

**Cilengitide und Cetuximab in Plattenepithelkarzinomen der
Kopf-Hals-Region (HNSCC): Zytokinproduktion von HNSCC im
Ex-vivo-Chemoresponsetest FLAVINO als Indikator heterogenen
Therapieansprechens**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Susan Cedra
21.04.1988, Leipzig

angefertigt an: Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-
und Ohrenheilkunde / Plastische Chirurgie
Universität Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. A. Dietz,
Dr. rer. nat. G. Wichmann

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 12.12.2017

1	Einleitung	3
1.1	<i>Integrine – multifunktionale Transmembranproteine</i>	4
1.1.1	Erkennungsmerkmal RGD-Sequenz	5
1.1.2	Integrine $\alpha v\beta_3$ und $\alpha v\beta_5$ sowie deren Rolle in Tumorangiogenese und Metastasierung	5
1.2	<i>Cilengitide – ein Integrin-Inhibitor</i>	6
1.3	<i>Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor</i>	8
1.3.1	Die Rolle des EGFR bei Tumoren	9
1.3.2	Cetuximab - ein EGFR-Inhibitor	10
1.4	<i>Tumore der Kopf-Hals-Region und deren Biomarker</i>	11
1.4.1	Therapie von Kopf-Hals-Tumoren.....	12
1.4.2	Klinische Erprobungen von Cilengitide.....	12
1.4.3	Targeted Therapie mit Cetuximab bei Kopf-Hals-Tumoren	13
1.4.4	Biomarker bei HNSCC	15
1.4.5	Interleukin 6.....	16
1.4.6	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A – VEGF-A.....	17
1.4.7	Monozyten-Chemoattraktor Protein 1 – MCP-1	19
1.5	<i>Chemoresponsetestung ex vivo</i>	21
1.5.1	Der koloniebildende Kurzzeit-Chemoresponsetest FLAVINO.....	22
1.5.2	Flavin-induzierte photodynamische Degeneration.....	22
1.5.3	Ablauf des FLAVINO-Chemoresponsetests	23
1.6	<i>Aufgabenstellung und neue Erkenntnisse</i>	24
2	Publikationen	26
2.1	<i>Abstract zum Vortrag zur 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde und Kopf- und Hals-Chirurgie</i>	27
2.2	<i>Publikation bei Anticancer Research</i>	28
2.3	<i>Abstract zum Beitrag zur 88. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde und Kopf- und Hals-Chirurgie</i>	36
3	Zusammenfassung	37
4	Literaturverzeichnis	41
5	Anlagen.....	49
5.1	<i>Erklärung über die eigenständige Verfassung der Arbeit</i>	49
5.2	<i>Darstellung des Eigenanteils.....</i>	50
5.3	<i>Lebenslauf.....</i>	52
5.4	<i>Danksagung.....</i>	53

1 EINLEITUNG

Krebserkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes sind mehrheitlich Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC). Die meisten Patienten befinden sich zum Diagnosezeitpunkt in einem fortgeschrittenen Stadium und haben eine schlechte Prognose (Sant *et al.*, 2009; Gatta *et al.*, 2015). Nach kurativer Therapie, unter Einsatz von Chirurgie gefolgt von adjuvanter Strahlentherapie oder – bei Vorliegen von Risikofaktoren – Strahlentherapie mit Chemotherapie (Radiochemotherapie), gerade aber nach primärer kombinierter Radiochemotherapie im Falle von Rezidiven beim Fehlen chirurgischer Optionen, sind die Therapieoptionen sehr eingeschränkt, sodass eine zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) sehr wünschenswert ist (Dietz *et al.*, 2008). Das einzige bisher zugelassene Pharmakon zur *targeted* Therapie bei HNSCC ist Cetuximab, ein monoklonaler Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (siehe 1.3). Eine Vielzahl weiterer bei HNSCC überexprimierter Gene wurden in systembiologischen Ansätzen identifiziert und kommen wegen ihrer biologischen Funktion als geeignete Zielstrukturen einer pharmakologischen Therapie potentiell in Frage (Dietz *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2004; Kostareli *et al.*, 2013; Stransky *et al.*, 2011; Wichmann *et al.*, 2015b). Einige können mit niedermolekularen Substanzen (<1500 Dalton), sogenannten *small molecules*, inhibiert werden. Dazu gehören Oligopeptide wie das zyklische Pentapeptid Cilengitide, das spezifisch an Integrine binden und damit die Interaktion mit Proteinen der extrazellulären Matrix sowie Zell-Zell-Interaktionen beeinflussen kann (siehe 1.2). Die Kombination mehrerer zielgerichteter Therapeutika könnte geeignet sein, in der Summe stärkere Effekte und damit verbunden größere antitumorale Effekte zu erzielen. Das Ergebnis solcher Interaktionen ist nicht klar vorhersehbar im Hinblick ihrer Effektivität. Präklinische Untersuchungen von HNSCC stellen eine Möglichkeit dar, solche Effekte zu analysieren. Die Untersuchung primärer Tumorproben *ex vivo*, bspw. im FLAVINO-Assay (siehe 1.5) kann genutzt werden, um den Modus des Zusammenwirkens zu analysieren (Schrader *et al.*, 2012; Stoehr *et al.*, 2014; Liebig *et al.*, 2017). Als Read-out solcher Assays ist die Koloniebildung etabliert. Andere Auswertemöglichkeiten könnten in der Bestimmung der unter Therapie veränderten Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen bestehen, die als Biomarker bei HNSCC bekannt sind oder potentiell als geeignet in Frage kommen. Dazu gehören Interleukin 6, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF-A) und das Monozyten-Chemoattraktor Protein 1 (MCP-1; siehe 1.4.5 – 1.4.7). Da die Veränderung der Koloniebildung und Zytokinproduktion unter kombinierter Therapie mit Cetuximab und Cilengitide bisher nicht untersucht wurde, sind mir im Rahmen eines Forschungsprojektes die unter 1.6 beschriebenen

Aufgaben gestellt worden, um zu klären, ob die gemeinsame Gabe beider Therapeutika einen besseren Therapieerfolg ermöglichen kann oder ein solcher positiver Effekt nicht oder nur bei einer Untergruppe von Patienten mit HNSCC zu erwarten ist.

Kurz zusammengefasst ergaben die Daten der durchgeführten Analysen, dass das kombinierte *Targeting* von Integrinen und des EGFR mit Cilengitide und Cetuximab die suppressiven Effekte auf die Koloniebildung als auch auf pro-angiogene und pro-inflammatorische Zytokine erhöht. Die geprüften Zytokine VEGF-A, IL-6 und MCP-1 gewinnen an Relevanz als mögliche Biomarker für Chemoresponse. Diese Arbeit bekräftigt das therapeutische Potenzial des Integrin-Inhibitors Cilengitide in binärer Kombination mit Cetuximab. Mit Blick auf das milde Nebenwirkungsprofil sind weiterführende Studien für die Rehabilitation des Pentapeptids wünschenswert, um das demonstrierte antitumorale Potenzial im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte für HNSCC auszuschöpfen.

Die im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen erhobenen Ergebnisse wurden in mehreren wissenschaftlichen Beiträgen publiziert, die sich im Anschluss an die Aufgabenstellung wiedergegeben finden.

1.1 INTEGRINE – MULTIFUNKTIONALE TRANSMEMBRANPROTEINE

Eine Vielzahl biologischer Prozesse, die existenziell für die Proliferation, Funktion und das Überleben von Zellen sind, wird von Integrinen vermittelt. Integrine sind multifunktionale Adhäsionsrezeptoren auf allen tierischen Zelloberflächen (außer Erythrozyten), welche aus nicht-kovalent miteinander verbundenen α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind. Diese heterodimeren, transmembranen Adhäsionsmoleküle stellen Verflechtungen zwischen einzelnen Zellen und zwischen Zellen mit der umgebenden Matrix dar (Kumar, 1998). Derzeit sind beim Menschen 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die zellspezifisch exprimiert werden und 24 Kombinationen bilden können (Hynes, 2002). Des Weiteren bilden Integrine transmembrane Verbindungen zum Zytoskelett und aktivieren intrazelluläre Signalwege. Binden extrazelluläre Liganden, so vermitteln Integrine komplexe Signalvorgänge durch die Aktivierung von beispielsweise *mitogen activated protein kinase* (MAPK), *focal adhesion kinase* (FAK), Mitglieder der *Rho*-Familie, *integrin-linked kinase* (ILK), *protein kinase B* (PKB) und *nuclear factor kappa B*, die unter anderem die Zell-Zell-Interaktion, Zelladhäsion, -migration, -proliferation, Angiogenese, Wundheilung, maligne Transformation sowie Metastasierung regulieren (Hynes, 1992; Kumar, 1998; Stupp *et* Rüegg, 2007). Integrine besitzen selbst keine intrinsische enzymatische Wirkung und sind auf zytoplasmatische

Adaptermoleküle und Kinasen (beispielsweise FAK und Src-Kinasen) angewiesen, um die entsprechenden Signalwege zu starten (Alghisi *et al.*, 2009).

1.1.1 Erkennungsmerkmal RGD-Sequenz

Aus dem Zellmilieu werden Liganden Integrin-spezifisch erkannt und gebunden. Ein häufiges Kernmerkmal ist die RGD-Sequenz in Liganden von $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ Integrinen wie beispielsweise Fibronectin, Vitronectin und Laminin. RGD ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben-Code, das heißt diese charakteristische Sequenz besteht aus den Aminosäuren Arginin, Glycin, Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp), welche an die genannten Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ bindet und die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe, die mechanische Verankerung von Zellen, sowie die Übermittlung von Überlebenssignalen veranlasst. Integrine sind Rezeptoren für eine Vielzahl von Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM), unter anderen Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Kollagen und Fibrinogen, dabei weisen die drei Erstgenannten die markante RGD-Sequenz auf (Nagai *et al.*, 1991; Kumar, 1998). Die differente Erkennung verschiedener Matrixproteine mit RGD-Sequenz durch die Integrine, mit entsprechender Signalweiterleitung, erfolgt unter anderem durch die spezifische plastische Gestalt der kurzen Aminosäuresequenz, proteinspezifische RGD-flankierende Aminosäuren sowie durch die Interaktion weiterer Bindungsdomänen die an anderer Stelle mit dem Integrin in Verbindung treten (Nagai *et al.*, 1991; Mas-Moruno *et al.*, 2010). Der Verlust der Integrin-gestützten Verankerung, zum Beispiel von Endothelzellen mit der EZM, führt unter normalen Umständen zur Apoptose der losgelösten Zellen (Anoikis). Es wird diskutiert, ob Integrin-vermittelte Überlebenssignale fehlen und ob Ligand-freie Integrine selbständig Apoptose-induzierende Signale bewirken können. Dieser Mechanismus der Anoikis ist oftmals in Tumorzellen aufgehoben (Frisch *et Francis*, 1994; Rüegg *et al.*, 2004). Auf Grund der Tatsache, dass Integrine vielfältig in biologischen als auch malignen Prozessen beteiligt sind und bei einer großen Anzahl solider Tumoren zahlreich überexprimiert gefunden wurden, liegt die Frage nach ihrer Eignung als Angriffspunkt in der zielgerichteten Krebstherapie nahe.

1.1.2 Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ sowie deren Rolle in Tumorangiogenese und Metastasierung

Integrin-abhängige Endothelzelladhäsion und -migration sind sowohl für die embryonale Gefäßentwicklung als auch für die pathologische Neovaskularisation und Gefäßanbindung von Tumoren und deren Metastasierung von größter Wichtigkeit. Insbesondere das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ist auf Endothelzellen während der Angiogenese in Wunden und Tumoren sowie auf

glatten Muskelzellen während ihrer Proliferationsphase überexprimiert (Brooks *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 2008). Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ zählt zu den bedeutendsten Integrinen der Angiogenese und stellt einen potenziellen Biomarker für Tumorangiogenese dar. Dieses Integrin wurde als erster möglicher Angriffspunkt einer auf Hemmung von Integrinen basierenden, gegen die Tumorangiogenese gerichteten, Therapie identifiziert. Die Blockierung der Interaktion von $\alpha_v\beta_3$ mit seinen natürlichen Liganden soll ebendiese, für das Tumorwachstum essentiellen, Prozesse unterbinden (Rüegg *et al.*, 2004). Schon 1994 wurde gezeigt, dass die Hemmung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ durch RGD-Mimetika zum Absterben von Endothelzellen führt, was die außerordentliche Rolle von Integrin $\alpha_v\beta_3$ in der Angiogenese beweist (Brooks *et al.*, 1994; Varner *et al.*, 1996).

Das Integrin $\alpha_v\beta_5$ ist vornehmlich ein Vitronektinrezeptor und in der Angiogenese von Retinopathien involviert. Es wird auf vielen soliden epithelialen Tumoren übermäßig exprimiert und ist maßgeblich an deren Metastasierung und Angiogenese beteiligt und deswegen ebenfalls interessant für die selektive Hemmung in der Krebstherapie (Friedlander *et al.*, 1995; Goodman *et al.*, 2002; Mas-Moruno *et al.*, 2010). Bisher wurden zahlreiche niedermolekulare Inhibitoren (*small molecules*) für Integrine als mögliche antitumorale Substanzen synthetisiert, die unterschiedliche Aktivitäten und differente Selektivität gegenüber Integrinen der α_v -Gruppe haben und gegen $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_5$, vorrangig aber gegen $\alpha_v\beta_3$ gerichtet sind (Goodman *et al.*, 2002).

1.2 CILENGITIDE – EIN INTEGRIN-INHIBITOR

Der Integrin-Antagonist Cilengitide ist ein N-methyliertes, zyklisches Pentapeptid mit RGD-Sequenz (cyclo Rg-Gly-Asp-D-Phe-(N-methyl)-Val; EMD 121974; Abb.1) der Firma Merck KGaA aus Darmstadt (Goodman *et al.*, 2002). Es inhibiert selektiv die Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ (Dechantsreiter *et al.*, 1999). Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) liegt im niedernanomolaren Bereich bei 3 nM für $\alpha_v\beta_3$ und 37 nM für $\alpha_v\beta_5$. Mit einer geringeren Affinität bindet und inhibiert Cilengitide ebenfalls das Integrin $\alpha_v\beta_6$, wiedergespiegelt durch die wesentlich höhere IC_{50} von 470 nM (Goodman *et al.*, 2002).

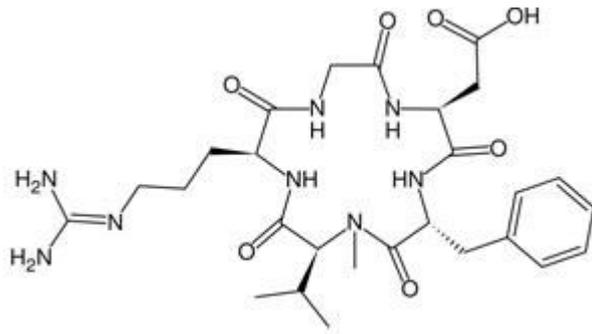


Abb. 1 Schematische Struktur von
Cilengitide EMD 121974 (C₂₇H₄₀N₈O₇)
nach S. Goodman et al. 2002

Im Mausmodell wurde der antitumorale Effekt von Cilengitide *in vivo* als auch *in vitro* erfolgreich belegt. Die Ergebnisse vorangegangener Studien konnte zeigen, dass das zyklische Pentapeptid das Wachstum von Medulloblastomen und Glioblastomen (MacDonald *et al.*, 2001), maligner Melanome (Mitjans *et al.*, 2000) und im Xenograftmodell das aggressive Wachstum von Mammakarzinomen hemmt, ohne die Mortalität der Mäuse zu erhöhen oder lebenslimitierende Toxizitäten zu offenbaren (Burke *et al.*, 2002). Cilengitide erwies sich als hochpotenter Angiogenese-Hemmer, indem es Apoptose von aktivierten Endothelzellen durch die Hemmung der Interaktion zwischen Integrinen und ihren Extrazellulärmatrix-Liganden induziert (Mas-Moruno *et al.*, 2010). Die Analysen der molekularen Effekte von Cilengitide auf Endothelzellen ergaben nicht nur Auswirkungen auf die Zelladhäsion durch die hemmende Wirkung auf $\alpha_v\beta_3$, sondern auch weiterer Effekte, die im folgenden Modell von Alghisi, Ponsionnet und Rüegg zusammengefasst sind (Abb. 2):

1. Cilengitide hemmt die $\alpha_v\beta_3$ -abhängige Adhäsion durch direkte Inhibition der $\alpha_v\beta_3$ -Ligand-Bindung
2. die β_1 -vermittelte Zelladhäsion wird gestört durch den transdominant-negativen Effekt, welcher durch Cilengitide-aktivierte $\alpha_v\beta_3$ -Integrine induziert ist
3. Cilengitide stimuliert die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von VE-Cadherin und führt zur Unterbrechung von VE-Cadherin-bedingten Verbindungen zwischen Endothelzellen. Die Lokalisation der VE-Cadherine, bezüglich ihrer Polarität bei Zell-Zellkontakten, wird durch die Cilengitide-induzierte Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ - und Src-Kinase-abhängigen Signalen gestört

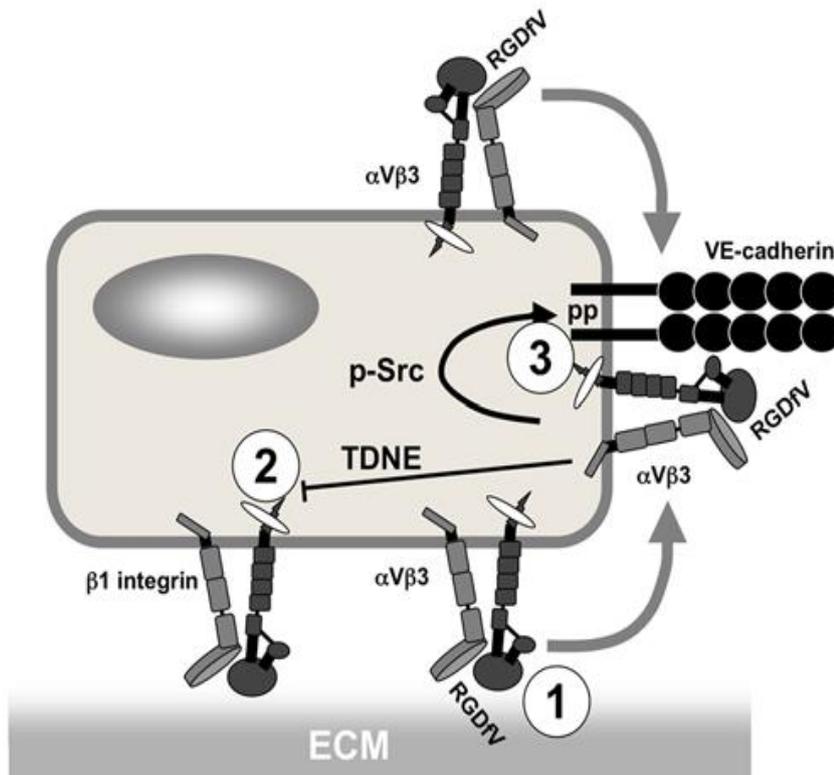


Abb. 2 Schematische Darstellung der Zielstrukturen von Cilengitide und modellhafter Vorstellungen zur Wirkungsweise (Alghisi et al. 2009)

Abkürzungen: ECM, extrazelluläre Matrix; RGDfV, Cilengitide; TDNE, transdominanter negativer Effekt; pp, Phosphorylierung.

