienprogramm Onkologie, 2020b). Nur ein Mehrnutzen eines neuen Wirkstoffs würde die kostenintensive Therapie rechtfertigen. Diesen Mehrnutzen in der Therapie des Ovarialkarzinoms konnte für P8-D6 *in vitro* bereits belegt werden.

Mit der Inhibition der Topoisomerasen besitzt P8-D6 einen relativ entitätsunspezifischen Wirkmechanismus, weshalb eine Therapie des Mammakarzinoms durch P8-D6 auch denkbar wäre. Bereits die Ergebnisse der NCI-Untersuchung konnten zeigen, dass P8-D6 eine hohe Effektivität gegenüber diesen Tumorzellen besitzt.

Mammakarzinome zeichnen sich durch eine auffallend hohe Anzahl an Neuerkrankungen aus und sind durch sehr individuelle intrinsische Tumorsubtypen (Hormonrezeptor-positive, triple negative oder Her2-neu positive Tumore) gekennzeichnet. Dies macht die Entwicklung neuer, innovativer Arzneistoffe klinisch relevant. Bei der Testung fiel auf, dass der Effekt von P8-D6 in Mammakarzinomzellen nicht derart überragend war wie in Ovarialkarzinomzellen, jedoch im Vergleich zu den Referenzen signifikant (Abschnitt 4.4.1.3, 4.4.1.4). P8-D6 zeigt deutliche Effekte in der Proliferationshemmung, Apoptoseinduktion in Zelllinien und primären *ex vivo* Patientenzellen. Für die Therapie des rezidierten Mammakarzinoms ist die leitliniengerechte Chemotherapie häufig eine Kombination von Cyclophosphamid mit einem Taxan oder eine Kombination aus einem Anthracyclin bzw. Topo II Inhibitors mit einem Taxan. Zwar sind Etoposid, Topotecan und Cisplatin als Therapeutika in der Leitlinie für das Mammakarzinom in Deutschland nicht verankert und werden damit selten in der Therapie genutzt, trotzdem zeigten einige klinische Studien ein gutes Tumorsprechen von Cisplatin und Etoposid beim metastasiertem Brustkrebs (Lluch *et al.*, 1994). Zwar wäre ein Vergleich der Standardtherapeutika Cyclophosphamid oder Epirubicin zu P8-D6 eine sinnvolle Ergänzung, jedoch ermöglichen die gewählten Referenzen die Vergleichbarkeit zwischen der

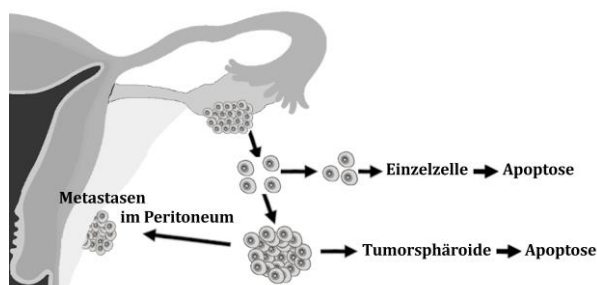
Ovarialkarzinom- und Mammakarzinomstudie und es werden Zytostatika mit einem ähnlichen Wirkmechanismus miteinander verglichen.

Aufgrund phänotypischer Veränderungen der immortalisierten Zellen im Vergleich zum *in vivo* Gewebe können sich Unterschiede in der Zellintegrität ergeben. Testungen von Zellkombinationen, die als interaktive organotypische Kulturen die Vorgänge *in vivo* besser widerspiegeln, bieten deshalb große Vorteile. Aus diesem Grund wurden neben den 2D Monokultur auch die Effekte von P8-D6 auf eine Co-Kultur aus Fibroblasten und Ovarialkarzinomzellen untersucht (Abschnitt 4.4.2). Hierbei zeigte sich, dass die Fibroblasten in der Monokultur eine höhere Apoptoserate besaßen als in der Co-Kultur. Für die Ovarialkarzinomzellen war der Effekt genau umgekehrt. Somit besitzt die Co-Kultur einen protektiven Effekt für die Fibroblasten. Eventuell dadurch geschuldet, dass die P8-D6 Moleküle auch vermehrt in die Ovarialkarzinomzelle diffundieren und dort an den DNA-Enzym-Komplex binden. Somit liegen weniger Moleküle ungebunden vor, die in den Fibroblasten wirken können. Diese Argumentation lässt jedoch nicht die erhöhte Apoptoseinduktion der Ovarialkarzinomzellen in der Co-Kultur erklären. Die Untersuchungen von FU et al. (2013) konnten zeigen, dass die Entwicklung einer Co-Kultur aus Fibroblasten und Ovarialkarzinomzellen die Proliferationsrate der Ovarialkarzinomzellen steigern kann. Überträgt man diese Aussage auf die in dieser Arbeit durchgeführte Studie, so könnte die Co-Kultur die Proliferation der Tumorzellen eventuell fördern und P8-D6 dann verbessert in den Zellteilungsprozess eingreifen. Eventuell befinden sich weniger Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus und dies steigert das Apoptosesignal verglichen zur Monokultur. Dies ist eine mögliche Hypothese, die jedoch noch belegt werden müsste. Für die Behandlung mit Etoposid und Topotecan konnte ein vergleichbarer Effekt der Co-Kultur zur Monokultur detektiert werden. Die Referenzen kommen zwar in den Ovarialkarzinomzellen sowohl in der Co- als auch in der Monokultur nicht an die Effektivität von P8-D6 heran, jedoch besitzen sie auch einen milderen Effekt auf die Fibroblasten.

Die klassischen 2D-Monoschicht-Modelle zur Testung von neuen Wirkstoffen sind verbreitet, jedoch limitiert in ihrer Aussagekraft und Übertragbarkeit auf die physiologische Situation von Geweben und Tumoren. 3D-Zellkulturmodelle können das Verhalten der Tumore deutlich besser imitieren. Sie besitzen ähnlich zum Gewebe ein komplexes Netz aus Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktionen, die nicht nur die Verteilung und Funktion biologischer Regulatoren (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren), sondern auch die Penetration und Aktivität von Wirkstoffen beeinflussen (Goodman *et al.*, 2007; Kimlin *et*

*al.*, 2013; Lagies *et al.*, 2020). Deshalb sind zusätzlich zu den 2D-Modellen auch Wirksamkeitsstudien mit 3D-Modellen durchgeführt worden (Abschnitt 4.4.3).

Ein weiterer wesentlicher Grund, warum die Testung mit Sphäroiden gerade in der Therapie des metastasierten Ovarialkarzinoms einen großen Wissenszugewinn liefert, ist die *in vivo* Situation im Aszites. Während der peritonealen Metastasierung entstehen im Aszites mehrzellige Sphäroide, die Chemoresistenz fördern und sich typischerweise im Bauchraum ausbreiten (Habyan *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2007). Über den Ursprung und die Mechanismen, durch die Sphäroide entstehen, ist jedoch wenig bekannt. Das Labormodell scheint diese *in vivo* Situation sehr gut nachzubilden und liefert damit Aussagen zum Ansprechen der Aszites-Tumorzellen auf das Zytostatikum.



**Abb.5.1: Entstehung von Tumorsphäroiden im Peritoneum.**

Während des Metastasierungsprozesses können aus Einzelzellen zum Schutz vor Apoptose Tumorsphäroide entstehen. Diese bilden dann Metastasen am Mesothel (modifiziert nach Ahmed *et al.*, 2007).

Unterschiedliche Ovarialkarzinom und Mammakarzinomzellen bildeten vielfältige Sphäroide und Aggregate, die nach einer Wachstumsphase mit P8-D6 behandelt wurden. Dabei fällt bei einem Blick in die Literatur die Fülle an unterschiedlichen Methoden zur Generierung von Sphäroiden und Aggregaten auf. Beispielsweise ist für die MCF-7 Zellen häufig eine Methode mit agarosebeschichteten Platten zu finden. Die publizierten Sphäroide wirken als Formation kompakter und stabiler als die in dieser Arbeit mit Ultra-Low Attachment Platten generierten MCF-Aggregate (Pereira *et al.*, 2017; Sukanya Gayan *et al.*, 2017; Boo *et al.*, 2016). Vergleicht man wiederum die MCF-7 Aggregate der Literatur, die mit Ultra-Low Attachment Platten-Verfahren erzeugt wurden, sind diese sehr ähnlich zu den hier gezeigten Sphäroiden (Kaymak *et al.*, 2018). Ähnliches trifft für A2780 oder HEY, SKOV3 Zellen zu (Raghavan *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2017; Pease *et al.*, 2012).

Der große Vorteil der Ultra-Low-Attachment Methode ist der deutlich geringere Einfluss von zusätzlichen künstlichen Kompartimenten, die wie oben beschreiben die Zell-Matrix-Interaktion beeinflussen und so Aktivität von Wirkstoffen verändern könnten, weshalb auf diese Methode zurückgegriffen wurde. Zusätzlich zur Methode hängt die Bildung von

Sphäroiden auch stark von den biologischen Eigenschaften der verwendeten Zellen ab, sodass eine große Variabilität in der Matrixvernetzung und Porosität herrscht.

Allgemein konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Integrität aller Sphäroide/Aggregate durch die Behandlung mit P8-D6 deutlich beeinflusst wurde. Zusätzlich konnte eine deutlich erhöhte Zytotoxizität in den mit P8-D6 behandelten Sphäroiden/Aggregaten nachgewiesen werden als in den Kontrollgruppen Topotecan und PBS. Auch eine signifikant höhere Apoptoseinduktion konnte für P8-D6 im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden. Dabei fällt auf, dass P8-D6 wieder um den Konzentrationsfaktor  $\sim 10$  potenter ist als die Kontrollen. Die Veränderungen der Sphäroid-/Aggregatintegrität wurden neben der Phasenkontrastmikroskopie mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Diese Aufnahmen zeigen sehr eindrucksvoll den Effekt von P8-D6 auf Porosität und Oberflächenbeschaffenheit der Sphäroide/Aggregate. Bisher sind nur wenige Publikationen veröffentlicht, die ein Zytostatika-behandeltes Sphäroides versus unbehandeltes Sphäroid mittels Rasterelektronenmikroskopie vergleichen (Sun *et al.*, 2020). Diese eine Publikation weist einen Effekt von Taxol auf Sphäroide nach.

## 5.4 Wirkung im lebenden Organismus

Die Aggressivität des Ovarialkarzinoms und damit einhergehend die hohe Sterberate von 13,1 pro 100.000 Personen bewegt Ärzte und Wissenschaftler neue Therapieoptionen in diesem Gebiet zu entwickeln (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). Einen wesentlichen Teil der präklinischen Arzneimittelentwicklung stellt dabei die *in vivo* Testung in lebenden Systemen dar. Sie ist eine Möglichkeit einer Untersuchung der Wirksamkeit und Toxizität, aber auch der Prozesse der Verstoffwechslung und Verteilung eines Wirkstoffs in einem Multiorgansystem. Damit bildet sie eine Annäherung der Therapiesituation im menschlichen Körper nach. In dieser Arbeit sollte das Xenograft-Mausmodell dem Nachweis der *in vivo* Wirksamkeit von P8-D6 gegenüber dem humanen Ovarialkarzinom dienen. Dabei stellt bereits die Planung eines solchen Systems eine große Herausforderung dar. Humane Tumorzellen werden immunsuppressiven Mäusen injiziert und nach Anwachsen des Tumors beginnt eine Behandlung. Indessen ist das Anwachsen des Tumors abhängig vom Maustyp, aber auch von der Teilungsfähigkeit und der Wachstumskinetik der humanen Tumorzellen. Einhergehend damit ist der Zeitpunkt der initialen Behandlung optimal zu wählen, um eine realistische Aussage aus den Versuchen zu generieren, jedoch auch den Tumor therapieren zu können.

Der Verlauf der in dieser Arbeit beschriebenen Mausexperimente zeigt, wie variabel dieses *in vivo* System ist. In Abschnitt 3.4.2 ist eine Methode beschrieben, welches aufbauend auf Untersuchungen und einer Etablierung aus dem Jahr 2006 (Bauerschlag *et al.*, 2010) und der Literatur (Vassileva *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010) geplant wurde. Im Laufe der Durchführung zeigte sich jedoch ein deutlich aggressiveres Tumorwachstum als zu erwarten war (Abschnitt 4.5.1). Die Mäuse erreichten kaum die Initialbehandlung bevor Abbruchkriterien erreicht wurden, obwohl mit Tieren desselben Mausstamms, vom selben Züchter und derselben Tumorzelllinie wie 2006 gearbeitet wurde (Bauerschlag *et al.*, 2010). Somit konnte keine Erkenntnisgewinn zur Therapie aus der maximal zweimaligen Behandlung mit P8-D6 gezogen werden. Dies zeigt, dass ein *in vivo* System aus multiplen Faktoren aufgebaut ist, die durch kleine Veränderungen in der Kultivierung der Tumorzellen oder durch genetischen Drift hervorgerufene Unterschiede in der Mauslinie das komplexe System verändern können. Gleichwohl konnten die Ergebnisse dieser ersten *in vivo* Behandlungsstudie den sehr aggressiven Verlauf einer Ovarialkarzinomkrankung mit Aszites- und Metastasenbildung zeigen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde eine Etablierungsstudie durchgeführt, welche zeigen konnte, dass mit einer Reduktion der injizierten Tumordosis und einem früheren Behandlungsbeginn das Tumorwachstum kontrollierbarer und damit therapierbar wurde. Diese Etablierungsstudie diente als Ausgangspunkt für die zweite Behandlungsstudie. In dieser wurden die Tiere mindestens siebenmal mit P8-D6 behandelt bevor ein Abbruchkriterium erreicht wurde. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass P8-D6 im Vergleich zu PBS einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum besitzt. Dies legten sowohl die Biolumineszenzmessungen also auch die Ultraschalluntersuchungen der therapierten Mäuse dar. Allgemein bestätigt dies die Wirksamkeit von P8-D6 im *in vivo* System. Im Vergleich zu den *in vitro* Ergebnissen, in denen P8-D6 der Positivkontrolle Topotecan in der antitumoralen Wirkung eklatant (~10-fache) überlegen war, zeigten die *in vivo* Ergebnisse eine nahezu vergleichbare Wirksamkeit.

Ein *in vivo* Modell dient nicht nur dem Nachweis der Wirksamkeit, sondern kann auch Auskunft über toxische Prozesse im Lebewesen infolge der Wirkstoffbehandlung liefern. Dabei zeigt die Überlebenskurve der zweiten Behandlungsstudie einen klaren Vorteil der Topotecan-Behandlung gegenüber P8-D6. Dies ist durch die auftretende hämatologische Toxizität in den mit P8-D6 behandelten Mäusen begründet. Nach wiederholter i.v. Gabe von P8-D6 veränderte sich die Hautfarbe der Tiere sichtbar von rosa zu weiß. Die Sektion der Tiere zeigte eine signifikant verkleinerte Milz. Die Milz dient der Maus neben der

immunologischen Komponente auch zum Eisenstoffwechsel und der Hämatopoese (Iseki *et al.*, 2008). Hier gibt es Unterschiede zur humanen Funktion der Milz, die nur in der Embryonalphase an der Blutbildung beteiligt ist und postnatal nur die Aussortierung alter Erythrozyten und Thrombozyten bedingt (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019). In weiteren Untersuchungen müsste somit geprüft werden, was die Reduktion der Milz verursacht hat und welche Folgen dies für eine humane Therapie hätte. Bedingt durch die Beeinträchtigung der Milz ist es wahrscheinlich, dass das Immunsystem der immunsuppressiven Mäuse vermehrt herunterreguliert wurde. SCID/beige-Mäuse besitzen durch Mutation eine schwere kombinierte Immunschwäche, die sowohl B- als auch T-Lymphozyten betrifft und vermehrt zu defekten natürlichen Killerzellen führt (Carter *et al.*, 2018). Dadurch besitzen diese SCID/beige-Mäuse verglichen zu anderen Mausarten ohnehin eine kleinere Milz (0,03 g versus 0,1 g) und weniger Lymphozyten (34,40 % versus 80 %) (Klejewski *et al.*, 2017). Da das Immunsystem auch für eine Tumorabwehr verantwortlich ist, wäre es möglich, dass mit weiterer Herunterregulierung des Immunsystems der Tumor im späteren Versuchsabschnitt erleichtert wachsen und sich leichter Aszites ausbilden konnte. Dies könnten neben einer möglichen Metabolisierung von P8-D6 Gründe für die verglichen zu den Erwartungen schlechtere Wirksamkeit sein.

In der Kooperation mit der AG Peipp wurde die Wirksamkeit von P8-D6 auf das Multiple Myelom untersucht. In dieser Arbeit wurde P8-D6 *in vitro* auch an mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Probanden getestet (Klusz *et al.*, Manuskript 2020). Neueste Ergebnisse zeigen, dass bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  P8-D6 nach 24 h nur ~40 % der Blutzellen viable vorliegen. Dies könnte ein Hinweis auf die hämatologische Toxizität sein.

Bereits bekannt ist, dass die wichtigsten dosislimitierenden Toxizitäten von Topoisomerase-Inhibitoren weitgehend hämatologisch (Neutropenie, Anämie, Thrombozytopenie) sind. Es ist für viele, auch bereits etablierte Topoisomerase-Inhibitoren, wie Etoposid, Irinotecan oder Topotecan, sowie duale Topoisomerase-Inhibitoren, wie Pyrazoloacridin eine hämatologische Toxizität beschrieben worden (Armstrong und O'Reilly, 1998; van Gijn *et al.*, 2000; Ramaswamy *et al.*, 2011; Hexal AG, 2018, 2019). Aus diesem Grund war zu vermuten, dass der duale Topoisomerase-Inhibitor P8-D6 leichte, dosisabhängige hämatologische Toxizitäten verursacht könnte. Da diese Nebenwirkungen jedoch häufig dosisabhängig sind, wären weitere Untersuchungen der durch P8-D6 verursachten hämatologischen Toxizität und der damit einhergehenden Findung eines therapeutischen Fensters sehr sinnvoll. Auch wäre empfehlenswert zu untersuchen, ob SCID/beige-Mäuse

als stark immunsuppressive Mäuse mit verkleinerter Milz (Klejewski *et al.*, 2017) ein sinnvolles Testsystem darstellen. Anderenfalls wäre ein Wechsel auf ein anderes Maussystem oder ein anderes Tiermodell zu überlegen. Jedoch werden die meisten publizierten Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodelle mit SCID/beige-Mäuse durchgeführt, da sie durch ihre kombinierte Immunsuppression das Anwachsen humaner Ovarialkarzinomzellen erleichtern (Yokoi *et al.*, 2017; Vassileva *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010). Anderenfalls wäre die Testung in einem syngenem Mausmodell überlegenswert (Wilkinson-Ryan *et al.*, 2019). Der Vorteil dieses Modells wäre die Verwendung von nicht-immunsuppressiven Mäusen. Mit funktionierendem Immunsystem wirkt neben der Zytotoxizität die Eigenantwort des Immunsystems. Dies ist realitätsnäher bezogen auf die Situation im Menschen. Nachteil wäre hier die Therapie eines murinen Tumors.

Auch müsste geklärt werden, warum Topotecan im Vergleich zu P8-D6 in der getesteten Dosis keine Toxizität hervorruft.

In einer 2008 publizierte Studien mit SCID/beige-Mäusen von MOLINA *et al.* wurde Topotecan dreifach oral in einer Dosis von 10 mg/kg KG verabreicht und es war keine Gewichtsreduktion beschrieben. Angaben zur Milz und zur hämatologischen Toxizität wurden nicht gemacht. Jedoch zeigt diese Arbeit, dass die hämatologische Toxizität nicht einhergehend mit einer Gewichtsreduktion ist. In einer weiteren *in vivo* Studie an CDF1 (immunsuffizient) Mäusen verstarben die Tiere nach der i.p. Applikation der dualen Topo-Inhibitoren Intoplicine (20mg/kg KG) und TAS-103 (7mg/kg KG).

Bereits 2017 wurden von Meier *et al.* erste Toxizitätsdaten zu P8-D6 bei *i.v.* Einfachgabe in weiblichen athymischen Nacktmäusen vorgestellt. Dabei lag die MTD bei 1mg/kg KG. In Toxizitätsstudien zu P8-D6 in SCID/beige-Mäusen wurde eine MTD von 1 mg/kg KG (*i.v.* vierfach Gabe) bestimmt (Klausz *et al.*, Manuskript 2020). Die AG Peipp berichtete jedoch nicht von einer auftretenden hämolytischen Toxizität. Jedoch werden Toxizitätsstudien ohne Beisein von Tumor und ohne stressende Narkose durchgeführt. Dies könnten Gründe sein, warum in der hier beschriebenen zweiten Behandlungsstudie früher eine hämatologische Toxizität auftrat im Vergleich zu den Toxizitätsstudien der AG Peipp.

Aufgrund der hohen Wirksamkeit von P8-D6 in *in vitro* Untersuchungen wäre es trotz der aufgetretenen hämatologischen Toxizität sinnvoll P8-D6 weiter als potentiellen Arzneistoffkandidaten für Ovarialkarzinom zu verfolgen und zu untersuchen. Dafür sollten zunächst weitere Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden, bevor weitere Tumormodelle zur Testung der Wirksamkeit folgen.

