

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gängsbacher)

**Bedeutung und Wirkung spezifitätsoptimierter synthetischer Urokinase-
und Faktor Xa-Inhibitoren bei der experimentellen Metastasierung
von murinen Lymphom- und humanen Fibrosarkomzellen**

Ingo Jörg Banke

Dissertation



-2006-

Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher)

**Bedeutung und Wirkung spezifitätsoptimierter synthetischer Urokinase-
und Faktor Xa-Inhibitoren bei der experimentellen Metastasierung
von murinen Lymphom- und humanen Fibrosarkomzellen**

Ingo Jörg Banke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Krüger
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher
3. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

Die Dissertation wurde am 13.12.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2007 angenommen.

Für Jolly, Bernd und meine Eltern

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 <u>Krebserkrankung und Metastasierung</u>	2
2.1.1 Metastasenentstehung	3
2.1.2 Experimentelle Metastasierungsmodelle zur präklinischen Evaluierung antimetastatischer Therapien	6
2.2 <u>An Krebsgeschehen und Metastasierung beteiligte proteolytische Enzyme</u>	9
2.2.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)	10
2.2.2 Serinproteinasen	11
2.2.2.1 <i>Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System)</i>	11
2.2.2.2 <i>Blutgerinnungsfaktor Xa (FXa) und weitere Enzyme der Gerinnungskaskade</i>	14
2.2.2.3 <i>Matriptase</i>	18
2.2.3 Interaktionen tumorassoziierter Proteasefamilien	19
2.3 <u>Antimetastatische Therapie mit Proteasehemmstoffen</u>	20
2.3.1 MMP-Inhibitoren (MMPIs)	21
2.3.2 Ursachen für das bisherige Scheitern von klinischen Prüfungen mit Proteasehemmstoffen	22
2.3.3 Serinprotease-Inhibitoren (SPIs)	24
2.3.3.1 <i>uPA-Hemmstoffe</i>	25
2.3.3.2 <i>FXa-Hemmstoffe und Hemmstoffe von weiteren Enzymen der Blutgerinnung</i>	27
2.3.4 Neuartige antiproteolytische Therapiekonzepte	29
3 Zielsetzung der Arbeit	31
4 Material und Methoden	32
4.1 <u>Versuchstiere</u>	32
4.2 <u>Tumorzellen</u>	32
4.3 <u>Metastasierungsmodelle</u>	33
4.3.1 Experimentelle Metastasierung mit murinen L-CI.5s Zellen	33
4.3.1.1 <i>Expressionsmuster von uPA, FX und Matriptase im Zeitverlauf der Metastasierung</i>	34
4.3.1.2 <i>Selektivitäts-/Effektivitätskorrelationen mit FXa- und uPA-Inhibitoren sowie Ermittlung der antimetastatischen Wirkung von WX-FX4</i>	34
4.3.1.3 <i>Ermittlung der Wirksamkeit verschiedener Inhibitor-Applikationsarten am Beispiel von CJ-504 und CJ-463</i>	35
4.3.2 Experimentelle Metastasierung mit humanen HT1080 Zellen	36
4.3.2.1 <i>Ermittlung der antimetastatischen Effizienz und Evaluierung des optimalen Zeitfensters einer Therapie mit WX-FX4 (i.p.) und CJ-463 (i.p. und s.c.)</i>	36
4.3.2.2 <i>Überlebensstudien mit WX-FX4 und CJ-463</i>	37
4.4 <u>Proteaseinhibitoren</u>	38
4.4.1 CJ-Inhibitoren	38
4.4.2 WX-FX4	40
4.4.3 DX-9065a	41
4.4.4 Bestimmung der Selektivitäten der eingesetzten Inhibitoren	42

4.5 <u>Zellbiologische Verfahren</u>	43
4.5.1 Zellkultur	43
4.5.2 Bestimmung der Zellzahl	43
4.5.3 Sulforhodamin B (SRB)-Zytotoxizitätsassay	44
4.6 <u>X-Gal-Färbung</u>	45
4.7 <u>Biochemische Verfahren</u>	46
4.7.1 Proteingewinnung und Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	46
4.7.1.1 Proteingewinnung aus Zellen	46
4.7.1.2 Proteingewinnung aus Gewebe	46
4.7.1.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	47
4.7.2 Zymographie	47
4.7.3 ROTEG [®] -Blutgerinnungsassay	48
4.8 <u>Molekularbiologische Verfahren</u>	50
4.8.1 RNA-Isolation	50
4.8.1.1 RNA-Isolation aus Zellen	50
4.8.1.2 RNA-Isolation aus Gewebe	50
4.8.2 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	51
4.9 <u>Statistische Analysen</u>	53
5 Ergebnisse	54
5.1 <u>Steigerung der anti-metastatischen Wirksamkeit durch Selektivitäts- und nicht Affinitätsoptimierung synthetischer Serinproteinase-Inhibitoren (sSPIs) im murinen T-Zell Lymphom</u>	54
5.1.1 Anstieg der uPA-Expression in der Leber im Zeitverlauf des Metastasierungsprozesses	54
5.1.2 Anti-metastatische Wirkung von uPA-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität im murinen T-Zell Lymphom	56
5.1.3 Korrelation zwischen Selektivität und anti-metastatischer Wirkung der Inhibitoren im murinen T-Zell Lymphom	58
5.1.4 Korrelation zwischen Faktor Xa-Selektivität und anti-metastatischer Wirkung der Inhibitoren im murinen T-Zell Lymphom	61
5.1.5 Korrelation zwischen Faktor Xa-Selektivität und Hemmung der Mikrometastasierung der Inhibitoren im murinen T-Zell Lymphom	63
5.1.6 Modulation der FX- und Matriptase-Expression in der Leber im Zeitverlauf des Metastasierungsprozesses	65
5.1.7 Keine kompensatorische Induktion von uPA, MMP-2 und MMP-9 durch anti-metastatische Inhibitortherapie	67
5.2 <u>Unabhängigkeit der anti-metastatischen Wirkung eines Serinproteinase-Inhibitors von der Applikationsart (subkutane gegenüber intraperitoneale)</u>	69
5.3 <u>Reduktion experimenteller Metastasierung und Verlängerung des Überlebens durch den hochselektiven und nur schwach anti-koagulatorisch wirkenden Faktor Xa-Inhibitor WX-FX4</u>	70
5.3.1 Hohe Faktor Xa-Selektivität, niedrige anti-koagulatorische Wirkung <i>in vitro</i> und geringe Halbwertszeit von WX-FX4	71
5.3.2 Schwache Beeinflussung der Gerinnungszeiten von Plasma und Vollblut <i>in vitro</i> durch WX-FX4	73
5.3.3 Anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 auf die Makro- und Mikrometastasierung im murinen T-Zell Lymphom	75

5.3.4	Anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 über verschiedene Behandlungszeiträume im humanen Fibrosarkom	77
5.3.5	Prävention tumorbedingten Gewichtsverlustes und weiterer Krank- heitssymptome durch Therapie mit WX-FX4	80
5.3.6	Keine Verlängerung der Gerinnungszeit <i>ex vivo</i> durch anti- metastatische Therapie mit WX-FX4	81
5.3.7	Keine kompensatorische Induktion von uPA, MMP-2 und MMP-9 durch anti-metastatische Therapie mit WX-FX4	83
5.3.8	Verlängerung des Überlebens durch WX-FX4 im humanen Fibrosarkom	84
5.4	<u>Reduktion experimenteller Metastasierung und Verlängerung des Überlebens durch den hochselektiven uPA-Inhibitor CJ-463</u>	86
5.4.1	Anti-metastatische Wirksamkeit von CJ-463 über verschiedene Behandlungszeiträume im humanen Fibrosarkom	87
5.4.2	Prävention tumorbedingten Gewichtsverlustes und weiterer Krank- heitssymptome durch nebenwirkungsfreie CJ-463-Therapie	90
5.4.3	Verlängerung des Überlebens durch CJ-463 bei der experimentellen Metastasierung mit humanen Fibrosarkomzellen	92
6	Diskussion	94
6.1	<u>FXa-Selektivität von sSPIs korreliert mit ihrer anti-metastatischen Potenz im T-Zell Lymphommodell</u>	95
6.2	<u>Favorisierung subkutaner gegenüber intraperitonealer Applikation von sSPIs in der Krebstherapie</u>	100
6.3	<u>Effiziente und nebenwirkungsfreie anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 als Hinweis auf prometastatische Wirkung von FXa unabhängig von der Gerinnungskaskade</u>	101
6.4	<u>Optimales anti-metastatisches Therapiezeitfenster eines FXa-Inhibitors am Beispiel von WX-FX4 und zeitliche Relevanz von FXa im Verlauf der Metastasierung</u>	105
6.5	<u>Optimales anti-metastatisches Therapiezeitfenster eines uPA-Inhibitors am Beispiel von CJ-463 und zeitliche Bedeutung von uPA während der Metastasierung</u>	108
6.6	<u>Ausblick</u>	110
7	Literaturverzeichnis	113
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	131
9	Abkürzungsverzeichnis	133
10	Danksagung	134
Anhang:		
I	Lebenslauf	I
II	Eigene Publikationen	III

1 Zusammenfassung

Die Metastasierung ist Haupttodesursache bei Krebspatienten. Daher stehen anti-metastatische Wirkstoffe im Fokus des Interesses für die Krebstherapie. Obwohl Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen meist mit erhöhter Proteaseaktivität einhergehen, erlitt das Vorhaben, Therapieerfolge durch anti-proteolytische Behandlung zu erzielen, einen deutlichen Rückschlag. Klinische Studien mit Breitspektrum-Matrix Metalloproteinaseinhibitoren (MMPIs) waren gescheitert, was hauptsächlich auf die mangelnde Selektivität der Inhibitoren zurückgeführt wurde. Daher bedarf es eines Umdenkens bei Entwicklung und Einsatz anti-proteolytischer Krebstherapeutika. Kürzlich konnte der Nutzen einer selektivitätsoptimierten MMPI-Therapie im murinen T-Zell Lymphom Metastasierungsmodell aufgrund Korrelation von anti-metastatischer Wirkung und Selektivität von MMPIs für MMP-9 gezeigt werden. Da von vielen Serinproteasen (SPs), speziell des Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA)- und Blutgerinnungssystems, eine metastasierungsfördernde Rolle bekannt ist, stellen synthetische Serinproteasehemmstoffe (sSPIs) hoffnungsvolle Krebstherapeutika dar. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob auch bei sSPIs eine Selektivitätsoptimierung von Vorteil ist für das Erzielen maximaler anti-metastatischer Effekte und minimaler Nebenwirkungen. Dazu wurde eine Reihe strukturverwandter 4-Amidinobenzylamid-sSPIs mit unterschiedlichen Selektivitätsprofilen für uPA und Blutgerinnungsfaktor Xa (FXa) im T-Zell Lymphom eingesetzt. Dieses *in vivo*-Screening zeigte eine enge Korrelation von signifikanter anti-metastatischer Wirkung und Selektivität (und nicht Affinität) der sSPIs für FXa (und nicht uPA). Da eine Hemmung von SPs wie insbesondere FXa zu schweren Nebenwirkungen *in vivo* führen kann, wurde auch der höchst selektive FXa-I WX-FX4 eingesetzt, der sich aufgrund geringer Hemmung von im Prothrombinasekomplex gebundenen FXa als außergewöhnlich schwaches Antikoagulans auszeichnet. WX-FX4 führte neben signifikanter anti-metastatischer Wirkung im T-Zell Lymphom Lebermetastasierungsmodell und humanen Fibrosarkom Lungenmetastasierungsmodell zu signifikanter Überlebensverlängerung der Tiere, ohne Nebenwirkungen über einen 100-tägigen Therapiezeitraum hervorzurufen. Somit konnte FXa als therapeutische Zielprotease identifiziert und eine gerinnungsunabhängige Rolle der SP bei der Metastasierung aufgedeckt werden. Auch der höchst selektive uPA-I CJ-463 zeigte im Fibrosarkom signifikante, nebenwirkungsfreie anti-metastatische Wirksamkeit und Überlebensverlängerung. In dieser Arbeit wurde erstmalig für sSPIs gezeigt, dass eine Selektivitätsoptimierung von hohem strategischem Wert für die Steigerung von anti-metastatischer Wirksamkeit und Reduktion von Nebenwirkungen ist. Dieses Verständnis kann wegweisend sein für die künftige Entwicklung anti-proteolytischer Therapeutika gegen die Metastasierung.