Cilengitide unterbindet die Anhaftung von Endothelzellen an Matrixproteine wie Kollagen I (mittels β_1 -Liganden), Fibronectin (über $\alpha_5\beta_1 > \alpha_V\beta_3$ -Liganden) und Vitronectin (hauptsächlich durch $\alpha_V\beta_3$ -Liganden) und demonstriert anti-angiogene und anti-tumorale Qualitäten in zahlreichen präklinischen Studien (Mitjans *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2001; Buerkle *et al.*, 2002; Paolillo *et al.*, 2009).

Von weiterer Bedeutung ist die Synergie zwischen dem Integrin-Antagonist und bereits etablierter Therapieregimen: eine Bestrahlung verringert einerseits das lokale Tumorwachstum, andererseits steigert es die $\alpha_V\beta_3$ -Expression und begünstigt damit die lokale Invasivität und Metastasierung von Tumoren. Daher überrascht es nicht, dass Cilengitide synergistische Effekte in der Kombination mit therapeutischer Bestrahlung zeigt, weil es antagonistisch am $\alpha_V\beta_3$ -Integrin wirkt und damit einen zentral relevanten negativen Nebenaspekt der Bestrahlung abschwächt (Abdollahi *et al.*, 2005).

1.3 EPIDERMALER WACHSTUMSFAKTORREZEPTOR

Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR, ErbB1/HER1) ist der ErbB-Familie von Typ-I-Rezeptor-Tyrosinkinasen zugeordnet. Weitere

Mitglieder dieser Rezeptorklasse sind ErbB2/HER2neu, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4 (Alroy *et Yarden*, 1997). Die ErbB-Rezeptoren bilden ein komplexes Interaktionssystem indem bei Ligandenbindung an einen ErbB-Rezeptor ein weiterer Rezeptor (meist ErbB2) derselben Familie rekrutiert wird und so das Signal durch Heterodimerisation amplifiziert und diversifiziert (Normanno *et al.*, 2006). Der EGFR ist ein transmembranes Glykoprotein (170 kDa) mit extrazellulärer Bindungsdomäne für die Liganden EGF (*epidermal growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*) und Amphiregulin. Bindet ein Ligand, so dimerisiert der Ligand-Rezeptorkomplex und aktiviert die rezeptorständige intrazelluläre Tyrosinkinase. Durch die nachfolgende Autophosphorylierung werden *downstream* Signale (unter anderem RAS, RAF und ERK1/2) mittels MAPK, STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) stimuliert, die die biologische Antwort auf die Rezeptoraktivierung bestimmen und unter anderem das Zellwachstum fördern und Apoptose verhindern (Salomon *et al.*, 1995; Hynes *et al.*, 2001). Zudem sind ErbB-Rezeptoren bedeutend involviert in der embryonalen Entwicklung, Zellmigration, -proliferation, -differenzierung und Angiogenese aber auch in der Metastasierung epithelialer Tumoren (Zimmermann *et al.*, 2006).

1.3.1 Die Rolle des EGFR bei Tumoren

In verschiedenen menschlichen Tumoren (siehe Tabelle 1) sind Komponenten des ErbB-Signalweges durch unterschiedliche Mechanismen verändert: Überproduktion von Liganden, Amplifikation von ErbB-Rezeptoren mit nachstehender Hypersensibilisierung von Tumorzellen auf niedrige Ligandenkonzentration oder mutationsbedingt gesteigerte Aktivierung der ErbB-Rezeptoren (Yarden *et Sliwkowski*, 2001). Bei >90% aller Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region ist der EGFR höchst überexprimiert (Grandis *et Twardy*, 1993).

EGFR (ErbB1-) Überexpression	HNSCC, Mamma-Ca, Blasen-Ca, Prostata-Ca, NSCLC
ErbB2-Überexpression	Mamma-Ca, Zervix-Ca, Tumore des Aerodigestivtrakts
ErbB3- Expression	Oropharynx-Ca, Mamma-Ca, Kolon-Ca, Magen-Ca
ErbB4- Expression	Medulloblastom des Kindes

Tabelle 1 Übersicht der ErbB-Rezeptoren mit assoziierten Tumoren nach Yarden *et Sliwkowski*, 2001
 Abk.: HNSCC, Head and Neck squamous cell carcinoma, Ca, Karzinom, NSCLC, non-small cell lung carcinoma

Die Überexpression von EGFR hat einen schädlichen Effekt auf das normale Zellwachstum und kann die onkogene Transformation der Zelle begünstigen (Salomon *et al.*, 1995). Obendrein ist die EGFR-Überexpression assoziiert mit einem höheren Erkrankungsstadium, gesteigerten Metastasierungspotenzial, schlechteren Überleben (Maurizi *et al.*, 1996) und der

Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie (Zhang *et al.*, 2005). Im Jahr 2001 wurde der prognostische Wert der vermehrten EGFR-Expression hinsichtlich progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens untersucht mit dem Ergebnis, dass die EGFR-Expression eine hohe prognostische Relevanz bei HNSCC, Ovarial-, Blasen-, Zervix- und Ösophaguskarzinomen zeigt (Nicholson *et al.*, 2001). Die Überexpression von EGFR findet frühzeitig in der Entstehung von HNSCC statt: auf noch gesunder Mukosa, die später maligne entartet, ist eine verstärkte Expression des EGFR nachweisbar, welche mit steigendem Grad der Dysplasie zunimmt (Grandis *et Tweardy*, 1993).

Auf Grund der enormen Bedeutung des EGFR bei epithelialen Tumoren wurden verschiedene Substanzen entwickelt, um Tumore mit EGFR-Überexpression gezielt zu therapieren. Die gegen den EGFR gerichteten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI, zum Beispiel Lapatinib, Gefitinib, Erlotinib) binden an die intrinsische Tyrosinkinase des EGFR und verhindern deren Aktivierung, sodass die Initiierung der obengenannten Signalwege gehemmt wird. Im *ex vivo* Chemoresponsetest FLAVINO wurde demonstriert, dass Lapatinib einen supprimierenden Effekt auf die Koloniebildung epithelialer Tumorzellen von HNSCC zeigt, der synergistisch durch Cisplatin verstärkt wurde (Schrader *et al.*, 2012). Die klinische Datenlage für die Therapie von HNSCC mit TKI ist jedoch insgesamt spärlich. Ein weiterer Ansatz zur planvollen Hemmung ist der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Rezeptoren der ErbB-Familie. Neben Trastuzumab, ein gegen ErbB-2/HER2-Rezeptor gerichteter Antikörper und erfolgreich in der Behandlung einiger Mammakarzinome eingesetzt, ist Cetuximab von großer Wichtigkeit für die *targeted therapy* epithelialer Tumoren.

1.3.2 Cetuximab - ein EGFR-Inhibitor

Cetuximab ist ein chimärer (Maus-Mensch) monoklonaler Antikörper der sich gegen EGFR richtet. EGFR kommt auf epithelialen Geweben vor und ist auf zahlreichen epithelialen Tumoren (bis zu 90% bei HNSCC) überexprimiert (Grandis *et Tweardy*, 1993). Für die gezielte Hemmung von EGFR wurde der monoklonale IgG1-Antikörper Cetuximab (Handelsname: Erbitux®, C225, ImClone Systems, Merck KGaA, Bristol-Myers Squibb) entwickelt. Cetuximab hat eine Größe von 146 kDa und weist eine höhere Bindungsaffinität zur extrazellulären Bindungsdomäne des EGFR auf als seine Liganden EGF, TGF α oder Amphiregulin. Durch die kompetitive Hemmung der Ligandenbindung seitens des Antikörpers wird die Dimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren und dadurch die Rezeptorfunktion mit Aktivierung der intrinsischen rezeptorständigen Tyrosinkinase unterbunden. Ein weiterer Effekt ist die Internalisierung und der Abbau des Antikörper-

EGFR-Komplexes und damit die Verminderung der überzähligen EGF-Rezeptoren (Zimmermann *et al.*, 2006). Zahlreiche, tumorunterstützende Prozesse werden durch Cetuximab blockiert, zum Beispiel das Zellwachstum, Ausbreitungs- und Metastasierungsprozesse sowie die Angiogenese durch verminderte Bildung von VEGF-A. Die Hemmung der Apoptose wird durch die Aktivierung pro-apoptotischer Moleküle aufgehoben. Überdies weist Cetuximab eine antikörperabhängige zellvermittelte Toxizität auf, die den zytotoxischen Effekt verstärkt (Vincenzi *et al.*, 2010). Cetuximab wird intravenös in einer Dosierung von 400 mg/m² unter simultaner Gabe eines Antihistaminikums mit einer maximalen Infusionsrate von 10 mg/min appliziert. Während der Behandlung mit Cetuximab ist unbedingt auf Anzeichen für akut toxische und allergische Reaktionen zu achten. Häufige Nebenwirkungen sind Haut- und Infusionsreaktionen aber auch schwerwiegende unerwünschte Effekte wurden unter Cetuximab beobachtet: Sepsis, Herz-Kreislaufversagen, Niereninsuffizienz und Lungenembolie (Bonner *et al.*, 2006; Bou-Assaly *et Mukherji*, 2010). Die Ausbildung eines Arzneimittelexanthems durch Cetuximab war signifikant mit dem Therapieansprechen und einer verbesserten Überlebensrate assoziiert (Burtneß *et al.*, 2005; Bonner *et al.*, 2010). Im Jahr 2006 wurde Cetuximab von der *Federal Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von Kolorektalkarzinomen und von fortgeschrittenen, rezidivierenden und/oder metastasierenden HNSCC in Kombination mit Bestrahlung zugelassen. Als Monotherapie kommt es bei versagender Platin-haltiger Chemotherapie bei rezidivierenden und/oder metastasierenden HNSCC zum Einsatz.

1.4 TUMORE DER KOPF-HALS-REGION UND DEREN BIOMARKER

Europaweit erkranken pro Jahr circa 650.000 Menschen an einem malignen Tumor der Kopf-Hals-Region; etwa 350.000 Todesfälle sind auf diese Tumorentität zurückzuführen (Guntinas-Lichius *et al.*, 2010; Dietz *et Wichmann*, 2011). Bei >90% der diagnostizierten Tumore des Larynx, Pharynx und der Mundhöhle (einschließlich Zunge, Mundboden und Tonsillen) handelt es sich histopathologisch um Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC). Entgegen sich stetig weiterentwickelnden Therapieoptionen ist lediglich für Oropharynxkarzinome eine Verbesserung des Gesamtüberlebens zu verzeichnen, für Larynxkarzinome bleibt dieses jedoch unverändert schlecht (Pulte *et Brenner*, 2010). Verschiedene Risikofaktoren, hauptsächlich die Synergie von chronischem Tabak- und Alkoholkonsum, beschleunigen die Tumorentstehung oder machen diese wahrscheinlich (Ramroth *et al.*, 2004). Neben der individuellen genetischen Prädisposition zählen auch mangelnde Mundhygiene, mechanische Irritationen (zum Beispiel locker sitzender

Zahnersatz), ein niedriger sozioökonomischer Status, berufliche Exposition gegenüber Toxinen und Holzstäuben, aber ebenso der exzessive Gebrauch von aggressiven Mundspülungen zu den Risikofaktoren. Die Infektionen mit Epstein-Barr-Viren gilt weithin als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung von Malignomen, vor allem im Nasopharynx (Link, 2009; Dietz *et* Wichmann, 2011; Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2012). Eine an Bedeutung zunehmende Gefährdung für die Entstehung von HNSCC ist die orale Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV), vor allem dem Hochrisikotyp HPV 16. Besonders bei jüngeren Patienten ist die Inzidenz HPV-positiver HNSCC steigend (D'Souza *et al.*, 2007).

1.4.1 Therapie von Kopf-Hals-Tumoren

Die Behandlung von Tumoren der Kopf-Hals-Region ist abhängig von der Tumorgöße (T), dem Lymphknotenbefall (N), dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M) sowie vom Allgemeinzustand und Komorbiditäten des Patienten. Nach der Diagnosesicherung, Staging und UICC-Stadium-Einteilung sollten in einem interdisziplinären Tumorboard prätherapeutisch, basierend auf bereits vorhandenen Befunden, gegebenenfalls weitere Diagnostik und Therapie individuell geplant und verbindlich festgelegt werden. Für Tumoren in frühen Stadien (UICC I–II) gibt es zum einen die primär chirurgische Tumorresektion mit ggf. ipsilateraler *Neck dissection* (Entfernung zervikaler Lymphknoten) ab Stadium II, sowie die primäre Strahlentherapie (Dietz, 2009). In Deutschland wird die primär chirurgische Therapie der frühzeitigen Bestrahlung vorgezogen um den Spättoxizitäten der Strahlung zu entgehen. Ist eine erfolgversprechende Tumorresektion nicht möglich, wird die primäre Bestrahlung oder Radiochemotherapie empfohlen. Aufgrund hoher Rezidivraten nach alleiniger chirurgischer Tumorresektion wird ab UICC III postoperativ adjuvant Radio- bzw. Radiochemotherapie angewandt (Dietzsch *et* Kortmann, 2009). Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (UICC III–IV B) oder bei inakzeptablem Operationsrisiko wird ein multimodales Therapiekonzept eingesetzt. Neben der Chemo- oder Radiochemotherapie kommen in diesem Zusammenhang auch neuartige Substanzen sowie Substrate zur zielgerichteten (*targeted*) Therapie zum Einsatz, vor allem in der Behandlung rezidivierender und/oder metastasierender HNSCC (UICC IV C) (Dietz, 2009).

1.4.2 Klinische Erprobungen von Cilengitide

Auf Grund der Ergebnisse der vorstehend benannten mechanistischen und vielversprechenden, präklinischen Untersuchungen (siehe 1.2) wurde Cilengitide auch in klinischen Studien erprobt. In verschiedenen Phase-I- und II-Studien wurden Glioblastoma

multiforme-Patienten mit Cilengitide entweder als alleinige Substanz oder in Kombination mit Bestrahlung und/oder Temozolomid geprüft. Es konnten, wie im Mausmodell, keine dosislimitierenden Toxizitäten festgestellt werden, außerdem überraschte Cilengitide mit einem milden Nebenwirkungsprofil und war allgemein gut verträglich (Nabors *et al.*, 2007; Stupp *et Rüeegg*, 2007; Reardon *et al.*, 2008). In der ADVANTAGE-Studie, einer *open-label*, randomisiert-kontrolliert klinischen Studie der Phase I/II, wurde die Sicherheit und Effektivität von Cilengitide in Kombination mit Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Cetuximab bei Patienten mit rezidivierenden und/oder metastasierenden Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region untersucht (Vermorken *et al.*, 2011). Das Ziel war, die Therapiemöglichkeiten zu erweitern und die in dieser Patientengruppe sehr schlechten Überlebenschancen (medianes Überleben bei HNSCC in der First-Line-Therapie ca. sechs Monate) zu verbessern. Das Einzigartige dieser Studie ist die Kombination von systemischer Chemotherapie durch Cisplatin und 5-FU mit zweifacher *targeted* Therapie. Es wurde vermutet, dass die simultane Integrin-Inhibition durch Cilengitide und die Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR mit Cetuximab vorteilhaft ist, weil der EGFR in HNSCC fast durchgängig (>90% der epithelialen Zellen in HNSCC) überexprimiert ist (Grandis *et Tweardy*, 1993) und die Integrine $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 5$ auf Endothelzellen von HNSCC während der Tumorangiogenese überexprimiert werden. Vermorken *et al.* demonstrierten und bestätigten 2014 die gute Verträglichkeit und ein geringes Nebenwirkungsprofil von Cilengitide in Kombination mit Cisplatin, 5-FU und Cetuximab. Eine Verbesserung der klinischen Ergebnisse bezüglich der Überlebensdauer durch die zusätzliche Gabe von Cilengitide konnte jedoch in den untersuchten Patientengruppen nicht festgestellt werden (Vermorken *et al.*, 2014). In der multizentrischen, *open label*, Phase-III-Studie CENTRIC EORTC 26071-22072 wurde die Effektivität von Cilengitide bei Patienten mit Glioblastoma multiforme untersucht. Die additive Gabe von Cilengitide in der Dosierung von 2000 mg/m² Körperoberfläche intravenös zweimal wöchentlich zusätzlich zur etablierten Radiochemotherapie mit Temozolomid wurde gut toleriert, ergab allerdings ebenfalls keinen Überlebensvorteil für die Patienten (Stupp *et al.*, 2014).

1.4.3 Targeted Therapie mit Cetuximab bei Kopf-Hals-Tumoren

Auf Grund der Tatsache, dass die Mehrheit aller HNSCC den EGFR überexprimieren und dies mit einem schlechteren Überleben und Therapieansprechen sowie einem gesteigerten Metastasierungspotenzial einhergeht, wurde 2006 der monoklonale Antikörper gegen EGFR von der FDA für die Behandlung von rezidivierenden und/oder metastasierenden HNSCC bewilligt (siehe 1.4). In der für die FDA-Genehmigung zu Grunde liegenden Phase-III-Studie

von Bonner *et al.* wurde die Überlegenheit von mit Cetuximab kombinierter Bestrahlung gegenüber alleiniger Bestrahlung in der Therapie von Patienten mit lokal fortgeschrittenen HNSCC anhand der signifikanten Verbesserung der Tumorkontrolle und der 5-Jahresüberlebensrate demonstriert (Bonner *et al.*, 2006; 2010). Die Phase-III-Studie EXTREME (*ErbituX in 1st-line Treatment of REcurrent or MEtastatic HNSCC*) untersuchte, ob die Hinzunahme von Cetuximab zu Platin-haltiger Chemotherapie einen Nutzen bei Patienten mit rezidivierenden und/oder metastasierenden HNSCC erzielt. In der Patientengruppe, die Cisplatin, 5-FU und zusätzlich Cetuximab als Erstlinientherapie erhielt, konnte eine gesteigerte Ansprechrates auf die Therapie sowie ein signifikant verbessertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben im Vergleich zur alleinigen Cisplatin und 5-FU-Gabe erzielt werden (Vermorken *et al.*, 2008; Rivera *et al.*, 2009). Auch als alleinige Behandlungssubstanz konnte Cetuximab bei Patienten mit rezidivierenden und/oder metastasierenden HNSCC, die unter Platin-basierender Therapie einen Krankheitsprogress erleben mussten, überzeugen (Vermorken *et al.*, 2008). Obwohl EGFR ubiquitär auf größtenteils aller HNSCC überexprimiert ist, spricht nur ein geringer Anteil der Patienten auf die Therapie mit EGFR-Inhibitoren an. Es wurde überprüft, ob die Höhe der EGFR-Expression als prognostischer Marker für das Therapieansprechen mit Cetuximab nutzbar ist, jedoch konnte keine Korrelation zwischen der immun-histochemisch gemessenen Menge an exprimierten EGFR mit dem klinischen Therapieerfolg der EGFR-Inhibitoren demonstriert werden (Chung *et al.*, 2005; Byers *et al.*, 2010; Brand *et al.*, 2011). Deswegen ist die Etablierung einer prätherapeutischen Testung einer Tumorbiopsie des zu behandelnden Patienten hinsichtlich seiner Response auf Cetuximab, zum Beispiel im FLAVINO-Kurzzeit-Chemoresponsestest, erstrebenswert.