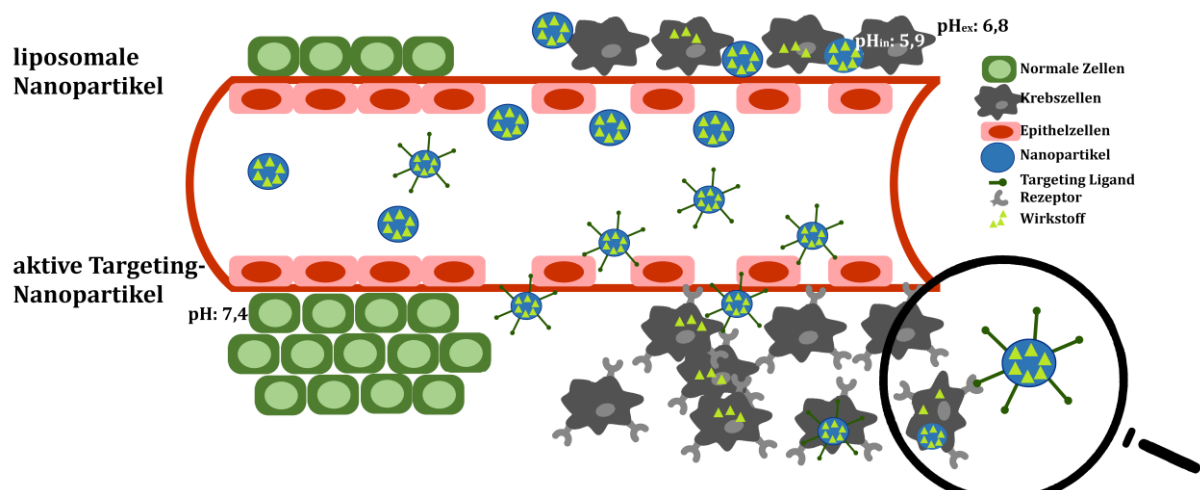


## 5.5 Geplanter Weg bis zu den klinischen Studien

Ein weiterer Schwerpunkt der Arzneimittelentwicklung besteht in der Aufklärung der Pharmakokinetik. Diese Arbeit konnte zwar zeigen, dass P8-D6 sein Target in der Zelle erreicht. Jedoch ist dies noch kein Beweis dafür, dass P8-D6 im Menschen nach guter Absorption und Distribution unverändert seinen Wirkort erreicht. Die Pharmakokinetik beschäftigt sich mit den Prozessen der Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion (LADME-Schema). Die Verteilung kann dabei die Dosis am Wirkort stark beeinflussen. Die Metabolisierung kann Veränderungen in der Aktivität bewirken. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus von P8-D6 Voraussetzung für den Eintritt in klinische Studien. Es ist bereits bekannt, dass P8-D6 durch die endständige basische, tertiäre Aminofunktion, die bei physiologischem pH-Wert überwiegend protoniert vorliegt, eine hohe Wasserlöslichkeit besitzt. Das BCS (*Biopharmaceutical Classification System*) wiederum spricht gut löslichen und permeablen Substanzen eine gute Bioverfügbarkeit zu. Diese müsste jedoch noch experimentell bestätigt werden. Hierzu wären Tierversuche mit Ratten denkbar, denen peroral und *i.v.* der Wirkstoff appliziert wird. Anschließend könnte eine Bestimmung der Substanzkonzentration im Serum mittels HPLC erfolgen, sodass die Bioverfügbarkeit berechnet werden könnte und die Proben auf entstandene Metabolite untersucht werden könnten. Anhand der strukturellen Merkmale von P8-D6 können mögliche Metabolismusreaktionen, wie eine oxidative *N*-Demethylierung an der basischen Seitenkette oder eine oxidative Demethylierung der Methoxygruppen am Phenylsubstituenten zwar diskutiert werden. Genaue Angaben zu den Metaboliten sich jedoch erst durch Inkubationsstudien mit humanen Lebermikrosomen oder CYP-Enzymen mit anschließender Identifizierung mittels LC-MS und NMR möglich. Auch könnte die Bioverfügbarkeitsuntersuchungen für die Metaboliten-Detektion herangezogen werden. Neben der Aufklärung der Pharmakokinetik müssten ergänzend zu den in dieser Arbeit beschriebenen *in vivo* Versuchen weitere Toxizitätsstudien und Tierexperimente zum Nachweis der Wirksamkeit durchgeführt werden. Diese sind rechtliche Voraussetzung für die Beantragung klinischer Studien für P8-D6 (Deklaration von Helsinki, Arzneimittelgesetz, REACH-Verordnung).

Aufgrund der aufgetretenen Toxizität von P8-D6 im Ovarialkarzinom-Xenograft-Mausmodell ist zu überlegen, ob ein Wirkstoffträgersystem den Transport des Wirkstoffs zur Zielzelle erleichtern könnte und somit unerwünschte Arzneimittelwirkungen reduzieren könnte. Das Prinzip des Antikörper-Wirkstoff-Konjugat wäre eine zielgerichtete Therapie,

welches bereits in Abschnitt 1.4.2 beschrieben wurde. Dabei erkennt ein Antikörper, welcher mit Wirkstoffmolekülen beladen wurde, spezifisch Oberflächenstrukturen der Zielzelle und kann eine Rezeptor-vermittelte Endozytose hervorrufen. Nach Freisetzung des Toxins durch Spaltung des Linkers oder lysosomale Degradation, kann der Wirkstoff dann zum Wirkort diffundieren und seine Wirkung gezielt in Tumorzellen ausüben. Aufgrund der chemischen Struktur von P8-D6 mit der basischen Seitenkette (Dimethylaminoethoxy-Rest) wäre eine Verlinkung dort denkbar. Ein weiteres Wirkstoff-trägersystem wären liposomale Nanopartikel oder aktive Targeting-Nanopartikel, welche mit Wirkstoffmolekülen beladen werden könnten (Abb.5.2). Aktive Targeting-Nanopartikel sind Systeme, die an Targeting-Liganden auf der Oberfläche von Nanopartikeln konjugiert sind und so eine wichtige Rolle bei der Verbesserung der Wirkstoffselektivität für die Krebszelle spielen. Das Prinzip der Nanopartikel funktioniert über eine erhöhte Arzneimittelakkumulation durch passive und aktive Transportmechanismen in Krebszellen. Blutgefäße, die Krebszellen versorgen, besitzen eine höhere Permeabilität und Retentionseffekte. Aufgrund der Größe können Nanopartikel erleichtert in der Krebszelle penetrieren und akkumulieren. Mithilfe der pH-Verschiebung in Krebszellen ins saurere Milieu könnten in Liposomen degradieren und den Wirkstoff freigegeben (Webb und Jordan, 2017; Shen *et al.*, 2008).



**Abb.5.2: Wirkprinzip liposomaler Nanopartikel und aktiver Targeting-Nanopartikel für die Krebstherapie.**

Nanopartikel besitzen eine vereinfachte Penetration in Krebszellen, wodurch die Akkumulation des Wirkstoffs in diese Zellen erhöht ist. Durch ein Trägersystem und eine damit verbundene Verpackung des Wirkstoffs wird die Selektivität des Wirkstoffs auf die Krebszelle erhöht. Liposomale Nanopartikel könnten sich durch pH-Verschiebung auflösen und den Wirkstoff in der Zielzelle freigegeben. Aktive Targeting-Nanopartikel transportieren den Wirkstoff selektiv zur Zielzelle (modifiziert nach (Muhamad *et al.*, 2018).

Aktive Targeting-Nanopartikel agieren ähnlich zu Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten. Die Nanopartikel sind mit einem Wirkstoff beladen und an der Oberfläche der Nanopartikel

befinden sich Targeting-Liganden, die spezifisch an Rezeptoren der Tumorzelle binden können und diese so den Wirkstoff in die Tumorzelle einschleusen (Muhamad *et al.*, 2018). Diese Wirkprinzipien würden die Selektivität des Arzneistoffs zu Tumorzellen erhöhen und das Nebenwirkungspotential senken.

Diese Arbeit stellt also einen wesentlichen Teil der präklinischen Forschung zum Wirkstoff P8-D6 da. Jedoch ist die Entwicklung ein langer und methodisch aufwändiger Weg, sodass neben Ergänzungen einiger *in vitro* Daten noch weitere Nachweise der Wirksamkeit und der kontrollierbaren Toxizität von P8-D6 in einem geeigneten *in vivo* Modell notwendig sind, um klinische Studien für P8-D6 möglich zu machen.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

ABIGERGES D; ARMAND J P; CHABOT G G; BRUNO R; BISSERY M C; BAYSSAS M; KLINK-ALAKL M ET AL.

Phase I and pharmacology study of intoplicine (RP 60475; NSC 645008), novel topoisomerase I and II inhibitor, in cancer patients.

*Anticancer Drugs* **1996**; 7, 166–174.

ADJEI A A

Current status of pyrazoloacridine as an anticancer agent.

*Investigational new drugs* **1999**; 17, 43–48.

ADJEI A A; CHARRON M; ROWINSKY E K; SVINGEN P A; MILLER J; REID J M; SEBOLT-LEOPOLD J ET AL.

Effect of pyrazoloacridine (NSC 366140) on DNA topoisomerases I and II.

*Clinical cancer research* **1998**; 4, 683–691.

AGARWAL R; LINCH M; KAYE S B

Novel therapeutic agents in ovarian cancer.

*European Journal of Surgical Oncology* **2006**; 32, 875–886.

AGHAJANIAN C; GOFF B; NYCUM L R; WANG Y V; HUSAIN A; BLANK S V

Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer.

*Gynecologic oncology* **2015**; 139, 10–16.

AHMED N; THOMPSON E W; QUINN M A

Epithelial–mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas.

*Journal of Cellular Physiology* **2007**; 213, 581–588.

AICHINGER G; LICHTENBERGER F-B; STEINHAUER T N; FLÖRKEMEIER I; DEL FAVERO G; CLEMENT B; MARKO D

The Aza-Analogous Benzo[c]phenanthridine P8-D6 Acts as a Dual Topoisomerase I and II Poison, thus Exhibiting Potent Genotoxic Properties.

*Molecules* **2020**; 25, 1524.

AOYAGI Y; KOBUNAI T; UTSUGI T; OH-HARA T; YAMADA Y

In vitro antitumor activity of TAS-103, a novel quinoline derivative that targets topoisomerases I and II.

*Japanese journal of cancer research : Gann* **1999**; 90, 578–587.

ARMSTRONG D; O'REILLY S

Clinical Guidelines for Managing Topotecan-Related Hematologic Toxicity.

*The oncologist* **1998**; 3, 4–10.

ARONSON J K

Side Effects of Drugs Annual 27,

1.Aufl. Amsterdam: *Elsevier Science* **2004**, 477–479.

AVENDANO C; MENENDEZ J C

Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs,

2.Aufl. Burlington: *Elsevier Science* **2015**, 633.

BAKER S D; WADKINS R M;; STEWART C F; BECK W T; DANKS M K

Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as

- determined by fluorescence digital imaging microscopy.  
*Cytometry* **1995**; 19, 134–145.
- BARDIA A; TOLANEY S M; LOIRAT D; PUNIE K; OLIVEIRA M; RUGO H S; BRUFKY A ET AL.  
ASCENT: A randomized phase III study of sacituzumab govitecan (SG) vs treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC).  
*Annals of Oncology* **2020**; 31, 1149–1150.
- BAROK M; JOENSUU H; ISOLA J  
Trastuzumab emtansine: Mechanisms of action and drug resistance.  
*Breast cancer research* **2014**; 16, 209.
- BAUERSCHLAG D O; MAASS N; LEONHARDT P; VERBURG F A; PECKS U; ZEPPERLICK F; MORGENROTH A ET AL.  
Fatty acid synthase overexpression.  
*Journal of translational medicine* **2015**; 13, 146.
- BAUERSCHLAG D O; SCHEM C; TIWARI S; EGBERTS J H; WEIGEL M T; KALTHOFF H; JONAT W ET AL.  
Sunitinib (SU11248) inhibits growth of human ovarian cancer in xenografted mice.  
*Anticancer research* **2010**; 30, 3355–3360.
- BEAUFORT C M; HELMIJR J C A; PISKORZ A M; HOOGSTRAAT M; RUIGROK-RITSTIER K; BESSELINK N; MURTAZA M ET AL.  
Ovarian Cancer Cell Line Panel (OCCP).  
*PLoS ONE* **2014**; 9, 103988.
- BECK A; HAEUW J-F; WURCH T; GOETSCH L; BAILLY C; CORVAIA N  
The next generation of antibody-drug conjugates comes of age.  
*Discovery medicine* **2010**; 10, 329–339.
- BECK D E; LV W; ABDELMALAK M; PLESCIA C B; AGAMA K; MARCHAND C; POMMIER Y ET AL.  
Synthesis and biological evaluation of new fluorinated and chlorinated indenoisoquinoline topoisomerase I poisons.  
*Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**; 24, 1469–1479.
- BERGER D P UND MERTELSMANN R  
Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie, 6.Aufl. Heidelberg: *Hüthig Jehle Rehm* **2017**, 325-330.
- BERGER J M; GAMBLIN S J; HARRISON S C; WANG J C  
Structure and mechanism of DNA topoisomerase II.  
*Nature* **1996**; 379, 225–232.
- BERTRAND R; O'CONNOR P M; KERRIGAN D; POMMIER Y  
Sequential administration of camptothecin and etoposide circumvents the antagonistic cytotoxicity of simultaneous drug administration in slowly growing human colon carcinoma HT-29 cells.  
*European Journal of Cancer* **1992**; 28, 743–748.
- BISSERY M C; NGUYEN C H; BISAGNI E; VRIGNAUD P; LAVELLE F  
Antitumor activity of intoplicine (RP 60475, NSC 645008), a new benzo-pyrido-indole.  
*Investigational new drugs* **1993**; 11, 263–277.
- BOEGE F  
Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects.  
*European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* **1996**; 34, 873–888.

- BOO L; HO W Y; ALI N M; YEAP S K; KY H; CHAN K G; YIN W F ET AL.  
MiRNA Transcriptome Profiling of Spheroid-Enriched Cells with Cancer Stem Cell Properties in Human Breast MCF-7 Cell Line.  
*International journal of biological sciences* **2016**; 12, 427–445.
- BRAUN M S; RICHMAN S D; QUIRKE P; DALY C; ADLARD J W; ELLIOTT F; BARRETT J H ET AL.  
Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer.  
*Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2008**; 26, 2690–2698.
- BRAY F; FERLAY J; SOERJOMATARAM I; SIEGEL R L; TORRE L A; JEMAL A  
Global cancer statistics 2018.  
*CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**; 68, 394–424.
- BRESLIN S; O'DRISCOLL L  
The relevance of using 3D cell cultures, in addition to 2D monolayer cultures, when evaluating breast cancer drug sensitivity and resistance.  
*Oncotarget* **2016**; 7, 45745–45756.
- BROOKS S C; LOCKE E R; SOULE H D  
Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) From Breast Carcinoma.  
*The Journal of biological chemistry* **1973**; 248, 6251–6253.
- CAMACHO K M; KUMAR S; MENEGATTI S; VOGUS D R; ANSELMO A C; MITRAGOTRI S  
Synergistic antitumor activity of camptothecin-doxorubicin combinations and their conjugates with hyaluronic acid.  
*Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2015**; 210, 198–207.
- CARREL A  
PURE CULTURES OF CELLS.  
*The Journal of experimental medicine* **1912**; 16, 165–168.
- CARTER L M; POTY S; SHARMA S K; LEWIS J S  
Preclinical optimization of antibody-based radiopharmaceuticals for cancer imaging and radionuclide therapy-Model, vector, and radionuclide selection.  
*Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* **2018**; 61, 611–635.
- CHABNER B A  
NCI-60 Cell Line Screening.  
*Journal of the National Cancer Institute* **2016**; 108, 1–7.
- CHAMPOUX J J  
DNA topoisomerases.  
*Annual review of biochemistry* **2001**; 70, 369–413.
- Chipscreen Biosciences: Phase Ib Study of Chiauranib in Patients with Ovarian Cancer **2017**.  
<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03166891> (aktualisiert: 18.01.20).
- CLEMENT B; GIRRESER U; STEINHAUER T N; MEIER C; MARKO D; AICHINGER G; KALTEFLEITER I ET AL.  
11-Substituted Benzo[ c ]phenanthridines.  
*ChemMedChem* **2016**; 11, 2155–2170.

- CLEMENT B; WEIDE M; WOLSCHENDORF U; KOCK I  
A two-step synthesis of cytostatically active benzocphenanthridine derivatives.  
*Angewandte Chemie* **2005**; 44, 635–638.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer  
Ovarian cancer and oral contraceptives.  
*The Lancet* **2008**; 371, 303–314.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer  
Menopausal hormone use and ovarian cancer risk.  
*The Lancet* **2015**; 385, 1835–1842.
- COLOMBO N; GUTHRIE D; CHIARI S; PARMAR M; QIAN W; SWART A M; TORRI V ET AL.  
International Collaborative Ovarian Neoplasm Trial 1.  
*Journal of the National Cancer Institute* **2003**; 95, 125–132.
- COLONE M; KALIAPPAN S  
Redox-active Microcapsules as Drug Delivery System in Breast Cancer Cells and Spheroids.  
*Journal of Molecular and Genetic Medicine* **2016**; 10, 1–6.
- COSTANTINO A; MILAZZO G; GIORGINO F; RUSSO P; GOLDFINE I D; VIGNERI R; BELFIORE A  
Insulin-resistant MDA-MB231 Human Breast Cancer Cells Contain a Tyrosine Kinase Inhibiting Activity.  
*Molecular endocrinology* **1993**; 7, 1667–1676.
- CRAMER D W; HUTCHISON G B; WELCH W R; SCULLY R E; RYAN K J  
Determinants of ovarian cancer risk. I. Reproductive experiences and family history.  
*Journal of the National Cancer Institute* **1983**; 71, 711–716.
- CREEMERS G J; BOLIS G; GORE M; SCARFONE G; LACAVE A J; GUASTALLA J P; DESPAX R ET AL.  
Topotecan, an active drug in the second-line treatment of epithelial ovarian cancer.  
*Journal of clinical oncology* **1996**; 14, 3056–3061.
- CUSHMAN M; CHENG L  
Total synthesis of nitidine chloride.  
*Journal of Organic Chemistry* **1978**; 43, 286–288.
- DAVOU G I; CHUWANG N J; ESSIEN U C; CHOJI T PP; ECHEONWU B C; LUGOS M D  
Cytotoxicity analysis of etoposide and cisplatin on cell lines from human lung cancer and normal human lung.  
*International Research Journal of Medicine and Medical Sciences* **2019**; 7, 40–47.
- DENEL-BOBROWSKA M; LUKAWSKA M; OSZCZAPOWICZ I; MARCZAK A  
Histological Subtype of Ovarian Cancer as a Determinant of Sensitivity to Formamidine Derivatives of Doxorubicin - In Vitro Comparative Studies With SKOV-3 and ES-2 Cancer Cell Lines.  
*Asian Pacific journal of cancer prevention* **2016**; 17, 4223–4231.
- DENNY W A; BAGULEY B C  
Dual topoisomerase I/II inhibitors in cancer therapy.  
*Current topics in medicinal chemistry* **2003**; 3, 339–353.
- DERAKHSHAN A; CHEN Z; VAN WAES C  
Therapeutic Small Molecules Target Inhibitor of Apoptosis Proteins in Cancers with Deregulation of Extrinsic and Intrinsic Cell Death Pathways.  
*Clinical cancer research* **2017**; 23, 1379–1387.

Deutsche Krebsgesellschaft  
Gynäkologische Tumoren,

1.Aufl. München: *Urban & Fischer* **2016**, 281-287.

Deutsche Krebsgesellschaft: ONKO-Internetportal **2017**.

<http://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/andere-krebsarten/eierstockkrebs.html> (aktualisiert: 23.02.17).

DEWEESE J E; OSHEROFF N

The DNA cleavage reaction of topoisomerase II.

*Nucleic acids research* **2009**; 37, 738–748.

DOMINGUEZ-BRAUER C; THU K L; MASON J M; BLASER H; BRAY M R; MAK T W

Targeting Mitosis in Cancer.

*Molecular cell* **2015**; 60, 524–536.

DU BOIS A; LÜCK H J; MEIER W; MÖBUS V; WARM M; COSTA S; RICHTER B ET AL.

Entwicklung der Therapie des Ovarialkarzinoms: AGO-Studiengruppe Ovarialkarzinom Protokoll OVAR-3: Carboplatin-Paclitaxel versus Cisplatin-Paclitaxel in der Primärtherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms,

1.Aufl.: *Springer Berlin Heidelberg* **2000**, 287-289.

DU BOIS A UND PFISTERER J

Das Ovarialkarzinom,

1.Aufl. Stuttgart: *Thieme* **2002**, 8-14.

ECKSTEIN N

Platinum resistance in breast and ovarian cancer cell lines.

*Journal of experimental & clinical cancer research* **2011**; 30, 91.

EDMONDSON R; BROGLIE J J; ADCOCK A F; YANG L

Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors.

*Assay and drug development technologies* **2014**; 12, 207–218.

EFFERTH T

Molekulare Pharmakologie und Toxikologie Berlin: *Springer* **2007**.

Eli Lilly and Company: A Study of Prexasertib (LY2606368) in Platinum-Resistant or Refractory Recurrent Ovarian Cancer **2018**.

<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03414047> (aktualisiert: 18.03.20).

EMA: Etopophos, INN-etoposide phosphate **2017**.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/etopophos-article-30-referral-annex-ii\\_de.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/etopophos-article-30-referral-annex-ii_de.pdf) (aktualisiert: 26.06.17).

ETIÉVANT C; KRUCZYNSKI A; BARRET J-M; PERRIN D; VAN HILLE B; GUMINSKI Y; HILL B T

F 11782, a dual inhibitor of topoisomerases I and II with an original mechanism of action in vitro, and markedly superior in vivo antitumour activity, relative to three other dual topoisomerase inhibitors, intoplicin, aclarubicin and TAS-103.

*Cancer Chemother Pharmacol* **2000**; 46, 101–113.

European Collection of Authenticated Cell Cultures: Cell line profile MDA-MB-231 (ECACC catalogue no. 92020424).

<https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf>.



European Collection of Authenticated Cell Cultures: Cell line profile Ovarian Cancer cell line A2780 (ECACC catalogue no.93112519).

<https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/113526/a2780-cell-line-profile.pdf>.

EWESUEDO R B; IYER L; DAS S; KOENIG A; MANI S; VOGELZANG N J; SCHILSKY R L ET AL.  
Phase I clinical and pharmacogenetic study of weekly TAS-103 in patients with advanced cancer.

*Journal of clinical oncology* **2001**; 19, 2084–2090.

FAHLKE C

Taschenatlas Physiologie,

2.Aufl. München: *Urban & Fischer* **2015**, 22-23.