2 Einleitung

2.1 Krebserkrankung und Metastasierung

Krebserkrankungen stellen, nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, die zweithäufigste Todesursache in den Industrienationen dar (Welt-Gesundheits-Organisation, 2006). Dabei liegt die Ursache für den tödlichen Verlauf einer malignen Tumorerkrankung meist nicht in dem Wachstum des Primärtumors, sondern fast ausschließlich in der Entstehung von Metastasen (Pantel und Brakenhoff, 2004). Als Metastase wird die Neubildung eines Tumors in einem sekundären Organ, entstanden aus abgesiedelten Zellen eines Primärtumors nach hämatogener und/oder lymphogener Ausbreitung, bezeichnet (Günthert, 1997). Ein solider, örtlich begrenzter Tumor kann, oft in Kombination mit Radio-, Chemo-, Hormon- oder Immuntherapie als Vor- oder Nachbehandlung, operativ entfernt werden. Dadurch kann bei Patienten mit frühzeitig erkannten soliden Tumoren häufig eine Heilung erreicht werden (Fidler, 2003). Jedoch können bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eines Primärtumors, oder sogar schon davor, Tumorzellen in ein anderes, entfernt vom Ort des Primärtumors liegendes Gewebe eingedrungen sein und sich dort als Mikrometastasen angesiedelt haben (Frost und Levin, 1992; Wagener, 1999). Dieser Prozess kann sogar von kaum diagnostizierbaren Primärtumoren mit einer Tumordicke von wenigen Millimetern ausgehen, wie es z.B. vom malignen Melanom bekannt ist (Leiter et al., 2005). Schon wenige (ca. ein bis zehn) metastatische Tumorzellen können dabei ausreichen, um einen neuen Tumor zu bilden (Macdonald und Steeg, 1993). Eine chirurgische Entfernung dieser meist multipel auftretenden Metastasen ist kaum möglich. Auch die Effizienz und Durchführbarkeit konservativer Therapien ist in diesem fortgeschrittenen Stadium einer Krebserkrankung stark eingeschränkt. Ein Auftreten mehrerer Metastasen in lebenswichtigen Organen oder deren unmittelbaren Umgebung kann z.B. eine Radiotherapie unmöglich machen. Die Wirkung einer Chemotherapie kann z.B. durch metastatische Tumorzellen mit hoher chemotherapeutischer Resistenz, die für bestimmte Krebserkrankungen wie z.B. das maligne Melanom typisch sind, vollständig aufgehoben werden (Macdonald und Steeg, 1993; Soengas und Loewe, 2003). Patienten, bei denen eine kurative Therapie mit dem Ziel einer vollständigen Krankheitsfreiheit nicht mehr möglich ist oder aufgrund starker Nebenwirkungen abgebrochen werden muss (Caine et al., 2002), kann nur noch eine lindernde (palliative) Therapie angeboten werden (Kim et al., 2005). Die Behandlung zielt in diesen Fällen in erster Linie auf eine Verlangsamung des Krankheitsgeschehens durch Verringerung der Tumormasse und auf eine Linderung der Symptome ab.

Daher ist es ein vorrangiges Ziel in der Krebstherapie, Wirkstoffe zu entwickeln, die die Metastasierung als Folge der Primärtumorprogression hemmen, um damit das Auftreten fortgeschrittener, zum heutigen Zeitpunkt nicht heilbarer Erkrankungsstadien zu verhindern (Pantel und Brakenhoff, 2004). Krebspatienten können sich schon zu Beginn der Erkrankung in einem schlechten Gesundheitszustand mit reduziertem Allgemeinzustand, Kachexie und psychosomatischen Störungen befinden. Eine konventionelle krebstherapeutische Behandlung wie z.B. die Chemotherapie kann diesen Zustand noch weiter verschlechtern (Fallowfield, 2005). Als Folge dessen kann es, wie im klinischen Alltag regelmäßig beobachtet, zu einem Behandlungsabbruch kommen, ohne dass eine therapeutische Dosis je erreicht wurde. Daher existiert ein hoher medizinischer Bedarf an Wirkstoffen, die nicht nur gezielt und effektiv den Metastasierungsprozess hemmen können, sondern auch sicher und gut verträglich in ihrer Anwendung sind (Lah et al., 2006; Xu et al., 2006). Für die Entwicklung solcher therapeutischer Strategien bedarf es eine genaue Kenntnis über die bei der Metastasierung ablaufenden Prozesse.

2.1.1 Metastasenentstehung

Die Ausbildung eines *Primärtumors* (Abb. 2.1) beinhaltet den Übergang von normalen, gesunden Zellen zu Tumorzellen, genannt *Transformation* (Wagener, 1999). Dieser Vorgang ist durch einen zunehmenden Verlust der Zelldifferenzierung gekennzeichnet, was sich unter anderem in einer veränderten Zellform, einer gestörten Position der Zellen zueinander und einem zunehmenden Verlust der Gewebsstruktur äußert (Wagener, 1999). Nach Einwachsen des Primärtumors in das umliegende Gewebe kommt es im Verlauf des *Primärtumorwachstums* zu einer *Tumorangiogenese*, die bei Überschreiten einer Tumorgroße von 1-2 mm zu einer starken Neovaskularisation führt (Abb. 2.1, 1 und 2; Folkman, 1986). Als letzte Entwicklungsstufe der malignen Progression kann es zur Bildung von Metastasen kommen, das heißt zur Entstehung von *Sekundärtumoren*. Bei nicht-malignen Prozessen kommt es zwar auch oft zur Angiogenese, aber zu keiner direkten Vermischung verschiedener Zelltypen, da diese in ihren jeweiligen Bereichen verbleiben. Metastasierende Zellen hingegen haben die Eigenschaft, Gewebegrenzen zu überschreiten, sich mit anderen Zelltypen zu vermischen und mit diesen in Wechselwirkung zu treten. Die Metastasierung wird durch zahlreiche konzertant wirkende Proteine und Faktoren reguliert und ist ein mehrstufiger, kaskadenartig ablaufender Prozess (Abb. 2.1; Günthert, 1997; Bogenrieder und Herlyn, 2003): Nur solche Tumorzellen haben die Möglichkeit, Metastasen zu bilden, die sich vom Primärtumor *ablösen* sowie die den Tumor umgebende extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM) inklusive der Ba-

salmembran durchdringen können (Abb. 2.1, 3; Günthert, 1997; Egeblad und Werb, 2002). Die ECM besteht aus einem Proteinnetzwerk aus unter anderem Kollagenen (vornehmlich Typ IV), Laminin, Fibronektin, Glykoproteinen und Proteoglykanen, und bildet das intersti-tielle Stroma. Für den Abbau der Bestandteile der Basalmembran und die *Invasion* von Tu-morzellen in das sie umgebende Gewebe des Wirtes (Abb. 2.1, 3) sind Enzyme notwendig, die diese Substanzen spalten können, so genannte Proteasen (McKinell, 1999). Proteolytische

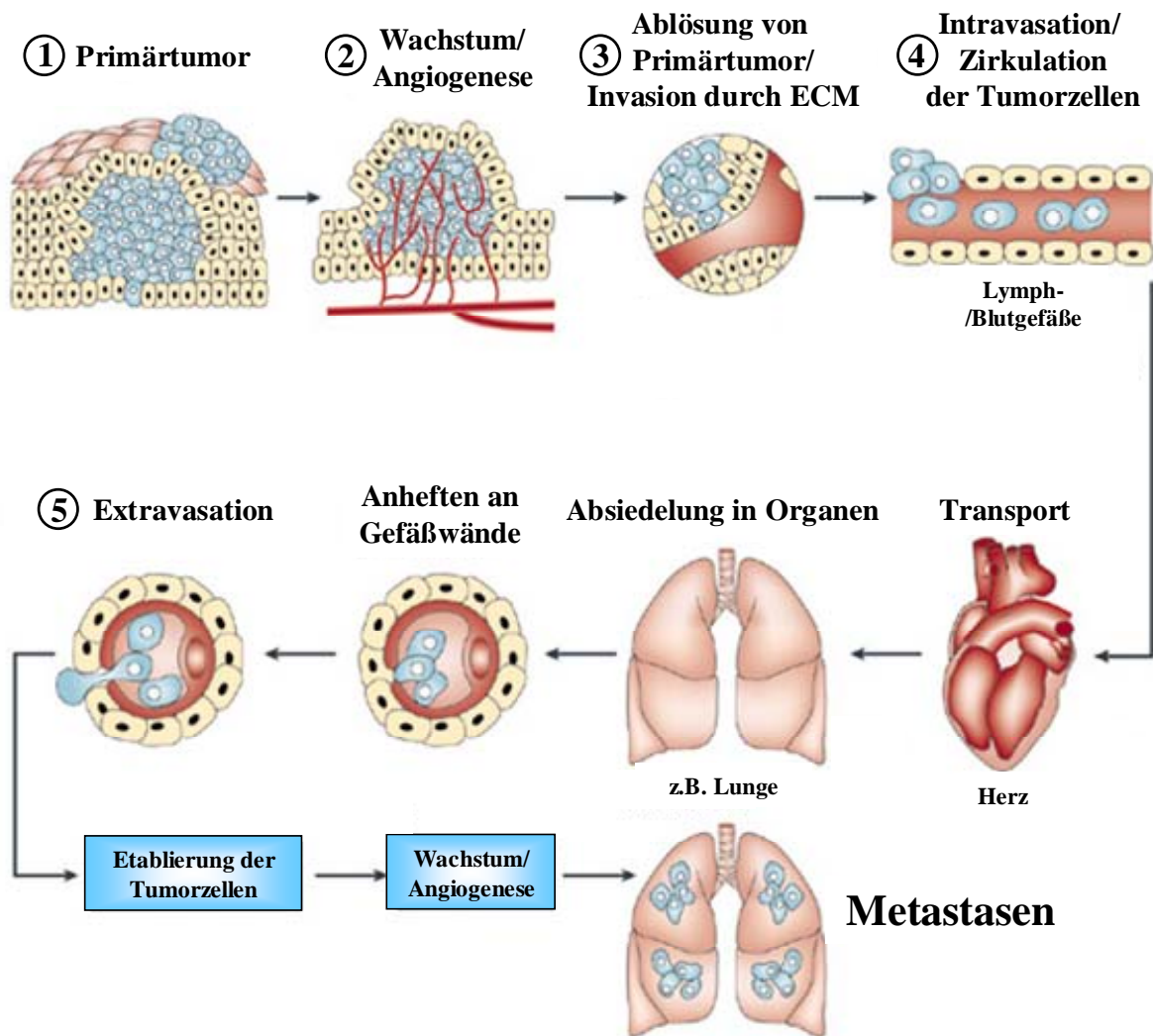


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Entstehung von Metastasen. 1. Zelltransformation und Auswachsen zu einem Primärtumor, 2. Einsetzen starker Angiogenese bei Überschreiten einer Primärtumorgroße von 1-2 mm, 3. Lokale Invasion von Tumorzellen in die Extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix*, ECM)/das Bindegewebe des Wirtes, 4. Einbruch von Tumorzellen in das Blut-/Lymphgefäßsystem (Intravasation), Transport und Überleben der Zellen in der Zirkulation, Abtransport in entfernte Organe/Gewebe (z.B. Lunge/Leber) und Anlagerung an Gefäßwände des dortigen Kapillarbettes, 5. Ausbruch aus dem Gefäßsystem (Extravasation), Vollendung der metastatischen Kaskade durch Auswachsen der Mikrometastasen (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen) zu Makrometastasen in einem sekundären Organ (z.B. Lunge/Leber) mit erneuter Angiogenese. Entstehung weiterer Metastasen durch erneute Invasion und Intravasation. Für genauere Erklärungen siehe Text (Abbildung abgeändert aus Fidler, 2003).

Enzyme (Proteasen) aus den Familien der Matrix Metalloproteinasen (MMPs), Serinproteasen wie z.B. dem Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System) wie auch den Cathepsinproteasen sind in entscheidendem Maße an diesem Prozess beteiligt (siehe unten; Magdolen et al., 2002). Dies beruht nicht nur auf deren Fähigkeit, Proteine abzubauen und damit Lücken für die Tumorzellen zur Durchwanderung der ECM zu schaffen (Günthert, 1997), sondern auch auf ihrem Vermögen, direkt Tumorzellen und Wirtsgewebe beeinflussen zu können (siehe unten; Bogenrieder und Herlyn, 2003).

Nach erfolgreicher *Invasion* können Tumorzellen in das Gefäßendothel des Blut- oder Lymphgefäßsystem einwandern und so in das Lumen von Gefäßen gelangen (*Intravasation*, Abb. 2.1, 4; Folkman, 1986). Auch dieser Metastasierungsschritt ist von Proteasen und deren Abbau der ECM und Einfluss auf das Gefäßendothel abhängig (Günthert, 1997).

Anschließend kommt es zu einem Abtransport der Zellen durch die Zirkulation. Da das Lymphgefäßsystem in den Blutkreislauf mündet, werden Tumorzellen, die primär in Lymphgefäße eingebrochen sind, auch der Blutzirkulation zugeführt (Swartz und Skobe, 2001). Dort agieren die Zellen mit Wirtszellen und vielen Mitgliedern des Gerinnungssystems, wie z.B. aus der Familie der Serinproteasen, was für ihr Überleben und ihre Funktion von entscheidender Bedeutung ist (siehe unten; Francis et al., 1998). Kleinere Tumorzellanhäufungen, eingebettet in Fibrin, Lympho- und Thrombozyten, bilden sich zu Mikrothromben aus. Dies schützt sie vor den mechanischen Belastungen im Blutgefäßsystem und dem Angriff des Immunsystems des Wirtes (Morris et al., 1993). Anschließend können sie als Tumoremboli in dem kapillaren Strombett entfernter Organe stecken bleiben (Abb. 2.1; Zacharski, 2003; Im et al., 2004). Nach Arrest der Emboli in den Kapillaren kommt es zur Adhäsion von Tumorzellen an das Endothel und/oder die Basalmembran der Gefäße. Der Verschluss der Kapillaren durch die Emboli kann zur Verletzung der Endothelzellen führen, so dass ein direkter Kontakt zwischen Tumorzellen und extrazellulärer Matrix möglich wird. Diese Prozesse werden durch zahlreiche Komponenten des Blutgerinnungssystems gefördert (McKinell, 1999; Al-Mehdi et al., 2000).

Das Austreten der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf durch Durchdringen des Gefäßendothels, *Extravasation* genannt, läuft auf ähnliche Art und Weise wie die *Intravasation* ab (siehe oben; Abb. 2.1, 5; Heyder et al., 2006). Der Prozess der *Extravasation* von Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem beginnt schon innerhalb eines kurzen Zeitraumes von wenigen Stunden nach Eintritt der Zellen in den Blutkreislauf. Nach 24 h ist er, wie aus experimentellen Untersuchungen mit intravitaler Videomikroskopie bekannt ist, schon zu über 90% abgeschlossen (Koop et al., 1996; Naumov et al., 1999). Auch an diesem wichtigen Schritt der

Metastasierung sind proteolytische Enzyme (siehe oben) sowie eine Reihe weiterer Faktoren insbesondere des Gerinnungssystems, die direkt das Endothel der Gefäße beeinflussen können, beteiligt (Orr et al., 2000; Bogenrieder und Herlyn, 2003).