Im Rahmen des Einsatzes von Cetuximab musste festgestellt werden, dass sich nach anfänglich gutem Therapieansprechen vermehrt Resistenzen gegenüber dem EGFR-Inhibitor entwickelten, die den Therapieerfolg beeinträchtigten. Es konnten sowohl erworbene als auch endogene Resistenzmechanismen gegenüber Cetuximab benannt werden. Als Beispiel genannt sei die Dysregulation der EGFR-Internalisierung und Degradation mit anschließender EGFR-abhängiger Aktivierung von ErbB2- und ErbB3-Rezeptoren mit konsekutiver Stärkung proliferativer und anti-apoptotischer Signalwege für das Krebszellüberleben (Wheeler *et al.*, 2008) sowie der inadäquate Transport zytotoxischer Substanzen in den Tumor durch tumorgetriebene Angiogenese durch vermehrtes Vorhandensein von VEGF-A (Chung *et al.*, 2015). Als ein weiterer Grund für die Resistenzentwicklung gegenüber Cetuximab wird die beständige Aktivierung der STAT3-Signalkaskade durch IL-6 diskutiert. Durch die

kontinuierliche STAT3-Aktivierung wird die onkogene Proliferation und Hemmung der Apoptose gefördert (Chen *et al.*, 2010).

Derzeitige Behandlungsmethoden sehen die Nutzung von Cetuximab in Kombination mit herkömmlicher Chemotherapie und Bestrahlung vor. Bei dieser Herangehensweise gibt es die Möglichkeit zur Resistenzentwicklung gegenüber Cetuximab. Die zielgerichtete Hemmung weiterer zellulärer Signalwege (in etwa IL-6- und VEGF- Signalwege) neben der EGFR-Inhibition ergaben in Laborversuchen vielversprechende Aussichten und könnten die *targeted therapy* mit Cetuximab gewinnbringend ergänzen (Wheeler *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Larsen *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2015).

1.4.4 Biomarker bei HNSCC

Auf Grund der Tatsache, dass viele Prozesse in der Entstehung von HNSCC noch nicht umfänglich verstanden sind und viele Unklarheiten über die Vorhersage des Behandlungserfolgs bestehen, wird seit vielen Jahren nach Biomarkern als prädiktive Indikatoren für Tumorentstehung und -progress oder auch als potenzielle Zielstrukturen für Therapieansätze geforscht. Ein Biomarker von großer Bedeutung ist der HPV-Status des Tumors. HPV-positiv getestete Tumoren haben ein signifikant besseres Gesamtüberleben, sodass die 8. Auflage der TNM-Klassifikation für HNSCC von 2017 den HPV-16 Status berücksichtigt (Wittekind, 2017). Im Jahr 2005 wurden auf der Suche nach weiteren prognostischen Markern für HNSCC 140 Gene entdeckt, die während des Tumorprogresses beständig vermehrt exprimiert wurden (Belbin *et al.*, 2002; 2005). Des Weiteren konnten mittels Genexpressionsanalysen vier verschiedene Subgruppen von HNSCC identifiziert werden, die biologisch variabel sind und innerhalb der Subgruppe ein ähnliches Verhalten bezüglich rezidivfreien Überlebens zeigen (Chung *et al.*, 2004). Die Tumoren mit dem schlechtesten Krankheitsausgang (Untergruppe 1) sind gekennzeichnet durch die hohe Expression von TGF α und dem damit verbundenen Hinweis auf verstärkte Aktivität des EGFR-Signalweges. Die Patienten mit Tumoren dieser Untergruppe könnten besonders von EGFR-inhibierender Therapien profitieren. Die Untergruppe 2 ist charakterisiert durch einen erhöhten Fibroblastenanteil und einer starken mesenchymalen Zellsignatur. Tumoren der Gruppe 3 zeigten Expression für Zytokeratin 14 und 15 sowie das beste rezidivfreie Überleben. Gruppe-4-Tumore ähneln in ihrem Genexpressionsmuster Tumoren, die Zigarettenrauch ausgesetzt waren und deuten auf das Risikoverhalten des Patienten hin (Chung *et al.*, 2004; 2006). Würden diese Erkenntnisse anhand größerer Kohorten bestätigt, so könnte das individuelle Genexpressionsmuster als Biomarker genutzt werden, um den

klinischen Krankheitsausgang abzuschätzen und um eine geeignete Therapie auf den individuellen Tumor abzustimmen. Häufig anzutreffende genetische Abwandlungen wurden anhand zytogenetischer und molekularer Herangehensweisen charakterisiert. Dabei wurden genetische Ungleichgewichte und epigenetische Dysregulationen mit einem schlechteren Überleben des Patienten assoziiert (Poage *et al.*, 2010). Als neuer Ansatz wurden DNA-Methylierungsmuster untersucht und in Form eines Methylierungs-Scores als verlässlichen prädiktiven Marker für das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten erforscht (Kostareli *et al.*, 2013; 2016).

Eine weitere Herangehensweise zur Identifizierung von Biomarkern bei Kopf-Hals-Tumoren ist die Auseinandersetzung mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Es gibt Veränderungen im Zytokinmuster zwischen gesundem Epithel und entartetem Epithel des HNSCC in Abhängigkeit vom Ausmaß der malignen Transformation (Pries *et Wollenberg*, 2006; Byers *et al.*, 2010; Lippitz, 2013). Bereits in den 1990er Jahren wurden erhöhte Werte pro-inflammatorischer und pro-angiogener Zytokine, wie IL-6, IL-8 und VEGF-A, sowohl in HNSCC-Zelllinien und Biopsien von HNSCC als auch in Patientenseren detektiert und als mögliche Biomarker oder als therapeutische Angriffspunkte in Erwägung gezogen (Mann *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1999). Argiris *et al* untersuchten die Immunmodulation durch Cetuximab mit Blick auf veränderte Zytokinproduktion (unter anderem von IL-6 und VEGF-A) mit dem Ziel, verlässliche Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit Cetuximab zu identifizieren (Argiris *et al.*, 2011). Auch die Forschungsgruppe um Byers erstellten 2010 anhand von Seren von HNSCC-Patienten ein *High Risk* - Profil von Hypoxie-induzierten Zytokinen und Angiogenesefaktoren, um den klinischen Ausgang bezüglich Tumorprogress vorherzusagen und um den Therapieerfolg zu überwachen (Byers *et al.*, 2010). Von herausragender Bedeutung sind das Interleukin 6, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor sowie das Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (siehe 1.5.5 bis 1.5.7).

1.4.5 Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) ist ein pro-inflammatorisches pleiotropes Zytokin mit einer Größe von 26 kDa und besteht aus 184 Aminosäuren. IL-6 wird von diversen Zellen produziert, unter anderem Monozyten, Makrophagen und auch Tumorzellen und wird vom IL-6-Rezeptor erkannt und gebunden (Nagasaki *et al.*, 2014). Der IL-6/IL-6-Rezeptor-Komplex aktiviert das Glykoprotein gp130, welches Signalwege des STAT3, der Ras-MAP-Kinasen und PI3-K über die Januskinasen in Gang setzt und so auf die Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose einwirkt. Als Akut-Phase-Protein wird es bei Gewebsverletzungen und Infektionen vermehrt

exprimiert und ist maßgeblich an der Regulierung der Entzündungs- und Immunantwort beteiligt (Kishimoto, 1989). Ebenso involviert ist es in zahlreichen biologischen Prozessen der Hämatopoese, Zelldifferenzierung, Wundheilung, des Knochenmetabolismus und der Apoptose (Tanaka *et al.*, 2014). Es ist bekannt, dass die fehlregulierte und übermäßige Produktion von IL-6 mit diversen chronisch-entzündlichen Erkrankungen sowie der Entstehung und Erhaltung von Tumoren assoziiert ist. In vielen malignen Entitäten, zum Beispiel in Lungen-, Mamma-, Kolorektal-, Pankreas-, Nierenkarzinomen, malignen Melanomen und HNSCC, wurden erhöhte IL-6-Serumkonzentrationen festgestellt (Lippitz, 2013). Die IL-6-Überproduktion kann als ein Aspekt der Fluchtreaktion des Tumors vor körpereigenen antitumoralen Effekten angenommen werden: die vermehrte IL-6-Produktion resultiert in der ständigen STAT3-Aktivierung, welche die Zellproliferation und Angiogenese durch VEGF-A-Produktion fördert und Überlebenssignale zur Apoptosehemmung gibt (Gao *et al.*, 2007). Erhöhte IL-6 Konzentrationen in Seren von Patienten mit HNSCC korrelieren mit einem höheren Erkrankungsstadium, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und gesteigerter proliferativer Aktivität des Tumors. Außerdem steht die erhöhte IL-6-Produktion im Zusammenhang mit einer verringerten Immunantwort, ausgeprägter Kachexie und einer signifikant schlechteren Prognose (Riedel *et al.*, 2005). Hohe IL-6 Transkriptionsniveaus im Tumor sind außerdem mit der erworbenen Cisplatin-Resistenz assoziiert (Gao *et al.*, 2016). IL-6 verstärkt die VEGF-A-Produktion und hat damit eine tragende Rolle in der Unterhaltung der Tumorangiogenese (Nagasaki *et al.*, 2014). Die Aktivierung des IL-6-Rezeptors und des EGFR münden in überlappenden Signalkaskaden (STAT3, MAPK, PI3-K), sodass die Entstehung von Therapieresistenz gegenüber Cetuximab auch hinsichtlich der IL-6 Produktion des Tumors beachtet werden muss (Chen *et al.*, 2010). Es gibt Hinweise darauf, dass die IL-6-Konzentrationen im Rahmen therapeutischer Interventionen zur Tumorbeseitigung abfallen, sodass der Verlauf der IL-6-Produktion als prädiktiver Marker für das Therapieansprechen untersucht werden könnte (Riedel *et al.*, 2005).

1.4.6 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A – VEGF-A

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (*vascular endothelial growth factor* VEGF-A) ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und zählt zu den Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (Ferrara *et al.*, 1989). Neben VEGF-A gehören auch VEGF-B, VEGF-C und D (relevant für Lymphgefäßentwicklung), VEGF-E, VEGF-F und PlGF (*placental growth factor*) zur PDGF-Familie (*platelet derived growth factor*). VEGF-A ist der verbreitetste Vertreter und maßgeblich für die embryonale Vaskulogenese und

Angiogenese verantwortlich (Ferrara, 1999). Die durch VEGF-A getriggerten Effekte werden durch die Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor 1 und 2 auf Endothelzellen und Tumorzellen vermittelt. Der VEGF-A/VEGF-Rezeptorkomplex dimerisiert, aktiviert die rezeptorständige Tyrosinkinase und setzt nachfolgende *downstream*-Transduktionssignale (MAPK, STAT3, PI3-K, Ras) in Gang und führt zu einer gesteigerten Zellproliferation und -migration, Angiogenese und zur Hemmung von Apoptose der Endothel- oder Tumorzellen. Von großer Wichtigkeit für die Vermittlung pro-angiogener Signale in Endothelzellen ist der VEGF-Rezeptor 2. Zu der Familie der VEGF-Rezeptoren (VEGFR) gehört ebenfalls der VEGFR 1 und 3. VEGFR 1 reguliert Signale für Monozytenmigration und steht in Verbindung mit erhöhtem Metastasierungspotenzial diverser Tumoren (Kolorektalkarzinom, Mammakarzinom, Lungenkarzinome und weitere), wobei seine Funktionalität bisher nicht endgültig geklärt ist. Der VEGFR 3 bindet ausschließlich VEGF-C, -D und ist von besonderer Bedeutung für die Lymphgefäßentwicklung (Ferrara, 1999; Kowanetz *et Ferrara*, 2006). Die physiologischen Funktionen von VEGF-A sind die embryonale Vaskulogenese, die Beteiligung beim weiblichen Menstruationszyklus und der Wundheilung beim Erwachsenen. Des Weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen pathologischen Veränderungen wie der Entstehung einer diabetischen Retinopathie, Makuladegeneration, Rheumatoide Arthritis sowie der Metastasierung und Angiogenese von soliden Tumoren (Folkman, 1995; Ferrara, 1993; 2002).

Die VEGF-A-Produktion wird durch die Anwesenheit verschiedener Zytokinen, Wachstumsfaktoren (zum Beispiel FGF, *fibroblast growth factor*; PDGR; TNF, Tumornekrosefaktor; EGF), Onkogenen und durch Azidose der unmittelbaren Zellumgebung gesteigert. Es bestehen komplexe Verflechtungen zwischen den Signalwegen des EGFR und der VEGF-Regulierung, die sich gegenseitig fördern (O-charoenrat *et al.*, 2000). Der stärkste Reiz für die VEGF-Produktion ist jedoch der Hypoxie-induzierende Faktor 1α (HIF- 1α) bei lokal bestehendem Sauerstoffmangel des Gewebes. Mit zunehmender Zellzahl und Größe des Tumors wird die Nährstoffversorgung des Tumors über Diffusion unzureichend. Auf Grund der hypoxischen Areale werden vermehrt pro-angiogene Faktoren, vor allem VEGF-A, gebildet, es kommt zum *angiogenic switch*. Die Anwesenheit von VEGF-A führt zur Endothelzellproliferation und wirkt als Überlebenssignal für junge unreife Gefäßsprösslinge. Weiterhin ist es als Gefäßpermeabilitätsfaktor aktiv und führt durch die Undichtigkeit der Gefäßwände zum Austritt von Plasmaproteinen und Enzymen, die die umgebende Extrazellulärmatrix auflockern und die ungehinderte Ausbreitung von Endothel- und Tumorzellen erlauben (Ferrara, 2002; Campbell *et al.*, 2010; Chung *et Ferrara*, 2010).

VEGF-A-induzierte Tumorgefäße unterscheiden sich wesentlich von physiologischen Blutgefäßen (McDonald *et al.*, 2002). Sie sind gekennzeichnet durch starke Verästelung, unregelmäßige Form und Brüchigkeit, zahlreiche in Sackgassen mündende Gefäßenden sowie durch die fehlende Hierarchie von Venolen, Arteriolen und Kapillaren. In den unreifen Gefäßen ist die Anzahl der Perizyten vermindert bzw. sind diese von dem Gefäßendothel dissoziiert, was in einer gestörten Barrierefunktion mündet. Die schlechte Tumorgefäßarchitektur hat zur Folge, dass die Blutversorgung des Tumors ungleichmäßig stattfindet und hypoxische Areale weiterhin die Produktion pro-angiogener Faktoren wie VEGF-A stimulieren. Auch der Transport therapeutischer Substanzen in den Tumor ist davon beeinträchtigt. In präklinischen Untersuchungen wurde demonstriert, dass eine Hemmung von VEGF-A (beispielsweise mit Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF-A) durch Gefäßnormalisierung den Transport von chemotherapeutischen Substanzen in den Tumor verbessern kann (Goel *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2015). Da die Regulierung von VEGF-A in HNSCC eng mit Signalwegen des EGFR verknüpft ist, wurde die duale Hemmung beider Signalwege beleuchtet mit dem Ergebnis, dass eine Bereicherung für die *targeted therapy* denkbar ist (Larsen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Auf Grund der Tatsachen, dass VEGF-A grundlegend mit der Tumorangiogenese verbunden ist und HNSCC stark vaskularisiert sind, wurde untersucht, ob die Höhe der VEGF-A Produktion von prognostischem Wert für diese Patientengruppe sein kann (Riedel *et al.*, 2000). Demonstriert wurde die Korrelation vermehrter VEGF-A-Produktion mit verstärkter Aggressivität, Invasivität, erhöhtem Metastasierungspotenzial bei HNSCC-Zelllinien und im Mausmodell (Sauter *et al.*, 1999). Die Ergebnisse einer Metaanalyse aus dem Jahr 2005 belegte die Assoziation zwischen erhöhtem VEGF-A und dem verminderten Gesamtüberleben von Patienten mit HNSCC (Kyzas *et al.*, 2005).

1.4.7 Monozyten-Chemoattraktor Protein 1 – MCP-1

Das MCP-1, häufig als CC-Chemokin-2-Ligand (CCL2) benannt, ist ein pro-inflammatorisches, chemotaktisches Zytokin und wird beim Menschen über das CCL2-Gen auf Chromosom 17 codiert. Es besteht aus 76 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von annäherungsweise 13 kDa (van Coillie *et al.*, 1999). MCP-1 wird von Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Gliazellen und Epithelzellen produziert, überwiegend jedoch von Makrophagen und Monozyten (Yoshimura *et al.*, 1989). Die Produktion von MCP-1 wird unter anderem durch oxidativen Stress, dem Einfluss anderer Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert (Deshmane *et al.*, 2009). Als pro-inflammatorisches Chemokin ist MCP-1 maßgeblich an der Rekrutierung von Makrophagen, Monozyten und natürlichen

Killerzellen bei Entzündungen und Gewebsverletzung beteiligt. Seine chemotaktischen Wirkungen werden durch die Bindung an die Chemokinrezeptoren 2 und 4 (CCR2, CCR4), welche zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen, entfaltet.

Die klinische Relevanz von MCP-1 ist gut belegt. Durch seine Wirkungen, unter anderen auf Monozyten, ist es verflochten in der Pathogenese von Multiple Sklerose, insulinresistenter Diabetes, Morbus Alzheimer, allergischem Asthma, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Psoriasis, rheumatoide Arthritis sowie Artherosklerose (Deshmane *et al.*, 2009). Weithin bekannt ist, dass hohe Konzentrationen von MCP-1 Auswirkungen auf die Tumorumgebung haben und mit Tumorprogress,- invasivität und Metastasierung assoziiert sind (Sato *et al.*, 1995; Saji *et al.*, 2001; Koide *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007; Wolf *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2014). Auf Grund diverser Effekte auf verschiedene Zellen wurden sowohl tumorprogressive als auch antitumorale Effekte durch MCP-1 beschrieben. Zu den tumorunterstützenden Wirkungen von MCP-1 zählen die konzentrationsabhängig induzierte Endothelzellmigration und damit verbunden die direkte Stimulation der Angiogenese (Salcedo *et al.*, 2000) sowie die MCP-1-abhängige, tumorassoziierte Makrophageninfiltration mit vermehrter Produktion von Wachstumsfaktoren, pro-angiogenen und pro-inflammatorischen Zytokinen (Sato *et al.*, 1995) als auch die Regulierung von Tumorüberlebenssignalen wie ERK (*extracellular-signal regulated kinase*), Akt und STAT3 (Ji *et al.*, 2014). Das antitumorale Potenzial von MCP-1 äußert sich über die Anziehung von Monozyten und Makrophagen, die mit tumorinfiltrierenden T-Zellen interagieren und die Zerstörung des Tumorgewebes fördern. Außerdem kann MCP-1 zytotoxische Wirkungen von chemotherapeutischen Substanzen intensivieren, jedoch zeigte bei einer Subgruppe von HNSCC die Hemmung von MCP-1 eine Verbesserung der Wirksamkeit von Zytostatika (Wichmann *et al.*, 2015a). Unter welchen Umständen MCP-1 tumorunterstützende oder tumorhemmende Effekte bewirkt ist nicht abschließend geklärt; vermutet wird eine Konzentrationsabhängigkeit.