FLEISCHMANN T; JIRKOF P; HENKE J; ARRAS M; CESAROVIC N

Injection anaesthesia with fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice.

*Laboratory animals* **2016**; 50, 264–274.

FREISSMUTH M; OFFERMANN S; BÖHM S

Pharmakologie und Toxikologie,

2.Aufl. Berlin: *Springer* **2016**, 785-845.

FROELICH-AMMON S J; OSHEROFF N

Topoisomerase poisons.

*The Journal of biological chemistry* **1995**; 270, 21429–21432.

FU S; DONG L; SUN W; XU Y; GAO L; MIAO Y

Stromal-epithelial crosstalk provides a suitable microenvironment for the progression of ovarian cancer cells in vitro.

*Cancer investigation* **2013**; 31, 616–624.

GANAPATHI R N; GANAPATHI M K

Mechanisms regulating resistance to inhibitors of topoisomerase II.

*Frontiers in pharmacology* **2013**; 4, 89.

GAO Y; LIU P; SHI R

Anlotinib as a molecular targeted therapy for tumors.

*Oncology Letters* **2020**; 20, 1001–1014.

Genzyme (Sanofi): Dose Escalation Study to Assess the Safety and Tolerability of Genz-644282 in Patients With Solid Tumors **2009**.

<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT00942799> (aktualisiert: 19.03.14).

GHAHREMANI M; FOGHI A; DORRINGTON J H

Activation of Fas Ligand/Receptor System Kills Ovarian Cancer Cell Lines by an Apoptotic Mechanism.

*Gynecologic oncology* **1998**; 70, 275–281.

GOMEZ-LECHON M J; LAHOZ A; GOMBAU L; CASTELL J V; DONATO M T

In Vitro Evaluation of Potential Hepatotoxicity Induced by Drugs.

*Current Pharmaceutical Design* **2010**; 16, 1963–1977.

GOODMAN T T; OLIVE P L; PUN S H

Increased nanoparticle penetration in collagenase-treated multicellular spheroids.

*International Journal of Nanomedicine* **2007**; 2, 265–274.

GREM J L; POLITI P M; BERG S L; BENCHEKROUN N M; PATEL M; BALIS F M; SINHA B K ET AL.

Cytotoxicity and DNA damage associated with pyrazoloacridine in MCF-7 breast cancer

cells.

*Biochemical pharmacology* **1996**; 51, 1649–1659.

GRIDELLI C; PERRONE F; GALLO C; CIGOLARI S; ROSSI A; PIANTEDOSI F; BARBERA S ET AL.  
Chemotherapy for Elderly Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.  
*Journal of the National Cancer Institute* **2003**; 95, 362–372.

GUO L; LIU X; NISHIKAWA K; PLUNKETT W  
Inhibition of topoisomerase IIalpha and G2 cell cycle arrest by NK314, a novel benzo-  
cphenanthridine currently in clinical trials.  
*Molecular cancer therapeutics* **2007**; 6, 1501–1508.

HABYAN S A; KALOS C; SZYMBORSKI J; MCCAFFREY L  
Multicellular detachment generates metastatic spheroids during intra-abdominal dis-  
semination in epithelial ovarian cancer.  
*Oncogene* **2018**; 37, 5127–5135.

HALLIWELL B; GUTTERIDGE J M C  
Free radicals in biology and medicine,  
4.Aufl. Oxford: *Univ. Press* **2007**.

HANAHAHAN D; WEINBERG R A  
Hallmarks of cancer.  
*Cell* **2011**; 144, 646–674.

HARTER P; HAUKE J; HEITZ F; REUSS A; KOMMOSS S; MARMÉ F; HEIMBACH A ET AL.  
Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecu-  
tive ovarian cancer patients (AGO-TR-1).  
*PLoS ONE* **2017**; 12, 0186043.

HEESTAND G M; SCHWAEDERLE M; GATALICA Z; ARGUELLO D; KURZROCK R  
Topoisomerase expression and amplification in solid tumours.  
*European Journal of Cancer* **2017**; 83, 80–87.

HERDEGEN T; BÖHM R; CULMAN J  
Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie,  
4.Aufl. Stuttgart: *Thieme* **2020**, 557–578.

HEREDIA-SOTO V; REDONDO A; BERJÓN A; MIGUEL-MARTÍN M; DÍAZ E; CRESPO R; HERNÁNDEZ A ET  
AL.  
High-throughput 3-dimensional culture of epithelial ovarian cancer cells as preclinical  
model of disease.  
*Oncotarget* **2018**; 9, 21893–21903.

Hexal AG: Fachinformation: **2018**.  
[https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/fi/topotecan\\_hx\\_1mg\\_inf\\_spc.pdf](https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/fi/topotecan_hx_1mg_inf_spc.pdf) (aktu-  
alisiert: 01.03.18).

Hexal AG: Fachinformation: Etoposid HEXAL® 20 mg/ml Konzentrat zur Herstellung ei-  
ner Infusionslösung **2019**.  
[https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/fi/etoposid\\_hx\\_fi-1586262319.pdf](https://www.hexal.biz/praeparate/dokumente/fi/etoposid_hx_fi-1586262319.pdf) (ak-  
tualisiert: 01.10.19).

Hospira Deutschland GmbH: Fachinformation: Paclitaxel Hospira 6 mg/ml Konzentrat  
zur Herstellung einer Infusionslösung **2011**.  
<http://www.detect-studien.de/dokumente/d3/fachinfo/Paclitaxel.pdf> (aktualisiert:  
01.01.11).

- HSIANG Y H; HERTZBERG R; HECHT S; LIU L F  
Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.  
*The Journal of biological chemistry* **1985**; 260, 14873–14878.
- HUANG X; WEIMER J; VON WURMB-SCHWARK N; FREDRIK R; ARNOLD N; SCHEM C  
Alteration of STR profiles in ovarian carcinoma cells during primary culture.  
*Arch Gynecol Obstet* **2016**; 294, 369–376.
- ISAACS R J; HARRIS A L; HICKSON I D  
Regulation of the Human Topoisomerase II $\alpha$  Gene Promoter in Confluence-arrested Cells.  
*Journal of Biological Chemistry* **1996**; 271, 16741–16747.
- ISEKI A; MORITA Y; NAKAUCHI H; EMA H  
Hematopoietic Stem Cells in the Mouse Spleen.  
*Blood* **2008**; 112, 2421.
- JAVADI S; GANESHAN D M; QAYYUM A; IYER R B; BHOSALE P  
Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging.  
*American journal of roentgenology* **2016**; 206, 1351–1360.
- JELOVAC D; EMENS L A  
HER2-directed therapy for metastatic breast cancer.  
*Oncology* **2013**; 27, 166–175.
- JONGE M J A de; KAYE S; VERWEIJ J; BROCK C; READE S; SCURR M; VAN DOORN L ET AL.  
Phase I and pharmacokinetic study of XR11576, an oral topoisomerase I and II inhibitor, administered on days 1–5 of a 3-weekly cycle in patients with advanced solid tumours.  
*British journal of cancer* **2004**; 91, 1459–1465.
- JU B-G; LUNYAK V V; PERISSI V; GARCIA-BASSETS I; ROSE D W; GLASS C K; ROSENFELD M G  
A topoisomerase II $\beta$ -mediated dsDNA break required for regulated transcription.  
*Science* **2006**; 312, 1798–1802.
- KAUFMANN S H  
Antagonism between Camptothecin and Topoisomerase II-directed Chemotherapeutic Agents in a Human Leukemia Cell Line.  
*Cancer Res* **1991**; 51, 1129–1136.
- KAYMAK A; SAYOLS S; PAPADOPOULOU T; RICHLI H  
Role for the transcriptional activator ZRF1 in early metastatic events in breast cancer progression and endocrine resistance.  
*Oncotarget* **2018**; 9, 28666–28690.
- KETRON A C; DENNY W A; GRAVES D E; OSHEROFF N  
Amsacrine as a topoisomerase II poison.  
*Biochemistry* **2012**; 51, 1730–1739.
- KIMLIN L C; CASAGRANDE G; VIRADOR V M  
In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research.  
*Molecular carcinogenesis* **2013**; 52, 167–182.
- KING C; DIAZ H B; MCNEELY S; BARNARD D; DEMPSEY J; BLOSSER W; BECKMANN R ET AL.  
LY2606368 Causes Replication Catastrophe and Antitumor Effects through CHK1-Dependent Mechanisms.  
*Molecular cancer therapeutics* **2015**; 14, 2004–2013.

- KING P D; PERRY M C  
Hepatotoxicity of chemotherapy.  
*The oncologist* **2001**; 6, 162–176.
- KIRSCHNER S; FELIX M C; HARTMANN L; BIERBAUM M; MAROS M E; KERL H U; WENZ F ET AL.  
In vivo micro-CT imaging of untreated and irradiated orthotopic glioblastoma xenografts in mice.  
*Journal of neuro-oncology* **2015**; 122, 245–254.
- KISELEV E; DEGUIRE S; MORRELL A; AGAMA K; DEXHEIMER T S; POMMIER Y; CUSHMAN M  
7-azaindenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors and potential anticancer agents.  
*Journal of medicinal chemistry* **2011**; 54, 6106–6116.
- KLAUSZ K; KELLNER C; GEHLERT C; KROHN S; WILCKEN H; FLÖRKEMEIER I; GÜNTHER A ET AL.  
The novel dual topoisomerase inhibitor P8-D6 shows anti-myeloma activity in vitro and in vivo **Manuskript 2020**.
- KLEJEWSKI A; ŚWIERCZEWSKA M; ZAORSKA K; BRAZERT M; NOWICKI M; ZABEL M; JANUCHOWSKI R  
New and Old Genes Associated with Topotecan Resistance Development in Ovarian Cancer Cell Lines.  
*Anticancer research* **2017**; 37, 1625–1636.
- KOCK I; HEBER D; WEIDE M; WOLSCHELDORF U; CLEMENT B  
Synthesis and biological evaluation of 11-substituted 6-aminobenzocphenanthridine derivatives, a new class of antitumor agents.  
*Journal of medicinal chemistry* **2005**; 48, 2772–2777.
- KOH Y; NISHIO K; SAIJO N  
Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents.  
*The Cancer Handbook* **2005**.
- KOSTOPOULOS I; KARAVASILIS V; KARINA M; BOBOS M; XIROS N; PENTHEROUDAKIS G; KAFIRI G ET AL.  
Topoisomerase I but not thymidylate synthase is associated with improved outcome in patients with resected colorectal cancer treated with irinotecan containing adjuvant chemotherapy.  
*BioMedCentral cancer* **2009**; 9, 339.
- KURBACHER C M; KORN C; DEXEL S; SCHWEEN U; KURBACHER J A; REICHEL T R; ARENZ P N  
Isolation and Culture of Ovarian Cancer Cells and Cell Lines.  
*Cancer Cell Culture* **2011**, 161–180.
- KURTZBERG L S; ROTH S; KRUMBHOLZ R; CRAWFORD J; BORMANN C; DUNHAM S; YAO M ET AL.  
Genz-644282, a novel non-camptothecin topoisomerase I inhibitor for cancer treatment.  
*Clinical cancer research* **2011**; 17, 2777–2787.
- LAEMMLI U K  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **1970**; 227, 680–685.
- LAGIES S; SCHLIMPERT M; NEUMANN S; WÄLDIN A; KAMMERER B; BORNER C; PEINTNER L  
Cells grown in three-dimensional spheroids mirror in vivo metabolic response of epithelial cells.  
*Communications Biology* **2020**; 3, 1–10.

- LARSEN A K; ESCARGUEIL A E; SKLADANOWSKI A  
Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy.  
*Pharmacology & Therapeutics* **2003**; 99, 167–181.
- LARSEN A K; GRONDARD L; COUPRIE J; DESOIZE B; COMOE L; JARDILLIER J C; RIOU J F  
The antileukemic alkaloid fagaronine is an inhibitor of DNA topoisomerases I and II.  
*Biochemical pharmacology* **1993**; 46, 1403–1412.
- LAX S F  
Die Pathologie: Schlüssel zur Therapie des Ovarialkarzinoms.  
*Gynäkopathologie* **2017**; 1, 18–22.
- LECLUYSE E L; ALEXANDRE E  
Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue.  
*Methods in molecular biology* **2010**; 640, 57–82.
- LEDERMANN J; HARTER P; GOURLEY C; FRIEDLANDER M; VERGOTE I; RUSTIN G; SCOTT C ET AL.  
Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer.  
*The New England journal of medicine* **2012**; 366, 1382–1392.
- LEFEVRE D; RIOU J-F; AHOMADEGBE J C; ZHOU D; BENARD J; RIOU G  
Study of molecular markers of resistance to m-AMSA in a human breast cancer cell line.  
*Biochemical pharmacology* **1991**; 41, 1967–1979.
- Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms **2017**.  
<http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (aktualisiert: 01.12.17).
- Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre S3 Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms **2020a**.  
<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html> (aktualisiert: 01.02.20).
- Leitlinienprogramm Onkologie: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren **2020b**.  
<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Ovarialkarzinom.61.0.html> (aktualisiert: 01.03.20).
- LI L; BI X; SUN H; LIU S; YU M; ZHANG Y; WENG S ET AL.  
Characterization of ovarian cancer cells and tissues by Fourier transform infrared spectroscopy.  
*Journal of Ovarian Research* **2018**; 11, 359.
- LLUCH A; AZAGRA P; CERVANTES A; MUÑOZ M; ALBEROLA V; SANTABARBARA P; GARCÍA-CONDE J  
Phase II trial of cisplatin and etoposide as first-line therapy in metastatic breast carcinoma.  
*Oncology* **1994**; 51, 352–355.
- LORUSSO P M; WEISS D; GUARDINO E; GIRISH S; SLIWKOWSKI M X  
Trastuzumab Emtansine.  
*Clinical cancer research* **2011**; 17, 6437–6447.
- LUKYANOVA N Y; RUSETSKYA N V; TREGUBOVA N A; CHEKHUN V F  
Molecular Profile and Cell Cycle in MCF-7 Cells Resistant to Cisplatin and Doxorubicin.  
*Experimental oncology* **2009**; 31, 87–91.

LÜLLMANN-RAUCH R; ASAN E  
Taschenlehrbuch Histologie,  
6.Aufl. Stuttgart: *Thieme* **2019**.

MA S; TAN W; DU B; LIU W; LI W; CHE D; ZHANG G  
Oridonin effectively reverses cisplatin drug resistance in human ovarian cancer cells via induction of cell apoptosis and inhibition of matrix metalloproteinase expression.  
*Molecular medicine reports* **2016**; 13, 3342–3348.

MAHNER S; TRILLSCH F; HARTER P; HILPERT F; PFISTERER J; DU BOIS A; WAGNER U  
Moderne Therapieoptionen beim Ovarialkarzinom.  
*ONKOLOGIE heute* **2013**; 5, 41–46.

MEIER C  
Zur Entwicklung neuer aza-analoger Benzo[c]phenanthridine mit antitumorale Wirkung.  
Dissertation Kiel **2014**.

MEIER C; STEINHÄUER T N; KOCZIAN F; PLITZKO B; JAROLIM K; GIRRESER U; BRAIG S ET AL.  
A Dual Topoisomerase Inhibitor of Intense Pro-Apoptotic and Antileukemic Nature for Cancer Treatment.  
*ChemMedChem* **2017**; 12, 347–352.

MESSMER W M; TIN-WA M; FONG H H S; BEVELLE C; FARNSWORTH N R; ABRAHAM D J; TROJÁNEK J  
Fagaronine, a New Tumor Inhibitor Isolated from *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae).  
*Journal of Pharmaceutical Sciences* **1972**; 61, 1858–1859.

MILLER C M; O'SULLIVAN E C; MCCARTHY F O  
Novel 11-Substituted Ellipticines as Potent Anticancer Agents with Divergent Activity against Cancer Cells.  
*Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **2019**; 12, 90.

MIRZA M R; MONK B J; HERRSTEDT J; OZA A M; MAHNER S; REDONDO A; FABBRO M ET AL.  
Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer.  
*The New England journal of medicine* **2016**; 375, 2154–2164.

MISTRY P; STEWART A J; DANGERFIELD W; BAKER M; LIDDLE C; BOOTLE D; KOFLER B ET AL.  
In vitro and in vivo characterization of XR11576, a novel, orally active, dual inhibitor of topoisomerase I and II.  
*Anti-cancer Drugs* **2002**; 13, 15–28.

MODI S; SAURA C; YAMASHITA T; PARK Y H; KIM S-B; TAMURA K; ANDRE F ET AL.  
Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer.  
*The New England journal of medicine* **2020**; 382, 610–621.

MOLINA J R; KAUFMANN S H; REID J M; RUBIN S D; GÁLVEZ-PERALTA M; FRIEDMAN R; FLATTEN K S ET AL.  
Evaluation of Lapatinib and Topotecan Combination Therapy.  
*Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2008**; 14, 7900–7908.

MONTERO J C; GARCÍA-ALONSO S; OCAÑA A; PANDIELLA A  
Identification of therapeutic targets in ovarian cancer through active tyrosine kinase profiling.  
*Oncotarget* **2015**; 6, 30057–30071.

- MOORE K; COLOMBO N; SCAMBIA G; KIM B-G; OAKNIN A; FRIEDLANDER M; LISYANSKAYA A ET AL.  
Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer.  
*The New England journal of medicine* **2018**; 379, 2495–2505.
- MOTA A D L; EVANGELISTA A F; MACEDO T; OLIVEIRA R; SCAPULATEMPO-NETO C; VIEIRA R A;  
MARQUES M M C  
Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical  
markers.  
*Oncology Letters* **2017**; 13, 4708–4712.
- MUHAMAD N; PLENGSURIYAKARN T; NA-BANGCHANG K  
Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs  
and traditional/herbal medicines in cancer therapy.  
*International Journal of Nanomedicine* **2018**; 13, 3921–3935.
- MUTSCHLER E; GEISSLINGER G; MENZEL S  
Mutschler Arzneimittelwirkungen,  
11.Aufl. **2020**, 825-915.
- NATH S; DEVI G R  
Three-dimensional culture systems in cancer research.  
*Pharmacology & Therapeutics* **2016**; 163, 94–108.
- NELSON E M; TEWEY K M; LIU L F  
Mechanism of antitumor drug action.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* **1984**; 81, 1361–1365.
- NEWMAN R A; KIM J; NEWMAN B M; BRUNO R; BAYSSAS M; KLINK-ALAKI M; PAZDUR R  
Phase I trial of intoplicine (RP 60475) administered as a 72 h infusion every 3 weeks in  
patients with solid tumors.  
*Anticancer Drugs* **1999**; 10, 889–894.
- NG S W; LIU Y; SCHNIPPER L E  
Cloning and characterization of the 5'-flanking sequence for the human DNA topoi-  
merase II beta gene.  
*Gene* **1997**; 203, 113–119.
- NIU N; MERCADO-URIBE I; LIU J  
Dedifferentiation into blastomere-like cancer stem cells via formation of polyploid giant  
cancer cells.  
*Oncogene* **2017**; 36, 4887–4900.
- NuCana plc: NUC-1031 in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer **2017**.  
<https://ClinicalTrials.gov/show/NCT03146663> (aktualisiert: 14.01.20).
- ÖLANDER M; WIŚNIEWSKI J R; FLÖRKEMEIER I; HANDIN N; URDZIK J; ARTURSSON P  
A simple approach for restoration of differentiation and function in cryopreserved hu-  
man hepatocytes.  
*Archives of toxicology* **2018**; 93, 819–829.
- OSHEROFF N  
Eukaryotic topoisomerase II. Characterization of enzyme turnover.  
*The Journal of biological chemistry* **1986**; 261, 9944–9950.
- OSHEROFF N  
DNA topoisomerases.  
*Biochimica et biophysica acta* **1998**; 1400, 1–2.

- OSMAK M; KAPITANOVIĆ S; VRHOVEC I; BEKETIĆ-ORESKOVIĆ L; JERNEJ B; ELJUGA D; SKRK J  
Characterization of Human Breast Adenocarcinoma SK-BR-3 Cells Resistant to Doxorubicin.  
*Neoplasma* **1997**; 44, 157–162.
- OZA A M; COOK A D; PFISTERER J; EMBLETON A; LEDERMANN J A; PUJADE-LAURAIN E; KRISTENSEN G ET AL.  
Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7).  
*The Lancet Oncology* **2015**; 16, 928–936.
- PAMPALONI F; REYNAUD E G; STELZER E H K  
The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.  
*Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**; 8, 839–845.
- PARK S-J; ARMSTRONG S; KIM C-H; YU M; ROBERTSON K; KELLEY M R; LEE S-H  
Lack of EGF receptor contributes to drug sensitivity of human germline cells.  
*British journal of cancer* **2005**; 92, 334–341.
- PAULL K D; SHOEMAKER R H; HODES L; MONKS A; SCUDIERO D A; RUBINSTEIN L; PLOWMAN J ET AL.  
Display and analysis of patterns of differential activity of drugs against human tumor cell lines.  
*Journal of the National Cancer Institute* **1989**; 81, 1088–1092.
- PEASE J C; BREWER M; TIRNAUER J S  
Spontaneous spheroid budding from monolayers.  
*Biology open* **2012**; 1, 622–628.
- PEREIRA P M R; BERISHA N; BHUPATHIRAJU N V S D K; FERNANDES R; TOMÉ J P C; DRAIN C M; MORENO-SANCHEZ R  
Cancer cell spheroids are a better screen for the photodynamic efficiency of glycosylated photosensitizers.  
*PLoS ONE* **2017**; 12, e0177737.
- PETRU E, JONAT W, FINK D UND KÖCHLI O R  
Praxisbuch Gynäkologische Onkologie,  
4.Aufl. Berlin: *Springer* **2014a**, 1-36.
- PETRU E, JONAT W, FINK D UND KÖCHLI O R  
Praxisbuch Gynäkologische Onkologie,  
4.Aufl. Berlin: *Springer* **2014b**, 109-133.
- PHILLIPS S D; CASTLE R N  
A review of the chemistry of the antitumor benzo[ c ]phenanthridine alkaloids nitidine and fagaronine and of the related antitumor alkaloid coralyne.  
*Journal of Heterocyclic Chemistry* **1981**; 18, 223–232.
- PODDEVIN B; RIOU J F; LAVELLE F; POMMIER Y  
Dual topoisomerase I and II inhibition by intoplicine (RP-60475), a new antitumor agent in early clinical trials.  
*Molecular pharmacology* **1993**; 44, 767–774.
- POMMIER Y  
Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors.  
*Biochimie* **1998**; 80, 255–270.