Nach Extravasation der Tumorzellen in das Gewebe eines sekundären Organs kommt es zu der dortigen Etablierung der Zellen als Mikrometastasen (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen; Kopfstein und Christofori, 2006). Anschließend können diese zu Makrometastasen auswachsen, wobei verschiedene Proteasen und Wachstumsfaktoren notwendig sind (Günthert, 1997; Luzzi et al., 1998). Dabei ist auch eine erneute starke Neovaskularisation für die Ernährung der Metastasen bei Überschreiten einer Tumorgröße von 1-2 mm erforderlich (Abb. 2.1; Folkman, 1986). Nach Vollendung der metastatischen Kaskade kann es durch erneute Ablösung von Tumorzellen aus etablierten Metastasen und Gewebepenetration zu einer Entstehung weiterer Metastasen kommen, sekundäre Invasion genannt (Wagener, 1999; Hanahan und Weinberg, 2000; Fidler, 2002).

Um die Beteiligung von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Proteasen an einzelnen Schritten der Metastasierung zu bestimmen und die Wirkung antimetastatischer Therapien zu untersuchen, benötigt es Modelle, die oben genannte Prozesse widerspiegeln (MacDonald et al., 2002).

2.1.2 Experimentelle Metastasierungsmodelle zur präklinischen Evaluierung antimetastatischer Therapien

Der präklinische Einsatz antimetastatischer Therapeutika in *in vivo*-Tiermodellen stellt einen wichtigen Schritt bei der Medikamentenentwicklung in der Krebstherapie dar. Dabei erfolgt eine erste Überprüfung der Wirksamkeit von Medikamenten *in vivo*, bevor diese in klinischen Studien mit gesunden und später Krebspatienten eingesetzt werden können. Dabei kann auch die Wirkung von Therapeutika auf einzelne Schritte der Metastasierung (Abb. 2.1) untersucht werden (Francis und Amirkhosravi, 2002). Zudem können Therapeutika in Tiermodellen als Werkzeuge eingesetzt werden. Dies ermöglicht es, die Relevanz und zeitliche Bedeutung von bestimmten Faktoren, auf welche die Wirkung der Medikamente abzielt, im Zeitverlauf der Metastasierung (siehe 2.1.1) zu evaluieren und überprüfen (Francis und Amirkhosravi, 2002; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Es ist eine große Anzahl verschiedener Tumormodelle in Mäusen und Ratten etabliert. Diese *in vivo*-Tiermodelle unterscheiden sich je nach Art und Herkunft von Tumorzellen und Wirtsorganismus. Bei *syngen* Tumormodellen, wie z.B. dem in dieser Arbeit verwendeten experimentellen T-Zell Lymphom Metastasierungsmodell mit murinen L-CI.5s-Lymphomzellen und immunkompetenten DBA/2 Mäusen (Krüger et al.,

1994 a; Krüger et al., 2005), gehören Tumorzellen und Wirtsorganismus derselben Spezies an. Bei *Xenograft*-Tumormodellen, wie z.B. dem zusätzlich in dieser Arbeit eingesetzten experimentellen Fibrosarkom Metastasierungsmodell mit humanen HT1080 Fibrosarkomzellen (Schweinitz et al., 2004; Kopitz et al., 2005), sind Tumorzellen und Wirtsorganismus von unterschiedlicher Spezies. Daher müssen dort immunsupprimierte Tiere, wie die verwendeten immundefizienten CD1 *nu/nu* Nacktmäuse, eingesetzt werden (Schweinitz et al., 2004; Kopitz et al., 2005). Die Aussagekraft von *Xenograft*-Tumormodellen für die Metastasierung im Menschen ist durch die Verwendung aus humanen Tumoren gewonnener Krebszellen möglicherweise höher als die *syngener* Modelle. Obwohl hier immunsupprimierte Tiere eingesetzt werden müssen, können durch die Verwendung humaner Tumorzellen leichter Rückschlüsse auf humane Tumoren gezogen werden, wohingegen bei *syngen* Tumormodellen die Auswirkung eines intakten Immunsystems auf die Tumorentwicklung mitbeobachtet werden kann (Eccles, 2001).

Tumormodelle können sich weiter in solche mit „spontaner“ und solche mit „experimenteller“ Metastasierung unterscheiden. Spontane Metastasierungsmodelle beinhalten eine extravasale Tumorzellinokulation (TZI) an einen definierten Ort des Wirtes, eine anschließende Primärtumorentwicklung sowie die spontane Entstehung von Metastasen nach Abfolge meist aller in Abb. 2.1 beschriebener Metastasierungsschritte. Experimentelle Metastasierungsmodelle wie die in der Arbeit verwendeten beruhen dagegen auf einer intravasalen TZI in das Blutgefäßsystem. Diese kann als intrakardiale, zentralvenöse (*Vena portae*) oder, wie in dieser Arbeit durchgeführt, als risikoarme, zuverlässige und hoch reproduzierbare Injektion in die gut zugängliche Schwanzvene von Mäusen erfolgen (Krüger et al., 1998). Nach intravenöser Injektion einer definierten Anzahl von Tumorzellen kommt es zu einer typischen Bildung von Mikro- und später Makrometastasen (siehe 2.1.1) in dem Zielorgan der Metastasierung des jeweiligen Modells, wie z.B. der Leber im T-Zell Lymphommodell (Krüger et al., 2005) und der Lunge im Fibrosarkommodell (Kopitz et al., 2005). Die Anzahl der Metastasen ist dabei von Modell zu Modell unterschiedlich, innerhalb eines Modells aber weitgehend konstant (Fidler, 2003). Experimentelle Metastasierungsmodelle ahmen, im Gegensatz zu solchen mit spontaner Metastasierung, nur die späten Schritte der Metastasenentstehung nach. Diese erstrecken sich nach TZI von der Zirkulation und Überleben der Tumorzellen im Blutkreislauf (Abb. 2.1, 4) über mehrere Zwischenschritte (siehe 2.1.1) bis hin zur Etablierung und Auswachsen von Mikrometastasen zu Makrometastasen in einem sekundären Organ (Abb. 2.1). Frühere Metastasierungsschritte wie z.B. Ablösung vom Primärtumor, Invasion in das umliegende Gewebe und Intravasation von Tumorzellen (Abb. 2.1, 1 bis 4) können dabei nicht simuliert werden

(Ossokowski, 1996; Francis und Amirhosravi, 2002). Allerdings ist vom experimentellen T-Zell Lymphommodell eine über die Zeit zunehmende und von etablierten Metastasen ausgehende Mikrometastasierung der Leber mit einem sprunghaften Infiltrationsanstieg 6 Tage nach TZI bekannt (Krüger et al., 1994 a und b; Krüger et al., 1998). Ob diese etablierten Metastasen sich im Lebergewebe befinden, oder ob es sich um Metastasen eines weiteren Organs wie z.B. der Milz handelt, konnte noch nicht vollständig geklärt werden (unveröffentlichte Daten AG Krüger).

Metastatische Herde lassen sich oft schlecht vom Wirtsgewebe unterscheiden (Robinson, 2000). Dies erschwert die Evaluierung von Therapieeffekten in experimentellen Metastasierungsmodellen aufgrund eingeschränkter Visualisierung und Quantifizierung von Metastasen. Die Verwendung genetisch markierter Tumorzellen, wie z.B. die in dieser Arbeit eingesetzten, mit dem *lacZ*-Gen aus *E. coli* markierten Tumorzellen (Krüger et al., 1994 a), ist hierbei von Vorteil. Das Gen kodiert für das Enzym β -D-Galactosidase (Pardee et al., 1958), welches zu einer Hydrolyse intrazellulärer chromogener Substrate wie z.B. dem hier verwendeten 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) führt. Dies hat im Fall von X-Gal eine Präzipitation von Indigo im Cytoplasma von Tumorzellen zur Folge, das als blauer Farbstoff imponiert (Pearson, 1963). Durch das Anfügen einer sogenannten *nuclear leader sequence* (kurze Sequenz des nukleären SV40 *large T* Antigen) an das *lacZ*-Gen wird die β -D-Galactosidase nach Translation im Cytoplasma in den Zellkern transportiert und akkumuliert dort (Krüger et al., 1994 a). Dies führt z.B. bei den verwendeten L-CI.5s Lymphomzellen (siehe oben) aufgrund ihres in Relation zum Zytoplasma großen Zellkerns zu einer Intensivierung der Färbung. Mit dem *lacZ*-Gen markierte Tumorzellen können nach X-Gal Färbung als Metastasen sogar in Form einzelner Zellen auf Organoberflächen eindeutig visualisiert und quantifiziert werden (Krüger et al., 1994 a).

Obwohl experimentelle Metastasierungsmodelle die Metastasierung im Menschen nie vollständig widerspiegeln können, dienen sie doch dazu, den Einfluss antimetastatischer Therapien auf entscheidende Schritte der Metastasierung zu untersuchen (Francis und Amirhosravi, 2002). Solche Metastasierungsmodelle, vor allem in Verbindung mit therapeutischen Regimen wie einer antimetastatischen Behandlung der Tiere vor Inokulation der Tumorzellen (Vorbehandlung), stellen keine rein künstlich hervorgerufene experimentelle Therapiesituation dar. Vielmehr sind sie, wie schon von Hejna et al. beschrieben, von großer Bedeutung für die Simulation bestimmter klinischer Szenarien (Hejna et al., 1999). Ein solches Beispiel wäre die *iatrogen* ausgelöste Streuung von Tumorzellen bei chirurgischer Entfernung oder operativer Größenreduktion eines Tumors, die auch bei größter operativer Umsicht (z.B. „*no touch*

isolation technique“) nie ganz ausgeschlossen werden kann. Dadurch entstehende Lokal- oder Fernmetastasen führen zu einer erheblichen Prognoseverschlechterung (Atkin et al., 2005; Hirota et al., 2005). Dieses Risiko könnte durch eine präoperative antimetastatische Vorbehandlung verringert werden, wie auch schon mit einem Proteasehemmstoff in einem experimentellen Metastasierungsmodell angedeutet worden ist (Tsuchiya et al., 2003).

An der Progression und Metastasierung von Tumoren sind sowohl *in vivo* in Tiermodell und Mensch wie auch *in vitro* proteolytische Enzyme wesentlich beteiligt.

2.2 An Krebsgeschehen und Metastasierung beteiligte proteolytische Enzyme

Die Entwicklung und Progression bösartiger Tumoren steht in Zusammenhang mit der Überexpression und verstärkten Aktivität unterschiedlicher Proteasen, ihrer Substrate und Inhibitoren (auch Krebs-Degradom genannt; Lopez-Otin und Overall, 2002) aus den Familien der Serin-, Matrix Metallo-(MMP) und Cathepsinproteasen (Dano et al., 2005; Fehrenbacher und Jaattela, 2005; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Den sezernierten Proteasen dieser Familien wie z.B. den Serinproteasen Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA) und Plasmin, den MMPs 2, 3 und 9, sowie den lysosomalen Cysteinproteasen Cathepsin B und L und der Aspartylprotease Cathepsin D kommt dabei eine zentrale Bedeutung zu. Zum einen fördern sie den Abbau extrazellulärer Grundsubstanz (*extracellular matrix*, ECM; die ECM ist das Proteinnetzwerk, das Zellen und Gewebe umgibt). Zum anderen spielen sie eine entscheidende Rolle bei Wachstum, Angiogenese, Apoptose, Regulation des Immunsystems und *multi-drug resistance* von Tumorzellen sowie der Metastasierung (Mignatti und Rifkin, 1993; Reuning et al., 1998; Koblinski et al., 2000; Gottesman et al., 2002; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Die Mitglieder dieser Proteasefamilien sind in den letzten Jahren hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz für die Prognose von Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren umfangreich untersucht worden. Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression dieser Proteasen oft mit einer schlechten Prognose für die Krebspatienten verbunden ist (Unheilbarkeit des Krebsleidens, Verkürzung des Überlebens, erneutes Auftreten des Tumors nach Therapie; Vihinen und Kähäri, 2002; Jedeszko und Sloane, 2004; Han et al., 2005). Daher stellen oben genannte Proteasen aufgrund der umfassenden Beteiligung an Wachstum und Metastasierung von Tumoren hoch attraktive und viel versprechende Zielstrukturen für die Krebstherapie dar (Jedinak und Maliar, 2005; Lah et al., 2006). Insbesondere von der MMP-Familie ist schon seit langem eine zentrale Rolle im Krebsgeschehen bekannt (Nagase und Woessner, 1999).