In zahlreichen Studien wurden erhöhte Serumkonzentrationen von MCP-1 bei Patienten mit soliden Tumoren, einschließlich fortgeschrittenen und metastasierten HNSCC, demonstriert und die Überexpression von MCP-1 mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben korreliert (Wang *et al.*, 2014). Diese Tatsachen unterstreichen die Bedeutung von MCP-1 als prognostischen Biomarker solider Tumoren inklusive HNSCC.

1.5 CHEMORESPONSETESTUNG *EX VIVO*

Zahlreiche Therapieprotokolle zur Behandlung von HNSCC sehen die gleichzeitige oder sequenzielle Verabreichung mehrerer zytotoxischer Substanzen vor. Obwohl diese Einzelsubstanzen (zum Beispiel Cisplatin, 5-Fluorouracil und Docetaxel) sich in der Therapie von HNSCC als effektiv erwiesen, sind diese noch nicht vollständig verstanden, vor allem hinsichtlich ihrer Kombination miteinander sowie der Synergien von Toxizitäten. Es ist bekannt, dass der Erfolg von Taxan- als auch Platin-basierender Chemotherapie entscheidend mit der Höhe der applizierten Dosis korreliert. Diese Substanzen sind allerdings durch eine sehr enge therapeutische Breite gekennzeichnet. Überdies gibt es insbesondere bei Cisplatin eine maximale kumulative Lebenszeit-Exposition, die nicht überschritten werden kann (Trotti *et al.*, 2007). Dem zu Folge sollte zwar versucht werden, die größtmögliche Dosis zu applizieren, die mit der Sicherheit des Patienten vereinbar ist und onkologische Sicherheit erzielt, dies aber ohne die Toxizitäten und damit das Risiko fataler Ereignisse zu steigern. Problematisch wird es bei der Entscheidung bezüglich der idealen Dosierung mehrerer Komponenten zur simultanen oder sequenziellen Applikation im gleichen Therapieprotokoll. Präklinische Versuche an Mäusen über die Kombination von Docetaxel mit Cisplatin offenbarten, neben dem verbesserten zytotoxischen Effekt auf Tumoren, eine synergistische Steigerung der toxischen Wirkung der beiden Substanzen, die sich gegenseitig verstärken (Bissery *et al.*, 1995a; 1995b). Noch ist unklar, ob beim Menschen die Veränderung der Höhe der Einzeldosen in der Gesamtkombination einen Einfluss auf die kumulierte Toxizität hat. Allerdings zeigen die Erfahrungen mit simultaner Radiochemotherapie unter Einsatz von Cisplatin und 5-FU eine massive Zunahme der Toxizität (insbesondere Spättoxizität und assoziierte Todesfälle; Machtay *et al.*, 2008), sodass eine Übertragbarkeit der präklinischen Untersuchungen auf die *In-vivo*-Situation bei HNSCC-Patienten denkbar ist.

Auf Grund der Tatsache, dass HNSCC in ihrem biologischen Charakter eine breite Heterogenität aufweisen, verwundert es nicht, dass Behandlungsmaßnahmen unterschiedlich erfolgreich sind und gegebenenfalls nicht den erwünschten Effekt erzielen (Wichmann *et al.*, 2009; Wichmann *et al.*, 2016). Mit der zunehmenden Anzahl neu aufkommender antitumoraler Substanzen in der Krebstherapie (zum Beispiel *targeted therapy*, *biologicals*) wird es immer schwieriger die bestmögliche Therapie für den Patienten zu bestimmen. Das Ziel ist, einen verlässlichen Test zu etablieren, der vor Behandlungsbeginn die bestmögliche erfolgversprechende Therapie für den Tumorpatienten vorhersagt; dies ist im Sinne der individualisierten Medizin. Eine akkurate Prognose der Reaktion eines Tumors auf die dargebotene Therapie kann bedeuten, dass nur vorher als effektiv getestete Medikamente zum

Einsatz kommen. Unwirksame Chemotherapeutika könnten vermieden, Toxizitäten vermindert und der Ausgang der Erkrankung günstig beeinflusst werden. Die Therapie wäre für den Patienten sicherer, verträglicher, und Kosten für unwirksame nebenwirkungsreiche Therapien würden eingespart.

Bei der erfolgreichen *Ex-vivo*-Testung von Proben solider Tumoren im klinischen Alltag sollte das Testverfahren bestimmte Kriterien erfüllen: es muss möglich sein, die Testung aussagekräftig anhand kleinster Biopsatmengen von maximal 100 mg und in einen engen Zeitrahmen vorzunehmen. Die prätherapeutische Evaluierung darf keinesfalls eine Verzögerung des Behandlungsstarts nach sich ziehen. Außerdem sollte die Durchführbarkeit des Testverfahrens möglichst praktikabel und eine hohe prädiktive Genauigkeit erzeugen (Dollner *et al.*, 2004). Es ist möglich, in Hinsicht auf die biologische Individualität eines jeden HNSCC, verschiedene potenzielle Behandlungsmethoden parallel an den entsprechenden Tumorproben zu testen, um die am meisten erfolgversprechende Therapieoption zu eruieren. Außerdem könnten Non-Responder auf Chemotherapie erkannt werden, um sie erfolgversprechenderen chirurgischen Verfahren zuzuführen.

1.5.1 Der koloniebildende Kurzzeit-Chemoresponsetest FLAVINO

An der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Leipzig wurde der FLAVINO-Assay (*short-time ex vivo colony-forming assay - flavin protecting conditions*) entwickelt und 2009 patentiert (US-Provisional Ser. No 61/044,082). Dieser Kurzzeit-Test erlaubt die Chemoresponse-Testung von Tumorproben unter Flavin-schützenden Bedingungen *ex vivo* anhand der Untersuchung der Koloniebildung und kann innerhalb von vier Tagen nach Probenentnahme fertiggestellt werden.

1.5.2 Flavin-induzierte photodynamische Degeneration

Riboflavine (Vitamin B₂) vermitteln photodynamische Reaktionen und führen zur Bildung von Sauerstoffradikalen (Dollner 1999). In Zellkulturmedien sind Flavine obligatorisch in unterschiedlichen, meist hohen Konzentrationen vorhanden und sind, im Gegensatz zu *in vivo* Situationen, sichtbaren Licht exponiert. Durch den Einfluss von Licht mit Wellenlängen <500 nm kommt es in Flavin-haltigen Medien zur Bildung zytotoxischer Sauerstoffradikale die zu Apoptose, DNA-Schädigung und zur Degradierung von Zytostatika mit einhergehenden Wirkverlust führen. Die Riboflavin-induzierte Photoreaktion bewirkt auch ohne Zytostatikaeinfluss Zellschädigungen bzw. -tod in Zellkulturen unter Standardbedingungen, sodass die große Varianz und schlechte Reproduzierbarkeit der

Ergebnisse in bisherigen Chemoresponsetests damit erklärt werden können. Die Unterdrückung der Flavin-induzierten Degeneration führte zur verbesserten Effizienz und Reproduzierbarkeit von Zellkulturexperimenten sowie zu einer geringeren Varianz der Ergebnisse (Granzow *et al.*, 1995; Dollner, 1999; Heuser *et al.*, 2005). Beim FLAVINO-Assay werden Flavin-induzierte photodynamische Artefakte vermieden durch die Verwendung ausschließlich monochromatischen Lichts einer Wellenlänge von 589 nm (emittiert von SOX-E-Natriumdampflampen, Phillips, Hamburg), Vermeidung von Phenolrot sowie der Reduzierung des Riboflavin-Gehalts im Zellkulturmedium.

Das FLAVINO-Testverfahren ermöglicht es anhand Tumorproben die geeignete Pharmakakombination und, zu einem gewissen Grad, die effektive Dosierung der einzelnen Komponenten zu klären. Des Weiteren trägt er zu einem besseren Verständnis der individuellen Tumorbiologie der einzelnen HNSCC bei, zumal die Effekte der chemotherapeutischen Substanzen als auch der *targeted therapy* bei den verschiedenen vorhandenen Zellarten (vor allem Stroma- und Epithelzellen) innerhalb eines HNSCC analysiert werden können (Horn *et al.*, 2010).

1.5.3 Ablauf des FLAVINO-Chemoresponsetests

Bei Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses des Patienten wird im Rahmen eines chirurgischen Eingriffes unter Allgemeinanästhesie eine Probe des HNSCC mit einer Masse von circa 100 mg entnommen. Unmittelbar danach wird die Probe in einem mit Tumormedium gefüllten Gefäß in das HNO-Forschungslabor transportiert. Das Flavin-reduzierte Tumormedium beinhaltet Antibiotika und Antimykotika um eine mikrobielle Verunreinigung des Biopsats zu unterbinden. Alle weiteren Arbeitsschritte finden unter Flavin-schützenden Bedingungen (Vermeidung von Wellenlängen mit $\lambda < 550$ nm) im HNO-Forschungslabor statt. Die Tumorprobe wird mechanisch zerkleinert und zur enzymatischen Aufspaltung dem Kollagenase-IV-Verdau zugeführt. Dieser Schritt verhindert die Isolierung von Zellen sowie die Aufhebung regulatorischer Signalflüsse und notwendiger Kommunikationswege zwischen Zellen des HNSCC, welche in der *in vivo* Situation vorhanden waren und in der *ex vivo* Situation ebenfalls gegeben sein sollten. Das Probenmaterial des HNSCC wird auf Zellkulturplatten ausgesät. Diese können zuvor mit Proteinen der Extrazellulärmatrix (zum Beispiel humanes Fibronectin, Kollagen, Laminin) beschichtet werden um das Wachstum der Kolonien auf den verschiedenen Matrixproteinen beurteilen zu können. Nach dreitägiger Kultivierung der Tumorproben unter Standardbedingungen (36,5°C, 3,5% CO₂, relative Luftfeuchtigkeit von 95%) werden die

Mikrotiterplatten in Hinsicht auf mikrobielle Kontamination untersucht und ggf. nachfolgend verworfen. Die Koloniebildung wird separat für maligne Epithelzellen und Stromazellen untersucht. Mittels Fluoreszenz-markierter Antikörper können unterschiedliche Zelltypen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht und die entsprechende Chemoresponse evaluiert werden. Dies hat den Vorteil, dass die korrekte Interpretation des Testergebnisses nicht durch Pseudoresistenz multiresistenter Stromazellen getäuscht wird. Die entstandenen Kulturüberstände können auf lösliche Faktoren, Biomarker und Zytokine, die eine Rolle in der Tumorbiologie spielen, mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auf deren Quantität untersucht werden. Der FLAVINO-Kurzzeittest ist validiert durch parallele Qualitätskontrollen: bei jedem zu testenden HNSCC werden simultan KB-Zellen unter den gleichen Bedingungen getestet. Es werden die identischen Zellkulturmedien, Zytostatikakonzentrationen und Kulturbedingungen genutzt, die auch für die getesteten Tumoren verwendet werden.

1.6 AUFGABENSTELLUNG UND NEUE ERKENNTNISSE

Es war wegen der präklinischen Untersuchungen von Cilengitide sowie Cilengitide und Cetuximab als auch den positiven klinischen Ergebnissen mit Cetuximab zu vermuten, dass die duale Hemmung des EGFR mit Cetuximab und simultan der Integrine $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ einen günstigen Effekt in der Therapie von HNSCC haben kann.

Wegen des in der ADVANTAGE-Studie fehlenden Überlebensvorteils durch zusätzliches Cilengitide wurde die Frage nach Ursachen des ausbleibenden therapeutischen Benefits aufgeworfen. Es wurde an der HNO-Universitätsklinik ein entsprechendes translationales Forschungsprojekt durchgeführt, in dem an Frau Dr. Daphne Schlegel und mich zwei im Zusammenhang stehende Promotionsthemen vergeben wurden.

In der Dissertation von Frau Dr. Daphne Schlegel lag der Schwerpunkt auf der Beeinflussung der Koloniebildung von HNSCC durch Cilengitide und Cetuximab mit Hauptaugenmerk auf der Auszählung der *ex vivo* gebildeten Kolonien epithelialer Tumorzellen zur Erfassung der Chemoresponse mittels Fluoreszenzmikroskopie (Schlegel, 2014). Mir war die Aufgabe gestellt, die Zytokinproduktion *ex vivo* mit Cilengitide \pm Cetuximab behandelte HNSCC zu untersuchen. Dementsprechend wurden mir mehrere Aufgaben gestellt:

1. Mitwirkung an der *Ex-vivo*-Chemoresponsetestung von HNSCC im FLAVINO-Assay.

2. Aufbau bzw. Etablieren geeigneter Methoden zur Untersuchung der Zytokinproduktion von im FLAVINO-Assay auf Koloniebildung geprüfter Tumorproben von HNSCC.
3. Messung der Zytokine IL-6, MCP-1 und VEGF in Kulturüberständen aus FLAVINO-Assays.
4. Ermittlung der Korrelation der Zytokinproduktion mit der Koloniebildung von HNSCC im FLAVINO.
5. Bestimmung des Interaktionsmechanismus von Cilengitide und Cetuximab (*mode of action*) in Kombination bezüglich der Wirksamkeit hinsichtlich der Suppression von Koloniebildung und Zytokinproduktion von HNSCC.

Die hier vorliegende Arbeit fasst die Ergebnisse der von mir innerhalb des oben genannten Projektes erhobenen Daten zusammen. Die Messung der Zytokinproduktion realisierte ich mittels indirekter Sandwich-ELISA zur spezifischen und hochsensitiven Messung von IL-6, MCP-1 und VEGF. Die Produktion dieser Zytokine erwies sich als geeignetes *Read-out* für den FLAVINO-Assay. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Effektivität von Cilengitide und Cetuximab und deren Kombination hinsichtlich Koloniebildung, insbesondere aber der Zytokinproduktion von HNSCC *ex vivo*. Ich konnte demonstrieren, dass die Bestimmung der Zytokinproduktion als Read-Out für den Chemoresponsetest FLAVINO der Auszählung der Koloniebildung überlegen ist.

2 PUBLIKATIONEN

Im Ergebnis des translationalen Projektes zur Untersuchung von Cilengitide allein und in Kombination mit Cetuximab und Chemotherapeutika wurden bisher drei wissenschaftliche Beiträge mit meiner Beteiligung publiziert. Zur Beeinflussung der Koloniebildung wurde 2013 in Nürnberg auf der 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde und Kopf- und Hals-Chirurgie ein Vortrag gehalten, dessen Abstract unter <http://dx.doi.org/10.3205/13hnod211> online verfügbar ist (siehe 2.1). Das zentrale Ergebnis meiner Arbeit ist die 2017 in *Anticancer Research* erschienene Publikation zur Interaktion von Cilengitide und Cetuximab hinsichtlich der gemeinsam verstärkten Suppression der Zytokinproduktion von HNSCC (siehe 2.2). In dieser Arbeit wurden die kombinatorischen Effekte von Cilengitide und Cetuximab bei 39 HNSCC im Kurzzeit-Chemoresponsetest FLAVINO *ex vivo* hinsichtlich ihres therapeutischen Potenzials geprüft. Es konnte die Effektivität von Cilengitide als Einzelsubstanz und in Zweierkombination mit Cetuximab bei Tumorproben von HNSCC *ex vivo* um das vorhandene antitumorale Potenzial von Cilengitide, aber auch eine große Heterogenität der HNSCC hinsichtlich der Wirksamkeit aufgezeigt werden. Wesentliche Inhalte des Manuskripts wurden als Beiträge zum 88. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde und Kopf- und Hals-Chirurgie 2017 in Erfurt akzeptiert und sind in Form eines Abstracts und eines elektronischen Posters online verfügbar (siehe 2.3).

2.1 ABSTRACT ZUM VORTRAG ZUR 84. JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR HALS-, NASEN-, OHRENHEILKUNDE UND KOPF- UND HALS-CHIRURGIE

Wichmann G, Schlegel D, **Cedra S**, Dietz A, Mozet C, Reiche A, Herrmann K, Weissheimer N, Boehm A. Cilengitide (EMD121974) suppresses tumor growth of head and neck squamous cell carcinoma *ex vivo*. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Nürnberg, 08.-12.05.2013.

Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2013. Doc13hnod211
<http://dx.doi.org/10.3205/13hnod211>,
<http://www.egms.de/static/en/meetings/hnod2013/13hnod211.shtml>

Cilengitide (EMD121974) Suppresses Tumor Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma *ex vivo*

Introduction: Cilengitide (Cil), an inhibitor of integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$, is under investigation in clinical trials in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). However, combinatory effects of Cil with Erbitux (E) on colony-formation (CF) of HNSCC on various extracellular matrix proteins were not investigated so far. Methods: Biopsies of HNSCC were collagenase-digested and seeded into microtiter-plates coated with either collagen (C), fibronectin (F) or laminin (L) and grown for 3 days in the presence of 10 μ M Cil \pm 66 μ g/ml E in the FLAVINO-assay. Ethanol-fixed epithelial cells were stained by Cy2-labeled anti-cytokeratin-antibodies and fluorescent colonies counted. Results: CF of HNSCC was highest on C followed by F and L. Suppressive effects of Cil on CF were ECM-dependent: On C, CF of 43 evaluable HNSCC was suppressed by Cil in 24 (55.8%), by E in 29 (67.4%), and by Cil+E in 35 (81.4%) cases. On F, CF was suppressed by Cil in 38 (86.4%), by E in 31 (70.4%), and by Cil+E in 37 (84.1%) of 44 evaluable HNSCC. CF on L was suppressed by Cil in 32 (82.0%), by E in 30 (76.9%), and by Cil+E in 33 (84.6%) of 39 evaluable HNSCC. While strength in suppression of CF by E was comparable on C, F and L (40.0%, 37.4%, and 35.5%), the median suppression by Cil and Cil+E differed remarkably and was lowest on C (23.1%; 50%) but higher on L (57.1%; 60.3%) and F (60.8%, and 70.0%) due to specific interference with ECM binding and CF. Conclusion: Cil demonstrated ECM-dependent suppressive effects on tumor growth and in particular CF. Since the FLAVINO-assay indicates higher efficacy of E in presence of Cil in a large number of HNSCC, our investigations raise a rationale to investigate the impact of both compounds on HNSCC further in clinical trials.

The study was supported by Merck.

2.2 PUBLIKATION BEI *ANTICANCER RESEARCH*

Wichmann, G.; **Cedra, S.**; Schlegel, D.; Kolb, M.; Wiegand, S.; Boehm, A. ; Hofer, M.; Dietz, A. (2017):

Cilengitide and Cetuximab Reduce Cytokine Production and Colony Formation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells *Ex Vivo*.

In: *Anticancer research* 37 (2), S. 521–527.