POMMIER Y

Topoisomerase I inhibitors.

*Nature reviews. Cancer* **2006**; 6, 789–802.

POMMIER Y

Drugging topoisomerases.

*ACS chemical biology* **2013**; 8, 82–95.

POMMIER Y; LEO E; ZHANG H; MARCHAND C

DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs.

*Chemistry & biology* **2010**; 17, 421–433.

Probst

Beschreibung und Darstellungsweise einiger bei der Analyse des *Chelidonium majus* neu aufgefundenen Stoffe.

*Annalen der Pharmacie* **1839**; 29, 113–131.

Promega: ApoLive-Glo™ Multiplex Assay **2015**.

<https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/apolive-glo-multiplex-assay-protocol.pdf?la=en>.

PUGAZHENDHI A; EDISON T N J I; VELMURUGAN B K; JACOB J A; KARUPPUSAMY I

Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems.

*Life sciences* **2018**; 200, 26–30.

PUJADE-LAURAIN E; HILPERT F; WEBER B; REUSS A; POVEDA A; KRISTENSEN G; SORIO R ET AL.  
Bevacizumab combined with chemotherapy for platinum-resistant recurrent ovarian cancer.

*Journal of clinical oncology* **2014**; 32, 1302–1308.

RAGHAVAN S; MEHTA P; HORST E N; WARD M R; ROWLEY K R; MEHTA G

Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity.

*Oncotarget* **2016**; 7, 16948–16961.

RAGHAVAN S; WARD M R; ROWLEY K R; WOLD R M; TAKAYAMA S; BUCKANOVICH R J; MEHTA G

Formation of stable small cell number three-dimensional ovarian cancer spheroids using hanging drop arrays for preclinical drug sensitivity assays.

*Gynecologic oncology* **2015**; 138, 181–189.

RAMASWAMY B; MROZEK E; KUEBLER J P; BEKAI-SAAB T; KRAUT E H

Phase II Trial of Pyrazoloacridine (NSC#366140) in Patients with Metastatic Breast Cancer.

*Investigational new drugs* **2011**; 29, 347–351.

RAO V A; AGAMA K; HOLBECK S; POMMIER Y

Batracylin (NSC 320846), a dual inhibitor of DNA topoisomerases I and II induces histone gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage.

*Cancer research* **2007**; 67, 9971–9979.

REN W; LIU Y; WAN S; FEI C; WANG W; CHEN Y; ZHANG Z ET AL.

BMP9 Inhibits Proliferation and Metastasis of HER2-Positive SK-BR-3 Breast Cancer Cells through ERK1/2 and PI3K/AKT Pathways.

*PLoS ONE* **2014**; 9, 96816.

RIOU J F; FOSSÉ P; NGUYEN C H; LARSEN A K; BISSERY M C; GRONDARD L; SAUCIER J M ET AL.

Intoplicine (RP 60475) and its derivatives, a new class of antitumor agents inhibiting

both topoisomerase I and II activities.  
*Cancer research* **1993**; 53, 5987–5993.

RITCHIE M; TCHISTIAKOVA L; SCOTT N  
Implications of receptor-mediated endocytosis and intracellular trafficking dynamics in the development of antibody drug conjugates.  
*MedPage Today* **2013**; 5, 13–21.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.  
Krebs in Deutschland für 2015/2016,  
12.Aufl. **2019**.

Robert Koch-Institut und Statistischen Bundesamt  
Körperliche Aktivität Heft 25 "Brustkrebs" Berlin **2005**.

ROSENBERG B; VAN CAMO L; KRIGAS T  
Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode.  
*Nature* **1965**; 205, 698–699.

ROY J; NGUYEN T X; KANDULURU A K; VENKATESH C; LV W; REDDY P V N; LOW P S ET AL.  
DUPA conjugation of a cytotoxic indenoisoquinoline topoisomerase I inhibitor for selective prostate cancer cell targeting.  
*Journal of medicinal chemistry* **2015**; 58, 3094–3103.

RUDOLFOVÁ P; HANUŠOVÁ V; SKÁLOVÁ L; BÁRTÍKOVÁ H; MATOUŠKOVÁ P; BOUŠOVÁ I  
Effect of selected catechins on doxorubicin antiproliferative efficacy and hepatotoxicity in vitro.  
*Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)* **2014**; 64, 199–209.

SALERNO S; DA SETTIMO F; TALIANI S; SIMORINI F; LA MOTTA C; FORNACIARI G; MARINI A M  
Recent advances in the development of dual topoisomerase I and II inhibitors as anti-cancer drugs.  
*Current medicinal chemistry* **2010**; 17, 4270–4290.

SARKHOSH-INANLOU R; MOLAPARAST M; MOHAMMADZADEH A; SHAFIEI-IRANNEJAD V  
Sanguinarine enhances cisplatin sensitivity via glutathione depletion in cisplatin-resistant ovarian cancer (A2780) cells.  
*Chemical biology & drug design* **2020**; 95, 215–223.

SCHNEIDER D UND RICHLING F  
Checkliste Arzneimittel A-Z, 669 Wirkstoffprofile,  
7.Aufl. Stuttgart: *Thieme* **2017**.

SEHOULI J; SOMMER H; KLARE P; STAUCH M; ZEIMET A; PAULENZ A; STECK T ET AL.  
A randomized multicenter phase III trial of topotecan monotherapy versus topotecan + etoposide versus topotecan + gemcitabine for second-line treatment of recurrent ovarian cancer.  
*Journal of clinical oncology* **2006**; 24, 5030.

SEITER K  
Toxicity of the topoisomerase I inhibitors.  
*Expert opinion on drug safety* **2005**; 4, 45–53.

SEWELL J M; MACLEOD K G; RITCHIE A; SMYTH J F; LANGDON S P  
Targeting the EGF receptor in ovarian cancer with the tyrosine kinase inhibitor ZD 1839

('Iressa').

*British journal of cancer* **2002**; 86, 456–462.

SHEN Y; TANG H; RADOSZ M; VAN KIRK E; MURDOCH W J  
pH-Responsive Nanoparticles for Cancer Drug Delivery.  
*Springer Protocols* **2008**; 437, 183–216.

SHIMIZU I; SHIMAMOTO N; SAIKI K; FURUJO M; OSAW K  
Lipid Peroxidation in Hepatic Fibrosis.  
*IntechOpen* **2012**, 484–492.

SHOEMAKER R H  
The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen.  
*Nature Reviews Cancer* **2006**; 6, 813–823.

SIEGEL R L; MILLER K D; JEMAL A  
Cancer statistics, 2020.  
*CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2020**; 70, 7–30.

SIMEON S; RIOS J L; VILLAR A  
Pharmacological activities of benzophenanthridine and phenanthrene alkaloids.  
*Die Pharmazie* **1989**; 44, 593–597.

SKOK Ž; ZIDAR N; KIKELJ D; ILAŠ J  
Dual Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets.  
*Journal of medicinal chemistry* **2020**; 63, 884–904.

SLUSARCZYK M; LOPEZ M H; BALZARINI J; MASON M; JIANG W G; BLAGDEN S; THOMPSON E ET AL.  
Application of ProTide technology to gemcitabine.  
*Journal of medicinal chemistry* **2014**; 57, 1531–1542.

SMITH P K; KROHN R I; HERMANSON G T; MALLIA A K; GARTNER F H; PROVENZANO M D; FUJIMOTO E K ET AL.  
Measurement of protein using bicinchoninic acid.  
*Analytical biochemistry* **1985**; 150, 76–85.

SNOW K E; LANGDON S P  
Coculture of Ovarian Cells Using Porous Tissue Culture Inserts.  
*Methods in molecular medicine* **2004**; 88, 303–306.

SOUZA R de; ZAHEDI P; MORIYAMA E H; ALLEN C J; WILSON B C; PIQUETTE-MILLER M  
Continuous docetaxel chemotherapy improves therapeutic efficacy in murine models of ovarian cancer.  
*Molecular cancer therapeutics* **2010**; 9, 1820–1830.

Statistisches Bundesamt: Todesursachen **2019**.  
[https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/\\_inhalt.html#sprg229156/Todesursachen.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg229156/Todesursachen.html)  
(aktualisiert: 2019).

STEINHAUER T N  
Neue isostere stickstoffhaltige Heterozyklen auf Benzo[c]phenanthridin-Basis : synthetischer Zugang und antitumorale Wirksamkeit.  
Dissertation Kiel **2016**.

STENZEL L  
Synthese neuer Benzo[c]phenanthridin-Derivate und deren Stickstoff-Analoga als

potentielle Zytostatika.  
Dissertation Kiel **2009**.

STORDAL B; TIMMS K; FARRELLY A; GALLAGHER D; BUSSCHOTS S; RENAUD M; THERY J ET AL.  
BRCA1/2 mutation analysis in 41 ovarian cell lines reveals only one functionally deleterious BRCA1 mutation.  
*Molecular oncology* **2013**; 7, 567–579.

SUBRAMANIAN D; FURBEE C S; MULLER M T  
ICE bioassay. Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA.  
*Methods in molecular biology* **2001**; 95, 137–147.

Sukanya Gayan; Abhishek Teli; Tuli Dey  
Inherent aggressive character of invasive and non-invasive cells dictates the in vitro migration pattern of multicellular spheroid.  
*Sci Rep* **2017**; 7, 1–11.

SUN M; LEE J; CHEN Y; HOSHINO K  
Studies of nanoparticle delivery with in vitro bio-engineered microtissues.  
*Bioactive Materials* **2020**; 5, 924–937.

TEN BOKKEL H W; GORE M; CARMICHAEL J; GORDON A; MALFETANO J; HUDSON I; BROOM C ET AL.  
Topotecan versus paclitaxel for the treatment of recurrent epithelial ovarian cancer.  
*Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **1997**; 15, 2183–2193.

TEN BOKKEL H W; LANE S R; ROSS G A  
Long-term survival in a phase III, randomised study of topotecan versus paclitaxel in advanced epithelial ovarian carcinoma.  
*Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **2004**; 15, 100–103.

THAL S C; PLESNILA N  
Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO<sub>2</sub> during surgical anesthesia in mice.  
*Journal of neuroscience methods* **2007**; 159, 261–267.

TORRE L A; TRABERT B; DESANTIS C E; MILLER K D; SAMIMI G; RUNOWICZ C D; GAUDET M M ET AL.  
Ovarian cancer statistics, 2018.  
*CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2018**; 68, 284–296.

TSAO S-W; MOK S C; FEY E G; FLETCHER J A; WAN T SK; CHEW E-C; MUTO M G ET AL.  
Characterization of Human Ovarian Surface Epithelial Cells Immortalized by Human Papilloma Viral Oncogenes (HPV-E6E7 ORFs).  
*Experimental Cell Research* **1995**; 218, 499–507.

UHLÉN M; FAGERBERG L; HALLSTRÖM B M; LINDSKOG C; OKSVOLD P; MARDINOGLU A; SIVERTSSON Å ET AL.  
Proteomics. Tissue-based map of the human proteome.  
*Science (New York)* **2015**; 347, 1260419.

VAN GIJN R; LENDFERS R RH; SCHELLENS J HM; BULT A; BEIJNEN J H  
Dual topoisomerase I/II inhibitors.  
*Journal of Oncology Pharmacy Practice* **2000**; 6, 92–108.

VAN GIJN R; TEN BOKKEL HUININK W W; RODENHUIS S; VERMORKEN J B; VAN TELLINGEN O; ROSING H; VAN WARMERDAM L J ET AL.

Topoisomerase I/II inhibitor intoplicine administered as a 24 h infusion: phase I and pharmacologic study.

*Anticancer Drugs* **1999**; 10, 17–23.

VASSILEVA V; MORIYAMA E H; SOUZA R de; GRANT J; ALLEN C J; WILSON B C; PIQUETTE-MILLER M  
Efficacy assessment of sustained intraperitoneal paclitaxel therapy in a murine model of ovarian cancer using bioluminescent imaging.

*British journal of cancer* **2008**; 99, 2037–2043.

VENN A; WATSON L; BRUINSMA F; GILES G; HEALY D

Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation.

*The Lancet* **1999**; 354, 1586–1590.

VERGANI L; GRATTAROLA M; NICOLINI C

Modifications of chromatin structure and gene expression following induced alterations of cellular shape.

*The international journal of biochemistry & cell biology* **2004**; 36, 1447–1461.

VILDHEDE A; WIŚNIEWSKI J R; NORÉN A; KARLGREN M; ARTURSSON P

Comparative Proteomic Analysis of Human Liver Tissue and Isolated Hepatocytes with a Focus on Proteins Determining Drug Exposure.

*Journal of Proteome Research* **2015**; 14, 3305–3314.

VOS S M; TRETTER E M; SCHMIDT B H; BERGER J M

All tangled up.

*Nature reviews. Molecular cell biology* **2011**; 12, 827–841.

WALL M E; WANI M C

Camptothecin and taxol.

*Cancer research* **1995**; 55, 753–760.

WANG L K; JOHNSON R K; HECHT S M

Inhibition of topoisomerase I function by nitidine and fagaronine.

*Chemical research in toxicology* **1993**; 6, 813–818.

WANI M C; TAYLOR H L; WALL M E; COGGON P; MCPHAIL A T

Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*.

*Journal of the American Chemical Society* **1971**; 93, 2325–2327.

WEBB P M; JORDAN S J

Epidemiology of epithelial ovarian cancer.

*Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* **2017**; 41, 3–14.

WEIDE M

Synthese und Testung von Hemmstoffen der flavinhaltigen Monoxygenase.

Dissertation Kiel **1995**.

WILKINSON-RYAN I; PHAM M M; SERGENT P; TAFE L J; BERWIN B L

A Syngeneic Mouse Model of Epithelial Ovarian Cancer Port Site Metastases.

*Translational Oncology* **2019**; 12, 62–68.

WILSTERMANN A; OSHEROFF N

Stabilization of Eukaryotic Topoisomerase II-DNA Cleavage Complexes.

*Current topics in medicinal chemistry* **2003**; 3, 321–338.

WOJTALA A; BONORA M; MALINSKA D; PINTON P; DUSZYNSKI J; WIECKOWSKI M R  
Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry.  
*Methods in enzymology* **2014**; 542, 243–262.

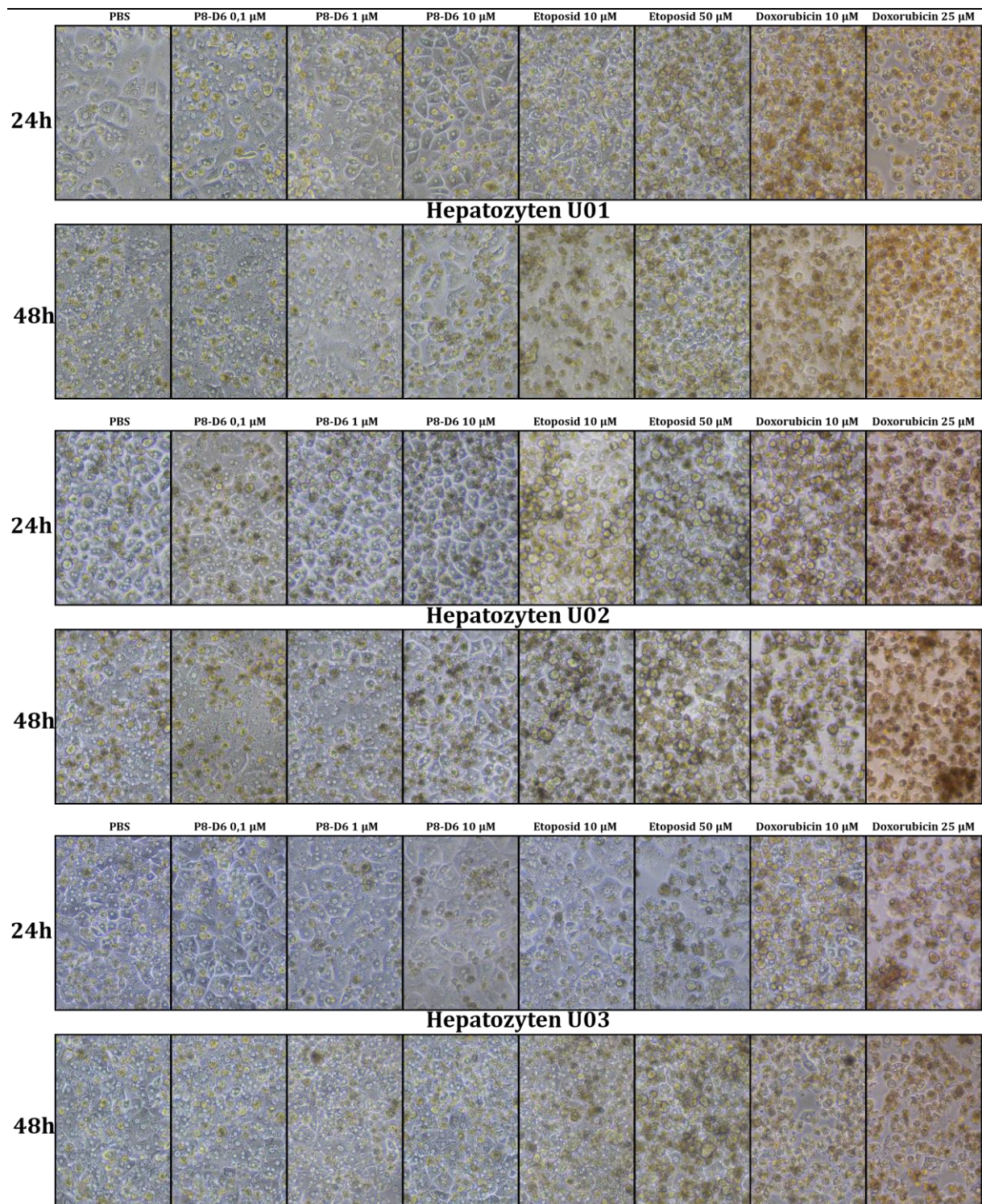
WRIGHT J D; CHEN L; TERGAS A I; PATANKAR S; BURKE W M; HOU J Y; NEUGUT A I ET AL.  
Trends in relative survival for ovarian cancer from 1975 to 2011.  
*Obstetrics and gynecology* **2015**; 125, 1345–1352.

XU L; DENG Q; PAN Y; PENG M; WANG X; SONG L; XIAO M A N ET AL.  
Cancer-associated fibroblasts enhance the migration ability of ovarian cancer cells by increasing EZH2 expression.  
*International Journal of Molecular Medicine* **2014**; 33, 91–96.

YOKOI A; YOSHIOKA Y; YAMAMOTO Y; ISHIKAWA M; IKEDA S; KATO T; KIYONO T ET AL.  
Malignant extracellular vesicles carrying MMP1 mRNA facilitate peritoneal dissemination in ovarian cancer.  
*Nature communications* **2017**; 8.

ZHOU Y; SHAN S; LI Z-B; XIN L-J; PAN D-S; YANG Q-J; LIU Y-P ET AL.  
CS2164, a novel multi-target inhibitor against tumor angiogenesis, mitosis and chronic inflammation with anti-tumor potency.  
*Cancer science* **2017**; 108, 469–477.

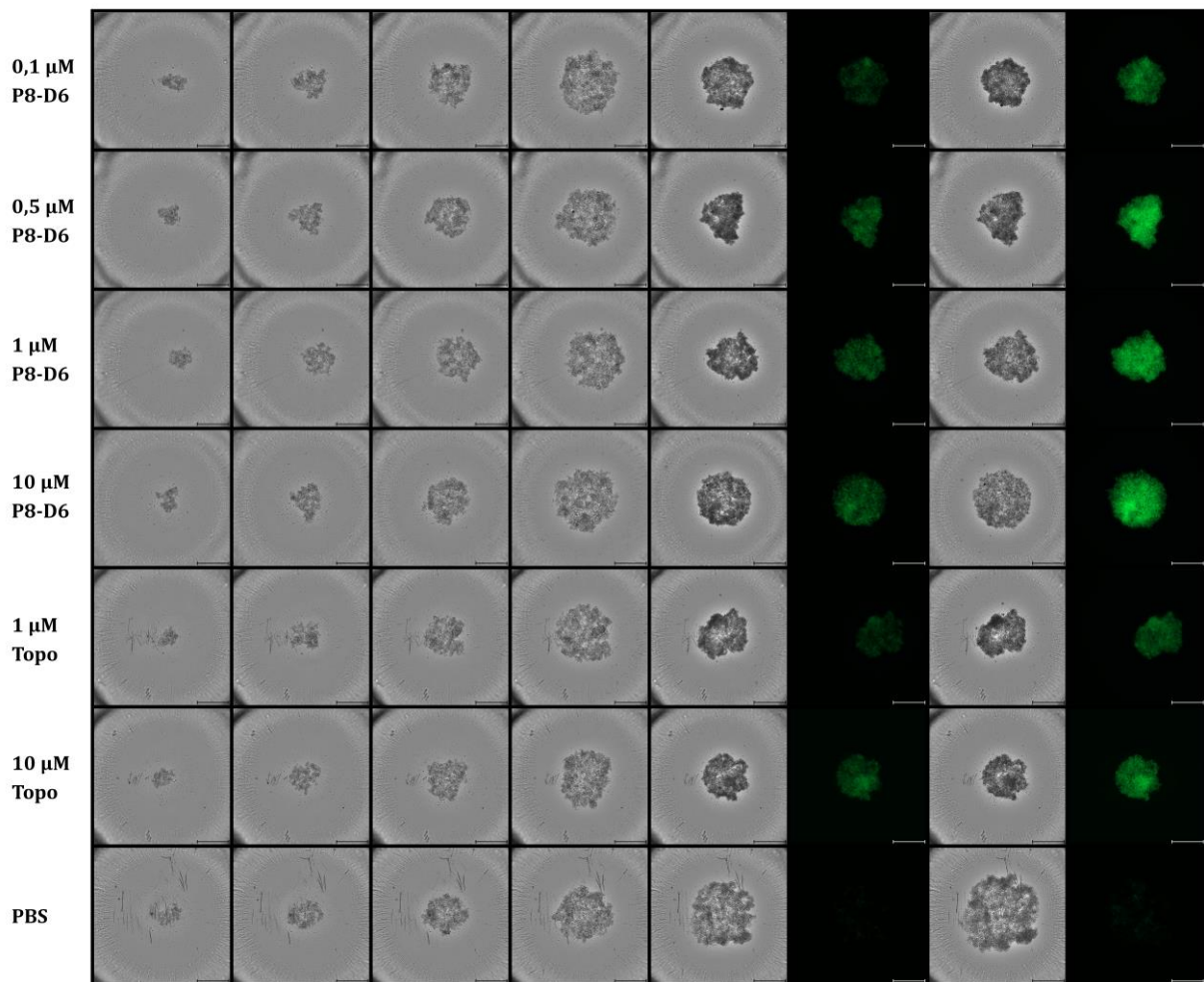
## ANHANG



**Abb. I: Mikroskopische Untersuchung der Hepatotoxizität nach Behandlung (Abschnitt:4.3.2)**

Mikroskopische Untersuchung von drei Chargen primär humaner Hepatozyten nach 24 h- und 48 h-Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Etoposid [10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ], Doxorubicin [10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Es erfolgte eine mikroskopische Kontrolle auf Veränderung der Adhäsion und Veränderung der Zellmorphologie. (Abschnitt:4.3.2.)