2.2.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Die Familie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) besitzt als gemeinsame strukturelle Grundlage ein Zinkion im aktiven Zentrum der Moleküle sowie zusätzlich ein strukturelles Zink- und zwei bis drei strukturelle Kalziumionen (Bode und Huber, 2000; Folgueras et al., 2004). Sie besteht gegenwärtig aus 24 Zink-abhängigen Endopeptidasen (Folgueras et al., 2004). Diese können aufgrund ihrer Struktur, Substratspezifität und Lokalisation in die sechs Untergruppen Kollagenasen, Gelatinasen, Membrantyp-Metalloproteasen, Stromelysine, Matrilysine sowie weitere MMPs eingeteilt werden (Visse und Nagase, 2003). Etliche Mitglieder dieser Familie spielen eine zentrale Rolle in vielen physiologischen Stoffwechselprozessen wie z.B. Embryogenese, Wiederherstellung („*remodelling*“) und Homöostase der extrazellulären Gewebestruktur, Wundheilung, Angiogenese und angeborener Immunität (Visse und Nagase, 2003; Overall, 2004; Parks et al., 2004; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Zudem sind sie an pathophysiologischen Prozessen wie Atherombildung, Arthritis, Gewebeulzeration und kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt (Creemers et al., 2001; Visse und Nagase, 2003). Darüber hinaus ist die MMP-Familie die erste Proteasefamilie, von der eine umfassende Beteiligung bei der Progression von Tumoren und der Metastasierung beschrieben wurde (Chambers und Matrisian, 1997; Nagase und Woessner, 1999; Mannello et al., 2005; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Insbesondere den Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) konnte eine entscheidende Funktion bei der Entwicklung und Metastasierung vieler Tumoren nachgewiesen werden (Egeblad und Werb, 2002; Lynch und Matrisian, 2002; Mook et al., 2004). Die Mitglieder der MMP-Familie können nahezu alle Bausteine der extrazellulären Grundsubstanz abbauen, was für verschiedene Schritte der Tumorausbreitung entscheidend ist (siehe 2.1.1; Chambers und Matrisian, 1997; Mannello et al., 2005; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Aktive MMPs können selbst weitere MMPs aktivieren (Visse und Nagase, 2003). MMPs spielen auch an der Regulation anderer tumorassoziierter Proteasesysteme eine Rolle: MMP-12 kann z.B. an der Abspaltung (*shedding*) des Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Rezeptors (uPAR, siehe unten) und damit an Chemotaxis und Angiogenese beteiligt sein (Andolfo et al., 2002; D'Alessio et al., 2004). Es ist auch eine Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (*protease activated receptors*, PARs) durch MMPs beschrieben (Pei, 2005), die eine Rolle in der Progression maligner Tumoren haben (Ossovskaya und Bunnett, 2004; siehe 2.2.2.2). Eine Hochregulation oder Überexpression von MMPs, insbesondere von MMP-2 und -9 korreliert mit einem fortgeschrittenen, oft metastasierten Tumorstadium und einer schlechten Prognose für Krebspatienten (Vihinen und Kähäri, 2002; Davidson et al., 2004; Weigelt et al., 2005). Dies kann auch in experimentellen Metastasierungsmodellen wie

z.B. dem T-Zell Lymphommodell beobachtet werden (siehe 2.1.2), in dem eine Überexpression von MMP-9 mit der zunehmenden Metastasenbelastung der Leber korreliert (Arlt et al., 2002). Von manchen MMPs ist auch eine gegenteilige Funktion bei der Tumorprogression im Sinne einer Schutzfunktion bekannt. In *in vivo*-Tumormodellen z.B. hat die Hemmung solcher MMPs eine verstärkte Tumorprogression zur Folge (siehe unten; Overall und Lopez-Otin, 2002; Folgueras et al., 2004; Overall und Kleinfeld, 2006 a und b). Als weitere große Proteasefamilie ist auch insbesondere von der Serinproteasefamilie eine maßgebliche Involvierung in der Tumorprogression bekannt (DelRosso, 2002).

2.2.2 Serinproteinasen

Serinproteinasen sind ebenso wie die Matrix Metallo-, Cystein- und Aspartylproteasen eine Unterklasse der Proteasen (Rooprai und McCormick, 1997; Barrett et al., 2004). Diese Enzymgruppe besitzt als gemeinsame strukturelle Grundlage einen aktiven Serinrest im katalytischen Zentrum, der, in Verbindung mit zwei weiteren Aminosäuren, grundlegend für die katalytische Aktivität dieser Enzyme ist (Barrett et al., 2004). Viele Mitglieder der sehr großen Familie der Serinproteasen (Powers et al., 1993) sind unverzichtbarer Bestandteil lebenswichtiger physiologischer Stoffwechselfvorgänge. Dabei sind z.B. die Blutgerinnungskaskade (Walsh und Ahmad, 2002), Fibrinolyse (Longstaff und Thelwell, 2005), Verdauung (Hooper et al., 2001), Immunantwort (Moraes et al., 2006), Wundheilung, Embryogenese, Ovulation, Entzündungsreaktion, Entwicklung von Blutgefäßen (Montuori et al., 2005) oder auch die Regulierung von neuronaler Funktion und neuronalem Überleben (Tsirka, 2002) zu nennen. Eine Funktionseinschränkung oder ein Ausfall solch lebensnotwendiger Serinproteasen kann zu schweren Erkrankungen mit lebenslangen Behinderungen und tödlichen Komplikationen führen (Telfer et al., 1956; Schuster et al., 1997; Schuster et al., 1999; Soucie et al., 2000; Hoots, 2006). Diverse Mitglieder aus der Familie der Serinproteasen sind auch in vielen Schritten des invasiven Tumorwachstums und der Metastasierung (siehe 2.1.2) involviert (Koblinski et al., 2000). Dabei konnte insbesondere das Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System) mit der malignen Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (Reuning et al., 1998).

2.2.2.1 Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-System (uPA-System)

Das uPA-System besteht aus dem Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA), seinem Rezeptor uPA Rezeptor (uPAR, CD87), den Plasmino-

gen-Aktivator-Inhibitoren (PAI)-1 und -2 und Plasmin, bzw. dessen inaktive Vorstufe Plasminogen. uPA (Abb. 2.2) wie auch der zweite Plasminogen-Aktivator Gewebe-Typ Plasminogen-Aktivator (*tissue-type plasminogen activator*, tPA; Abb. 2.2) sind Trypsin-ähnliche Serinproteasen. Beide sind Mitglieder des Plasminogen-Aktivator-Systems, können Bestandteile der ECM (zum Beispiel Kollagen, Fibrin, Fibro- und Vitronektin, Proteoglykane) abbauen und die inaktive Vorstufe Plasminogen in das katalytisch aktive Plasmin überführen, eine Serinprotease mit einem breiten Wirkspektrum (siehe unten, Abb. 2.2; Reuning et al., 1998). Die biologische Hauptaufgabe des vorwiegend vom Blutgefäßendothel gebildeten tPA scheint in der Aufrechterhaltung neurobiologischer Funktionen und der direkten Aktivierung der Fibrinolyse zu bestehen. Letzteres verhindert die Entstehung von Blutgerinnseln oder führt zu einem Abbau vorhandener Gerinnsel und stellt damit einen wichtigen Schutz vor Thrombosen dar. uPA hingegen ist in der normalen Physiologie das zentrale Molekül bei der perizellulären Proteolyse sowie der Wiederherstellung der Gewebestruktur („Remodelling“), was z.B. bei der Wundheilung und weiteren Stoffwechselprozessen von großer Bedeutung ist (Dano et al., 1985; Mayer, 1990; Castellino und Ploplis, 2005; Melchor und Strickland, 2005; Montuori et al., 2005). uPA wird sowohl von nicht-transformierten wie auch Tumorzellen als inaktives Proenzym (pro-uPA) gebildet und freigesetzt. Das entstandene pro-uPA (Abb. 2.2), welches

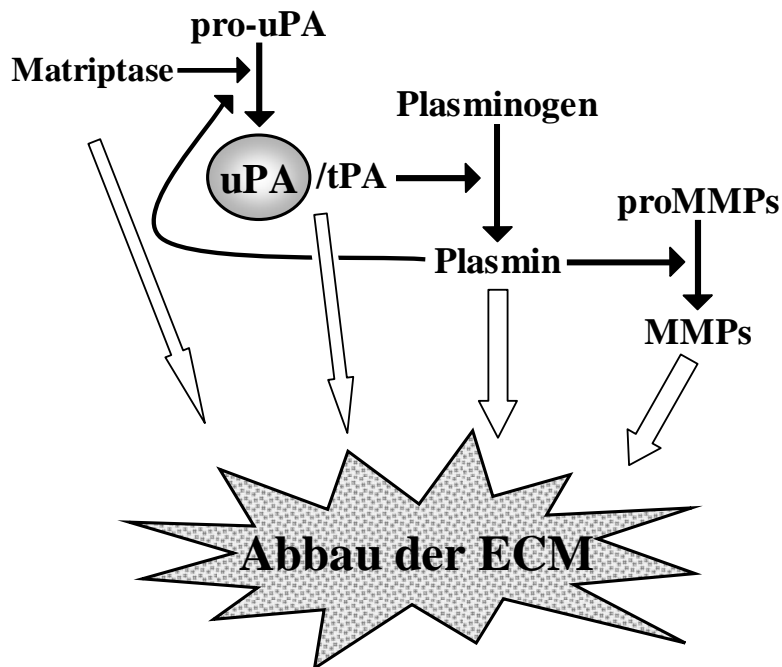


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des uPA-Systems. Dargestellt ist die zentrale Rolle von uPA im Plasminogen-Aktivator-System (Mitte), die Aktivierung von uPA durch Matriptase (MT-SP1; links) sowie der Einfluss von uPA auf die Aktivierung von MMPs (rechts). Genauere Beschreibung siehe Text.

aus einer Einzel-Polypeptidkette besteht, kann dann mit hoher Affinität an den spezifischen Zelloberflächenrezeptor Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR, CD87) auf der Zelloberfläche, wo er meist überexprimiert vorhanden ist, binden (Reuning et al., 1998; Montuori et al., 2005). Rezeptorgebundenes (und auch in geringerem Maße ungebundenes) pro-uPA wird hauptsächlich und sehr effizient durch Plasmin unter limitierter Proteolyse in das enzymatisch aktive uPA (*high molecular weight*-, HMW-uPA) umgewandelt (Abb. 2.2). Dieses besitzt zwei miteinander durch eine Disulfidbrücke verbundene Polypeptidketten. An der Aktivierung von uPA können aber auch in weniger effizientem Maße einige andere Proteasen wie z.B. die transmembranständige Serinprotease Matriptase (MT-SP1; Abb. 2.2), die Cathepsine B und L oder Plasmakallikreine beteiligt sein (Goretzki et al., 1992; Schmitt et al., 1992; Hashimoto et al., 2003; Suzuki et al., 2004). Die weitere Spaltung von HMW-uPA kann zu enzymatisch aktivem niedermolekularem (*low molecular weight*)-uPA mit der Freisetzung des aminoterminalen uPA-Fragmentes (ATF) führen. Das an der (Tumor-) Zelloberfläche konzentriert vorhandene, enzymatisch aktive HMW-uPA katalysiert wiederum die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin mit viel größerer Wirksamkeit als freies uPA (Andreasen et al., 2000; Reuning et al., 2003a; Dano et al., 2005). Die physiologische Hauptaufgabe von Plasmin (Abb. 2.2 und 2.3) besteht in dem ständigen Abbau fibrinhaltiger Blutgerinnsel und damit der Offenhaltung des Blutgefäßsystems. Plasmin spielt auch bei der extrazellulären Proteolyse von Proteinnetzwerken bei Wundheilung, Embryogenese und vielen anderen Prozessen eine wichtige Rolle (Castellino und Ploplis; 2005). Während die vererbare und mit schweren Symptomen verbundene Krankheit *Konjunktivitis lignosa* auf einem genetischen Defekt für Plasminogen beruht, ist kein Gendefekt für uPA oder uPAR bekannt (Schuster et al., 1997).

Für das Krebsgeschehen spielen die Serinproteasen uPA und Plasmin sowie die übrige Plasminogenaktivierungskaskade und deren physiologische Inhibitoren, wie zum Beispiel PAI-1 und -2 bekanntlich eine maßgebliche Rolle, wie es in vielen Tumormodellen gezeigt werden konnte (Sidenius und Blasi, 2003; Dano et al., 2005). Diese Faktoren sind am Abbau von Bestandteilen der ECM (siehe oben, Abb. 2.2) vor allem in der direkten Umgebung der Tumorzelle beteiligt (Reuning et al., 1998), wodurch es zu der Freisetzung und Aktivierung von Wachstumsfaktoren wie z.B. des Hepatozyten Wachstumsfaktors (*hepatocyte growth factor/scatter factor*, HGF), transformierenden Wachstumsfaktors (*transforming growth factor*, TGF)- β und basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors (*basic fibroblast growth factor*, bFGF)-2 kommen kann. Dies ermöglicht es den Tumorzellen abzuwandern und in verschiedene Gewebe einzubrechen. Auch das Eindringen in (Intravasation) und Austreten von Tu-

morzellen aus dem Gefäß- und Lymphsystem (Extravasation) wird dadurch gefördert (Abb. 2.1). Darüber hinaus kann das uPA-System auch durch direkte Interaktion mit den Tumorzellen zu deren Wachstum, Vermehrung, Chemotaxis, Abwanderung und Gewebeadhäsion beitragen. Neben allen oben genannten Punkten, die eine Verstärkung von Tumorprogression und Metastasierung zur Folge haben (Reuning et al., 1998; Schmitt et al., 2000; Reuning et al., 2003b; Castellino und Ploplis, 2005), kann uPA auch direkt oder über die proteolytische Kaskade und die Bildung von Plasmin Enzyme anderer Proteaseklassen aktivieren. Diese können ebenfalls einen fördernden Einfluss auf die Entwicklung und Metastasierung von Tumoren ausüben (DeClerck et al., 1997; Schmitt et al., 2000; Rabbani und Mazar, 2001). Zusätzlich zu der direkten Aktivierung von MMP-2 und -9 durch uPA (Quigley et al., 1987; Baramova et al., 1997) ist auch Plasmin in der Lage, neben uPA und tPA aktive MMPs, wie zum Beispiel MMP-2 und -9 über eine Aktivierung von MMP-3 (Stromelysin 1) zu generieren (Abb. 2.2; Baramova et al., 1997; Mazzieri et al., 1997; Ramos-DeSimone et al., 1999; Lijnen, 2001). Darüber hinaus haben klinische Studien gezeigt, dass es bei Krebspatienten, vor allem bei solchen mit besonders aggressiven metastasierenden Tumor-Phänotypen, zu einer Erhöhung der Spiegel von uPA, uPAR und PAI-1 kommen kann. Diese zeigen, insbesondere bei bestimmten Krebsarten wie z.B. Brust-, Eierstock-, Speiseröhren-, Magen-, Darm- und Leberzellkrebs, eine hohe Korrelation mit dem Erkrankungsstadium. Dies macht uPA zu einem wertvollen tumorbiologischen Diagnose- und Prognosefaktor in der Klinik und zu einem attraktiven Ziel für Krebstherapeutika (Sidenius und Blasi, 2003; Schmitt et al., 2004; Han et al., 2005). Allerdings gibt es auch erste Hinweise auf eine gegenteilige Funktion von uPA bei der Tumorprogression im Sinne einer anti-angiogenen und anti-proliferativen Schutzfunktion für den Wirt, was eine verzögerte Tumorprogression zur Folge haben kann (Merchan et al., 2006). Neben dem uPA-System ist auch vor allem von etlichen Mitgliedern des Blutgerinnungssystems ein fördernder Einfluß auf das Krebsgeschehen bekannt (Francis et al., 1998).