DOI: 10.21873/anticanres.11344.

Die Basis der Ergebnisse der folgenden Publikation bilden die von mir durchgeführten Zytokinmessungen von VEGF, MCP-1 und IL-6 von 39 HNSCC mittels ELISA sowie deren Beurteilung bezüglich Koloniebildung per Fluoreszenzmikroskopie bei der ich mitgewirkt habe. Die Auswertung und statistische Aufarbeitung der gewonnenen Daten erfolgte gemeinsam mit Herrn Dr. rer. nat. Wichmann. Die erste Version des Manuskripts inklusive der Tabelle und der Abbildungen wurden von mir erstellt und zusammen mit Herrn Dr. Wichmann bis zur Publikationsfähigkeit überarbeitet und in *Anticancer Research* publiziert (geteilte Erst-Autorenschaft mit Dr. Wichmann).

Cilengitide and Cetuximab Reduce Cytokine Production and Colony Formation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells *Ex Vivo*

GUNNAR WICHMANN^{1*}, SUSAN CEDRA^{1*}, DAPHNE SCHLEGEL², MARLEN KOLB¹,
SUSANNE WIEGAND¹, ANDREAS BOEHM¹, MATHIAS HOFER¹ and ANDREAS DIETZ¹

¹Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany;

²Department of Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Paracelsus Medical University Nuremberg Hospital South, Nuremberg, Germany

Abstract. Background/Aim: To analyze in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells *ex vivo* effects of combined targeting of the epidermal growth factor-receptor (EGFR) by cetuximab (E) plus $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins by cilengitide (Cil) on colony formation of epithelial cells (CF_{ec}) and release of pro-angiogenic and pro-inflammatory cytokines. Materials and Methods: Collagenase-IV digests of 43 histopathological confirmed HNSCC cases were seeded into laminin-coated 96-well plates containing E, Cil, or Cil+E in final concentrations of 66.7 $\mu\text{g/ml}$, 10 μM , and 10 μM +66.7 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Following the FLAVINO-assay protocol, supernatants were harvested after 3 days and adherent cells fixed in ethanol. Counting of CF_{ec} was facilitated by FITC-labeled pan-cytokeratin antibodies. Out of 43 HNSCC cases, 39 had adherent growth (mean $CF_{ec} \geq 4$ /well in triplicate controls). Cytokines in supernatants were measured using ELISA were interleukin 6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA). Results: CF_{ec} on laminin was significantly reduced by Cil, E, and Cil+E. Cytokine measurements revealed also significant suppression of MCP-1, IL-6 and VEGFA. The strongest suppression of CF_{ec} , MCP-1 and VEGFA release was exerted by Cil and E

combined. Efficacy of Cil+E exceeded those of the solely applied pharmaceuticals but failed regarding significant synergism of both treatments as E was unable to significantly boost the effects of Cil. In contrast, IL-6 release was significantly suppressed by E but not by Cil, while their combination strongly reduced it. Conclusion: Combined targeting of EGFR and integrins with E and Cil heightens their suppressive effects regarding CF_{ec} as well as release of pro-angiogenic and pro-inflammatory cytokines.

Tumors of the head and neck region, mostly head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), especially locally advanced and recurrent and/or metastatic HNSCC, are still related with poor outcome regarding 5-year survival time despite advancements in multimodal therapy strategies such as combined surgery with radio chemotherapy (1). Individual personalized therapy approaches need further investigation to overcome tumor heterogeneity and incalculable therapy response rates. Cytokines can potentially serve as biomarkers or even as new targets for therapy. This study focuses on monocyte chemoattractant protein (MCP-1), vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and interleukin 6 (IL-6) which are potentially important roles in tumor proliferation, vascularization and metastasis (2). Recent results showed that MCP-1 is of special interest since inhibition of MCP-1 may improve the power of standard cytotoxic substances against HNSCC and on the other hand, MCP-1 may act as agent in tumor defense (3). In 2005 it was shown that IL-6 levels in cancer patients' serum correlates with tumor stage and lymph node status suggesting an active role of IL-6 in tumor progression (4). High IL-6 expression is also associated with poor prognosis and cisplatin resistance in HNSCC and other cancers (5). Since HNSCC are highly vascularized, it makes sense to investigate therapeutic options to interfere with tumor angiogenesis. Proangiogenic VEGFA is overexpressed in HNSCC and associates with elevated aggressiveness of the

*These Authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Gunnar Wichmann, Ph.D., Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, University of Leipzig, Liebigstrasse 10-14, 04103 Leipzig, Germany. Tel: +49 3419721926, Fax: +49 3419721909, e-mail: gunnar.wichmann@medizin.uni-leipzig.de

Key Words: Head and neck cancer; head and neck squamous cell carcinoma, predictive assay, chemoresponse *ex vivo*, epidermal growth factor-receptor, cetuximab, cilengitide, integrin, targeted therapy.

tumor (6-9). Targeted therapy such as inhibiting epidermal growth factor receptor (EGFR) with monoclonal antibody E is already used in clinical routine treatments (10, 11). As the first approved EGFR inhibitor for treatment of HNSCC in 2006, E improves survival in curative treatment of advanced HNSCC (10, 12) but also in first-line treatment of recurrent and/or metastatic HNSCC when teamed up with cisplatin and 5-fluorouracil (5-FU) (13). Since EGFR upregulates VEGFA, a potential readout of the response of HNSCC to E may be VEGFA as reported in a number of studies (14-17). Other attractive targets are integrins as they are key players in tumor growth by binding to particular extracellular matrix (ECM) being crucial in cell communication, cell-to-cell and cell-to-ECM interaction, modulating signaling pathways important for cell growth, differentiation and survival (18). The RGD-peptide Cil is a selective inhibitor for $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins (18, 19). As both integrins are excessively expressed during vascularization, and $\alpha V\beta 5$ is overexpressed in various tumor entities including HNSCC, targeting these integrins by Cil is therefore promising (20). In phase I and II trial of Cil combined with E, cisplatin and 5-FU, no dose-limiting toxicities were found (13, 21) which makes treatment with Cil combinations even more attractive for further investigations concerning heterogeneity in *ex vivo* response of HNSCC. This work demonstrates the effects of Cil and E, alone and in combination on CF_{ec} and release of MCP-1, IL-6 and VEGFA by HNSCC.

Patients and Methods

Patient characteristics. HNSCC samples of 43 patients were included in this study. With patients' informed consent, biopsies of tumor tissue were obtained during surgery or panendoscopy. 39 histopathologically confirmed HNSCC patients of 34 males and 5 females (mean age at 60.3 years; Table I) could be analyzed regarding tumor cytokine production and colony formation after treating the specimens with or without Cil or E alone or in combination.

The primaries' localizations were mostly oropharynx (24/39; 61.5%), larynx and hypopharynx (12/39; 30.8%); three HNSCC were localized in the nasopharynx (1/39; 2.6%) and oral cavity (2/39; 5.1%).

Only 8/39 (21.5%) tumors were early stage (UICC I and II), while 31/39 (79.5%) cancers were locally advanced (7/39, 18.0%, UICC III; 24/39, 61.5%, UICC IV). 16/39 (41%) had no lymph node metastasis, while 23/39 (59.0%) had lymph node metastasis at first diagnosis (N1: 3/39, 7.7%; N2a: 1/39, 2.5%; N2b: 6/39, 15.4%; N2c: 12/39, 30.8%; N3: 1/39, 2.5%); two patients had distant metastasis (M1: 2/39, 5.1%). 8/39 (21.5%) patients were nonsmokers, 4/39 (10.3%) avoided alcohol. Only 2 patients had never consumed tobacco and alcohol; 1 patient denied information about these aspects (Table I).

FLAVINO-assay. The same procedures according the protocol of the FLAVINO assay were used as previously described (3). Briefly, freshly obtained tumor specimens were put into phenol red- and riboflavin-free medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (TM). After mechanical disintegration and digestion by

230 mU/ml collagenase IV (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) 10,000 viable HNSCC cells were added to wells in triplicates coated with human laminin (Roche, Germany) containing either 66.7 $\mu\text{g/ml}$ E, 10 μM Cil, Cil+E, or (for reference) medium alone, adjusting the total volume to 300 μL . According to the FLAVINO-assay protocol, supernatants were harvested after 3 days and adherent cells were ethanol-fixed. Counting of colonies of epithelial cells was facilitated by FITC-labeled pan-cytokeratin antibodies. 39 HNSCC had adherent growth (mean $CF_{ec} \geq 4$ /well in triplicate controls).

ELISA assay. The influence of Cil and E on the cytokine secretion by HNSCC was analyzed using ELISA. The levels of cytokines IL-6, MCP-1 and VEGFA in supernatants were measured using indirect sandwich ELISAs (OptEIA Kits; BD Biosciences, Heidelberg, Germany) following the manufacturers' instructions and using tetramethyl benzidine as substrate. The optical density of each well was determined measuring the optical density at $\lambda_1=450$ nm and $\lambda_2=620$ nm on the Synergy2™ multi-mode microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA); calibration curves were calculated using the Gen5 software (BioTek). The lower limit of detection for all cytokines was ≤ 4 pg/ml.

Statistical analysis. All data shown are based on triplicate measurements. Differences were compared by Student's *t*-test for paired samples using SPSS Statistics for Windows, version 20.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA); *p*-values ≤ 0.05 were regarded as significant.

Results

Colony formation by HNSCC and release of IL-6, MCP-1 and VEGFA demonstrated a huge amount of heterogeneity. In untreated controls no significant association were found with localization of the primary tumor, T category, N category, UICC stage, risk factors (pack years of tobacco smoking, daily alcohol consumption), sex and other patient characteristics regarding un-normalized readouts.

Treatments however, showed different effects on all analyzed parameters when using *t*-tests for paired samples compared to heteroscedastic *t*-tests for comparisons of measures normalized to individual controls. The effects of E, Cil, and Cil+E are shown in Figure 1 for CF_{ec} , IL-6, MCP-1, and VEGFA normalized to controls. Targeting EGFR and integrins is suppressing CF_{ec} and cytokine release but shows variable strength of effects on individual readouts and among HNSCC patients. This is demonstrated by the scatter plots of Table II showing the correlation of normalized data for CF_{ec} , IL-6, MCP-1 and VEGFA regarding the three treatments.

Cilengitide and cetuximab affect colony formation and cytokine production. In contrast to an earlier study with smaller sample size and slightly different experimental conditions regarding coating of cell-culture microtiter-plates (3), Cil suppressed significantly CF_{ec} on laminin ($p=0.0003$; Table II). However, also E ($p=0.004$) and Cil and E combined ($p=0.0003$) reduced CF_{ec} (Table II). IL-6 production was not significantly affected by Cil ($p=0.07$) and only slightly by E ($p=0.03$) alone but combining Cil and

Table I. Characteristics of HNSCC patients and treatment for 39 patients with cytokine measurements among the cohort of 43 patients with sufficient colony formation ($CF_{ec} \geq 4$ per well of untreated control in laminin-coated microtiter-plates) allowing for reliable response assessment.

Patient ID	Gender	Localization of primary	Age at diagnosis (years)	UICC stage	T	N	M	Therapy	Therapy monomodal vs. multimodal	Tobacco smoking (Pack Years)	Alcohol	Grading	Pn	V	L	R
1	M	oroph	57.9	III	2	1	0	Op+PORT	multi	45	≥ 60	3	0	0	1	0
2	M	larynx	59.5	III	3	0	0	Op+PORT	multi	0	0	2	0	0	0	0
3	M	hypo	57.9	IVA	3	2c	0	ICH+Op+RT	multi	40	<30	2	1	0	1	0
5	F	oroph	78.3	II	2	0	0	Op	mono	50	≥ 60	3	0	0	1	0
6	M	oroph	58.2	IVA	4a	2c	0	pRChT	multi	40	<60	3	--	--	--	--
7	M	larynx	69.7	III	3	0	0	Op	mono	--	--	2	0	0	0	0
8	M	oroph	48.9	II	2	0	0	Op+PORT	multi	40	<30	2	1	0	0	0
9	M	hypo	43.8	IVA	1	2a	0	Op+PORT	multi	30	≥ 60	2	0	0	0	0
10	M	oroph	63.2	IVA	1	2b	0	ICH+Op+RT	multi	0	<60	3	0	0	1	0
11	F	larynx	64.1	IVA	4a	2c	0	Op	mono	8	<30	2	0	0	1	1
12	M	hypo	73.2	IVA	4a	1	0	Op	mono	20	<30	2	--	--	--	--
13	M	oroph	66.3	II	2	0	0	Op	mono	40	<30	2	0	0	0	0
14	M	oroph	49.7	III	3	0	0	ICH+Op+RT	multi	45	≥ 60	2	1	0	1	--
15	M	hypo	56.6	IVC	4a	2c	1	pRChT	multi	--	<30	2	--	--	--	--
16	F	nasoph	50.8	IVA	4a	0	0	Op+PORChT	multi	0	<30	3	0	1	0	0
17	M	oral	77.3	II	2	0	0	Op+PORT	multi	80	<60	3	1	0	0	0
19	M	oroph	53.7	IVB	3	3	0	Op+PORT	multi	30	≥ 60	2	1	0	1	0
20	M	larynx	66.3	I	1	0	0	Op	mono	30	≥ 60	2	0	0	1	0
21	M	oroph	49.0	III	3	0	0	Op	mono	30	<30	3	0	0	1	0
22	M	hypo	49.3	IVC	4a	2c	1	pRChT	multi	45	≥ 60	3	--	--	--	--
24	M	oroph	59.2	III	3	1	0	Op	mono	0	<30	2	0	0	1	0
25	M	oroph	56.8	IVA	4a	2b	0	Op+PORChT	multi	40	<60	3	1	1	1	0
26	F	oroph	74.2	I	1	0	0	Op	mono	0	0	2	1	0	0	0
27	M	oroph	61.1	IVA	1	2c	0	Op+PORChT	multi	90	<60	3	0	0	1	0
28	F	larynx	50.4	IVA	3	2c	0	Op+PORChT	multi	40	--	2	0	1	1	0
29	M	oroph	58.7	IVA	3	2c	0	Op+PORT	multi	60	≥ 60	2	--	--	--	--
30	M	oroph	74.0	IVA	3	2b	0	Op+PORChT	multi	0	<30	2	1	1	1	0
32	M	oroph	56.0	IVA	4a	2c	0	Op	mono	40	<30	2	1	1	1	0
33	M	oroph	60.0	IVA	3	2b	0	Op	mono	0	<30	3	1	0	1	0
34	M	oroph	64.4	IVA	4a	0	0	Op+PORT	multi	0	<30	3	1	0	0	0
35	M	larynx	57.2	IVA	4a	2c	0	ICH+Op+RT	multi	80	≥ 60	3	0	0	1	0
36	M	oroph	70.3	IVA	4a	2c	0	Op+PORT	multi	50	0	2	0	0	1	0
37	M	oroph	51.1	IVA	3	2b	0	ICH+Op+RT	multi	30	<30	3	0	0	0	0
38	M	oroph	41.7	IVA	4a	2c	0	Op	mono	20	<60	3	0	1	1	0
39	M	oral	55.9	II	2	0	0	Op+PORT	multi	30	≥ 60	3	1	0	1	0
40	M	hypo	71.7	II	2	0	0	Op	mono	45	<60	2	0	0	0	0
41	M	oroph	83.1	III	3	0	0	Op	mono	60	0	--	--	--	--	1
42	M	oroph	65.5	IVA	4a	0	0	Op	mono	125	<60	2	1	0	1	0
43	M	oroph	48.2	IVA	3	2b	0	ICH+Op+RT	multi	35	≥ 60	2	0	1	1	0

F, Female; M, male; oroph, oropharynx; hypo, hypopharynx; oral, oral cavity; nasoph, nasopharynx; Op, surgery; RT, radiotherapy; ICh, induction-chemotherapy; PORT, post-operative radiotherapy; PORChT, post-operative radiochemotherapy; pRChT, primary concomitant radiochemotherapy.

E led to considerable suppression of IL-6 ($p=0.00024$). All treatments altered MCP-1 production significantly. Cil showed the strongest impact on MCP-1 production ($p=0.00008$) followed by Cil+E ($p=0.00038$) and E alone ($p=0.01$). While E alone was not able to achieve significant effects on VEGFA ($p=0.14$), Cil ($p=0.037$) or Cil+E ($p=0.03$) substantially suppressed VEGFA release.

As shown in Table II, this study proves that for chemoresponse assessment measuring cytokine production is

superior to colony formation. Readouts of CF_{ec} were more inconsistent than cytokine release in triplicate measurements although effects of Cil and E were considerable.

Discussion

By analyzing 39 HNSCC *ex vivo* we were able to demonstrate significant impact of EGFR and integrin inhibition on CF_{ec} and production of IL-6, MCP-1 and

VEGFA in the majority of HNSCC samples (Figure 1, Table II). However, the inter-individual heterogeneity calls for a more detailed analysis. As far as we are aware, there are no other studies regarding this specific topic. Our findings showed that 10 μ M Cil in HNSCC tumor cells *ex vivo*, may suppress production of MCP-1 and VEGFA as well as CF_{ec} significantly. We demonstrated that activity of Cil increased in binary combination with E. Reynolds et al. demonstrated in 2009 that low dose integrin inhibition can lead to altered expression of α v β 3 and VEGFR-2 resulting in tumor angiogenesis and proliferation (22). In our study, some individual tumor samples reacted paradoxically with an increase in VEGFA production and CF_{ec} suggesting dose dependency of Cil effects.

In the ADVANTAGE study, Cil was given as fourth component in addition to cisplatin, 5-FU and E to patients with recurrent and/or metastatic HNSCC (13). In this setting no benefit in overall survival could be demonstrated for Cil. This may be related to limited response in this heavily pre-treated population that might be exploited already by the three other drugs to its maximum extend. This is also strengthened by the CeFCiD study that was unable to demonstrate superiority of the fourth component in HNSCC using the otherwise highly active taxol docetaxel (23, 24). Therefore, ADVANTAGE which is the only clinical trial of Cil in HNSCC (13) appears to be inadequate to elucidate the full potential of Cil in HNSCC and may not stand against potential efficacy of Cil or Cil+E.

To our knowledge, there are so far no clinical trials in HNSCC analyzing solely Cil or Cil in binary combination together with one additional drug, *e.g.* E. As most newly emerging drugs are tested, the sole investigation of Cil combined with cisplatin, 5-FU and E may have limited the chance to demonstrate any benefit of the fourth component Cil. No dose limiting toxicities and only mild side effects of Cil were observed (13) and potential benefit from Cil is highlighted by our data. This argues for new clinical trials as there might still be potential for including this pentapeptide in targeted therapy of eligible patients. These patients, as suggested by our data (Figure 1, Table II), could eventually be identified by *ex vivo* testing.