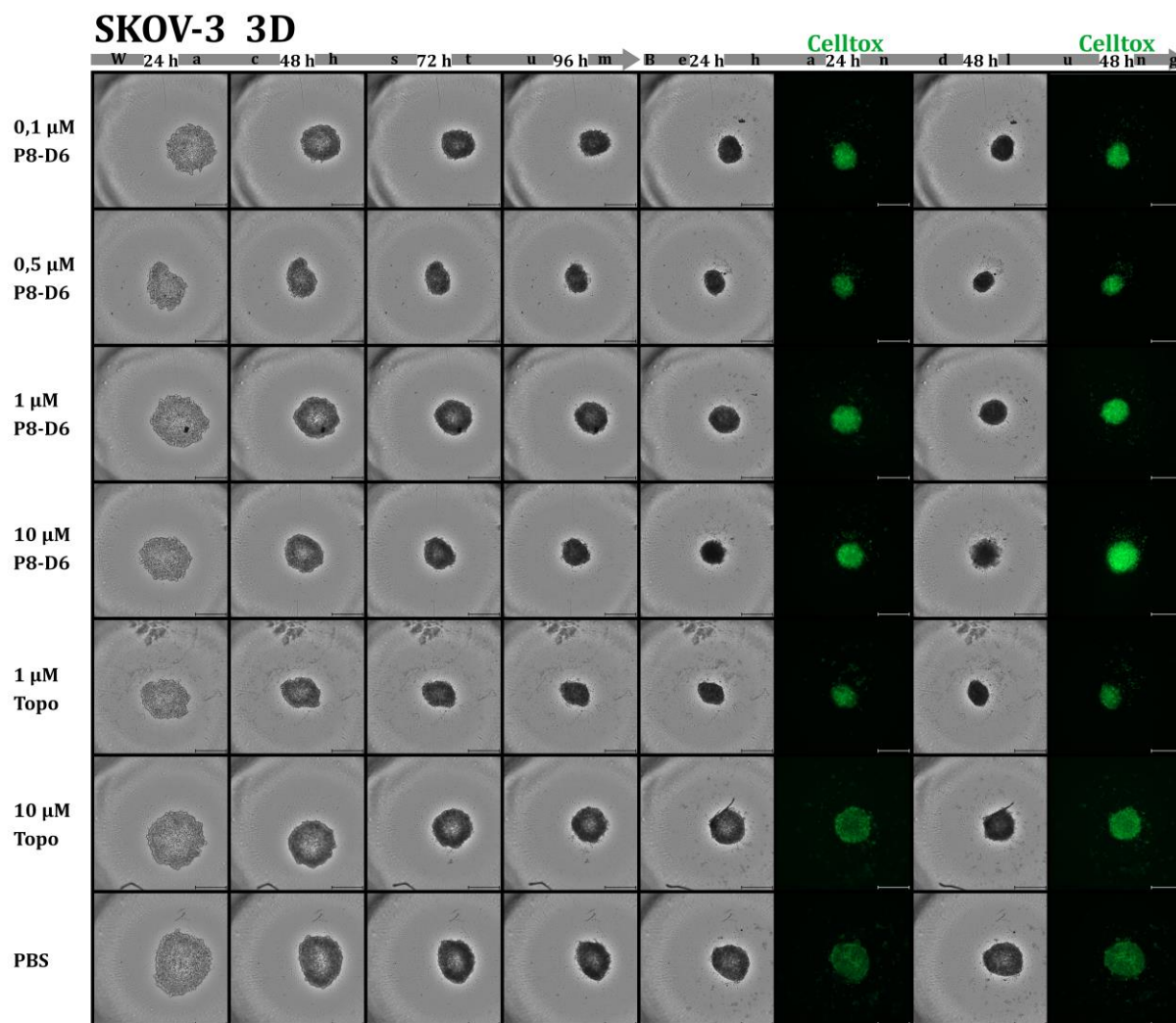
## A2780 3D



**Abb. II: Wachstumsverlauf der A2780-Aggregate und Zytotoxizität.**

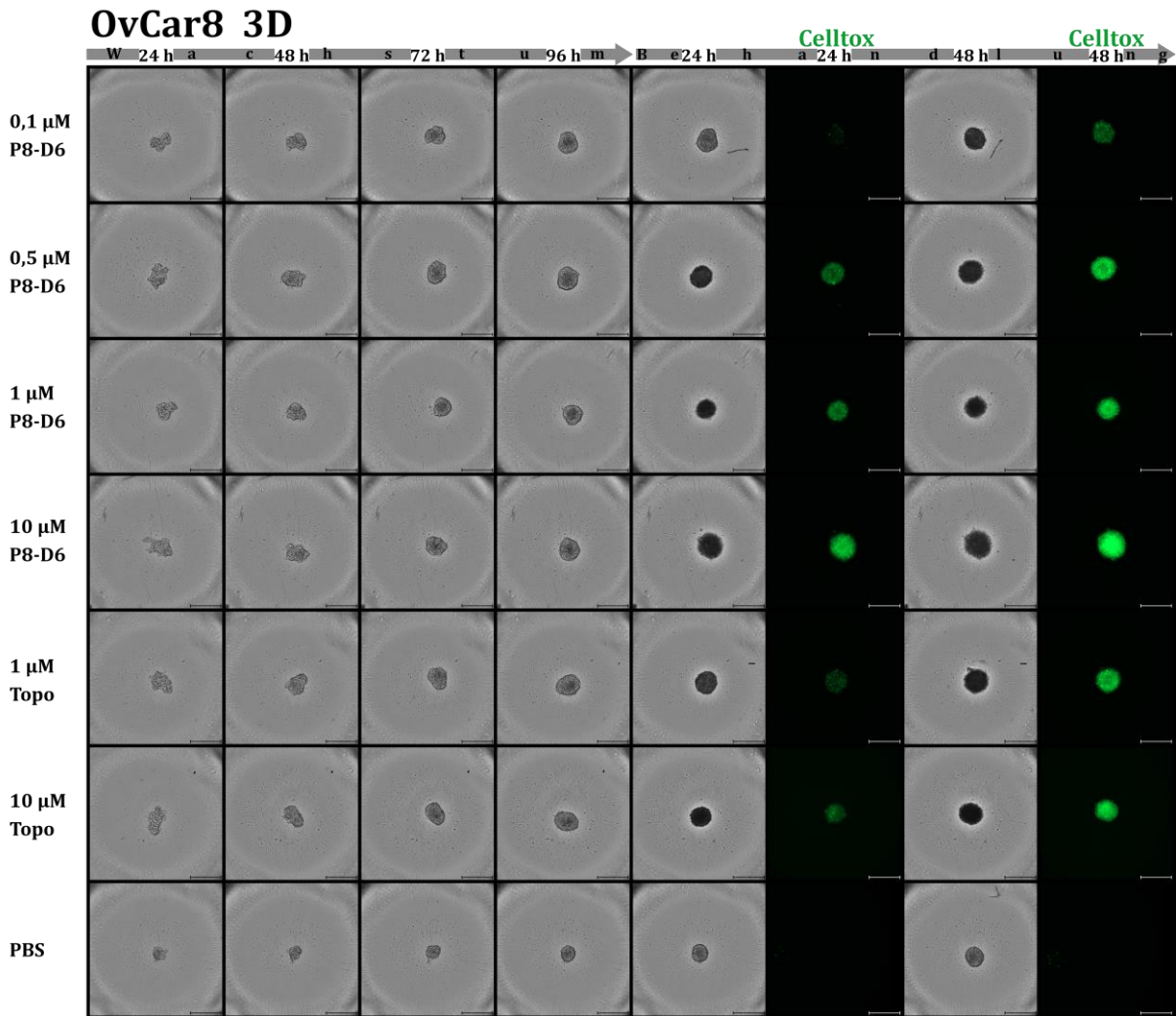
Mikroskopische Untersuchung des Aggregat-Wachstumsverhaltens von A2780 für 96 h- und weitere 48 h- Behandlung mit P8-D6 [0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM], Topotecan [1 µM, 10 µM] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500 µm. (Abschnitt: 4.4.3.)





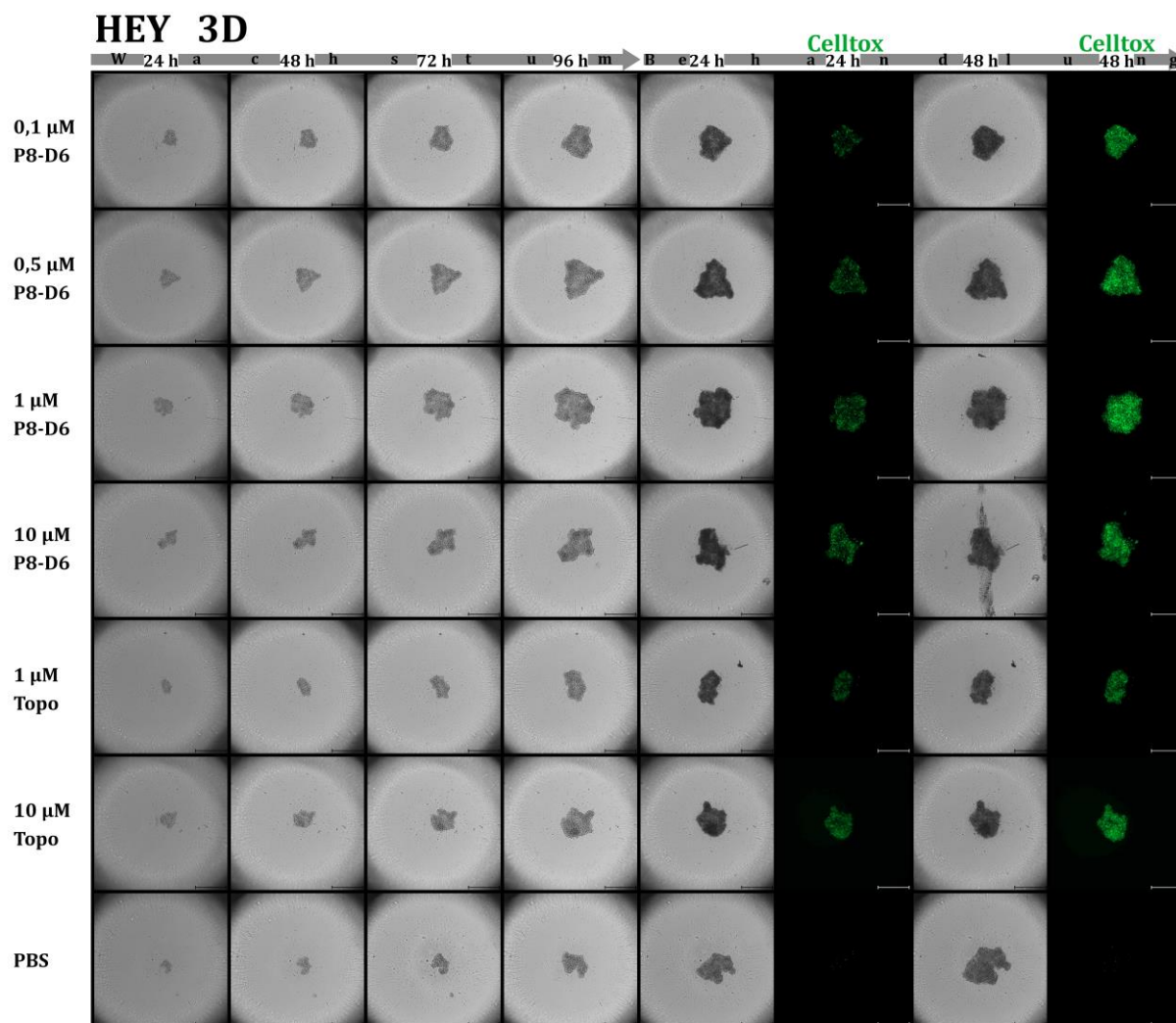
**Abb. III: Wachstumsverlauf der SKOV-3-Sphäroide und Zytotoxizität.**

Mikroskopische Untersuchung des Sphäroid-Wachstumsverhaltens von SKOV-3 für 96 h und weitere 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)



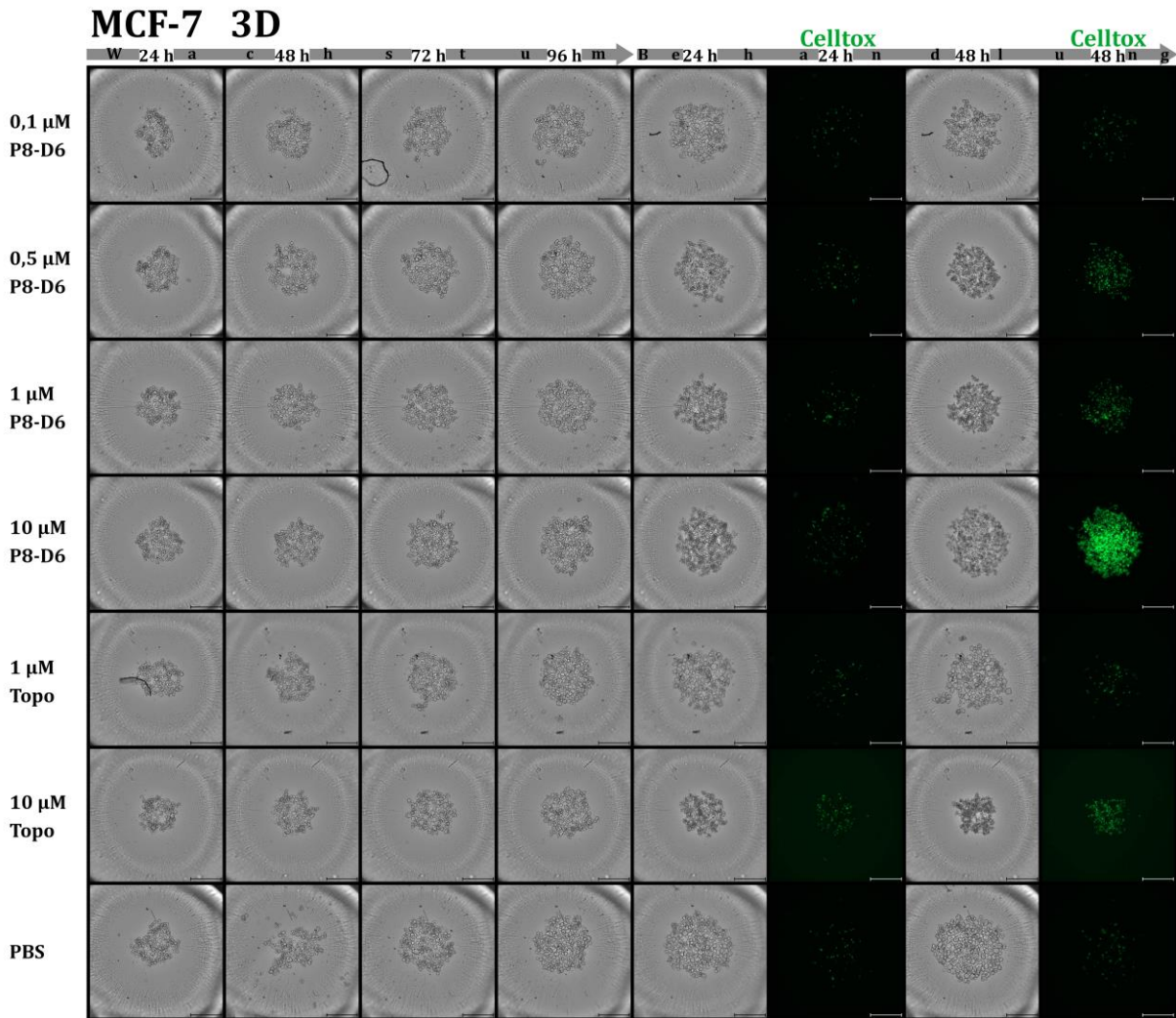
**Abb. IV: Wachstumsverlauf der OvCar8-Sphäroide und Zytotoxizität.**

Mikroskopische Untersuchung des Sphäroid-Wachstumsverhaltens von OvCar8 für 96 h und weitere 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500  $\mu$ m. (Abschnitt: 4.4.3.)



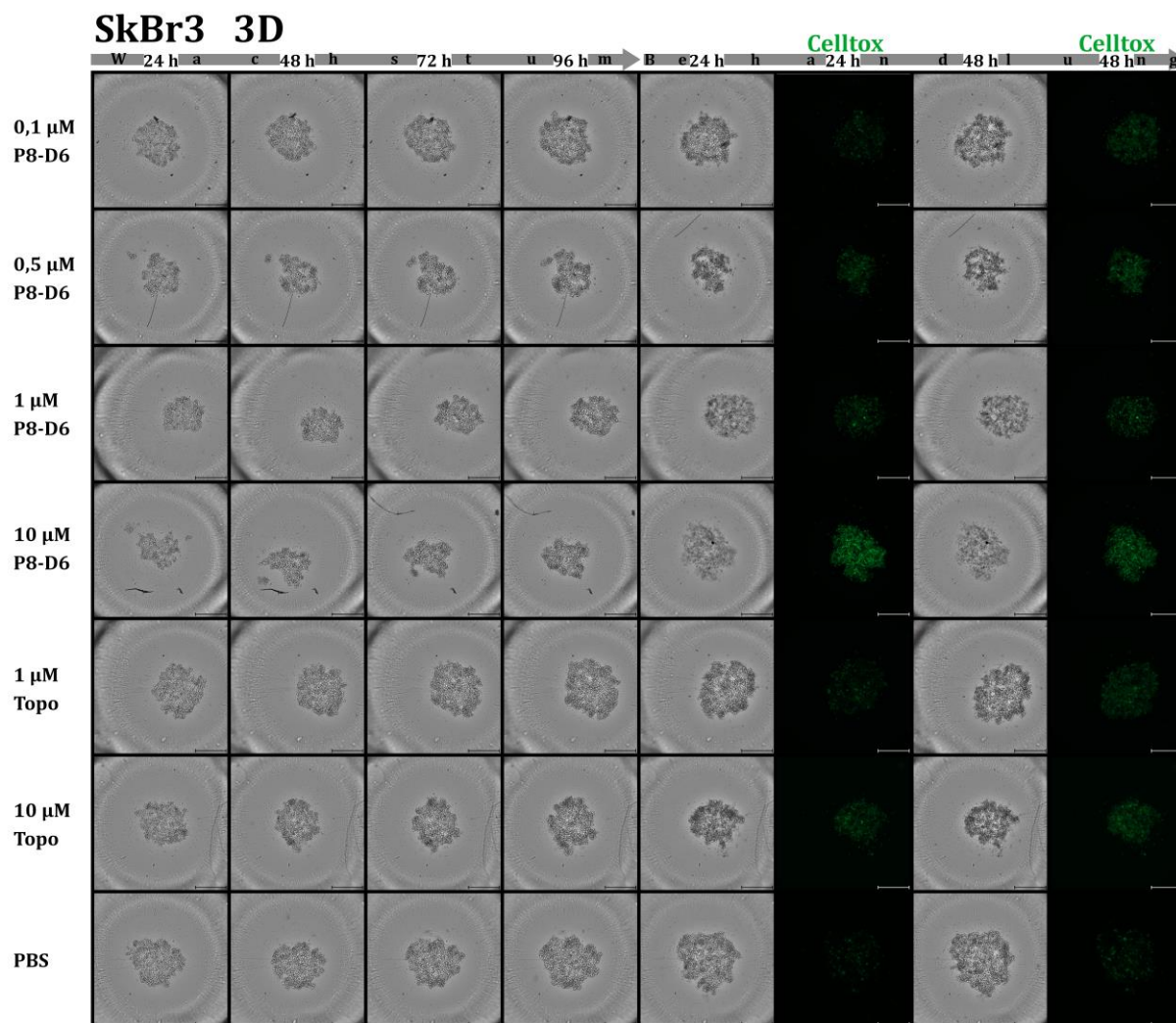
**Abb. V: Wachstumsverlauf der HEY-Aggregate und Zytotoxizität.**

Mikroskopische Untersuchung des Aggregat-Wachstumsverhaltens von HEY für 96 h und weitere 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)