2.2.2.2 Blutgerinnungsfaktor Xa (FXa) und weitere Enzyme der Gerinnungskaskade

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass auch das Blutgerinnungssystem (Abb. 2.3) eine wichtige Rolle in der Biologie bösartiger Tumorerkrankungen spielt (Trousseau, 1895; Francis et al., 1998; Zacharski, 2003; Boccaccio und Comoglio, 2005; Xie et al., 2005). Krebspatienten mit Tumorerkrankungen unterschiedlichster Genese weisen sehr oft einen Zustand erhöhter Gerinnungsaktivität auf (Prandoni et al., 2005; Wada et al., 2005), der nicht nur durch die Krebserkrankung selbst, sondern auch durch eine unspezifische, tumortypische Entzündungsreaktion des Wirtes ausgelöst werden kann (De Cicco, 2004). Diese systemische Stö-

rung der Blutgerinnung nimmt im Verlauf der Krebserkrankung meist zu und kann, verursacht durch einen massiven Gewebsuntergang im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium, dramatische Ausmaße annehmen (Caine et al., 2002). Durch die Gerinnungsaktivierung kann es zu einer Vielzahl schwerwiegender klinischer Komplikationen kommen. Im Vordergrund stehen dabei thrombotische Ereignisse, die entweder örtlich begrenzt sind und sich auf bestimmte Gefäßabschnitte beschränken, oder über das gesamte Gefäßsystem des Körpers verteilt auftreten (Falanga und Zacharski, 2005; Horton, 2005). Venöse thrombembolische Ereignisse, wie z.B. die Lungenembolie nach tiefer Beinvenenthrombose, stellen bei Krebspatienten die zweithäufigste Todesursache nach der Erkrankung selbst dar (Cohen et al., 2005; Pruemer, 2005). Eine idiopathische (ohne erkennbare Ursache auftretende) venöse Thrombose kann

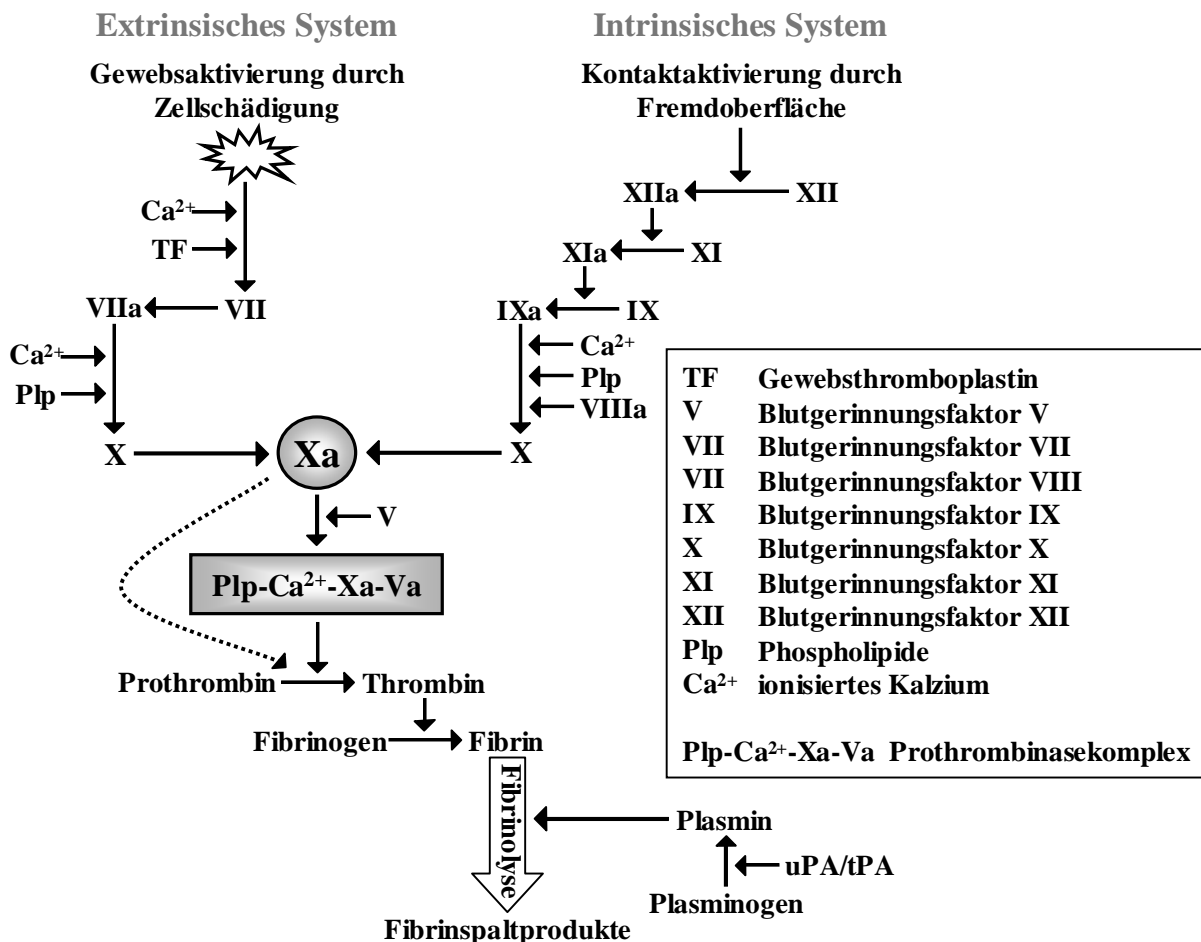


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade. Vereinfacht dargestellt sind die intrinsische (endogene) und extrinsische (exogene) Kaskade der Blutgerinnung, die beide über eine Aktivierung der zentral positionierten Serinprotease Faktor Xa und dem nachgeschalteten Prothrombinasekomplex zu einer Bildung von Fibrin und damit Blutgerinnseln führen. Der gestrichelte Pfeil weist auf die Möglichkeit einer direkten, für die Gerinnungsaktivierung unbedeutenden Aktivierung von Prothrombin durch freien FXa hin. Unten gezeigt ist der fibrinolytische Einfluss des uPA-Systems. Genauere Beschreibung siehe Text.

auch die erste Manifestation eines Krebsleidens sein, das ansonsten asymptomatisch ist. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die idiopathische venöse Thrombose mit einem signifikant erhöhten Risiko einer zugrunde liegenden Krebserkrankung einhergeht (Rickles und Levine, 2001; Bura et al., 2004). Als weitere ernstzunehmende Komplikation einer Krebserkrankung ist das Auftreten von Blutungen unterschiedlichen Ausmaßes aufgrund eines Verbrauchs von Gerinnungs- und Kofaktoren der Gerinnungskaskade (Abb. 2.3) im Rahmen einer disseminierten intravasalen Gerinnung zu nennen, verursacht durch die generalisierte Gerinnungsaktivierung (De Cicco, 2004; Labelle und Kitchens, 2005).

Neben diesen komplikationsreichen Auswirkungen der Krebserkrankung auf die Blutgerinnung gibt es auch vielfache Hinweise darauf, dass das Blutgerinnungssystem selbst entscheidend an Krebsgeschehen und Metastasierung mitwirken kann. Erste Hinweise dazu kamen von dem Chirurgen Theodor Billroth. Er formulierte schon im Jahr 1878 eine Theorie, nach welcher Tumorzellen in Gerinnungsthromben des Primärtumors überleben können und nach Abscheidung in den Blutkreislauf als Emboli im Lumen kleinerer Gefäße stecken bleiben. Dies war das erste Anzeichen für eine Rolle der Gerinnungsaktivierung bei der Metastasierung (Billroth, 1878). Inzwischen ist es, auch aus zahlreichen tierexperimentellen Studien, bekannt, dass viele Bestandteile des Blutgerinnungssystems (Abb. 2.3) wie z.B. Gewebsthromboplastin (*tissue factor*, TF; Versteeg et al., 2004; Forster et al., 2006), Fibrinogen (Staton et al., 2003) und etliche Gerinnungsfaktoren aus der Klasse der Serinproteasen (Putnam et al., 2003; Hu et al., 2004; Xie et al., 2005) zu der Entwicklung bösartiger Tumoren beitragen können. Dabei fördern sie Wachstum und Angiogenese von Tumoren und führen zu einer verstärkten Metastasierung (Sampson und Kakkar, 2002; De Cicco, 2004). Gewebsthromboplastin im Komplex mit der Serinprotease Gerinnungsfaktor VIIa (FVIIa, Abb. 2.3; Hembrough et al., 2003; Mousa, 2005) sowie die Serinprotease Thrombin (Rickles et al., 2003) können diese Effekte sogar durch neue, von der Gerinnung unabhängige Signaltransduktionskaskaden erzielen.

Der Blutgerinnungsfaktor Xa (*Stuart(-Prower)-factor*, FXa, Abb. 2.3; Venkateswarlu et al., 2002) ist eine weitere, in der Leber gebildete Serinprotease der Blutgerinnungskaskade und kann zwei voneinander völlig unabhängige Funktionen ausüben: Aufgrund der zentralen Position am Konvergenzpunkt von intrinsischem (Aktivierung von FX durch eine proteolytische Kaskade plasmatischer Gerinnungsfaktoren wie z.B. den Serinproteasen Faktor XII, XI, IX, ausgelöst durch Kontaktaktivierung) und extrinsischem Weg (Aktivierung von FX durch Komplex aus TF und FVIIa, ausgelöst durch Aktivierung von Phospholipiden aus Gewebezellen) innerhalb der Blutgerinnungskaskade erfüllt sie eine äußerst bedeutsame Aufgabe für die

lebenswichtige Blutgerinnung (Abb. 2.3; Furie und Furie, 1988). Dies wird besonders deutlich im Fall eines angeborenen Mangels des Enzyms (Stuart[-Prower]-Krankheit; autosomal rezessiv erblich), wo es zu der Manifestation einer hämorrhagischen Diathese mit mäßiger bis starker Blutungsneigung kommt (Telfer et al., 1956; Hougie et al., 1957). Neben dieser zentralen Position ist FXa auch unverzichtbarer Bestandteil des Prothrombinasekomplexes (FXa, FVa, ionisiertes Kalzium und Phospholipide) in der Gerinnungskaskade (Abb. 2.3). Der Komplex ist für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin verantwortlich, was zu der Bildung von Fibrin und letztendlich Fibringerinnseln führt (Stassen et al., 2004). Komplexgebundener FXa ist 300.000 mal wirkungsvoller bei der proteolytischen Spaltung von Prothrombin zu Thrombin als freier FXa (gestrichelter Pfeil, Abb. 2.3), dessen Aktivität für eine direkte Gerinnungsaktivierung nicht ausreicht (Mann et al., 1990; Bukys et al., 2005). Eine Aktivierung der Blutgerinnung jeglichen Ursprungs kann, wie oben erwähnt, einen fördernden Einfluss auf das Krebsgeschehen haben. Daher kann FXa auch allein aufgrund seiner zentralen Position in der Gerinnungskaskade im Rahmen einer verstärkten Blutgerinnung indirekt zu der Metastasierung beitragen (Francis et al., 1998; Lee, 2002; Mandala et al., 2003). Zudem können Tumorzellen selbst eine direkte „FX-aktivierende Aktivität“ besitzen, in dem sie unter anderem gerinnungsaktive Substanzen bilden, wie etwa das Gewebsthromboplastin oder die Cysteinprotease „*Cancer Procoagulant*“. Beide bewirken eine direkte Aktivierung von Faktor X, der dann zu einer Aktivierung der Gerinnung und damit zu einer verstärkten Metastasierung führen kann (Francis et al., 1998; Lee, 2002; Sampson und Kakkar, 2002).