EGFR targeting by E improves overall survival in HNSCC patients (10, 11). E treatment decreased considerably the release of IL-6, MCP-1, VEGFA and CF_{ec} in our *ex vivo* experiments. As IL-6, MCP-1 and VEGFA could serve prognostic biomarkers and increased levels of IL-6 (4), MCP-1 (3,25) and VEGFA (6-8,26,27) are associated with inflammation and poor outcome, we interpret their reduction towards normal levels as indicators for response. The high degree of correlation of reduced colony formation and reduced cytokine release of our samples supports this interpretation. Pathways of EGFR and VEGFA are closely linked since they share common downstream pathways effecting tumor cells

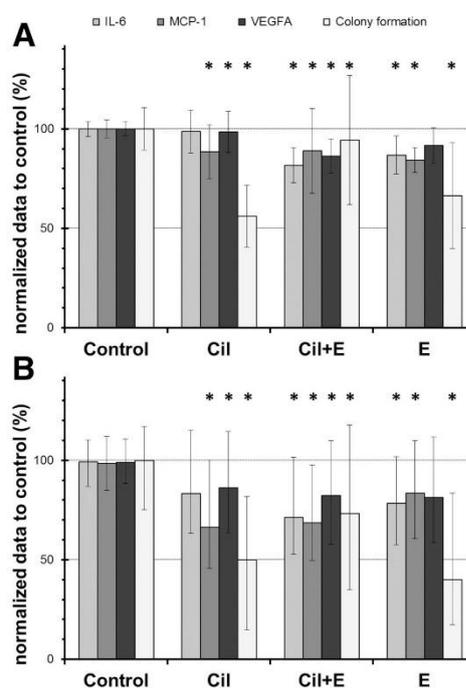


Figure 1. Effect of cilengitide (Cil), cetuximab (E) and Cil+E on production of IL-6, MCP-1, VEGFA and colony formation of epithelial cells (CF_{ec}) normalized to individual control. (A) Mean and 95% confidence interval; (B) median and interquartile range of 39 HNSCC. Asterisks indicate significance (p-value ≤ 0.05).

directly and indirectly (28). Overexpression of EGFR leads to increased VEGFA expression (14, 29). This study, showing that VEGFA release was reduced after EGFR targeting, highlights VEGFA as a suitable biomarker for response to E (14, 29, 30). Our measurements highlight the suppressing effect of EGRF blockage on VEGFA and IL-6 as well as on MCP-1 (Figure 1, Table II) solidifying the value of E in anticancer therapy regimes.

In this study, actual tumor samples – primary HNSCC without prolonged propagation by cultivation under artificial conditions leading to loss of normal features and chemoresistance – were exposed to anticancer agents *ex vivo*. We did not use cell lines in order to provide most biologically appropriate conditions bypassing common problems with cell lines as they are highly selected and sometimes artificially immortalized hindering transfer of

Table II. Correlation obtained in 39 evaluable patients by analyzing formation of epithelial colonies (CF_{ec}; A), IL-6 (B), MCP-1 (C), and VEGFA (D) with their response to cilengitide (Cil), cetuximab (E), and Cil+E. The probability R², Pearson's correlation coefficient r and p-values for the number of pair-wise comparisons are shown accompanied by scatter plots showing the distribution of source data. Correlations with p-value ≤0.05 were considered as significant and highlighted in bold.

A		CF _{ec} Cil+E (n)	CF _{ec} E (n)	CF _{ec} Cil (n)	CF _{ec} ctrl (n)
CF _{ec} ctrl (n)	R ²	0.224	0.599	0.300	
	r	0.473	0.774	0.548	
	p	0.0003	0.0042	0.0003	
CF _{ec} Cil (n)	R ²	0.300	0.260		
	r	0.548	0.510		
	p	0.209	0.0013		
CF _{ec} E (n)	R ²	0.298			
	r	0.546			
	p	0.0018			
CF _{ec} Cil+E (n)	R ²				
	r				
	p				

B		IL-6 Cil+E (pg/ml)	IL-6 E (pg/ml)	IL-6 Cil (pg/ml)	IL-6 ctrl (pg/ml)
IL-6 ctrl (pg/ml)	R ²	0.531	0.675	0.528	
	r	0.729	0.822	0.727	
	p	0.0002	0.0301	0.0714	
IL-6 Cil (pg/ml)	R ²	0.609	0.593		
	r	0.780	0.770		
	p	0.0148	0.8623		
IL-6 E (pg/ml)	R ²	0.780			
	r	0.883			
	p	0.0034			
IL-6 Cil+E (pg/ml)	R ²				
	r				
	p				

C		MCP-1 Cil+E (pg/ml)	MCP-1 E (pg/ml)	MCP-1 Cil (pg/ml)	MCP-1 ctrl (pg/ml)
MCP-1 ctrl (pg/ml)	R ²	0.611	0.811	0.575	
	r	0.782	0.901	0.758	
	p	0.0004	0.0112	0.0001	
MCP-1 Cil (pg/ml)	R ²	0.410	0.572		
	r	0.640	0.756		
	p	0.6194	0.0023		
MCP-1 E (pg/ml)	R ²	0.652			
	r	0.807			
	p	0.0479			
MCP-1 Cil+E (pg/ml)	R ²				
	r				
	p				

D		VEGFA Cil+E (pg/ml)	VEGFA E (pg/ml)	VEGFA Cil (pg/ml)	VEGFA ctrl (pg/ml)
VEGFA ctrl (pg/ml)	R ²	0.646	0.802	0.772	
	r	0.804	0.896	0.879	
	p	0.0329	0.1416	0.0368	
VEGFA Cil (pg/ml)	R ²	0.605	0.718		
	r	0.778	0.847		
	p	0.5492	0.1017		
VEGFA E (pg/ml)	R ²	0.723			
	r	0.850			
	p	0.0783			
VEGFA Cil+E (pg/ml)	R ²				
	r				
	p				

such data to treatment of individual tumors. We saw real-world heterogeneity in response to treatment as individual tumors responded differently to the same treatment. The impact of Cil and E varied enormously depending on distinct tumor features. This aspect suggests the presence of subgroups within HNSCC patients of which some react with suppressed cytokine production to treatment and some which react with a boost of cytokine release.

Targeting $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ integrins by Cil and EGFR by E leads to reduced CF_{ec} and cytokine release proving that Cil does have a potential in cancer treatment. Analyzing cytokine release is superior to counting epithelial cell colonies concerning chemoresponse testing in order to select suitable patients which could benefit from targeted therapy.

Acknowledgements

The Authors would like to thank all patients and their families for participation in this study.

References

- Pulte D and Brenner H: Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist* 15(9): 994-1001, 2010.
- Pries R and Wollenberg B: Cytokines in head and neck cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(3): 141-146, 2006.
- Wichmann G, Körner C, Boehm A, Mozet C and Dietz A: Stimulation by monocyte chemoattractant protein-1 modulates the *ex vivo* colony formation by head and neck squamous cell carcinoma cells. *Anticancer Res* 35(7): 3917-3924, 2015.
- Riedel F, Zaiss I, Herzog D, Götte K, Naim R and Hörmann K: Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 25(4): 2761-2765, 2005.
- Gao J, Zhao S and Halstensen TS: Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 35(6): 3265-3274, 2016.
- Kyzas PA, Cunha IW and Ioannidis JP: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 11(4): 1434-1440, 2005.
- Riedel F, Götte K, Schwalb J, Wirtz H, Bergler W and Hörmann K: Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257(6): 332-336, 2000.
- Vassilakopoulou M, Psyrris A and Argiris A: Targeting angiogenesis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 51(5): 409-415, 2015.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS and Ferrara N: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* 362(6423): 841-844, 1993.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK and Ang KK: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354(6): 567-578, 2006.
- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N and Hitt R: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359(11): 1116-1127, 2008.
- Dietz A, Boehm A, Mozet C, Wichmann G and Giannis A: Current aspects of targeted therapy in head and neck tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 265(Suppl 1): 3-12, 2008.
- Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J, Mesia R, Remenar E, Gauler TC, Keilholz U, Delord JP, Schafhausen P, Erfan J, Brümmendorf TH, Iglesias L, Bethe U, Hicking C and Clement PM: Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann Oncol* 25(3): 682-688, 2008.
- O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Modjtahedi H and Eccles SA: Vascular endothelial growth factor family members are differentially regulated by c-erbB signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis* 18(2): 155-161, 2000.
- Jouan-Hureau V, Boura C, Merlin JL and Faivre B: Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab. *Microvasc Res* 83(2): 131-137, 2011.
- Moehler M, Frings C, Mueller A, Gockel I, Schimanski CC, Biesterfeld S, Galle PR and Holtmann MH: VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. *World J Gastroenterol* 14(26): 4156-4167, 2008.
- Vincenzi B, Santini D, Russo A, Gavasci M, Battistoni F, Dicuonzo G, Rocci L, Rosaria VM, Gebbia N and Tonini G: Circulating VEGF reduction, response and outcome in advanced colorectal cancer patients treated with cetuximab plus irinotecan. *Pharmacogenomics* 8(4): 319-327, 2007.
- Goodman SL, Hölzemann G, Sulyok GA and Kessler H: Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins. *J Med Chem* 45(5): 1045-1051, 2002.
- Mas-Moruno C, Rechenmacher F and Kessler H: Cilengitide: The first anti-angiogenic small molecule drug candidate. design, synthesis and clinical evaluation. *anti-cancer agents in medicinal chemistry* 10: 753-768, 2010.
- Rüegg C, Dormond O and Mariotti A: Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1654(1): 51-67, 2004.
- Vermorken JB, Guigay J, Mesia R, Trigo JM, Keilholz U, Kerber A, Bethe U, Picard M and Brummendorf TH: Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck: findings of the phase I part. *Br J Cancer* 104(11): 1691-1696, 2011.
- Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD, Da Violante G, Gourlaouen M, Salih M, Jones MC, Jones DT, Saunders G, Kostourou V, Perron-Sierra F, Norman JC, Tucker GC, Hodivala-Dilke KM: Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med* 15(4): 392-400, 2009.

- 23 Knoedler M, Gauler T, Dietz A, Grünwald V, Stoehlmacher-Williams J, Knipping S, Schroeder M, Guntinas-Lichius O, Frickhofen N, Lindemann H, Fietkau R, Haxel B, Junghanß C, Maschmeyer G, Zipfel M, Martus P and Keilholz U: Cetuximab (c), fluorouracil (F) and cisplatin (P) alone or with docetaxel (D) for recurrent/metastatic (RM) head and neck cancer (HNSCC). Final analysis of AIO trial # 1108 - CeFCiD. *Ann Oncol* 25(suppl 4): iv340 doi:10.1093/annonc/mdu340.2, 2014.
- 24 Knoedler M, Gauler TC, Gruenwald V, Matzdorff A, Schroeder M, Dietz A, Jordan WO, Arnold D, Hennemann B, Hofele C, Weissinger F, Eberhardt W and Keilholz U: Phase II study of cetuximab in combination with docetaxel in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck after platinum-containing therapy: a multicenter study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *Oncology* 84(5): 284-289, 2013.
- 25 Wang H, Zhang Q, Kong H, Zeng Y, Hao M, Yu T, Peng J, Xu Z, Chen J and Shi H: Monocyte chemotactic protein-1 expression as a prognostic biomarker in patients with solid tumor: a meta analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 7(7): 3876-3886, 2014.
- 26 Chung TK, Warram J, Day KE, Hartman Y and Rosenthal EL: Time-dependent pretreatment with bevacuzimab increases tumor specific uptake of cetuximab in preclinical oral cavity cancer studies. *Cancer Biol Ther* 16(5): 790-798, 2015.
- 27 Carmeliet P: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69(Suppl 3): 4-10, 2005.
- 28 Herbst RS, Johnson DH and Mininberg E: Phase I/II trial evaluating the antivasculer endothelial growth factor monoclonal antibody bevacizumab in combination with the HER-1/epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib for patients with recurrent non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 2544-2555, 2005.
- 29 Larsen AK, Ouaret D, El Ouadrani K and Petitprez A: Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. *Pharmacol Ther* 131(1): 80-90, 2011.
- 30 Tabernero J: The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res* 5(3): 203-220, 2007.

Received November 23, 2016
Revised December 22, 2016
Accepted December 28, 2016

2.3 ABSTRACT ZUM BEITRAG ZUR 88. JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR HALS-, NASEN-, OHRENHEILKUNDE UND KOPF- UND HALS-CHIRURGIE

Cilengitide und Cetuximab vermindern Koloniebildung und Zytokinproduktion von Plattenepithelkarzinomen im FLAVINO-Assay

Susan Cedra, Marlen Kolb, Susanne Wiegand, Andreas Dietz, Andreas Boehm, Mathias Hofer, Gunnar Wichmann

HNO-Universitätsklinik Leipzig, Liebigstr. 10-14, 04103 Leipzig

Einleitung: Die zielgerichtete Therapie von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) durch simultanes *Targeting* von EGFR (*epidermal growth factor receptor*) mit Cetuximab (E) und $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen mit Cilengitide (Cil) könnte wegen dessen geringen Nebenwirkungen attraktiv sein. Wir analysierten die Koloniebildung epithelialer Zellen (CF_{ec}) und die Produktion pro-angiogener und pro-inflammatorischer Zytokine im Kurzzeit-Chemoresponsetest (FLAVINO). **Methoden:** Kollagenase-IV-verdaute Proben von 43 histopathologisch gesicherter HNSCC wurden in Laminin-beschichtete 96-well-Platten eingesät, die in Triplikaten E, Cil oder CilE in Endkonzentrationen von 66,7 µg/ml, 10 µM, und 66,7 µg/ml+10 µM enthielten. Kulturüberstände (KÜS) wurden nach 3 Tagen entnommen und adhärente Zellen Ethanol-fixiert. 39 HNSCC hatten CF_{ec}≥4/well. Interleukin 6 (IL-6), MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor A*) in KÜS wurden mit ELISA quantifiziert. **Ergebnisse:** CF_{ec} auf Laminin wurde durch Cil, E und CilE signifikant unterdrückt. Die Produktion von MCP-1, IL-6 und VEGF wurde ebenfalls vermindert. CilE bewirkte die stärkste Suppression von CF_{ec}, MCP-1 und VEGF. Die Wirksamkeit von CilE überstieg dabei diejenige von E oder Cil allein. Der überwiegend additiv gesteigerte aber bei manchen HNSCC ausbleibende Effekt zeigt starke Heterogenität in der Response verschiedener HNSCC auf. Die IL-6-Freisetzung wurde durch E und verstärkt durch CilE, aber nicht durch Cil allein signifikant supprimiert. **Schlussfolgerung:** Kombiniertes *Targeting* von EGFR und Integrinen mit CilE erhöht die suppressiven Effekte auf CF_{ec} und pro-angiogene und pro-inflammatorische Zytokine, welche potentielle Bedeutung als Biomarker für Response erlangen.

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med. an der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Cilengitide und Cetuximab in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC): Zytokinproduktion von HNSCC im *Ex-vivo*-Chemoresponsetest FLAVINO als Indikator heterogenen Therapieansprechens

eingereicht von Susan Cedra

angefertigt am Universitätsklinikum Leipzig - Anstalt öffentlichen Rechts

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde/Plastische Chirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Dietz

betreut von: Prof. Dr. med. Andreas Dietz
Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann

Eingereicht im Mai 2017

Im Rahmen der andauernden Forschung nach neuen Therapieoptionen in der Behandlung von fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) wurden verschiedene Angriffspunkte auf Tumorzellebene, unter anderem Integrine und der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EFGR), als lohnenswert in Betracht gezogen.

Integrine sind multifunktionale Transmembranproteine. Ihr Beitrag an vielen biologischen als auch malignen Prozessen, wie Tumorangiogenese und Metastasierung, erfolgt über die Bereitstellung von Kommunikationskontakten und der Vermittlung von Kommunikationssignalen zwischen einzelnen Zellen und zwischen Zellen mit der umgebenden Extrazellulärmatrix. Viele Studien konnten eine Überexpression verschiedener Integrine auf soliden Tumoren feststellen; vor allem das Integrin $\alpha_v\beta_3$ wurde als potenzieller Biomarker für Tumorangiogenese identifiziert. Für die selektive Integrin-Inhibition entwickelte Dr. Simon Goodman das N-methylierte zyklische Pentapeptid Cilengitide,

welches anhand integrierter RGD-Erkennungssequenz von den Integrinen $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ spezifisch gebunden wird und diese zuverlässig hemmt.

Der membranständige EGFR ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase mit Einfluss auf die Apoptose, Zellproliferation, -migration, -differenzierung sowie auf die Angiogenese und Metastasierung epithelialer Tumoren. Bei >90% aller HNSCC ist der EGFR überexprimiert und assoziiert mit einem gesteigerten Metastasierungspotenzial, höhergradigen Erkrankungsstadium sowie Resistenzen gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung. Zur gezielten Inhibition des EGFR wurde der monoklonale IgG1-Antikörper Cetuximab entwickelt und im Jahr 2006 als erste Substanz für die *targeted therapy* bei Kopf-Hals-Tumoren von der *Federal Drug Association* (FDA) zugelassen.

Antitumorale Effekte ohne dosislimitierende Toxizitäten sind für Cilengitide präklinisch belegt. Der Integrin-Inhibitor ist zudem durch ein mildes Nebenwirkungsprofil gekennzeichnet. In klinischen Phase-III-Studien aus dem Jahr 2014 wurde Cilengitide bei Patienten mit Glioblastoma multiforme als zusätzlicher Wirkstoff zur Radiochemotherapie mit Temozolomid (CENTRIC EORTC Studie; Stupp *et al.*, 2014) und bei Patienten mit fortgeschrittenen HNSCC zusätzlich zu Cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU) und Cetuximab (ADVANTAGE Studie, Vermorken *et al.*, 2014) eingesetzt. Auf Grund unzureichender Verbesserung des Überlebens in beiden Studien wurde die Empfehlung ausgesprochen, Cilengitide nicht weiter als Substanz in der Krebstherapie zu untersuchen. Der fehlende Überlebensvorteil durch Cilengitide in der ADVANTAGE-Studie mag unter anderem darin begründet sein, dass der Einsatz des Integrin-Inhibitors an stark vorbehandelten Patienten als vierte Substanz zusätzlich zu Cisplatin, 5-FU und Cetuximab untersucht wurde. Die CeFCiD Studie von Knoedler *et al.* konnte ebenfalls keine Überlegenheit bezüglich des Überlebens unter Hinzunahme einer vierten Komponente (in CeFCiD: Docetaxel, T) demonstrieren, obwohl sich Docetaxel als hocheffektiv in der Behandlung von HNSCC erwiesen hatte, dies aber als Monotherapie und insbesondere in Zweifach (TP)- oder Dreifach-Kombination (TPF) (Knoedler *et al.*, 2013; 2014). Angesichts dieser Erkenntnisse scheint in der ADVANTAGE-Studie der Entfaltung des vollen Potenzials von Cilengitide nur ungenügend Raum gegeben worden zu sein.