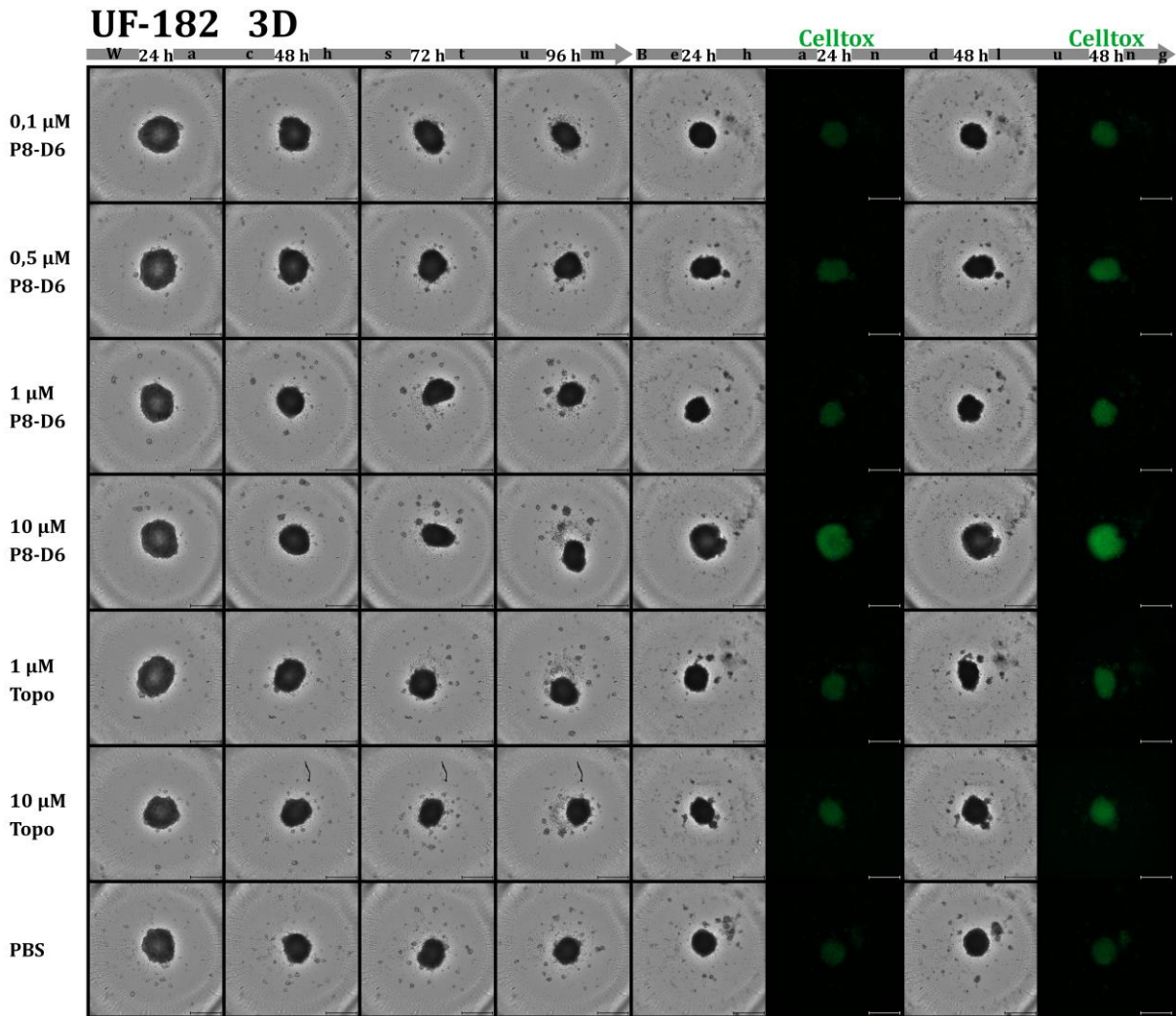
**Abb. VI: Wachstumsverlauf der MCF-7-Aggregate und Zytotoxizität.**

Mikroskopische Untersuchung des Aggregat-Wachstumsverhaltens von MCF-7 für 96 h und weitere 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)



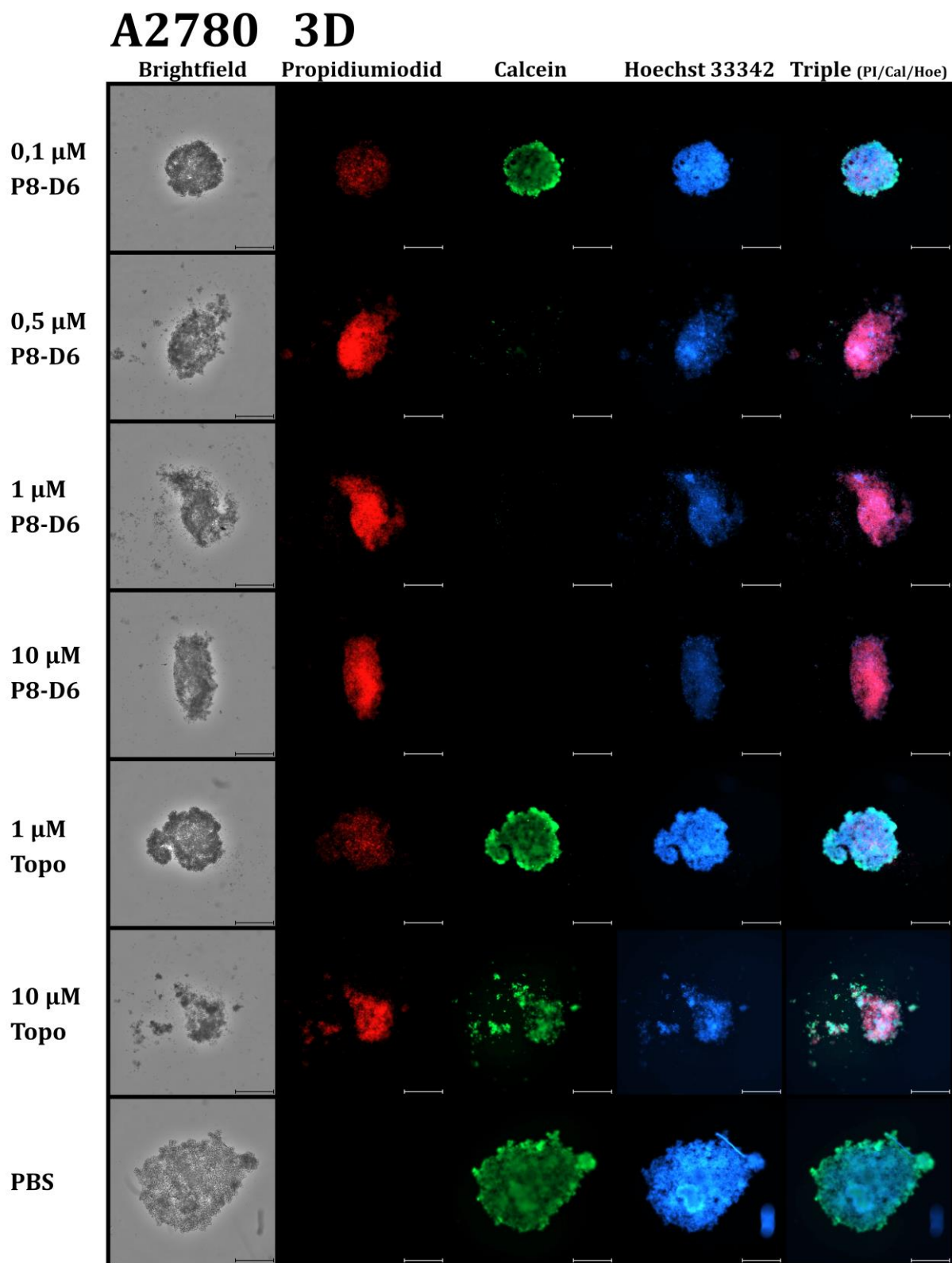
**Abb. VII: Wachstumsverlauf der Sk-Br 3-Aggregate und Zytotoxizität.**

Mikroskopische Untersuchung des Aggregat-Wachstumsverhaltens von Sk-Br 3 für 96 h und weitere 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500  $\mu$ m. (Abschnitt: 4.4.3.)



**Abb. VIII: Wachstumsverlauf der UF-182 Sphäroide und Zytotoxizität.**

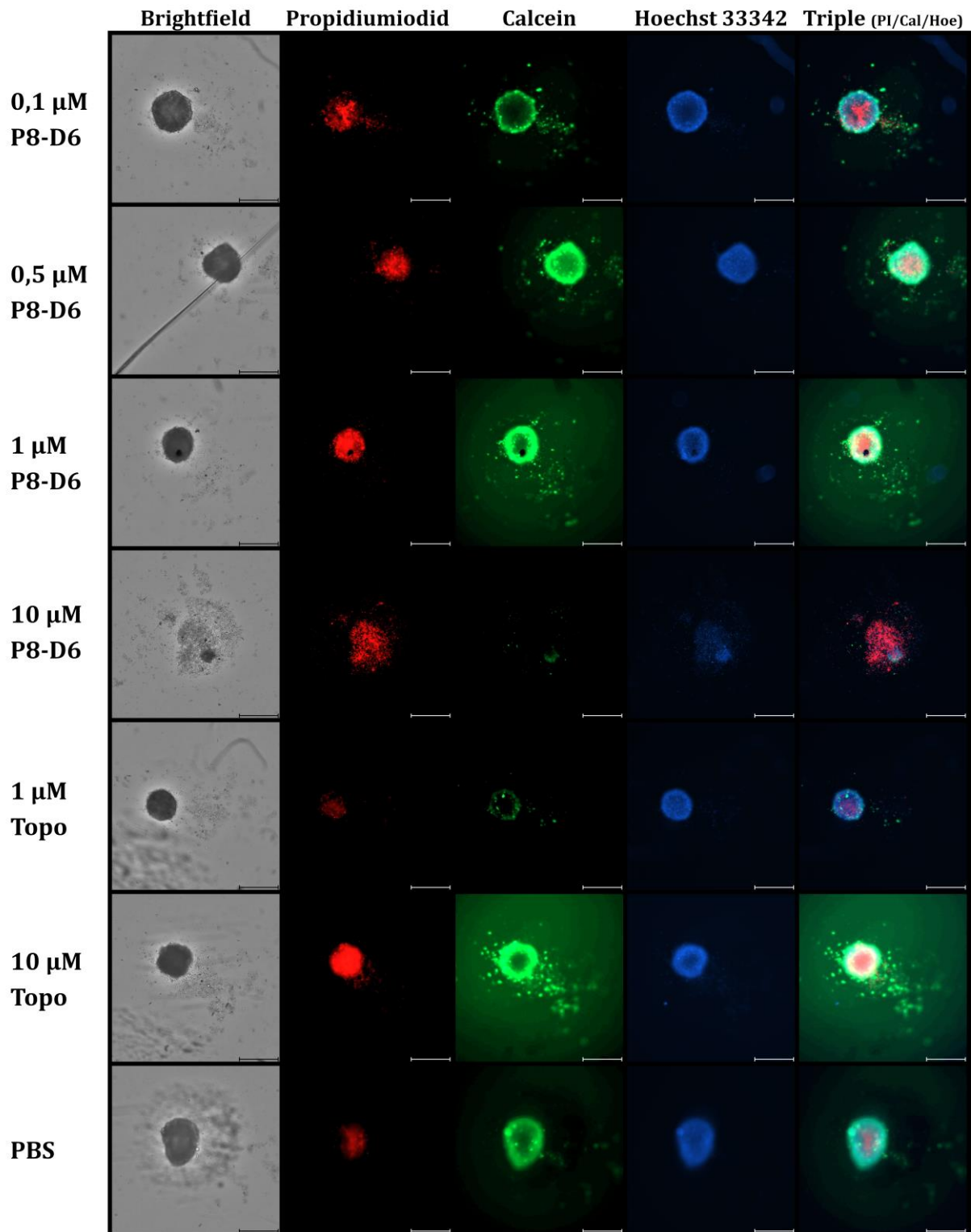
Mikroskopische Untersuchung des Sphäroid-Wachstumsverhaltens von UF-182 für 96 h und weitere 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS. Während der Behandlung wurde die Zytotoxizität mit Hilfe des CellTox™ Green Cytotoxicity Assays über Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt. Maßstab 500  $\mu$ m. (Abschnitt: 4.4.3.)



**Abb. IX: Lebend-Tod-Färbung der A2780-Aggregate.**

Anfärbung der A2780-Aggregate mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)

## SKOV-3 3D

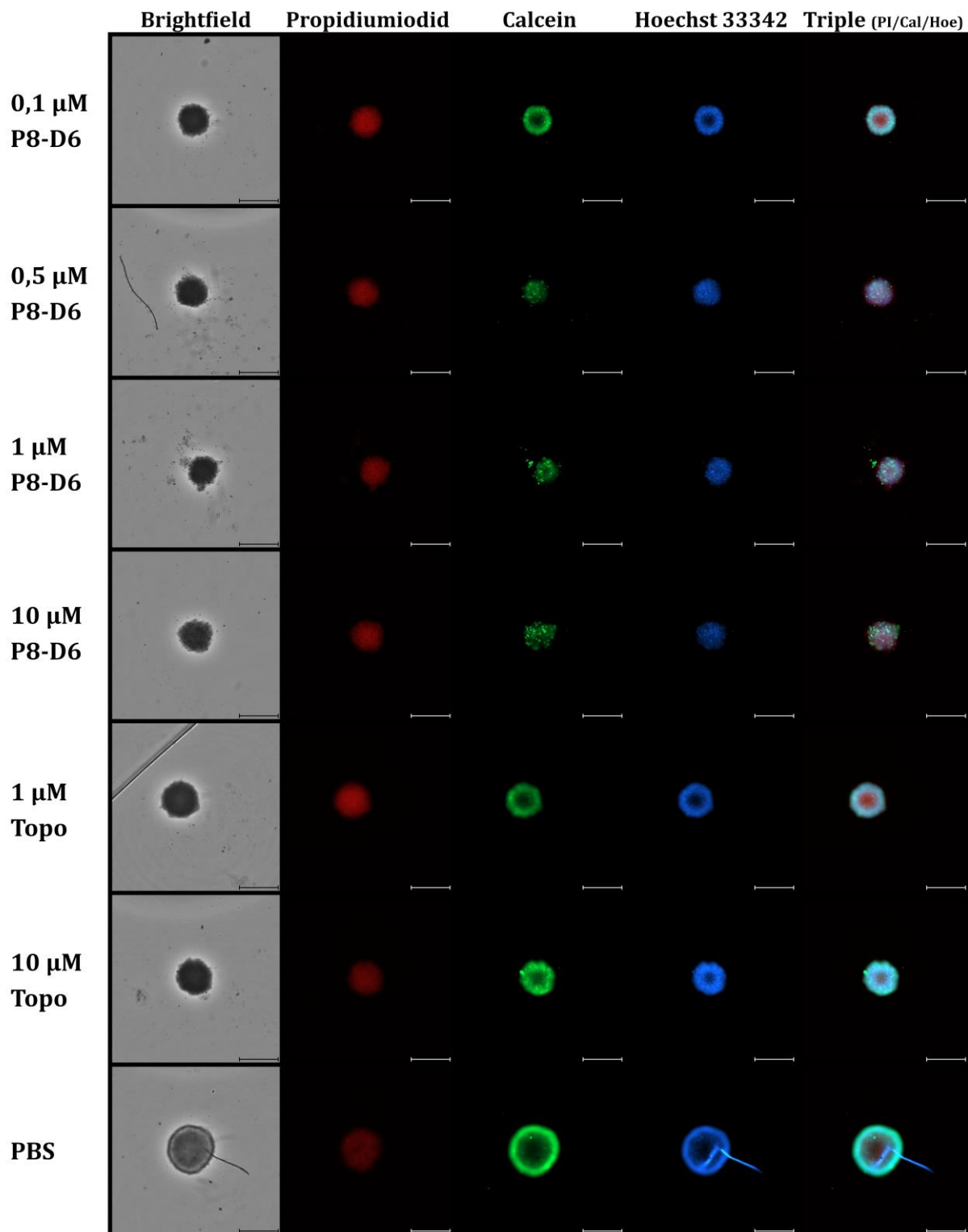


**Abb. X: Lebend-Tod-Färbung der SKOV-3 Sphäroide.**

Anfärbung der SKOV-3 Sphäroide mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS. Maßstab 500  $\mu$ m. (Abschnitt: 4.4.3.)



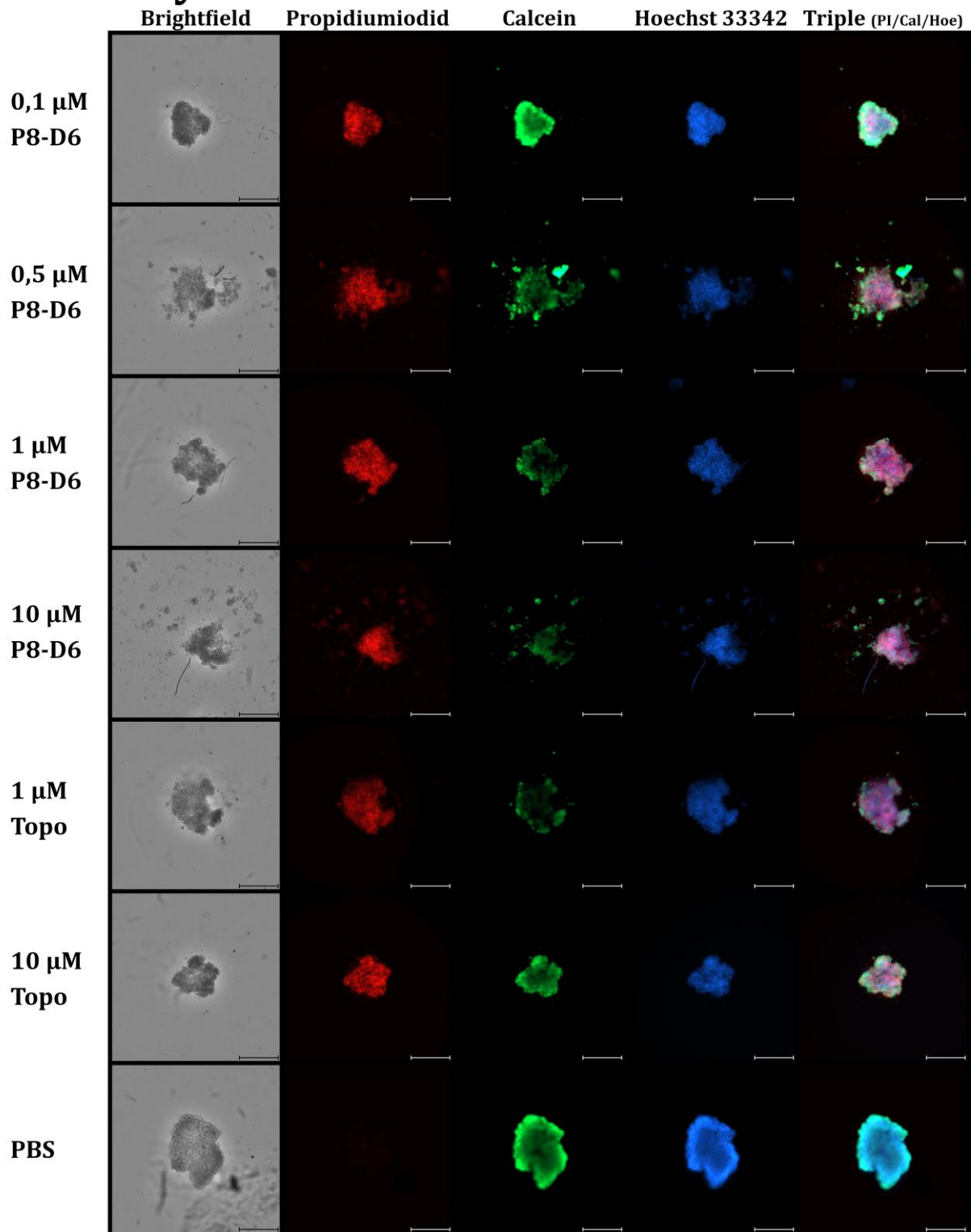
## OvCar8 3D



**Abb. XI: Lebend-Tod-Färbung der OvCar8 Sphäroide.**

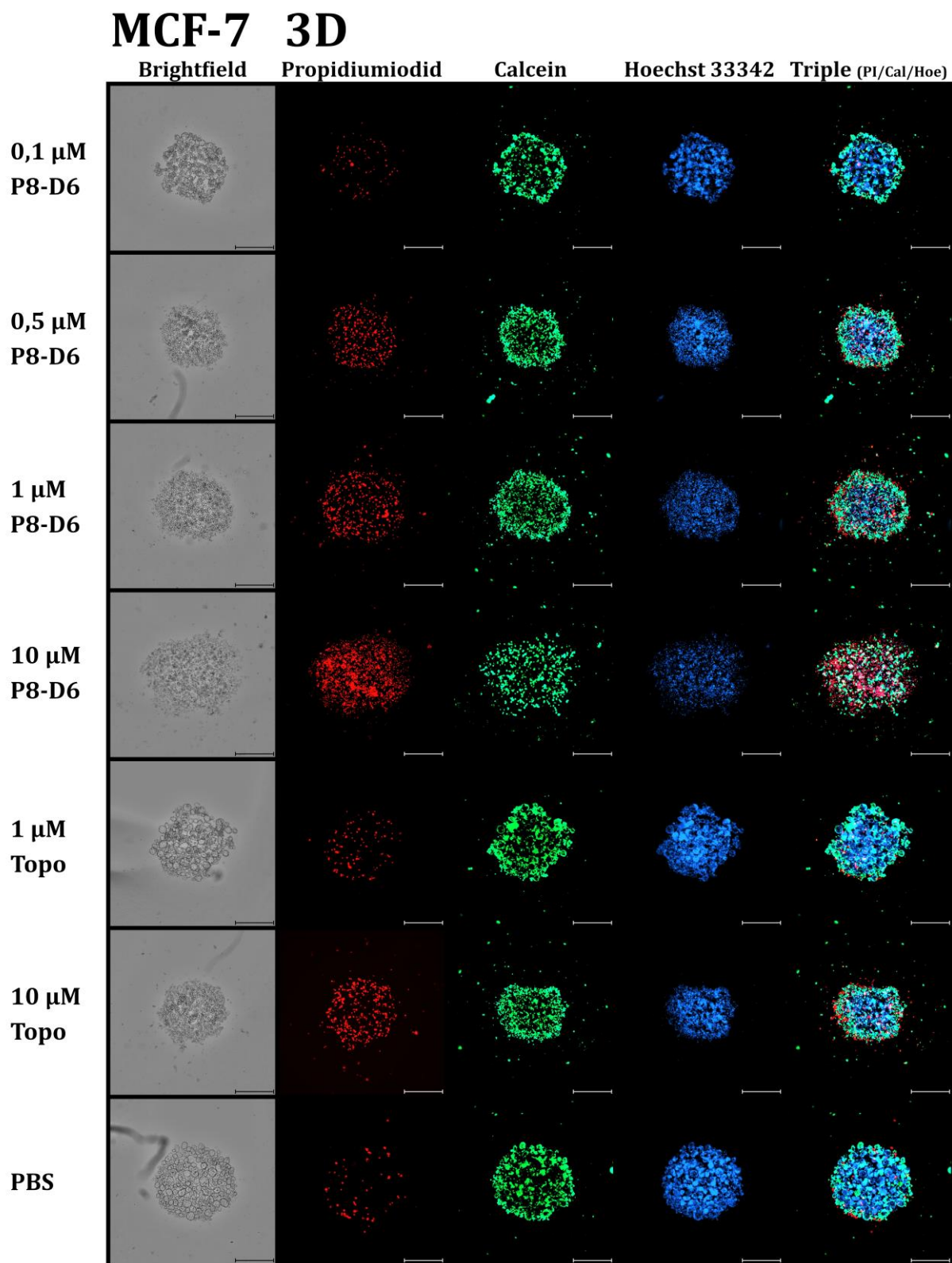
Anfärbung der OvCar8 Sphäroide mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M], Topotecan [1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M] und PBS. Maßstab 500  $\mu$ m. (Abschnitt: 4.4.3.)