Alle oben genannten physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von FXa sind mit der gerinnungsaktivierenden Eigenschaft des Enzyms in der Blutgerinnungskaskade verbunden. Völlig unabhängig davon gibt es immer mehr Hinweise, dass FXa auch aufgrund seiner Aktivitäten außerhalb der Blutgerinnungskaskade zu verschiedenen Krankheiten wie zum Beispiel akuten Entzündungsreaktionen, Restenosierung von Gefäßen, Sepsis, Hypotension und auch Krebs beitragen kann. Diese Schlussfolgerungen konnten unter anderem durch den Einsatz von FXa-Inhibitoren gezogen werden (Donnelly et al., 1998; Leadley et al., 2001; Ilies et al., 2002; Bruggemann et al., 2005). Zum einen ist FXa an einer Signaltransduktionskaskade mit Gewebsthromboplastin/Blutgerinnungsfaktor VIIa beteiligt. Zum anderen kann er auch Signaltransduktionskaskaden durch Bindung an den auf der Oberfläche mancher Tumorzellen exprimierten Rezeptor Protease-aktivierter Rezeptor-2 (*protease activated receptor-2*, PAR-2) auslösen. Über beide gerinnungsunabhängigen intrazellulären Signalwege kann FXa Entwicklung und Progression maligner Tumoren fördern. Zudem gibt es vermehrt Hinweise, dass die Bindung von FXa an den Zelloberflächenrezeptor *effector cell protease*

receptor-1 (EPR-1) und die dadurch ausgelöste Signaltransduktionskaskade an der Entwicklung von Tumoren beteiligt ist (Adida et al., 1996; Bono et al., 2000; Leadley et al., 2001; Sampson und Kakkar, 2002; Jiang et al., 2004; Morris et al., 2006). Neben oben genannten Proteasen der Blutgerinnungskaskade wird auch die Serinprotease Matriptase (MT-SP1) mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht.

2.2.2.3 Matriptase

Die membranständige Serinprotease Matriptase (MT-SP1) ist Mitglied der Familie der transmembranständigen Serinproteasen (Hooper et al., 2001; Szabo et al., 2003). Sie ist ein dem FXa (siehe 2.2.2.2) strukturell ähnliches Enzym, da sie eine ebenso enge S2-Bindungsposition besitzt. Dies hat eine Bevorzugung ähnlicher Substrate zur Folge (Friedrich et al., 2002). Die Funktion von Matriptase in der normalen Physiologie ist noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass sie verstärkt im Epithelgewebe vorhanden ist und dort, möglicherweise aufgrund ihrer proteolytischen Aktivität, zu der Entwicklung von Epidermis, Haarfollikel und Immunsystem beiträgt (List et al., 2002; Oberst et al., 2003). Matriptase kann sowohl Bestandteile der ECM (siehe oben) wie Laminin und Fibronectin proteolytisch abbauen (Abb. 2.2), als auch zu der Entstehung der biologisch aktiven Formen von *hepatocyte growth factor* (HGF/*scatter factor*), uPA (siehe 2.2.2.1; Abb. 2.2) und PAR-2 (siehe 2.2.2.2) führen (Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000; Satomi et al., 2001; Suzuki et al., 2004). Sowohl HGF als auch uPA (siehe 2.2.2.1; Abb. 2.2) sind an der Regulation des Abbaus der ECM sowie an Proliferation, Überleben und Motilität von Zellen beteiligt (Andreasen et al., 2000; Comoglio und Boccaccio, 2001), Vorgänge die für die Tumorprogression und Metastasierung entscheidend sind (siehe 2.1.1). Es konnte gezeigt werden, dass Matriptase über eine Aktivierung von pro-HGF wie auch pro-uPA die Invasivität von Tumorzellen fördern kann (Suzuki et al., 2004; Forbs et al., 2005). Zudem lässt sich Matriptase in einer Vielzahl von Tumorzellen/-geweben *in vitro* und *in vivo* nachweisen (Oberst et al., 2001; Tanimoto et al., 2001). Die Expression dieser Protease zeigt sich im Verlauf der Tumorprogression zunehmend dysreguliert und erhöht (Benaud et al., 2002; Netzel-Arnett et al., 2003). Das Vorhandensein des Enzyms korreliert sogar mit der Aggressivität und klinischen Prognose von Tumoren (Oberst et al., 2002). Zudem gibt es zunehmend Hinweise aus *in vivo* Tumormodellen, dass auch Matriptase direkt einen fördernden Einfluss auf die Metastasierung von Tumorzellen ausüben kann (Ihara et al., 2002; List et al., 2005). Zusammengefasst kann Matriptase die Progression von Tumoren beeinflussen, indem das Enzym entweder als vorgeschalteter Aktivator für pro-HGF, pro-

uPA (Abb. 2.2) oder PAR-2 (siehe 2.2.2.2) auf der Oberfläche von Tumorzellen fungiert oder direkt zu einem Abbau der ECM beiträgt.

2.2.3 Interaktionen tumorassoziierter Proteasefamilien

Proteolytische Systeme können sich, ähnlich den Signaltransduktionswegen, gegenseitig aktivieren und regulieren (DeClerck et al., 1997; Wagener, 1999; Del Rosso et al., 2002) und bilden damit ein dynamisches Netzwerk von miteinander verbundenen Systemen, Kaskaden und Kreisläufen (DeClerck et al., 1997; Overall und Kleifeld, 2006 b). Diese Kenntnis und Beachtung dessen ist vor allem von Bedeutung, wenn in solche Systeme therapeutisch eingegriffen wird (siehe unten). Dadurch können unerwünschte Effekte und weit reichenden Nebenwirkungen, ausgelöst durch eine Störung des gesamten proteolytischen Gleichgewichts, vermieden werden (Overall und Kleifeld, 2006 b). Metalloproteasen z.B. können, neben der Aktivierung weiterer pro-MMPs, das uPA-System (siehe 2.2.2.1) beeinflussen, indem sie eine Abspaltung (*shedding*) des uPAR von der Zelloberfläche bewirken. Dadurch können uPAR-abhängige Funktionen wie z.B. die Aktivierung von Plasmin gehemmt werden (Streuli, 1999; Andolfo et al., 2002; D'Allesio et al., 2004). MMPs, wie z.B. MMP-3, können auch die Menge aktivierbaren Plasminogens an der Zelloberfläche durch Abspaltung einzelner uPA- und Plasminogenfragmente herunterregulieren (Lijnen, 2001). Zudem können MMPs natürliche Cysteinproteaseinhibitoren (Cystatine) abbauen (Tam et al., 2004) und zu einer Aktivierung von PAR Rezeptoren (siehe 2.2.2.2), die bei gerinnungsunabhängigen Signalwegen von Enzymen der Gerinnungskaskade eine Rolle spielen, führen (Pei, 2005). An der Aktivierung von uPA können, neben Plasmin (Binnema et al., 1991), auch einige andere Proteasen wie z.B. die transmembranständige Serinprotease Matriptase (MT-SP1; Abb. 2.2; Suzuki et al., 2004), Plasmakallikreine (Hashimoto et al., 2003), die Cathepsine B und L oder der Blutgerinnungsfaktor XIIa beteiligt sein (Andreasen et al., 1997). uPA wiederum ist, genauso wie Plasmin und eine Reihe von Cathepsinen in der Lage, Einfluss auf das MMP-System auszuüben, indem sie etliche Zymogene (inaktive Proformen) aus der Familie der MMPs aktivieren können (Mignatti und Rifkin, 1993; Visse und Nagase, 2003). Auch Faktor Xa aus der Blutgerinnungskaskade kann das MMP-System beeinflussen, indem das Enzym z.B. die Freisetzung und Aktivierung von MMP-2 aus glatten Muskelzellen fördert, was zu einer verstärkten Invasivität der Zellen führt (Rauch et al., 2002). Proteolysekaskaden verschiedener Systeme, ausgelöst durch gegenseitige Aktivierung, sind z.B. für die Fibrinolyse und den Abbau der ECM von entscheidender Bedeutung. Die Überlappung von Substratspezifitäten unterschiedlicher Proteasen erzeugt dabei eine Redundanz (Del Rosso et al., 2002). Diese zeigt sich z.B.

in der partiellen Bevorzugung gleicher Substrate im extrazellulären Gewebe durch Plasmin, MMPs und Cathepsine (Noel et al., 1999). Die gegenseitige Aktivierung und Regulierung sowie das synergistische Zusammenspiel verschiedener Proteasesysteme bei dem Abbau der ECM und anderer Prozesse spielen bei vielen Schritten der Tumorprogression und Metastasierung eine bedeutende Rolle (Wagener, 1999). Die Kenntnis dessen ist von großer Wichtigkeit bei dem therapeutischen Eingreifen in solche Systeme (siehe 2.3).

2.3. Antimetastatische Therapie mit Proteasehemmstoffen

Diverse Mitglieder aus den Familien der Matrix Metallo- und Serinproteasen sind, wie unter 2.2 dargestellt, in vielen Schritten der Entwicklung und Progression bösartiger Tumoren bis hin zur Metastasierung involviert (Francis et al., 1998; Sampson und Kakkar, 2002; Dano et al., 2005; Lah et al., 2006; Overall und Kleifeld, 2006 a). Besonders hervorzuheben ist dabei die Serinprotease uPA. Von diesem zentralen Enzym des Plasminogen-Aktivatoren-Systems (Abb. 2.2) ist eine maßgebliche Rolle bei Tumorwachstum und Metastasierung bekannt (siehe 2.2.2.1; Reuning et al., 1998). Auch dem Blutgerinnungssystem und dabei insbesondere der Serinprotease FXa als zentrales Enzym der Gerinnungskaskade (Abb. 2.3) konnte eine entscheidende Beteiligung an der Progression und Metastasierung maligner Tumoren nachgewiesen werden (siehe 2.2.2.2; Francis et al., 1998). Von etlichen Enzymen der MMP-Familie, die nahezu alle Bausteine der extrazellulären Grundsubstanz abbauen können, ist schon lange eine tumor- und metastasierungsfördernde Wirkung bekannt (siehe 2.2.1). Dies macht gerade oben genannte Proteasen zu attraktiven und vielversprechenden therapeutischen Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente (Sampson und Kakkar, 2002; Jedinak und Maliar, 2005; Lah et al., 2006). Da die meisten krebsassoziierten Todesfälle nicht durch das Wachstum des Primärtumors, sondern durch seine Ausbreitung (Metastasierung) auf lebenswichtige Organe im Körper verursacht werden (siehe 2.1), besteht ein hoher medizinischer Bedarf an Wirkstoffen, die einerseits den Metastasierungsprozess hemmen und andererseits sicher und gut verträglich in ihrer Anwendung sind (Stadler et al., 1997; Hortobagyi, 2005). Nach den meist enttäuschenden Ergebnissen mit MMP-Hemmstoffen in klinischen Studien (siehe 2.3.1 und 2.3.2) werden zunehmend synthetische Serinproteasehemmstoffe, gerichtet gegen unter anderem uPA und FXa, entwickelt und als antimetastatische Therapeutika in präklinischen Tiermodellen sowie beginnend in klinischen Studien eingesetzt (siehe 2.3.3; Iliés et al., 2002; Jedinak und Maliar, 2005; Lah et al., 2006).

2.3.1 MMP-Inhibitoren (MMPIs)

Die Erforschung und Entwicklung von Proteasehemmstoffen als Krebstherapeutika erreichte ihren ersten Höhepunkt mit den MMP-Hemmstoffen (*matrix metalloproteinase inhibitors*, MMPIs; McCullagh et al., 1984; Overall und Lopez-Otin, 2002). Dies war darauf zurückzuführen, dass die Mitglieder der MMP-Familie nahezu alle Bestandteile der Extrazellulären Matrix abbauen können und die ersten Proteasen waren, denen eine umfassende Rolle bei der Progression maligner Tumoren nachgewiesen werden konnte (siehe 2.2.1; Chambers und Matrisian, 1997; Mannello et al., 2005; Overall und Kleifeld, 2006 a). Nach erfolgreichem Einsatz als krebstherapeutische Medikamente in zahlreichen *in vitro*-Studien und in präklinischen Tumormodellen (Coussens et al., 2002) wurden einige MMPIs sogar in klinische Studien der Phase III aufgenommen (Hidalgo und Eckhardt, 2001; Coussens et al., 2002). Das Vorhaben, Therapieerfolge gegen den Krebs durch medikamentöses Eingreifen in proteolytische Mechanismen zu erzielen, erlitt jedoch einen deutlichen Rückschlag. Die meisten klinischen Krebsstudien mit unterschiedlichen, meist unselektiven Breitspektrum-MMPIs der ersten und zweiten Generation und einigen wenigen mäßig selektiven MMPIs wurden abgebrochen. Es kam zu kleinen, gar keinen oder sogar adversiven Wirkungen auf die Tumorprogression in Krebspatienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien (Coussens et al., 2002; Fingleton, 2003; Folgueras et al., 2004; Chen und Siu, 2005; Vihinen et al., 2005). Zudem traten schwerwiegende, meist das muskuloskeletale System betreffende Nebenwirkungen auf (King et al., 2003). Darüber hinaus konnte keine Senkung der Sterblichkeit oder Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens von Krebspatienten durch die Therapie mit MMPIs gefunden werden (Zucker et al., 2000; Overall und Lopez-Otin, 2002; Mannello et al., 2005; Overall und Kleifeld, 2006 b). Die wenigen Studien mit MMPIs, die einen Therapieerfolg bei Krebspatienten zeigten, waren entweder in Kombination mit Chemotherapeutika oder bei äußerst frühen, noch nicht metastasierten Tumorstadien durchgeführt worden (Bachmeier et al., 2005; Lah et al., 2006). Auch kürzlich durchgeführte klinische Studien mit BMS-275291, einem niedermolekularen Breitspektrum-MMPI, und Prinomastat, einem für MMP-2, -3, -9 und -13 selektiven niedermolekularen MMPI (Chau et al., 2003), zeigten, als additive Gabe zu klassischen Chemotherapeutika, keine Verbesserung des Überlebens sowie keine verlangsamte Tumorprogression bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (Bissett et al., 2005; Leighl et al., 2005). Im T-Zell Lymphommodell (siehe 2.1.2) dagegen zeigte Prinomastat eine gute antimetastatische Wirkung sowohl auf die modelltypische Makro- als auch Mikrometastasierung in der Leber (siehe 2.1.1; Arlt et al., 2002). Bis jetzt war es noch nicht möglich, einen MMPI zu synthetisieren, der selektiv ein einziges Mitglied dieser Familie hemmt. Es

konnten aber Verbindungen hergestellt werden, die einzelne MMPs mit bestimmten Strukturähnlichkeiten selektiv hemmen (Jedinak und Maliar, 2005). Im T-Zell Lymphommodell (siehe 2.1.2) eingesetzt zeigte dabei ein für MMP-2 und -9 selektiver MMPI, SB-3CT, eine gute antimetastatische Wirkung mit einer 50%igen Überlebenszeitverlängerung (Krüger et al., 2005).