Ein Aspekt für das scheinbare Versagen von Cilengitide bei Patienten mit Glioblastoma multiforme kann in einer ungünstig niedrigen Dosierung und der kurzen Halbwertszeit des Pentapeptids begründet liegen (Tucci *et al.*, 2014). Cilengitide wurde in der CENTRIC-Studie nur jeweils zweimal wöchentlich in einer mittelhohen Dosierung von 2000 mg per Infusion

verabreicht, obwohl in präklinischen Untersuchungen die anti-angiogenen Effekte erst bei höheren Dosierungen demonstriert worden waren. Beide Aspekte sind Hinweise auf ein noch nicht ausreichendes Prüfverfahren über die klinische Wirksamkeit von Cilengitide. Es liegt mit meinen Untersuchungsergebnissen aber ein neuer Hinweis auf die Eignung von Cilengitide in binärer und ternärer Kombination zur Therapie zumindest einer Subgruppe von HNSCC vor.

Der klinische Einsatz des EGFR-Inhibitors Cetuximab konnte mit signifikant verbesserten Überlebensraten und sicherer Tumorkontrolle überzeugen (Bonner *et al.*, 2006; Vermorken *et al.*, 2008). Leider ist die Therapie mit Cetuximab nur für einen kleinen Anteil der Patienten gewinnbringend, und dies trotz mehrheitlicher EGFR-Überexpression bei HNSCC. Folglich ist die Etablierung einer prätherapeutischen Testung einer Tumorbiopsie des zu behandelnden Patienten hinsichtlich seiner Response auf Cetuximab, zum Beispiel im FLAVINO-Kurzzeit-Chemoresponsetest, erstrebenswert.

Trotz anfänglich guten Therapieansprechens wurde bei einer Vielzahl von Patienten die Resistenzentstehung gegenüber Cetuximab festgestellt. Die Signalwege des EGFR sind eng mit denen von IL-6 und VEGF vernetzt, sodass deren wechselseitigen Beziehungen in der Entwicklung antitumorale Therapien nicht ignoriert werden sollten. Möglicherweise ist die Kombination verschiedener zielgerichteter Therapeutika geeignet, stärkere antitumorale Effekte zu bewirken und Resistenzentwicklungen entgegenzutreten. Vor allem Cilengitide als Integrin-Inhibitor, besonders wegen seines milden Nebenwirkungsprofils, und Cetuximab, auf Grund seiner berechtigten Etablierung in der klinischen Routine und wegen seiner VEGF-Produktion supprimierenden Wirkung, sind als Kombinationspartner für die kombinierte zielgerichtete Therapie attraktiv.

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich die Effektivität von Cilengitide als Einzelsubstanz und in Binärkombination mit Cetuximab im *Ex-vivo*-FLAVINO-Kurzzeit-Chemoresponsetest bei Tumorproben von HNSCC hinsichtlich der Effekte auf die Produktion pro-angiogener und pro-inflammatorischer Zytokine. Aus den Kulturüberständen von 39 HNSCC mit positiver Koloniebildung im FLAVINO-Assay bestimmte ich mittels indirekter Sandwich-ELISA die Konzentrationen von VEGF, IL-6 und MCP-1. Ähnlich wie in den Untersuchungen zur Koloniebildung, konnten Cilengitide und Cetuximab sowohl einzeln als auch in Kombination ebenfalls die Produktion von VEGF, IL-6 und MCP-1 unterdrücken. Die Wirksamkeit der simultanen Exposition gegenüber Cilengitide und Cetuximab überstieg dabei diejenige von Cilengitide oder Cetuximab allein, was belegt, dass kombinierte zielgerichtete Therapien mit

beiden Therapeutika einen größeren Gewinn als deren singulärer Einsatz erzeugen können. Der überwiegend additiv gesteigerte, aber bei manchen HNSCC ausbleibende Effekt zeigt starke Heterogenität in der Response verschiedener HNSCC auf. Dieser Fakt unterstreicht den Bedarf an geeigneten Testverfahren zur Beurteilung jedes einzelnen Tumors hinsichtlich seiner Chemoresponse.

Prätherapeutische *Ex-vivo*-Tests beurteilen die Reaktion eines individuellen Tumors auf Therapeutika und Substanzkombinationen und ermöglichen ein besseres Verständnis über die biologischen Merkmale eines Tumors. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation *in vivo* wird jedoch oftmals wegen der höheren Komplexität und *ex vivo* kaum oder grundsätzlich nicht reproduzierbaren Situation im lebenden Gesamtorganismus oftmals bestritten, da die Einflüsse des Stoffwechsels inklusive Pharmakokinetik und -dynamik, der Exkretion, Beeinflussungen des Kreislaufs und des Immunsystems nur unzureichend berücksichtigt werden können und folglich die Testung unter (artifizialen) Laborbedingungen abläuft. Die gewonnenen Erkenntnisse sind jedoch gerade deshalb, weil sie monokausale Einflüsse zu untersuchen gestatten, nützlich für die weitere Therapieentscheidung (Wichmann *et al.*, 2011; Wichmann *et al.*, 2011; Wichmann *et al.*, 2016).

Der patentierte FLAVINO-Kurzzeit-Chemoresponsestest ist ein validiertes Verfahren zur prätherapeutischen Beurteilung des Therapieansprechens von bioptisch gewonnenen Tumorproben von HNSCC *ex vivo* (Wichmann *et al.*, 2016). Die von mir erhobenen Daten beweisen, dass die Bestimmung der Zytokinproduktion als Read-Out für den Chemoresponsestest FLAVINO der Auszählung der Koloniebildung mittels Fluoreszenzmikroskopie überlegen ist. Die untersuchten Zytokine IL-6, VEGF und MCP-1 gewinnen an Bedeutung als Biomarker für Response bei HNSCC. Zudem war es mir möglich, einen neuen Hinweis auf die Wirksamkeit von Cilengitide zu demonstrieren, sodass Cilengitide durchaus einen Platz in der weiterführenden Forschung über *targeted therapy* bei HNSCC verdient.

Aktuell sind Dr. Wichmann und ich eingeladen, unter Würdigung unserer eigenen Ergebnisse und vorhandener wissenschaftlicher Literatur einen kritischen Review zur Wirksamkeit von *Integrin-Targeting* bei HNSCC für die Fachzeitschrift *Cancers* zu erstellen. Das Erscheinen dieser Open-Access-Publikation ist für Ende des Jahres 2017 vorgesehen.

4 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdollahi, A.; Griggs, D. W.; Zieher, H.; Roth, A.; Lipson, K. E.; Saffrich, R. et al. (2005): Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (17), S. 6270–6279.
- Alghisi, G. C.; Ponsonnet, L.; Ruegg, C. (2009): The integrin antagonist cilengitide activates alphaVbeta3, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells. In: *PLoS one* 4 (2), e4449.
- Alroy, I.; Yarden, Y. (1997): The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis. Signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. In: *FEBS letters* 410 (1), S. 83–86.
- Argiris, A.; Lee, S. C.; Feinstein, T.; Thomas, S.; Branstetter, BF. [4th.]; Seethala, R. et al. (2011): Serum biomarkers as potential predictors of antitumor activity of cetuximab-containing therapy for locally advanced head and neck cancer. In: *Oral oncology* 47 (10), S. 961–966.
- Belbin, T. J.; Singh, B.; Barber, I.; Socci, N.; Wenig, B.; Smith, R. et al. (2002): Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. In: *Cancer research* 62 (4), S. 1184–1190.
- Belbin, T. J.; Singh, B.; Smith, R. V.; Socci, N. D.; Wreesmann, Vt B.; Sanchez-Carbayo, M. et al. (2005): Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. In: *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 131 (1), S. 10–18.
- Bissery, M. C.; Nohynek, G.; Sanderink, G. J.; Lavelle, F. (1995a): Docetaxel (Taxotere). A review of preclinical and clinical experience. Part I: Preclinical experience. In: *Anti-cancer drugs* 6 (3), 339-55, 363-8.
- Bissery, M. C.; Vrignaud, P.; Lavelle, F. (1995b): Preclinical profile of docetaxel (taxotere). Efficacy as a single agent and in combination. In: *Seminars in oncology* 22 (6 Suppl 13), S. 3–16.
- Bonner, J. A.; Harari, P. M.; Giralt, J.; Azarnia, N.; Shin, D. M.; Cohen, R. B. et al. (2006): Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. In: *The New England journal of medicine* 354 (6), S. 567–578.
- Bonner, J. A.; Harari, P. M.; Giralt, J.; Cohen, R. B.; Jones, C. U.; Sur, R. K. et al. (2010): Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer. 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. In: *The Lancet Oncology* 11 (1), S. 21–28.
- Bou-Assaly, W.; Mukherji, S. (2010): Cetuximab (erbitux). In: *AJNR. American journal of neuroradiology* 31 (4), S. 626–627.
- Brand, T. M.; Iida, M.; Wheeler, D. L. (2011): Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. In: *Cancer biology & therapy* 11 (9), S. 777–792.
- Brooks, P. C.; Clark, R. A.; Cheresch, D. A. (1994): Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5158), S. 569–571.
- Buerkle, M. A.; Pahernik, S. A.; Sutter, A.; Jonczyk, A.; Messmer, K.; Dellian, M. (2002): Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. In: *British journal of cancer* 86 (5), S. 788–795.
- Burke, P. A.; DeNardo, S. J.; Miers, L. A.; Lamborn, K. R.; Matzku, S.; DeNardo, G. L. (2002): Cilengitide targeting of alpha(v)beta(3) integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. In: *Cancer research* 62 (15), S. 4263–4272.
- Burtness, B.; Goldwasser, M. A.; Flood, W.; Mattar, B.; Forastiere, A. A. (2005): Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer. An Eastern Cooperative Oncology Group study. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (34), S. 8646–8654.
- Byers, L. A.; Holsinger, F. C.; Kies, M. S.; William, W. N.; El-Naggar, A. K.; Lee, J. J. et al. (2010): Serum signature of hypoxia-regulated factors is associated with progression after induction therapy in head and neck squamous cell cancer. In: *Molecular cancer therapeutics* 9 (6), S. 1755–1763.

- Campbell, N. E.; Kellenberger, L.; Greenaway, J.; Moorehead, R. A.; Linnerth-Petrik, N. M.; Petrik, J. (2010): Extracellular matrix proteins and tumor angiogenesis. In: *Journal of oncology* 2010, S. 586905.
- Chen, C-C; Chen, W-C; Lu, C-H; Wang, W-H; Lin, P-Y; Lee, K-D; Chen, M-F (2010): Significance of interleukin-6 signaling in the resistance of pharyngeal cancer to irradiation and the epidermal growth factor receptor inhibitor. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76 (4), S. 1214–1224.
- Chen, Z.; Malhotra, P. S.; Thomas, G. R.; Ondrey, F. G.; Duffey, D. C.; Smith, C. W. et al. (1999): Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 5 (6), S. 1369–1379.
- Chung, A. S.; Ferrara, N. (2010): The Extracellular Matrix & Angiogenesis: Role of the Extracellular Matrix in Developing Vessels and Tumor Angiogenesis. In: *Pathways Magazine* (11). Online verfügbar unter <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pathways11/extracellular-matrix-and-angiogenesis.php>.
- Chung, C. H.; Parker, J. S.; Ely, K.; Carter, J.; Yi, Y.; Murphy, B. A. et al. (2006): Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. In: *Cancer research* 66 (16), S. 8210–8218.
- Chung, C. H.; Parker, J. S.; Karaca, G.; Wu, J.; Funkhouser, W. K.; Moore, D. et al. (2004): Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. In: *Cancer cell* 5 (5), S. 489–500.
- Chung, K. Y.; Shia, J.; Kemeny, N. E.; Shah, M.; Schwartz, G. K.; Tse, A. et al. (2005): Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (9), S. 1803–1810.
- Chung, T. K.; Warram, J.; Day, K. E.; Hartman, Y.; Rosenthal, E. L. (2015): Time-dependent pretreatment with bevacuzimab increases tumor specific uptake of cetuximab in preclinical oral cavity cancer studies. In: *Cancer biology & therapy* 16 (5), S. 790–798.
- Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Matha, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A. et al. (1999): N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(V)beta(3) integrin antagonists. In: *Journal of medicinal chemistry* 42 (16), S. 3033–3040.
- Deshmane, S. L.; Kremlev, S.; Amini, S.; Sawaya, B. E. (2009): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). An overview. In: *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 29 (6), S. 313–326.
- Dietz, A. (2009): Fortschritte in der Therapie bei Kopf-Hals-Tumoren. Aspekte der Chirurgie bei Kopf-Hals-Tumoren. In: *Onkologisch*, S. 4–6.
- Dietz, A.; Boehm, A.; Mozet, C.; Wichmann, G.; Giannis, A. (2008): Current aspects of targeted therapy in head and neck tumors. In: *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 265 Suppl 1, S3-12.
- Dietz, A.; Wichmann, G. (2011): Head and neck cancer. Effective prevention in youth and predictive diagnostics for personalised treatment strategies according to biological differences. In: *The EPMA journal* 2 (2), S. 241–249.
- Dietzsch, S.; Kortmann, R-D (2009): Fortschritte in der Therapie bei Kopf-Hals-Tumoren. Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren. In: *Onkologisch*, S. 7–9.
- Dollner, R. (1999): Chaotropismus und Prävention flavinvermittelter Photoreaktionen bei Zellkulturexperimenten. Kurzfassung einer medizinischen Dissertation. Universität Heidelberg, Heidelberg. Medizinische Fakultät Heidelberg. Online verfügbar unter <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/80>.
- Dollner, R.; Granzow, C.; Werner, J. A.; Dietz, A. (2004): Is there a role for chemosensitivity tests in head and neck cancer? In: *Onkologie* 27 (3), S. 310–315.
- D'Souza, G.; Kreimer, A. R.; Viscidi, R.; Pawlita, M.; Fakhry, C.; Koch, W. M. et al. (2007): Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. In: *The New England journal of medicine* 356 (19), S. 1944–1956.

- Ferrara, N. (1993): Vascular endothelial growth factor. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* 3 (6), S. 244–250.
- Ferrara, N. (1999): Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. In: *Kidney international* 56 (3), S. 794–814.
- Ferrara, N. (2002): Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis. Therapeutic implications. In: *Seminars in oncology* 29 (6 Suppl 16), S. 10–14.
- Ferrara, N.; Henzel, W. J. (1989): Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 161 (2), S. 851–858.
- Folkman, J. (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. In: *Nature medicine* 1 (1), S. 27–31.
- Friedlander, M.; Brooks, P. C.; Shaffer, R. W.; Kincaid, C. M.; Varner, J. A.; Cheresch, D. A. (1995): Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5241), S. 1500–1502.
- Frisch, S. M.; Francis, H. (1994): Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. In: *The Journal of cell biology* 124 (4), S. 619–626.
- Gao, J.; Zhao, S.; Halstensen, T. S. (2016): Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oncology reports* 35 (6), S. 3265–3274.
- Gao, S. P.; Mark, K. G.; Leslie, K.; Pao, W.; Motoi, N.; Gerald, W. L. et al. (2007): Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (12), S. 3846–3856.
- Gatta, G.; Botta, L.; Sanchez, M. J.; Anderson, L. A.; Pierannunzio, D.; Licitra, L. (2015): Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s. The EUROCORE-5 population-based study. In: *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*.
- Goel, S.; Wong, A. H-K; Jain, R. K. (2012): Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (3), a006486.
- Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A. G.; Kessler, H. (2002): Nanomolar small molecule inhibitors for alphav(beta)6, alphav(beta)5, and alphav(beta)3 integrins. In: *Journal of medicinal chemistry* 45 (5), S. 1045–1051.
- Grandis, J. R.; Tweardy, D. J. (1993): Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. In: *Cancer research* 53 (15), S. 3579–3584.
- Granzow, C.; Kopun, M.; Krober, T. (1995): Riboflavin-mediated photosensitization of Vinca alkaloids distorts drug sensitivity assays. In: *Cancer research* 55 (21), S. 4837–4843.
- Guntinas-Lichius, O.; Büntzel, J.; Esser, D.; Schalldach, U.; Lochner, P.; Müller, A. et al. (Hg.) (2010): Epidemiologie der malignen Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. Analyse der Thüringer Krebsregister von 1996 bis 2005. German Medical Science GMS Publishing House. 81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie.
- Heuser, M.; Kopun, M.; Rittgen, W.; Granzow, C. (2005): Cytotoxicity determination without photochemical artifacts. In: *Cancer letters* 223 (1), S. 57–66.
- Horn, I-S; Wichmann, G.; Mozet, C.; Dietz, A.; Dollner, R.; Tschop, K.; Boehm, A. (2010): Heterogeneity of epithelial and stromal cells of head and neck squamous cell carcinomas in ex vivo chemoresponse. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65 (6), S. 1153–1163.
- Hynes, N. E.; Horsch, K.; Olayioye, M. A.; Badache, A. (2001): The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. In: *Endocrine-related cancer* 8 (3), S. 151–159.
- Hynes, R. O. (1992): Integrins. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. In: *Cell* 69 (1), S. 11–25.
- Hynes, R. O. (2002): Integrins. Bidirectional, allosteric signaling machines. In: *Cell* 110 (6), S. 673–687.

- Ji, W-T; Chen, H-R; Lin, C-H; Lee, J-W; Lee, C-C (2014): Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) modulates pro-survival signaling to promote progression of head and neck squamous cell carcinoma. In: *PloS one* 9 (2), e88952.
- Kishimoto, T. (1989): The biology of interleukin-6. In: *Blood* 74 (1), S. 1–10.
- Knoedler, M.; Gauler, T.; Dietz, A.; Grünwald, V.; Stoeckl-Williams, J.; Knipping, S. et al. (2014): cetuximab (c), fluorouracil (f) and cisplatin (p) alone or with docetaxel (d) for recurrent/metastatic (rm) head and neck cancer (hnscc). Final analysis of AIO trial # 1108 - CEFCID. In: *Annals of Oncology* 25 (suppl_4), iv340-iv340.
- Knoedler, M.; Gauler, T. C.; Gruenwald, V.; Matzdorff, A.; Schroeder, M.; Dietz, A. et al. (2013): Phase II study of cetuximab in combination with docetaxel in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck after platinum-containing therapy. A multicenter study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. In: *Oncology* 84 (5), S. 284–289.
- Koide, N.; Nishio, A.; Sato, T.; Sugiyama, A.; Miyagawa, S. (2004): Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. In: *The American journal of gastroenterology* 99 (9), S. 1667–1674.
- Kostareli, E.; Hielscher, T.; Zucknick, M.; Baboci, L.; Wichmann, G.; Holzinger, D. et al. (2016): Gene promoter methylation signature predicts survival of head and neck squamous cell carcinoma patients. In: *Epigenetics* 11 (1), S. 61–73.
- Kostareli, E.; Holzinger, D.; Bogatyrova, O.; Hielscher, T.; Wichmann, G.; Keck, M. et al. (2013): HPV-related methylation signature predicts survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas. In: *The Journal of clinical investigation* 123 (6), S. 2488–2501.
- Kowanetz, M.; Ferrara, N. (2006): Vascular endothelial growth factor signaling pathways. Therapeutic perspective. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (17), S. 5018–5022.
- Kumar, C. C. (1998): Signaling by integrin receptors. In: *Oncogene* 17 (11 Reviews), S. 1365–1373.
- Kyzas, P. A.; Cunha, I. W.; Ioannidis, J. P. A. (2005): Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma. A meta-analysis. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (4), S. 1434–1440.
- Larsen, A. K.; Ouaret, D.; El Ouadrani, K.; Petitprez, A. (2011): Targeting EGFR and VEGF(R) pathway cross-talk in tumor survival and angiogenesis. In: *Pharmacology & therapeutics* 131 (1), S. 80–90.
- Liebig, H.; Gunther, G.; Kolb, M.; Mozet, C.; Boehm, A.; Dietz, A.; Wichmann, G. (2017): Reduced proliferation and colony formation of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) after dual targeting of EGFR and hedgehog pathways. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 79 (2), S. 411–420.
- Link, H. (2009): Fortschritte in der Therapie bei Kopf-Hals-Tumoren. In: *Onkologisch*, S. 1–4.
- Lippitz, Bodo E. (2013): Cytokine patterns in patients with cancer. A systematic review. In: *The Lancet Oncology* 14 (6), e218-e228.
- Liu, Z.; Wang, F.; Chen, X. (2008): Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy. In: *Drug development research* 69 (6), S. 329–339.
- Lu, Y.; Cai, Z.; Xiao, G.; Liu, Y.; Keller, E. T.; Yao, Z.; Zhang, J. (2007): CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. In: *Journal of cellular biochemistry* 101 (3), S. 676–685.
- MacDonald, T. J.; Taga, T.; Shimada, H.; Tabrizi, P.; Zlokovic, B. V.; Cheresch, D. A.; Laug, W. E. (2001): Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist. In: *Neurosurgery* 48 (1), S. 151–157.
- Machtay, M.; Moughan, J.; Trotti, A.; Garden, A. S.; Weber, R. S.; Cooper, J. S. et al. (2008): Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer. An RTOG analysis. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (21), S. 3582–3589.