# Hey 3D



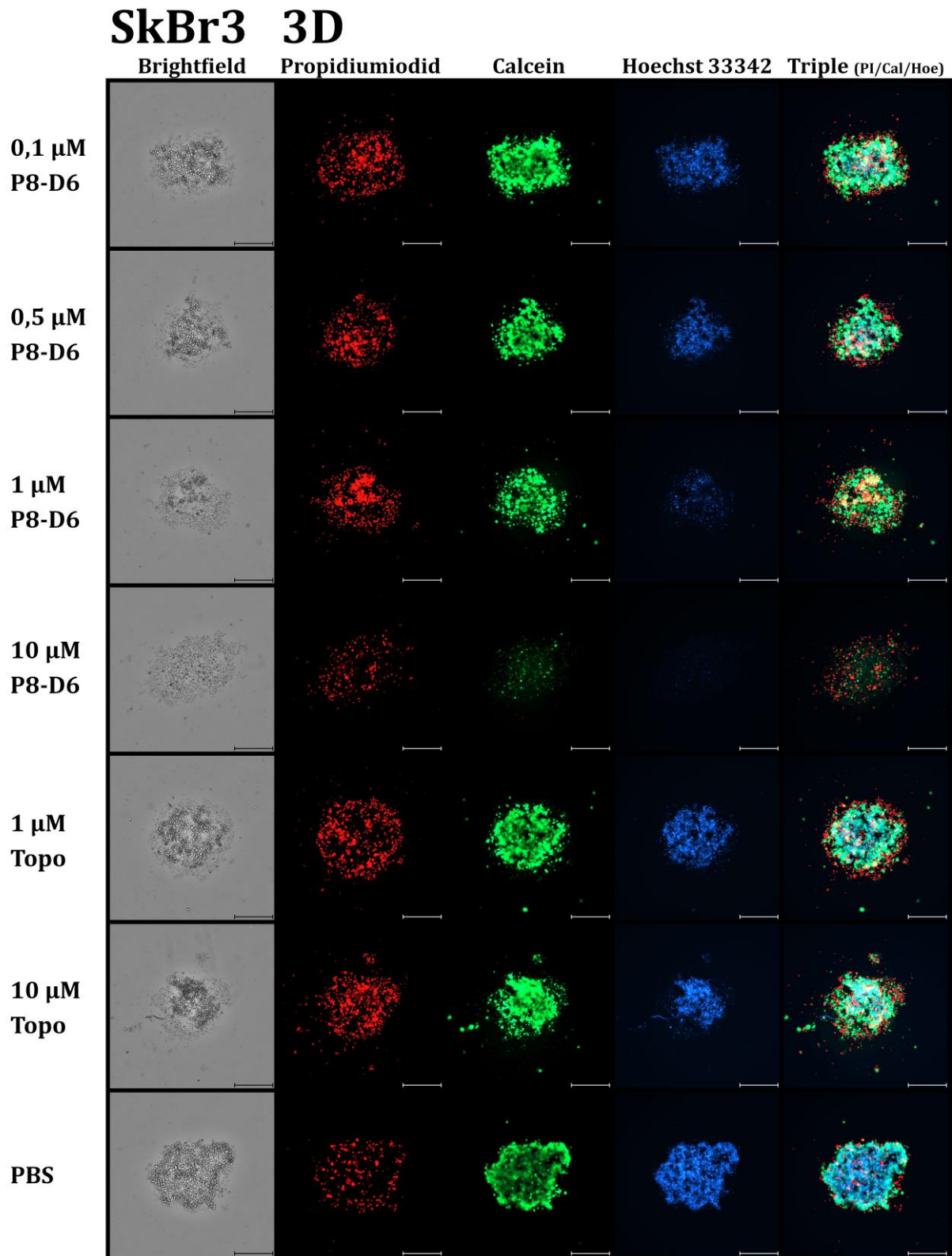
**Abb. XII: Lebend-Tod-Färbung der HEY-Aggregate.**

Anfärbung der HEY-Aggregate mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)



**Abb. XIII: Lebend-Tod-Färbung der MCF-7-Aggregate.**

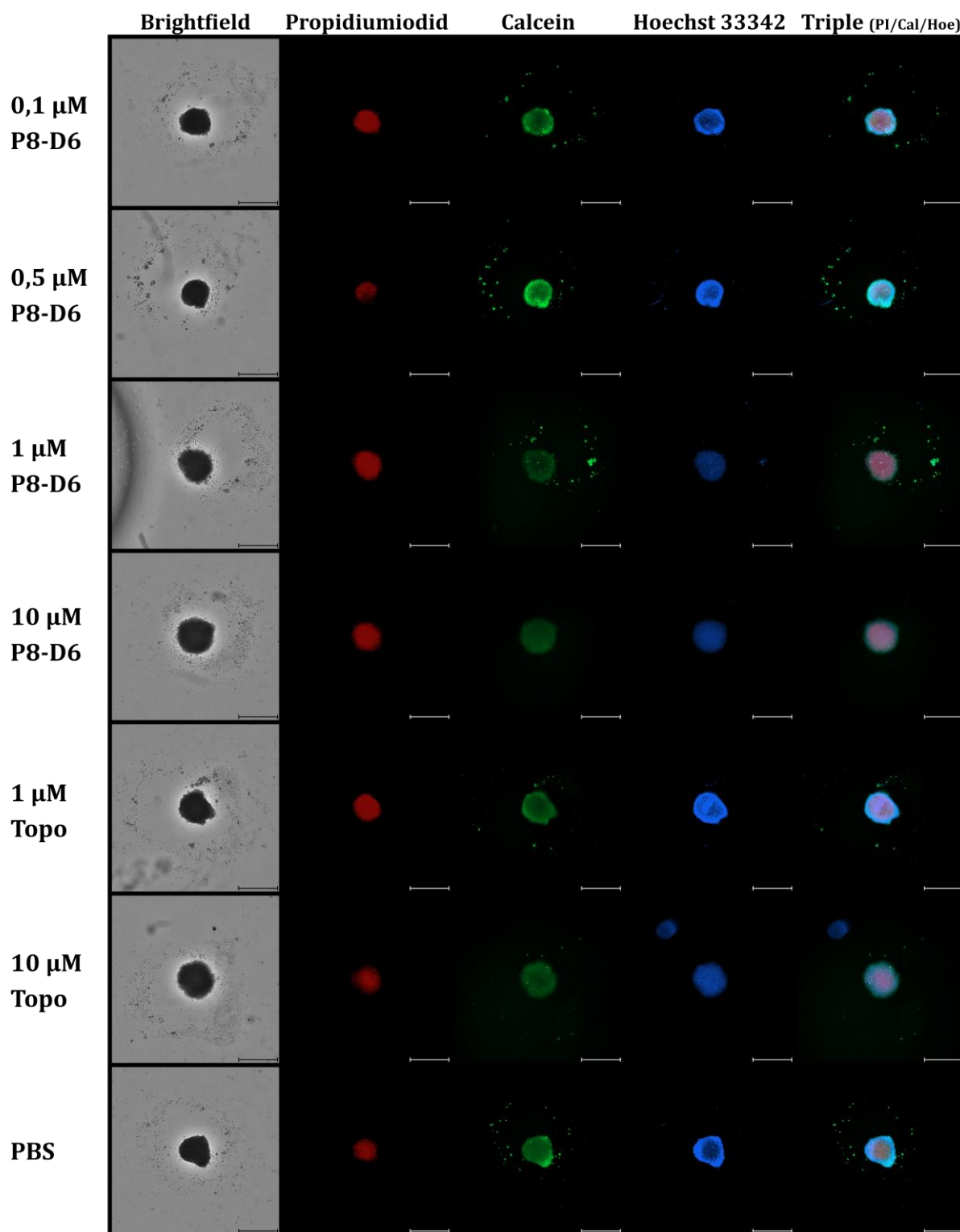
Anfärbung der MCF-7-Aggregate mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)



**Abb. XIV: Lebend-Tod-Färbung der Sk-Br 3-Aggregate.**

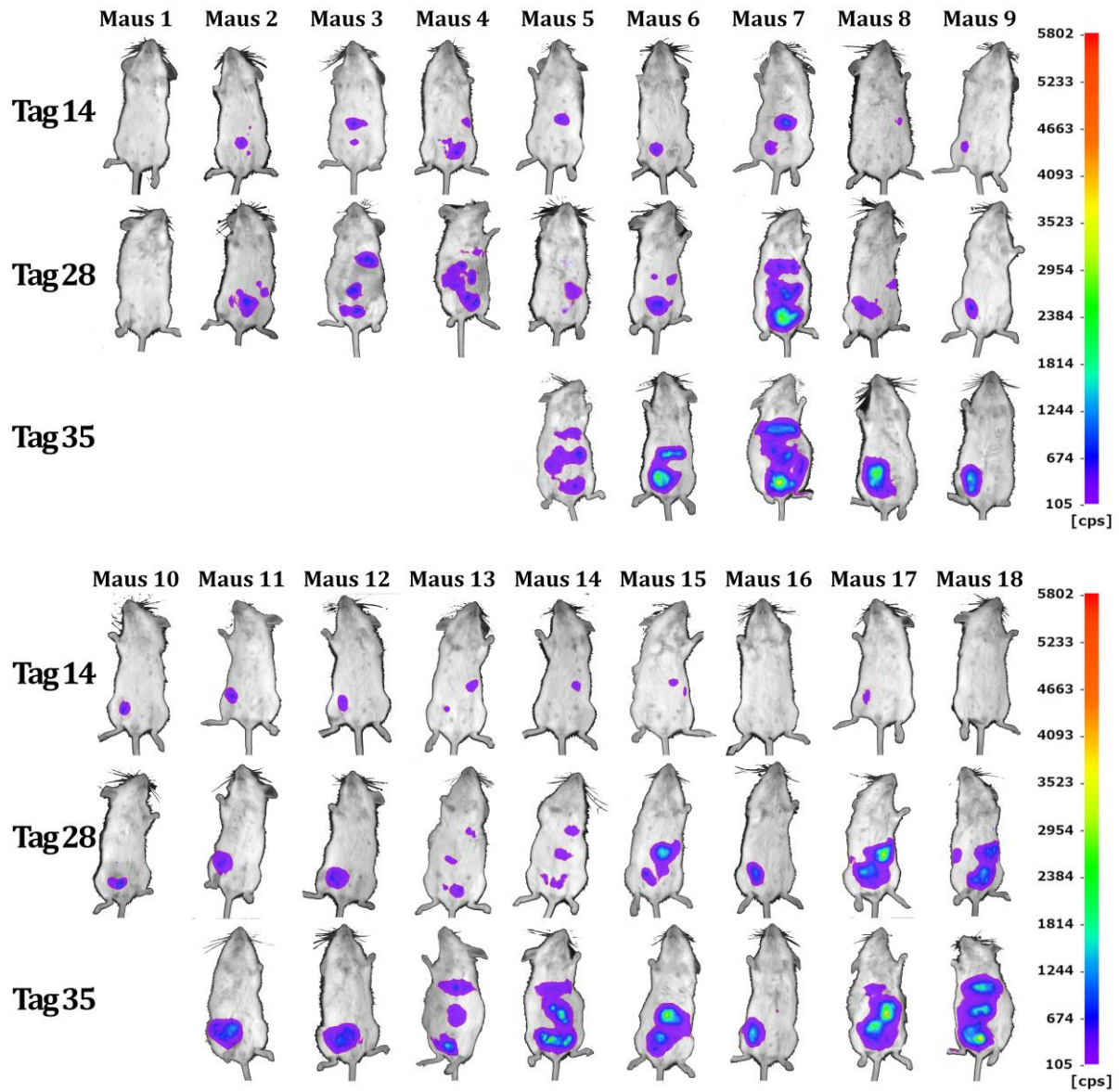
Anfärbung der Sk-Br 3-Aggregate mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)

## UF-182 3D



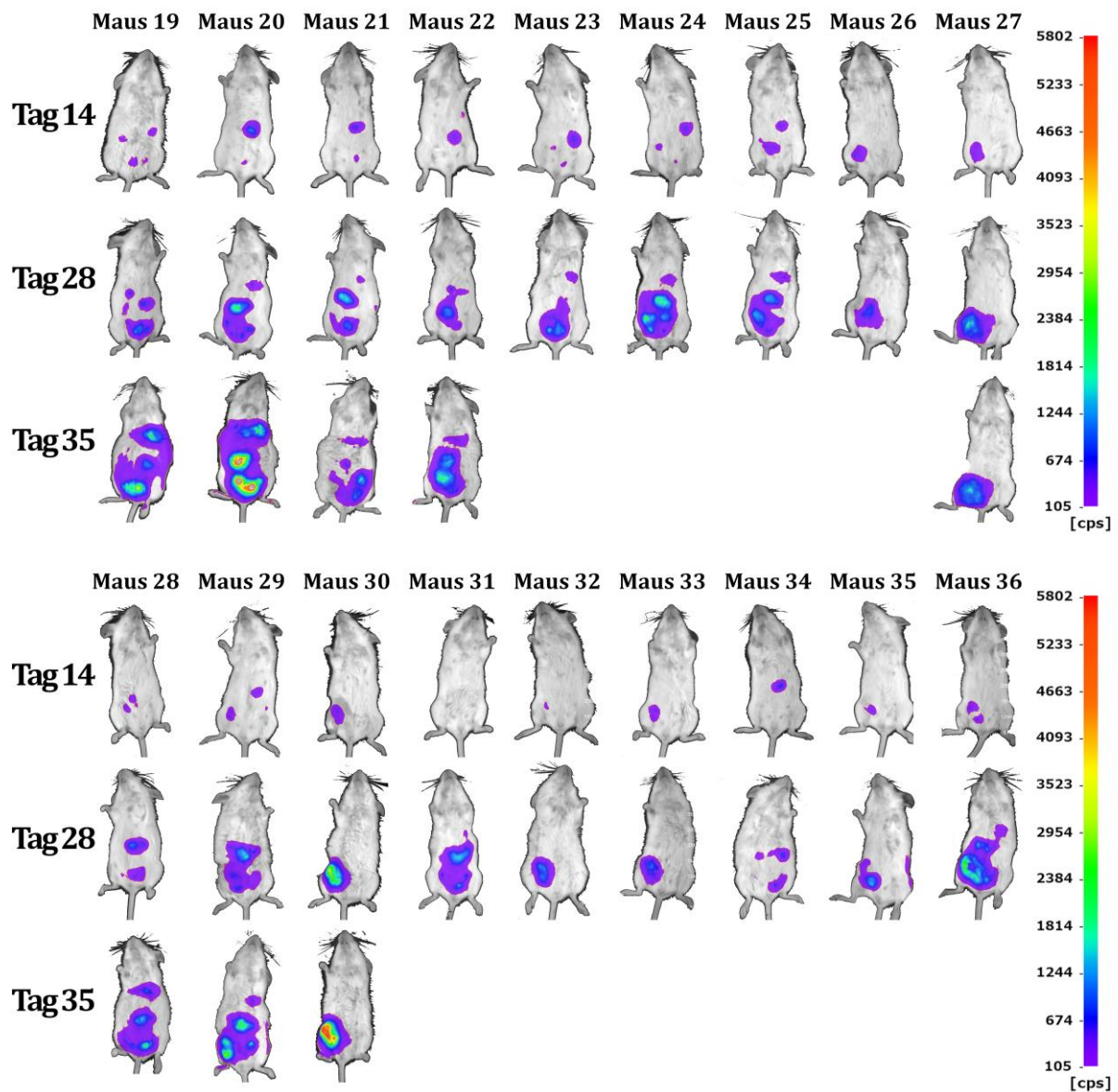
**Abb. XV: Lebend-Tod-Färbung der UF-182-Sphäroide.**

Anfärbung der UF-182-Sphäroide mit Propidiumiodid (Zelltod), Calcein (Zellviabilität) und Hoechst 33342 (Nukleus) nach 96 h Kultivierung und 48 h Behandlung mit P8-D6 [0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ], Topotecan [1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ] und PBS. Maßstab 500  $\mu\text{m}$ . (Abschnitt: 4.4.3.)



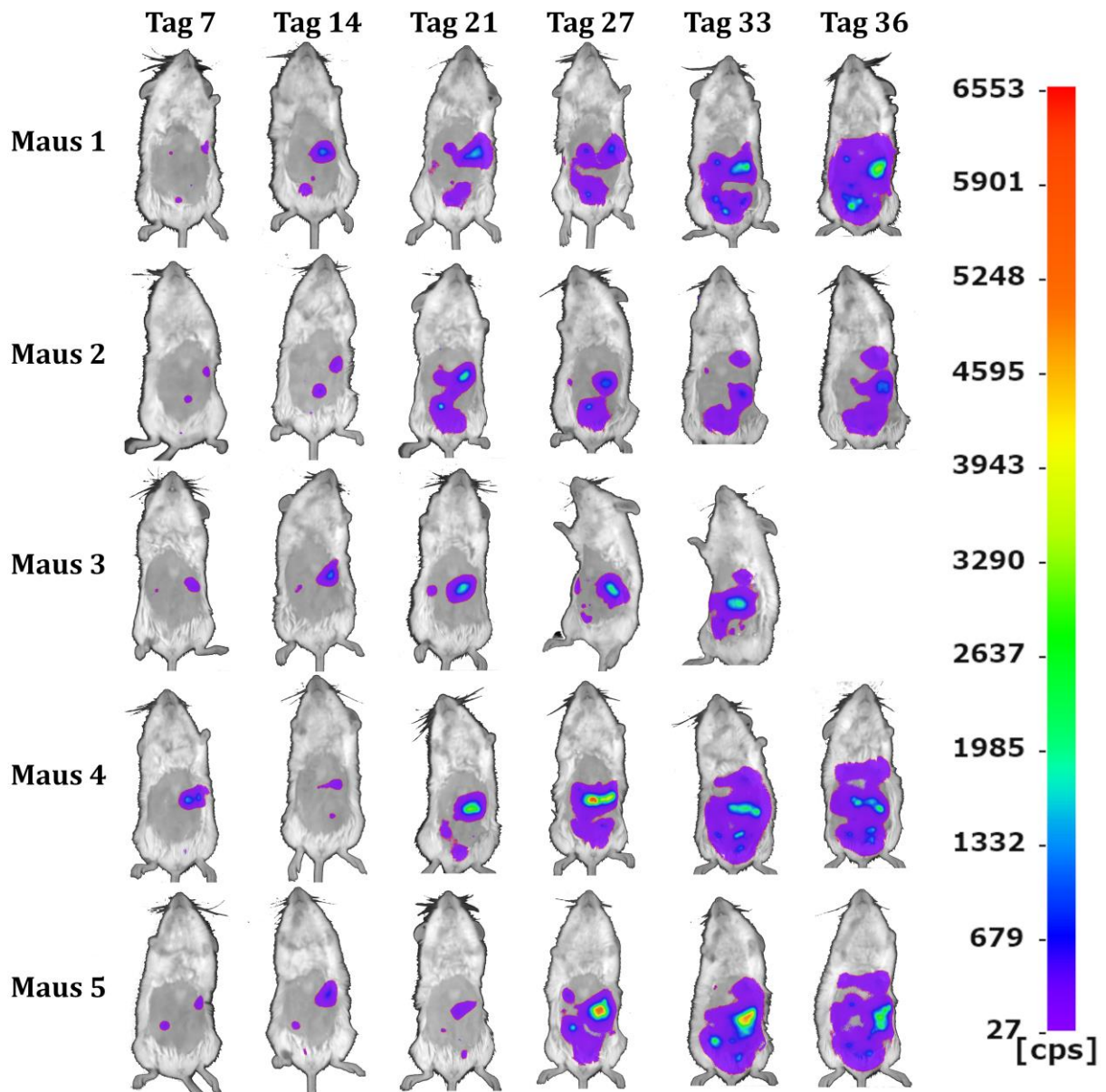
**Abb. XVI: Tumorwachstum der ersten *in vivo* Behandlungsstudie**

36 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $5 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 14, Tag 28 und Tag 36 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. (Abschnitt:4.5.1)