2.3.2 Ursachen für das bisherige Scheitern von klinischen Prüfungen mit Proteasehemmstoffen

Die Entwicklung von Proteasehemmstoffen als Krebstherapeutika hat in der Vergangenheit, trotz viel versprechender präklinischer Ergebnisse, etliche Rückschläge durch Misserfolge klinischer Studien erlitten (siehe 2.3.1; Chen und Siu, 2005; Lah et al., 2006). Ausreichend Erklärung dafür ergab sich aus den Erfahrungen, die mit den MMPIs als bisher einzige in der klinischen Krebstherapie eingesetzte Proteasehemmstoffe und den MMPs als deren therapeutische Zielstrukturen gewonnen werden konnten. Als hauptverantwortlich für deren Versagen in klinischen Prüfungen wird die mangelnde Selektivität der vorwiegend unselektiven Breitpektrum-MMPIs gegenüber der/den Zielprotease(n) angesehen (Overall und Lopez-Otin, 2002; Lah et al., 2006). MMP-9 z.B. ist eine solche bekannte Zielprotease, da von ihr eine fördernde oder protumorigene Wirkung auf die Tumorprogression bekannt ist (Bergers et al., 2000; Coussens et al., 2000; Krüger et al., 2005; Acuff et al., 2006). Eine unselektive Enzymhemmung kann verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen verursachen. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass Mitglieder aus der Familie einer Zielprotease (Overall und Kleifeld, 2006 a) zum einen von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen sein können (Egeblad und Werb, 2002; Heissig et al., 2002). Zum anderen ist von manchen MMPs eine gegenteilige Funktion bei der Tumorprogression im Sinne einer Schutzfunktion für den Wirt bekannt, was sie zu antitumorigenen Proteasen oder Nicht-Zielproteasen macht (Overall und Lopez-Otin, 2002; Folgueras et al., 2004; Overall und Kleifeld, 2006 a und b). Die Gefahr einer Hemmung physiologisch wichtiger Enzyme (Overall und Kleifeld, 2006 a), die bei einer unselektiven Enzymhemmung zwangsläufig auftritt, spiegelt sich im Auftreten massiver Nebenwirkungen wieder, wie bei dem klinischen Einsatz von Breitspektrum-MMPIs deutlich gezeigt werden konnte (King et al., 2003). Eine durch unselektive Enzymhemmung ausgelöste Inhibition auch antitumorigener Mitglieder von Proteasefamilien kann verschiedene unerwünschte Auswirkungen haben (Overall und Kleifeld, 2006 a und b), da diese einen hemmenden Einfluss auf die Tumorprogression ausüben können (Egeblad und Werb, 2002; Overall und Kleifeld, 2006 a). Zum einen regulieren sie z.B. andere krebsför-

dernde Proteasen, wie es bei der MMP-3 vermittelten Herunterregulierung der Plasminaktivität der Fall ist (Lijnen, 2001). Zum anderen können sie, wie für MMP-9 gezeigt, z.B. Tumorangiogenese und -wachstum (Hamano et al., 2003) sowie Intravasation und Metastasierung von Tumorzellen hemmen (Deryugina et al., 2005). Durch die Inhibition solcher Proteasen mittels unselektiver Breitspektrum MMPIs kann der beobachtete reduzierte oder sogar aufgehobene Therapieerfolg in klinischen Prüfungen (siehe 2.3.1) erklärt werden (Overall und Kleinfeld, 2006 a). Die AG Krüger konnte erstmalig einen fördernden Einfluss von Breitspektrum-MMPIs auf die Metastasierung in *in vivo*-Tumormodellen nachweisen, verbunden mit einem MMP-Expressionsanstieg: In dem hier verwendeten T-Zell Lymphommodell (siehe 2.1.2) und in anderen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem unspezifischen MMP-Inhibitor schon in Abwesenheit von Tumorzellen zu einer Hochregulierung von Gelatinasen (MMP-9) und dem Wachstumsfaktor HGF führt und in Anwesenheit von Tumorzellen die Lebermetastasierung von Lymphom-, Brustkrebs- (Krüger et al., 2001), Ösophagus- und Ovarialkarzinomzellen fördert (Della Porta et al., 1999). Demgegenüber führt der Einsatz selektiverer Gelatinaseinhibitoren in diesem Modell zu keiner Induktion von MMP-9 und hemmt wirksam die Metastasierung (Arlt et al., 2002). Zudem zeigt die Gelatinase-Selektivität dieser MMPIs eine enge Korrelation mit der antimetastatischen Wirkung der Hemmstoffe (Arlt et al., 2002). Durch Breitspektrum-MMPIs kann es auch zu einem Expressionsanstieg von MMPs *in vitro* kommen, wie bei der Expression von MMP-9 in humanen Fibrosarkomzellen durch MMPIs gezeigt werden konnte (Maquoi et al., 2002). Die Problematik einer unerwünschten Hemmung von physiologisch essentiellen sowie antitumorigenen Nicht-Zielproteasen im Rahmen einer unselektiven MMP-Inhibitortherapie kann auch von großer Bedeutung für die Wahl von Serinproteasen als Zielproteasen sein. Diese sind nämlich, im Vergleich zu den MMPs, nach dem heutigen Wissenstand noch stärker in einer Vielzahl lebenswichtiger physiologischer Funktionen im Organismus involviert (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Zudem wächst die Anzahl an neu entdeckten Mitgliedern der Serinproteasefamilie (wie z.B. die transmembranständigen Serinproteasen) mit noch zu bestimmenden Funktionen stetig (Netzel-Arnett et al., 2003). Darüber hinaus können Serinproteasen enge Gegenspieler in Physiologie und Pathophysiologie sein, wie z.B. FXa und Plasmin bei Thrombenbildung und Fibrinolyse (siehe Abb. 2.2).

Als weitere Ursache für das Versagen von Breitspektrum-MMPIs in klinischen Studien wird das Fehlen einer gezielten Suche nach einer möglichen therapeutischen Zielprotease im Rahmen eines rationellen Studiendesigns verantwortlich gemacht (siehe 2.3.4; Lah et al., 2006). Auch das limitierte Verständnis von Aktivität, Regulation und Interaktion der an den unter-

suchten Krebserkrankungen beteiligten Proteasen wird als ursächlich angesehen (Lah et al., 2006). Das schlechte Ergebnis klinischer Studien kann auch auf das eingeschränkte Verständnis, dass Proteaseinhibitoren vermutlich wichtig bei der Metastasierung sind, sowie auf den großen Anteil weit fortgeschrittener Tumorstadien bei den in den Studien eingeschlossenen Patienten zurückgeführt werden (Lah et al., 2006). Präklinische *in vivo*-Ergebnisse mit MMPIs weisen auf den Vorteil einer Behandlung von Patienten mit frühen Erkrankungsstadien hin (Acuff et al., 2006; Overall und Kleifeld, 2006 a). Als letzter wichtiger Punkt wird das Auftreten starker Nebenwirkungen, das oft zu einem frühzeitigen Behandlungsabbruch führte, für das Versagen klinischer Studien mit Breitspektrum-MMPIs verantwortlich gemacht (King et al., 2003). Dadurch konnte eine krebstherapeutische minimale Behandlungsdosis nicht über einen erforderlichen längeren Zeitraum verabreicht werden oder wurde erst gar nicht erreicht (Overall und Kleifeld, 2006 a). Das Versagen unselektiver und mäßig selektiver MMPIs in klinischen Studien regte die Suche nach weiteren, auch die extrazelluläre Matrix abbauenden Proteasen als alternative Zielstrukturen krebstherapeutischer Medikamente an. Aufgrund der Involvierung von Serinproteasen in viele Schritte der malignen Tumorphysion (Francis et al., 1998; Reuning et al., 1998) stellen synthetische Serinproteaseinhibitoren (sSPIs) vielversprechende Krebstherapeutika dar (Ilies et al., 2002).

2.3.3 Serinproteinase-Inhibitoren (SPIs)

Niedermolekulare, synthetische Serinproteaseinhibitoren (sSPIs), hauptsächlich für FXa und Thrombin (Abb. 2.2), sind seit langem als antikoagulatorische Wirkstoffe bekannt (Hauptmann und Stürzebecher, 1999; Sanderson, 1999; Hirsh et al., 2005). Sie wurden in zahlreichen klinischen Studien eingesetzt (Ilies et al., 2002; Becker et al., 2006; Diener, 2006) und sind zum Teil schon als Antikoagulantien für den klinischen Einsatz zugelassen (Wiles und Hunt, 2006). Niedermolekulare, synthetische Serinproteaseinhibitoren können sich in das aktive Zentrum des Zielenzym (siehe 2.3.2) einlagern und dadurch dessen katalytische Aktivität durch Verhinderung der Substratanlagerung und -bindung hemmen (Brandstetter et al., 1996; Zeslawska et al., 2000, Robertson, 2005). Je selektiver ein Hemmstoff dabei ist, desto besser passt seine Molekülstruktur in das aktive Zentrum des Zielenzym und desto schlechter in die aktiven Zentren von Nicht-Zielenzymen (siehe 2.3.2), wie auch aus Röntgenstruktur- und Kristallographieanalysen bekannt ist (Stürzebecher et al., 1992; Renatus et al., 1998; Zeslawska et al., 2000; Robertson, 2005). Niedermolekulare sSPIs können in die beiden Untergruppen kovalente (eine feste chemische Bindung mit dem Zielenzym eingehende) und nicht kovalente (nur elektrostatische Wechselwirkung und keine feste chemische Bindung mit dem

Zielenzym eingehende) Hemmstoffe eingeteilt werden (Robertson, 2005). Nicht kovalente sSPIs haben dabei gegenüber kovalenten sSPIs den Vorteil, selektiver, chemisch stabiler, oft nebenwirkungsärmer und metabolisch weniger angreifbar vom Wirtsorganismus zu sein, was eine bessere Pharmakokinetik zur Folge hat (Sanderson, 1999; Robertson, 2005). Darüber hinaus haben nicht kovalente Hemmstoffe meist eine schnellere Bindungskinetik an ihr Zielenzym, was zu einer Wirkungsverstärkung führt (Edwards und Bernstein, 1994; Stone und Tapparelli, 1995; Sanderson, 1999). Dies erklärt die Tatsache, dass nicht-kovalente Hemmstoffe im Schwerpunkt der pharmazeutischen Entwicklung stehen und bisher kein kovalenter sSPI für einen klinischen Einsatz gezielt entwickelt wurde (Sanderson, 1999; Robertson, 2005). Aufgrund der Involvierung des uPA-Systems in viele Schritte der malignen Tumorphysion (Reuning et al., 1998) stellen niedermolekulare, synthetische und nicht kovalente uPA-Hemmstoffe als viel versprechende Krebstherapeutika einen Schwerpunkt in der Medikamentenentwicklung dar (Schmitt et al., 2000).

2.3.3.1 uPA-Hemmstoffe

Die Proteasen des Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Systems (uPA-Systems, Abb. 2.2) haben bekanntlich eine maßgebliche Beteiligung an der Progression und Metastasierung vieler Tumoren. Daher stellt uPA als wesentliches Enzym dieses Systems eine attraktive und vielversprechende Zielstruktur in der Krebstherapie dar (Schmitt et al., 2000; Dano et al., 2005). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, therapeutischen Einfluss auf das uPA/uPAR System zu nehmen. Zusätzlich zu der Beeinflussung der Expression dieser Proteine durch Antisense Oligonukleotide ist es möglich, die Bindung von uPA an seinen Rezeptor durch eine Behandlung mit Antikörpern oder kompetitiven Analoga zu verhindern. Eine dritte Möglichkeit ist die Reduktion proteolytischer Enzymaktivität durch Behandlung mit niedermolekularen synthetischen Hemmstoffen (Schmitt et al., 2000; Muehlenweg et al., 2001; Reuning et al., 2003b). Dabei stellt die Entwicklung niedermolekularer uPA-Hemmstoffe zurzeit einen Schwerpunkt in der Krebstherapieforschung dar (Steinmetzer, 2003; Jedinak und Maliar, 2005; Schweinitz et al., 2005). sSPIs mit einer meist unselektiven Hemmung von uPA wurden in vielen präklinischen Studien als Krebstherapeutika eingesetzt. Dabei zeigten die unselektiven und mäßig selektiven Inhibitoren, analog den präklinischen Ergebnissen mit unselektiven und mäßig selektiven MMPIs, eine effektive Reduktion von Tumorphysion und Metastasierung *in vivo* (Muehlenweg et al., 2001; Setyono-Han et al., 2005). Allerdings wurden sie, im Gegensatz zu den MMP-Hemmstoffen, bisher noch nicht in größeren klinischen Studien und bei großen Patientengruppen als Krebstherapeutika eingesetzt (Magdolen et al., 2000;

Jedinak und Maliar, 2005; Lah et al., 2006). Der niedermolekulare, unselektive synthetische Serinproteasehemmstoff WX-UK1, bzw. dessen oral verabreichbare Vorstufe („Prodrug“) WX-671, sind die als Krebstherapeutika weltweit klinisch am weitesten entwickelten Hemmstoffe des uPA Systems (www.wilex.com). In präklinischen Studien zeigten sie, analog den unselektiven Breitspektrum-MMP Hemmstoffen (siehe 2.3.1), eine starke Hemmung von Primärtumorwachstum und Metastasierung von Brustkrebszellen (Setyono-Han et al., 2005). Zurzeit werden sie in Mono- und Kombinationstherapie in kleineren klinischen Studien der Phase Ib/IIa mit Krebspatienten eingesetzt, um vor deren Einsatz als Krebstherapeutika zuerst die Verträglichkeit der Wirkstoffe zu überprüfen (www.wilex.com). Erste Ergebnisse deuten auf eine gute Sicherheit und Verträglichkeit dieser unselektiven uPA-Hemmstoffe bei Patienten mit Krebserkrankungen hin (www.wilex.com).