- Mann, E. A.; Spiro, J. D.; Chen, L. L.; Kreutzer, D. L. (1992): Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas. In: *American journal of surgery* 164 (6), S. 567–573.
- Mas-Moruno, C.; Rechenmacher, F.; Kessler, H. (2010): Cilengitide. The first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. In: *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* 10 (10), S. 753–768.
- Maurizi, M.; Almadori, G.; Ferrandina, G.; Distefano, M.; Romanini, M. E.; Cadoni, G. et al. (1996): Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. In: *British journal of cancer* 74 (8), S. 1253–1257.
- McDonald, Donald M.; Baluk, Peter (2002): Significance of blood vessel leakiness in cancer. In: *Cancer research* 62 (18), S. 5381–5385.
- Mitjans, F.; Meyer, T.; Fittschen, C.; Goodman, S.; Jonczyk, A.; Marshall, J. F. et al. (2000): In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alpha v integrins. In: *International journal of cancer* 87 (5), S. 716–723.
- Nabors, L. B.; Mikkelsen, T.; Rosenfeld, S. S.; Hochberg, F.; Akella, N. S.; Fisher, J. D. et al. (2007): Phase I and correlative biology study of cilengitide in patients with recurrent malignant glioma. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (13), S. 1651–1657.
- Nagai, T.; Yamakawa, N.; Aota, S.; Yamada, S. S.; Akiyama, S. K.; Olden, K.; Yamada, K. M. (1991): Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. In: *The Journal of cell biology* 114 (6), S. 1295–1305.
- Nagasaki, T.; Hara, M.; Nakanishi, H.; Takahashi, H.; Sato, M.; Takeyama, H. (2014): Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis. Anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction. In: *British journal of cancer* 110 (2), S. 469–478.
- Nicholson, R. I.; Gee, J. M.; Harper, M. E. (2001): EGFR and cancer prognosis. In: *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 37 Suppl 4, S9-15.
- Normanno, N.; Luca, A. de; Bianco, C.; Strizzi, L.; Mancino, M.; Maiello, M. R. et al. (2006): Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. In: *Gene* 366 (1), S. 2–16.
- O-charoenrat, P.; Rhys-Evans, P.; Modjtahedi, H.; Eccles, S. A. (2000): Vascular endothelial growth factor family members are differentially regulated by c-erbB signaling in head and neck squamous carcinoma cells. In: *Clinical & experimental metastasis* 18 (2), S. 155–161.
- Paolillo, M.; Russo, M. A.; Serra, M.; Colombo, L.; Schinelli, S. (2009): Small molecule integrin antagonists in cancer therapy. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 9 (12), S. 1439–1446.
- Poage, G. M.; Christensen, B. C.; Houseman, E. A.; McClean, M. D.; Wiencke, J. K.; Posner, M. R. et al. (2010): Genetic and epigenetic somatic alterations in head and neck squamous cell carcinomas are globally coordinated but not locally targeted. In: *PloS one* 5 (3), e9651.
- Pries, R.; Wollenberg, B. (2006): Cytokines in head and neck cancer. In: *Cytokine & growth factor reviews* 17 (3), S. 141–146.
- Pulte, D.; Brenner, H. (2010): Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century. A period analysis. In: *The oncologist* 15 (9), S. 994–1001.
- Ramroth, H.; Dietz, A.; Becher, H. (2004): Interaction effects and population-attributable risks for smoking and alcohol on laryngeal cancer and its subsites. A case-control study from Germany. In: *Methods of information in medicine* 43 (5), S. 499–504.
- Reardon, D. A.; Fink, K. L.; Mikkelsen, T.; Cloughesy, T. F.; O'Neill, A.; Plotkin, S. et al. (2008): Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (34), S. 5610–5617.

- Riedel, F.; Gotte, K.; Schwalb, J.; Wirtz, H.; Bergler, W.; Hormann, K. (2000): Serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer. In: *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 257 (6), S. 332–336.
- Riedel, F.; Zaiss, I.; Herzog, D.; Gotte, K.; Naim, R.; Hormann, K. (2005): Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. In: *Anticancer research* 25 (4), S. 2761–2765.
- Rivera, F.; Garcia-Castano, A.; Vega, N.; Vega-Villegas, M. E.; Gutierrez-Sanz, L. (2009): Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer. The EXTREME trial. In: *Expert review of anticancer therapy* 9 (10), S. 1421–1428.
- Robert-Koch-Institut; Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausg. Berlin (Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes).
- Rüegg, C.; Dormond, O.; Mariotti, A. (2004): Endothelial cell integrins and COX-2. Mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1654 (1), S. 51–67.
- Saji, H.; Koike, M.; Yamori, T.; Saji, S.; Seiki, M.; Matsushima, K.; Toi, M. (2001): Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. In: *Cancer* 92 (5), S. 1085–1091.
- Salcedo, R.; Ponce, M. L.; Young, H. A.; Wasserman, K.; Ward, J. M.; Kleinman, H. K. et al. (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1. Direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. In: *Blood* 96 (1), S. 34–40.
- Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. (1995): Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 19 (3), S. 183–232.
- Sant, M.; Allemani, C.; Santaquilani, M.; Knijn, A.; Marchesi, F.; Capocaccia, R. (2009): EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. In: *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 45 (6), S. 931–991.
- Sato, K.; Kuratsu, J.; Takeshima, H.; Yoshimura, T.; Ushio, Y. (1995): Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in meningioma. In: *Journal of neurosurgery* 82 (5), S. 874–878.
- Sauter, E. R.; Nesbit, M.; Watson, J. C.; Klein-Szanto, A.; Litwin, S.; Herlyn, M. (1999): Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 5 (4), S. 775–782.
- Schlegel, D. (2014): Der Einfluss des Integrin-Rezeptor-Inhibitors Cilengitide auf die Ex-vivo-Chemoresponse von Kopf-Hals-Tumoren gegenüber Cisplatin, Docetaxel und Cetuximab im FLAVINO-Assay mit und ohne Bestrahlung. Dissertation. Universitätsklinikum, Leipzig. Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde / Plastische Chirurgie.
- Schrader, C.; Boehm, A.; Reiche, A.; Dietz, A.; Mozet, C.; Wichmann, G. (2012): Combined effects of lapatinib and cisplatin on colony formation of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Anticancer research* 32 (8), S. 3191–3199.
- Stoehr, M.; Mozet, C.; Boehm, A.; Aigner, A.; Dietz, A.; Wichmann, G. (2014): Simvastatin suppresses head and neck squamous cell carcinoma ex vivo and enhances the cytostatic effects of chemotherapeutics. In: *Cancer chemotherapy and pharmacology* 73 (4), S. 827–837.
- Stransky, N.; Egloff, A. M.; Tward, A. D.; Kostic, A. D.; Cibulskis, K.; Sivachenko, A. et al. (2011): The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6046), S. 1157–1160.
- Stupp, R.; Hegi, M. E.; Gorlia, T.; Erridge, S. C.; Perry, J.; Hong, Y-K et al. (2014): Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study). A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 15 (10), S. 1100–1108.
- Stupp, R.; Rüegg, C. (2007): Integrin inhibitors reaching the clinic. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (13), S. 1637–1638.

- Tanaka, T.; Kishimoto, T. (2014): The biology and medical implications of interleukin-6. In: *Cancer immunology research* 2 (4), S. 288–294.
- Trotti, A.; Pajak, T. F.; Gwede, C. K.; Paulus, R.; Cooper, J.; Forastiere, A. et al. (2007): TAME. Development of a new method for summarising adverse events of cancer treatment by the Radiation Therapy Oncology Group. In: *The Lancet Oncology* 8 (7), S. 613–624.
- Tucci, M.; Stucci, S.; Silvestris, F. (2014): Does cilengitide deserve another chance? In: *The Lancet Oncology* 15 (13), e584-e585.
- van Coillie, E.; van Damme, J.; Opdenakker, G. (1999): The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. In: *Cytokine & growth factor reviews* 10 (1), S. 61–86.
- Varner, J. A.; Cheresch, D. A. (1996): Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alphavbeta3. In: *Important advances in oncology*, S. 69–87.
- Vermorken, J. B.; Guigay, J.; Mesia, R.; Trigo, J. M.; Keilholz, U.; Kerber, A. et al. (2011): Phase I/II trial of cilengitide with cetuximab, cisplatin and 5-fluorouracil in recurrent and/or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. Findings of the phase I part. In: *British journal of cancer* 104 (11), S. 1691–1696.
- Vermorken, J. B.; Mesia, R.; Rivera, F.; Remenar, E.; Kawecki, A.; Rottey, S. et al. (2008): Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. In: *The New England journal of medicine* 359 (11), S. 1116–1127.
- Vermorken, J. B.; Peyrade, F.; Krauss, J.; Mesia, R.; Remenar, E.; Gauler, T. C. et al. (2014): Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. Results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). In: *Annals of Oncology* 25 (3), S. 682–688.
- Vincenzi, B.; Zoccoli, A.; Pantano, F.; Venditti, O.; Galluzzo, S. (2010): Cetuximab. From bench to bedside. In: *Current cancer drug targets* 10 (1), S. 80–95.
- Wang, H.; Zhang, Q.; Kong, H.; Zeng, Y.; Hao, M.; Yu, T. et al. (2014): Monocyte chemotactic protein-1 expression as a prognostic biomarker in patients with solid tumor. A meta analysis. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 7 (7), S. 3876–3886.
- Wheeler, D. L.; Huang, S.; Kruser, T. J.; Nechrebecki, M. M.; Armstrong, E. A.; Benavente, S. et al. (2008): Mechanisms of acquired resistance to cetuximab. Role of HER (ErbB) family members. In: *Oncogene* 27 (28), S. 3944–3956.
- Wichmann, G.; Dietz, A. (2011): Pharmakologische Charakterisierung von Kopf-Hals-Tumoren in Ex-vivo-Tests. In: *HNO* 59 (9), S. 866–873.
- Wichmann, G.; Dietz, A. (2016): Präklinische Modelle zur Etablierung innovativer Therapiestrategien. Ex-vivo-Testung der Chemo und Immunresponse von Kopf-Hals-Tumoren. In: *HNO* 64 (7), S. 460–469.
- Wichmann, G.; Horn, I-S; Boehm, A.; Mozet, C.; Tschop, K.; Dollner, R.; Dietz, A. (2009): Single tissue samples from head and neck squamous cell carcinomas are representative regarding the entire tumor's chemosensitivity to cisplatin and docetaxel. In: *Onkologie* 32 (5), S. 264–272.
- Wichmann, G.; Körner, C.; Boehm, A.; Mozet, C.; Dietz, A. (2015a): Stimulation by Monocyte Chemoattractant Protein-1 Modulates the Ex-vivo Colony Formation by Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. In: *Anticancer research* 35 (7), S. 3917–3924.
- Wichmann, G.; Körner, C.; Dietz, A. (2011): Ex-vivo-Chemoresponse-Testung von Kopf-Hals-Tumoren. Ein alter Hut? In: *Laryngo- rhino- otologie* 90 (8), S. 464–468.
- Wichmann, G.; Rosolowski, M.; Krohn, K.; Kreuz, M.; Boehm, A.; Reiche, A. et al. (2015b): The role of HPV RNA transcription, immune response-related gene expression and disruptive TP53 mutations in diagnostic and prognostic profiling of head and neck cancer. In: *International journal of cancer* 137 (12), S. 2846–2857.
- Wichmann, G.; Wiegand, S.; Dietz, A. (2016): Prädiktion des Therapieansprechens am Beispiel von Kopf-Hals-Tumoren. In: *Onkologie heute* (06), S. 20–23. Online verfügbar unter <http://www.onkologie-heute.info/onkologie-heute/archiv/literaturarchiv/literatur-2016/heft-6-2016/>.
- Wittekind, C. (Hg.) (2017): TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH.

Wolf, M. J.; Hoos, A.; Bauer, J.; Boettcher, S.; Knust, M.; Weber, A. et al. (2012): Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. In: *Cancer cell* 22 (1), S. 91–105.

Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (2), S. 127–137.

Yoshimura, T.; Yuhki, N.; Moore, S. K.; Appella, E.; Lerman, M. I.; Leonard, E. J. (1989): Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. In: *FEBS letters* 244 (2), S. 487–493.

Zhang, H.; Yun, S.; Batuwangala, T. D.; Steward, M.; Holmes, S. D.; Pan, L. et al. (2012): A dual-targeting antibody against EGFR-VEGF for lung and head and neck cancer treatment. In: *International journal of cancer* 131 (4), S. 956–969.

Zhang, W.; Park, D. J.; Lu, B.; Yang, D. Y.; Gordon, M.; Groshen, S. et al. (2005): Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 11 (2 Pt 1), S. 600–605.

Zimmermann, M.; Zouhair, A.; Azria, D.; Ozsahin, M. (2006): The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer. Its role and treatment implications. In: *Radiation oncology (London, England)* 1, S. 11.

5.1 ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGE VERFASSUNG DER ARBEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

Leipzig, den 12.05.2017

Susan Cedra

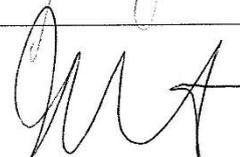
5.2 DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS

Im HNO-Forschungslabor wurde von Oktober 2010 beginnend das translationale Projekt zur Wirksamkeit von Cilengitide (EMD121974) im FLAVINO-Assay („Efficacy of Cilengitide in the FLAVINO assay“, gefördert durch Merck KGaA) durchgeführt. Seit Juni 2011 war ich in dieser präklinischen Studie gemeinsam mit Frau Dr. Daphne Schlegel mit der Zusammenstellung aller klinischen Daten der *ex vivo* untersuchten 108 Patienten befasst. Gemeinsam mit Daphne Schlegel und dem Projektleiter Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann stellte ich alle klinischen Daten der Patienten zusammen. Zentrale Aufgabe innerhalb meiner Arbeit war die Analyse der Chemoresponse der Tumoren auf die verschiedenen *ex vivo* eingesetzten Konzentrationen von Chemotherapeutika mit Cilengitide und Cetuximab unter den Bedingungen des FLAVINO-Assays. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Messung von pro-inflammatorischen und pro-angiogenen Zytokinen, dies auch unter Berücksichtigung der durch Wachstum auf verschieden mit EZM-beschichteten Oberflächen bewirkten Effekte. Die Messung der Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1 und VEGF-A führte ich mittels indirekter Sandwich ELISA allein durch. Die Ermittlung der in den Proben vorhandenen Konzentrationen anhand mitgeführter Kalibrierkonzentrationen erfolgte gemeinsam mit Dr. Wichmann. Die Daten wurden von mir in Auswertetabellen zusammengeführt und den Abstimmungen mit Dr. Wichmann entsprechend verrechnet und für statistische Analysen vorbereitet. Ich war zentral beteiligt an der Kuration der Daten, der Klassifizierung und Umkodierung klinischer Daten sowie der Bewertung der aus den statistischen Analysen resultierenden Ergebnisse. Teile dieser Arbeit wurden im Manuskript „*Cilengitide and Cetuximab Reduce Cytokine Production and Colony Formation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Ex Vivo*“ im Journal *Anticancer Research* publiziert.

Innerhalb dieses Manuskripts waren ausschließlich Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann und ich an der Erstellung des Datensatzes für die statistischen Analysen beteiligt. Gemeinsam mit Marlen Kolb und Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann diskutierte ich alle Zwischenergebnisse sowie tabellarischen und grafischen Darstellungen. Ich war an der Interpretation der finalen Daten und deren Verschriftlichung zentral beteiligt. Insbesondere erstellte ich die Tabelle (Table I) sowie die Abbildungen Figure 1 und Figure 2. Gemeinsam mit Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann schrieb ich die erste Version des Manuskripts, verwaltete die zitierte wissenschaftliche Literatur und erstellte die Referenzliste. Die finale Version schrieb ich mit Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann. Ich war am Einreichungsprozess des Manuskripts beteiligt.

„Cilengitide and Cetuximab Reduce Cytokine Production and Colony Formation of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells Ex Vivo“, erschienen im Journal *Anticancer Research*

Geteilte Erstautorenschaft mit Dr. Wichmann

Gunnar Wichmann	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		
Marlen Kolb	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		
Daphne Schlegel	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		
Susanne Wiegand	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		
Andreas Boehm	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		
Mathias Hofer	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		
Andreas Dietz	08.05.2017	
.....	
Leipzig, den		
<hr/>		

5.3 LEBENSLAUF

5.4 DANKSAGUNG

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dietz für die Ermöglichung und Supervision dieser Arbeit. Besonders gebührt Herrn Dr. rer. nat. Gunnar Wichmann größten Dank für die Betreuung dieser Arbeit, der Auswahl des Themas und Unterstützung bei dessen Bearbeitung im Rahmen seines von Merck geförderten Drittmittelprojektes inklusive der Ressourcen für meine Untersuchungen. Weiterhin sei den Oberärzten der HNO-Klinik, insbesondere Dr. med. Andreas Boehm und Dr. med. Christian Mozet für die Bereitstellung des Tumormaterials, sowie den Mitarbeitern des HNO-Forschungslabors Frau Anett Reiche, Kristin Herrmann und Ulrike Scharrer für die technische Hilfe und den Probentransfer vom OP zum Labor gedankt. Besonderer Dank gilt Dr. med. dent. Dr. med. Daphne Schlegel, mit der gemeinsam ich viele Stunden im Labor an den hier präsentierten Ergebnissen gearbeitet habe. Ich möchte mich außerdem bei allen Koautoren der Publikation bedanken für Ihre Zusammenarbeit und konstruktive Kritik, die so zum Gelingen der Publikationen beigetragen haben.

Mein allerherzlichster Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstützt hat.