**Abb. XVI: Tumorwachstum der ersten *in vivo* Behandlungsstudie**

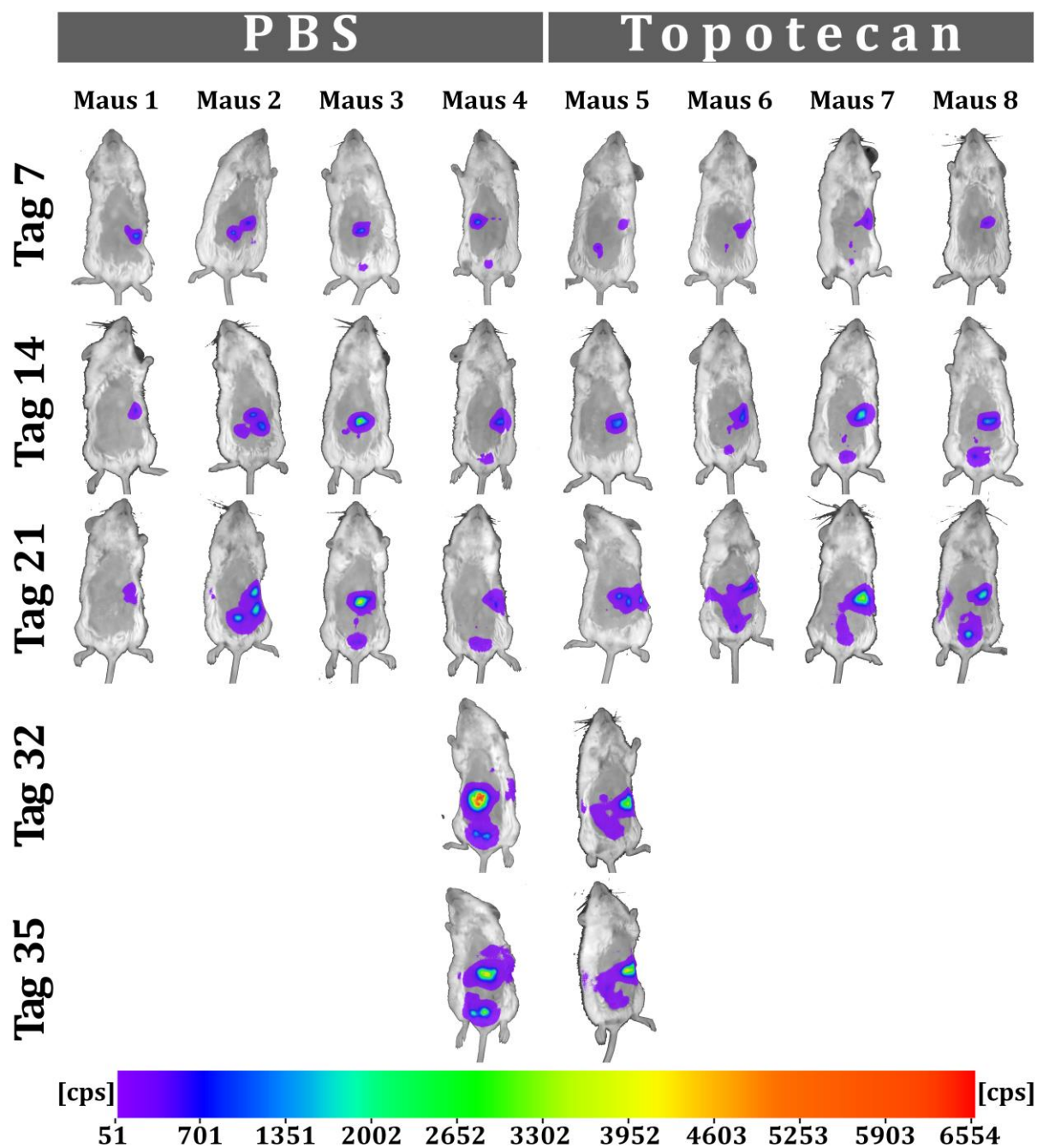
36 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $5 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 14, Tag 28 und Tag 36 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. (Abschnitt:4.5.1)



**Abb. XVII: Tumorwachstum der *in vivo* Methodenentwicklung**

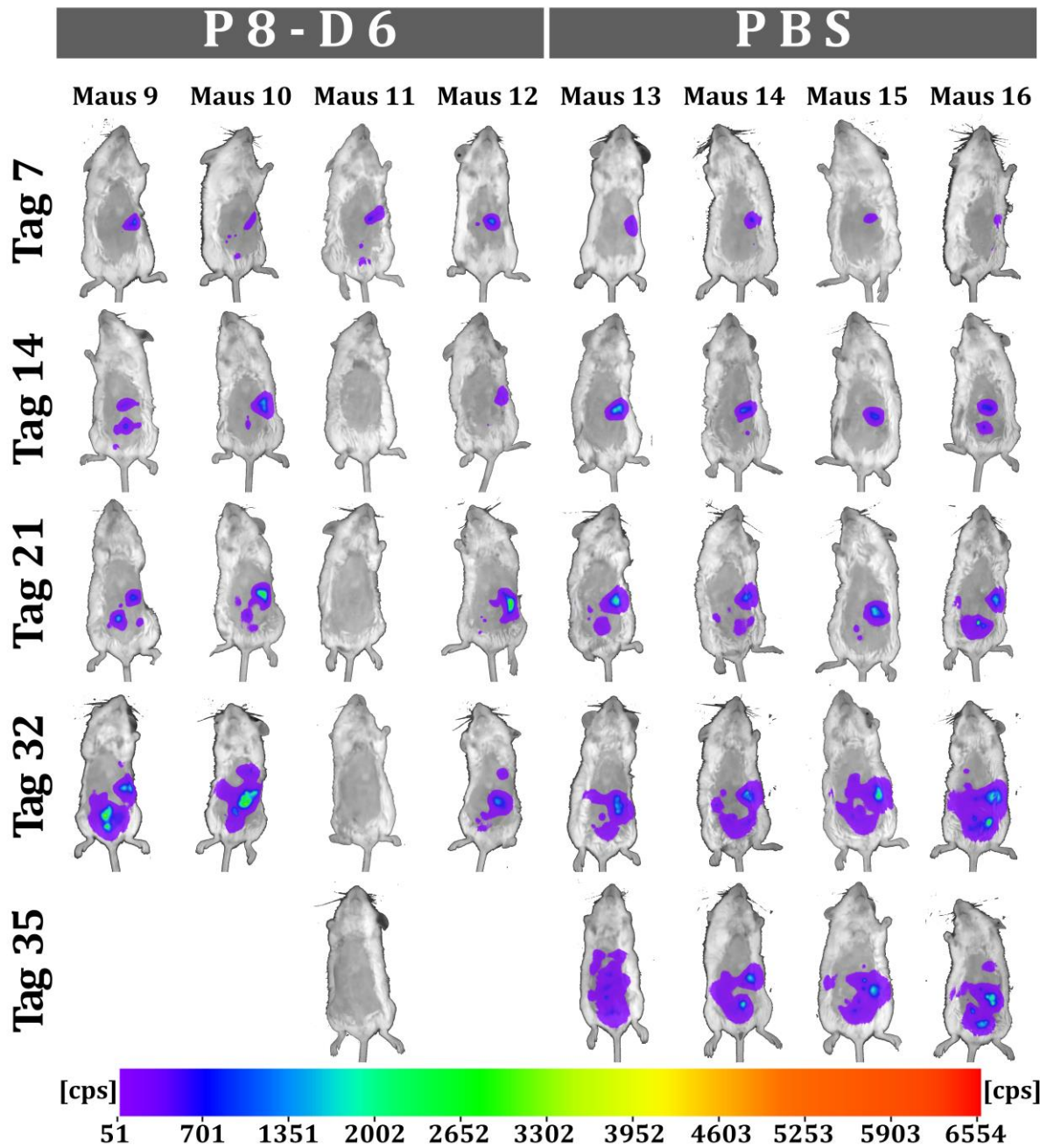
5 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 28, Tag 33 und Tag 35 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. (Abschnitt: 4.5.2)





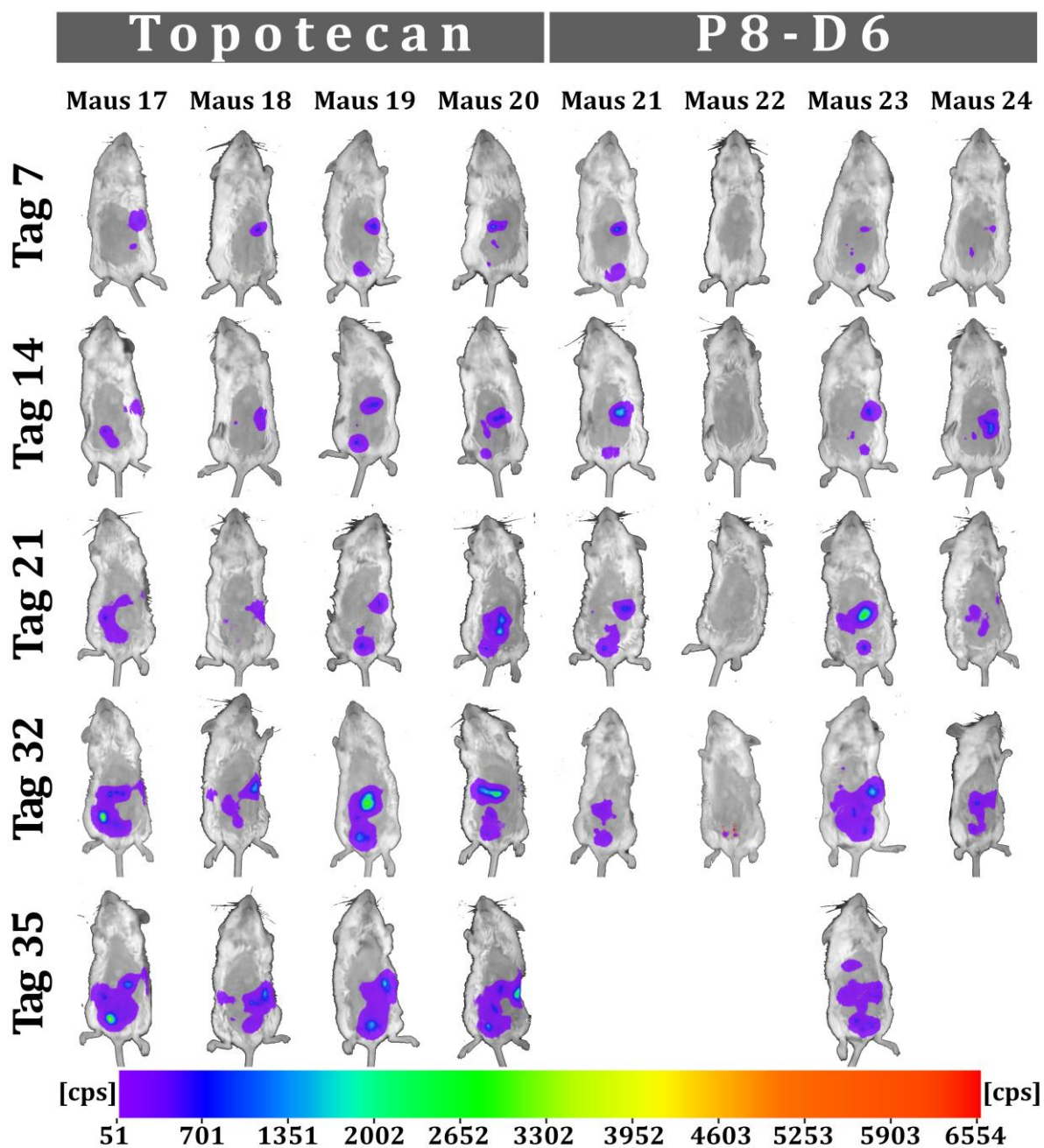
**Abb. XVIII: Tumorwachstum der der zweiten *in vivo* Behandlungsstudie**

24 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 32, Tag 35, Tag 39 und Tag 42 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. Ab Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 0,5 mg/kg KG P8-D6, 0,5 mg/kg KG Topotecan oder PBS 2x wöchentlich behandelt, bis die Tiere die Abbruchkriterien erreicht haben. (Abschnitt:4.5.3)



**Abb. XVIII: Tumorwachstum der der zweiten *in vivo* Behandlungsstudie**

24 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 32, Tag 35, Tag 39 und Tag 42 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere. Ab Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 0,5 mg/kg KG P8-D6, 0,5 mg/kg KG Topotecan oder PBS 2x wöchentlich behandelt, bis die Tiere die Abbruchkriterien erreicht haben. (Abschnitt:4.5.3)



**Abb. XVIII: Tumorwachstum der der zweiten *in vivo* Behandlungsstudie**

24 SCID/beige-Mäusen wurden an Tag 0 je  $1 \times 10^6$  SKOV-3 luc Zellen injiziert und an Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 32, Tag 35, Tag 39 und Tag 42 erfolgte eine Lumineszenzmessung dieser Tiere Ab Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 0,5 mg/kg KG P8-D6, 0,5 mg/kg KG Topotecan oder PBS 2x wöchentlich behandelt, bis die Tiere die Abbruchkriterien erreicht haben. (Abschnitt:4.5.3)

## **ERKLÄRUNG ZU §7 DER PROMOTIONSORDNUNG**

---

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer, selbstständig von mir mit den angegebenen Hilfsmitteln erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Diese Arbeit hat weder ganz noch in Teilen schon an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen, wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Außerdem versichere ich, dass mir noch nie ein akademischer Grad entzogen wurde.

Kiel, im November 2020  
Inken Flörkemeier

## DANKSAGUNG

---

Die vorliegende Arbeit wurde in einem Kooperationsprojekt mit der Pharmazeutischen/Medizinischen Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel unter Anleitung von **Herrn Prof. Dr. rer nat. Bernd Clement** und **Herrn Prof. Dr. med. Dirk O. Bauerschlag** angefertigt.

An erster Stelle gilt ein ganz besonderer Dank Prof. Dr. Dirk Bauerschlag für die Möglichkeit dieses vielseitige und spannende Thema mit allen Ideen und Freiheiten in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Danke für deine inspirierenden, motivierenden und auch kritischen Diskussionen und deine bemerkenswerte Unterstützung.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Bernd Clement danke ich für die außergewöhnliche Förderung schon während meines Studiums, meines Masters und schließlich der Zeit der Promotion. Ohne dich wäre dieses Kooperationsprojekt nicht möglich gewesen. Danke für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Der größte Teil der experimentellen Arbeit wurde im Onkologischen Labor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel durchführt. Hierfür möchte ich mich auch recht herzlich bei Prof. Dr. Nicolai Maass, Prof. Dr. Norbert Arnold und Dr. Jörg Weimer bedanken.

Für die hilfreiche Einarbeitung in das Thema und die Synthese der Substanz danke ich Dr. Tamara Steinhauer recht herzlich.

Prof. Per Artursson und Dr. Magnus Ölander haben nicht nur durch meinen Master einen Grundstein für mein wissenschaftliches Arbeiten gelegt, sondern mir auch während meiner Promotion ermöglicht Hepatotoxizitätsstudien in ihrem Labor durchzuführen. Tack så mycket.

Bei Marie Hellfritsch möchte ich mich für die schönen REM Bilder bedanken und Theo Rodat danke ich für das Molecular Modeling von P8-D6 in die Zielstrukturen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Susanne Sebens, Dr. Sanjay Tiwari, Catharina Verkooyen und Dr. Olga Will für Unterstützung und Supervision während der Mausversuche.

Als nächstes geht ein Dank an Prof. Dr. Dennis Schade für die Zwischenfinanzierung meiner Stelle und an Prof. Dr. Thomas Kunze für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit im Biochemie Praktikum.

Bei meinen Laborkollegen aus dem onkologischen Labor Dr. Sabrina Farrokh, Sigrid Hamann, Dr. Nina Hedemann, Doris Karrow, Asiyan Nusilati und Catharina Verkooyen und den zahlreichen Medizindoktoranden möchte ich mich für die familiäre Atmosphäre bedanken. Vielen Dank für die schöne gemeinsame Zeit.

Die spannende Betreuung des 6. Semesters mit Dr. Jennifer Schneider, Dr. Carsten Ginsel, Sophia Rixen und Till Priegann hat mir viel Freude gemacht. Auch die gemeinsamen Tagungen werden immer besonders in Erinnerung bleiben. Danke für die schöne Zeit und eure unermüdliche Motivation.

Ein Dank gilt den Patientinnen der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, UKSH, Campus Kiel, die durch ihre bereitwilligen Spenden von Gewebeproben Teile dieser Forschungsarbeit erst möglich gemacht haben.

Ein ganz liebes Dankeschön für das Korrekturlesen dieser Arbeit geht an Magdalena Eckner, Dr. Sabrina Farrokh, Dr. Carsten Ginsel, Christoph Rogmans und meine Familie. Danke für eure konstruktive Kritik und die vielen Ideen und Denkanstöße.

Während der Promotion habe ich zahlreiche schöne Momente im und außerhalb der Institute erlebt, die ich meinen lieben Kollegen/innen zu verdanken habe. Egal, wie stressig oder frustrierend die Forschung manchmal war, ich habe mich immer sehr wohl gefühlt.

Meiner Familie gilt der größte Dank, die mir stets ein großer Rückhalt waren und die durch ihre liebevolle Unterstützung, ihr Vertrauen und ihr Verständnis in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben.

## LEBENS LAUF

---

## KURZFASSUNG

---

Die Entwicklung innovativer zytotoxischer Verbindungen mit geeigneten physikochemischen Eigenschaften hat in der Krebstherapie hohe klinische Relevanz. In der gynäkologischen Onkologie ist Brustkrebs der häufigste und Eierstockkrebs der aggressivste Tumor. Resistenzentwicklungen und schwere Nebenwirkungen sind die Gründe für den fehlenden Behandlungserfolg. Die Kieler Substanz P8-D6 ist ein wirksamer Induktor der Apoptose, indem es als dualer Topoisomerase-Inhibitor wirkt. Das aza-analoge Benzo[c]-phenanthridin inhibiert die ubiquitäre Topoisomerasen (Topo I und Topo II), welche für die Entspiralisierung der DNA wichtig sind, indem P8-D6 den Enzym-DNA-Komplex kovalent stabilisiert. Sein herausragendes antitumorales Potential wurde im NCI-60 Human Tumor Cell Line Screen ( $GI_{50/60}$ : 49 nM) und in weiteren Studien an gynäkologischen Tumoren nachgewiesen. Ziel der Arbeit war die weitere Etablierung von P8-D6 als potenzieller Arzneistoff-kandidat in der Therapie des fortgeschrittenen Ovarial- und Mammakarzinoms.

Zum Nachweis der Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion von P8-D6 wurden neben den 2D-Kulturen, 3D- und Co-Kultur-Systeme mit unterschiedliche Ovarial- und Mammakarzinomzelllinie und *ex vivo* Primärkulturen validiert. Diese besitzen eine höhere Aussagekraft hinsichtlich der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die zytotoxischen Effekte von P8-D6 mit Topotecan, Cisplatin und Etoposid verglichen. Die Testung an nicht-tumorassozierten humanen ovariellen Oberflächenzellen und primären Hepatozyten diente zur Abschätzung der schädigenden Effekte auf gesunde Gewebe. Zusätzlich wurden erste Untersuchungen zur Wirksamkeit und Toxizität auf *in vivo* Ebene am Ovarialkarzinom durchgeführt. Im Vergleich zu Standardtherapeutika bewirkt P8-D6 einen signifikanten Anstieg der Apoptose in gynäkologischen Tumorzellen und eine Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit aller Sphäroide. In gesunden Zellen wurde die Zellintegrität minimal beeinträchtigt und es wurde kein hepatotoxischer Effekt beobachtet. Ferner konnte auch das *in vivo* Modell die antitumorale Wirkung von P8-D6 nachweisen.

Folglich besitzt P8-D6 gute antitumorale Eigenschaften für gynäkologische Tumore in *in vitro* und *in vivo* Modellen. Normale Zellen wurden wenig beeinträchtigt und es zeigte sich keine hepatotoxische Wirkung. P8-D6 ist demnach ein starker Induktor der Apoptose und ein vielversprechender Arzneistoffkandidat für die Therapie des Ovarial- und Mamakarzinoms.



## ABSTRACT

---

The development of innovative cytotoxic compounds with suitable physicochemical properties has a high clinical need in cancer therapy. In gynaecological oncology, breast cancer is the most common and ovarian cancer is the most aggressive tumour. Development of resistance and severe side effects are the reasons for a lack in success treatments. The Kiel compound P8-D6 is an effective inducer of apoptosis by acting as a dual topoisomerase inhibitor. The aza-analogous benzo[c]phenanthridine inhibits the ubiquitous topoisomerases (Topo I and Topo II), which are responsible for uncoiling of the DNA, as P8-D6 covalently stabilizes the enzyme-DNA intermediate. Its outstanding antitumour property was demonstrated in the NCI-60 DTP Human Tumour Cell Line Screening ( $GI_{50/60}$ : 49 nM) and in *in vitro* studies with gynaecological tumours. The aim is to establish P8-D6 as a potential drug candidate in the treatment of advanced ovarian and breast cancer.

To demonstrate the inhibition of proliferation and induction of apoptosis by P8-D6, in addition to 2D cultures, 3D and co-culture systems with different ovarian and breast cancer cell lines and *ex vivo* primary cultures were established. These are more indicative to the transferability of the results to human *in vivo* situation. In addition, the cytotoxic effects of P8-D6 were compared with topotecan, cisplatin and etoposide. A test on non-tumour-associated human ovarian surface cells and primary hepatocytes was used to estimate the damaging effects on healthy tissue. Further, the effectiveness and toxicity on *in vivo* level of ovarian cancer were tested.

P8-D6 causes a significant increase in apoptosis in gynaecological tumour cells compared to standard therapeutic agents and a change in the surface structure of all tested spheroids. In healthy cells, cell integrity was minimally affected, and no hepatotoxic effect was observed. The *in vivo* model was additionally able to demonstrate the antitumour effects of P8-D6.

Consequently, P8-D6 has good antitumour properties for gynaecological tumours in *in vitro* and *in vivo* models. Normal cells were little affected and there was no hepatotoxic effect. P8-D6 is therefore a strong inducer of apoptosis and a promising drug candidate for the therapy of ovarian and breast cancer.