Da insbesondere Serinproteasen, auch aus dem uPA-System, an vielen physiologischen Prozessen beteiligt sind (siehe 2.2.2), und von manchen sogar eine gegenteilige Funktion bei der Tumorprogression im Sinne einer Schutzfunktion für den Wirt vermutet wird (Merchan et al., 2006), könnte eine unselektive Hemmung zu unerwünschten oder sogar tumorfördernden Nebenwirkungen führen (Hawkins, 2004; Nutescu et al., 2005). Verglichen mit anderen Trypsin-ähnlichen Serinproteasen, wie insbesondere den Blutgerinnungsfaktoren Thrombin oder Faktor Xa (siehe unten), sind nur einige wenige Grundstrukturen von synthetischen Hemmstoffen bekannt, die selektiv uPA hemmen können (Rockway et al., 2002; Steimetzner, 2003; Rockway et al., 2003). Dazu gehören u.a. Amidinophenylalanin-Derivate (Stürzebecher et al., 1999) sowie 4-Aminomethylphenylguanidin-Derivate (Sperl et al., 2000). Diese Verbindungen zeigen trotz einer Hemmung von uPA mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich stark unterschiedliche Selektivitäten. Im Vergleich zu unselektiven uPA-Hemmstoffen (siehe vorheriger Absatz) wurden sie bis jetzt kaum in präklinischen Studien als Krebstherapeutika eingesetzt (Reuning et al., 1998; Rockway und Giranda, 2003). Es wurde auch eine ganze Reihe von niedermolekularen, synthetischen und nicht kovalenten uPA-Hemmstoffen mit einem C-terminalen 4-Amidinobenzylamidrest entwickelt, die das aktive Zentrum von uPA mit zum Teil hoher Affinität hemmen. Im Gegensatz zu den großen strukturellen Unterschieden der bisher als Krebstherapeutika verwendeten uPA-Hemmstoffe zeichnen diese sich durch eine enge strukturelle Verwandtschaft aus (Kunzel et al., 2002). Aus der systematischen Weiterentwicklung dieser 4-Amidinobenzylamid-Derivate der ersten Generation ist ein optimierter Hemmstoff, CJ-463, hervorgegangen, der eine verbesserte Pharmakokinetik aufweist (Schweinitz et al., 2004).

2.3.3.2 FXa-Hemmstoffe und Hemmstoffe von weiteren Enzymen der Blutgerinnung

Neben dem Plasminogen-Aktivator-System spielt auch das Blutgerinnungssystem, wie unter 2.2.2.2 dargestellt (Abb. 2.2), eine entscheidende Rolle im Krebsgeschehen. Vielen Bestandteilen der Blutgerinnungskaskade konnte, auch in zahlreichen tierexperimentellen Studien, ein fördernder Einfluss auf Wachstum und Angiogenese von Tumoren sowie Absiedelung von Tochtergeschwülsten nachgewiesen werden (Francis et al., 1998; Zacharski, 2003; Boccaccio und Comoglio, 2005; Xie et al., 2005). Daher wurden verschiedene antikoagulatorische Substanzen in präklinischen *in vivo*-Tumormodellen eingesetzt, um eine Hemmung der Metastasierung zu erzielen (Francis und Amirkhosravi, 2002; Zacharski, 2002; Mousa, 2005). Dabei zeigte sich, dass in der Klinik häufig verwendete unselektive Antikoagulantien wie niedermolekulares Heparin (Berezky et al., 2005; Mousa, 2005; Stevenson et al., 2005; Ludwig et al., 2006) und Warfarin (Bobek und Kovarik, 2004; Mousa, 2005), die die Synthese oder Aktivität vieler verschiedener Mitglieder der Gerinnungskaskade hemmen (Nutescu et al., 2005), die Entwicklung maligner Tumoren sowie die spontane und experimentelle Metastasierung (siehe 2.1.2) in präklinischen Tiermodellen verhindern können. Darüber hinaus gibt es Hinweise aus klinischen Studien, dass Heparin zu einem erhöhten therapeutischen Ansprechen von Chemotherapeutika sowie einer Überlebensverlängerung in Kombination mit chemotherapeutischen Substanzen bei einigen Krebsarten führen kann (Zacharski et al., 2004). Ergebnisse aus klinischen Studien deuten sogar auf eine protektive Wirkung von Heparin auf die Metastasierung bei Krebspatienten hin (Kragh und Loechel, 2005; Mousa, 2005). Solch unselektive Antikoagulantien können jedoch zugleich schwere, meist antikoagulatorische Nebenwirkungen aufgrund ihrer bedeutenden gerinnungshemmenden Wirkung, die auf die unselektive Beeinflussung des gesamten Blutgerinnungssystems zurückzuführen ist, verursachen. Daher ist ihr klinischer Einsatz generell immer mehr umstritten (Hawkins, 2004; Nutescu et al., 2005).

Niedermolekulare, nicht kovalente synthetische Serinproteaseinhibitoren (sSPIs, siehe 2.3.3), hauptsächlich gegen FXa oder Thrombin gerichtet (Abb. 2.2), sind seit langem als antikoagulatorische Wirkstoffe bekannt (Hauptmann und Stürzebecher, 1999; Sanderson, 1999; Hirsh et al., 2005). Selektive FXa-Inhibitoren werden heutzutage in der Klinik und klinischen Forschung erfolgreich als Antikoagulantien eingesetzt (Nutescu et al., 2005; Wiles und Hunt, 2006). Es gibt vermehrt Hinweise, dass sie den schwer zu synthetisierenden, selektiven Thrombin-Inhibitoren bezüglich Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum überlegen sind (Hauptmann und Stürzebecher, 1999; Ieko et al., 2004; Hawkins und Huston, 2006). Als Antikoagulantien werden selektive FXa-Hemmstoffe in ständig neuen klinischen Studien aufgenommen, um ihr therapeutisches Wirkspektrum immer stärker zu erweitern (Becker et al.,

2006; Yusuf et al., 2006). Betreffend ihrer Wirksamkeit (Reduktion von thrombembolischen Ereignissen und Mortalität) und Verträglichkeit (Ausbleiben größerer Blutungen peri-, postoperativ und während des gesamten Behandlungszeitraumes, Fehlen signifikanter Änderungen der Blutgerinnungswerte) werden sie als vorteilhaft gegenüber den standardmäßig eingesetzten, unselektiven Breitspektrum-Antikoagulantien angesehen (Karnicki et al., 2004; Ansell, 2005; Hosaka et al., 2006; Motsch et al., 2006). Da von dem Blutgerinnungsfaktor Xa ein fördernder Einfluss auf die Progression und Metastasierung maligner Tumoren bekannt ist (siehe 2.2.2.2; Francis et al., 1998; Sampson und Kakkar, 2002; Jiang et al., 2004; Morris et al., 2006), wurden selektive FXa-Hemmstoffe zudem als Krebstherapeutika in präklinischen experimentellen Metastasierungsmodellen eingesetzt. Dabei konnten aus Speicheldrüsensekret gewonnene (Antistasin), rekombinante (rAcAP) und synthetische Inhibitoren (MCM09) erfolgreich die experimentelle Metastasierung in Sarkom- und Melanom-Mausmodellen verringern (Tuszynski et al., 1987; Donnelly et al., 1998; Rossi et al., 2006). In klinischen Studien dagegen wurde bisher noch kein FXa-Hemmstoff als Krebstherapeutikum eingesetzt, auch nicht in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika. Da FXa-Inhibitoren eigentlich als Antikoagulantien entwickelt und erfolgreich als solche in der Klinik eingesetzt wurden und werden (siehe oben), stellt bei einem Einsatz der Wirkstoffe als Antimetastatika genau ihre gerinnungshemmende Wirkung auch zugleich ihre gefürchtetste Nebenwirkung dar (Alexander und Singh, 2005). Selbst selektive, jedoch antikoagulatorisch wirksame FXa-Hemmstoffe, können zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen (Szalony et al., 2003; Gerotziapas und Samama, 2005), wie am Beispiel mit dem selektiven FXa-Inhibitor rNAP5 deutlich gezeigt werden konnte. rNAP5 hemmt sowohl freien ($K_i \sim 43 \text{ pM}$) als auch im Prothrombinasekomplex gebundenen FXa ($K_i \sim 144 \text{ pM}$; siehe Abb. 2.2) in gleichem Maße (Stassens und Vlasuk, 1996). Durch den Einsatz dieses rekombinanten Hemmstoffs als Krebstherapeutikum kam es in mehreren Tumormodellen nach täglicher Verabreichung zu schweren intraperitonealen Blutungen, die zu einer erhöhten Mortalität der Tiere und damit zu einem Studienabbruch führten (Hembrough et al., 2003). Um solche Nebenwirkungen bei dem Einsatz von FXa-Inhibitoren als Krebstherapeutika zukünftig zu vermeiden, sollten Hemmstoffe identifiziert werden, die sich von den bekannten, als Antikoagulantien eingesetzten FXa-Inhibitoren (Hirsh et al., 2005) in ihrem Wirkungsprofil unterscheiden. WX-FX4, ein niedermolekularer synthetischer und nicht kovalenter FXa-Hemmstoff aus der Klasse der 3-Amidinophenylalanin-Derivate, weist eine hohe Affinität gegenüber FXa sowie einen neuartigen, „nicht-Substrat-ähnlichen“ Bindungsmodus auf (Mueller et al., 2002).

2.3.4 Neuartige antiproteolytische Therapiekonzepte

Aus den Misserfolgen, die bei der klinischen Entwicklung von MMPs als Krebstherapeutika auftraten, konnten viele Erkenntnisse und Lehren für die zukünftige Verwendung von antiproteolytischen Substanzen in der Krebstherapie gezogen werden (siehe 2.3.1 und 2.3.2; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Wie oben erläutert stellen auch synthetische Serinproteasehemmstoffe (sSPis) attraktive und viel versprechende Krebstherapeutika dar (siehe 2.3.3; Ilies et al., 2002). Um eine erfolgreiche Medikamentenentwicklung bei dem präklinischen und klinischen Einsatzes von sSPis gewährleisten zu können, sollten die folgenschweren Fehler, die mit den unselektiven MMPs begangen wurden (siehe 2.3.1 und 2.3.2), vermieden werden (Lah et al., 2006). Daher ist eine Änderung therapeutischer Strategien mit Proteasehemmstoffen gefordert (Lah et al., 2006; Overall und Kleinfeld, 2006 b). Dies setzt ein grundlegend verbessertes Verständnis für die Wirkung und das Zusammenspiel von Proteasen bei der Tumorprogression voraus (Overall und Kleinfeld, 2006 a). Bevor es zu einem Einsatz von Proteasehemmstoffen als Krebstherapeutika kommen kann, sollte untersucht werden, welche Proteasen in einem bestimmten Tumortyp aktiv sind und welche Rolle sie im Krebsgeschehen spielen. Dies führt zu der Identifikation und Überprüfung therapeutischer Zielproteasen/-strukturen (Lindsay, 2003; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Wenn es schon Hinweise auf eine bestimmte Zielprotease gibt, kann eine Bestimmung der Expressionsspiegel dieser Proteasen bei verschiedenen Tumorstadien erfolgen (Overall und Kleinfeld, 2006 a). Ansonsten ist die Bestimmung eines Proteasenprofils eines Tumors, genannt „Degradom“, durch z.B. *DNA-microarray chips* (Overall et al., 2004) von großem Nutzen, wodurch es zu der Entdeckung bisher unbekannter Zielproteasen kommen kann (Jessani et al., 2002). Im Bereich proteolytischer Systeme stellen zurzeit das Gerinnungs- und uPA-System, MT1-MMP (MMP-14) (Sabeh et al., 2004), Cathepsin L und das Proteasom (Mitsiades et al., 2005; Rajkumar et al., 2005) die vielversprechendsten Zielstrukturen in der Krebstherapie bei frühen Tumorstadien dar. Therapeutika gegen diese Zielproteasen werden meist in Kombination mit zytotoxischen Medikamenten eingesetzt (Lah et al., 2006).

Das ursprüngliche Konzept, alle Proteasefamilienmitglieder einer Zielprotease, die an der Progression maligner Tumoren beteiligt ist, unselektiv zu hemmen, kann längst nicht mehr aufrechterhalten werden (Overall und Kleinfeld, 2006 a und b). Mit einer Hemmstofftherapie, die hochselektiv gegen ein Zielenzym gerichtet ist, sollten unerwünschte Nebenwirkungen und eingeschränkte Therapieerfolge durch Vermeidung gegenteiliger Behandlungseffekte reduziert werden (siehe 2.3.2; Overall und Kleinfeld, 2006 b; Lah et al., 2006). Daher sollte nach der Bestimmung der Zielprotease im Sinne eines rationellen Studiendesigns eine Thera-

pieform ermittelt und ausgewählt werden, die das Enzym möglichst selektiv hemmt (Dano et al., 2005; Overall und Kleifeld, 2006 a und b). Dabei erweisen sich niedermolekulare, synthetische und nicht-kovalente Serinproteasehemmstoffe als attraktiv und vorteilhaft (siehe 2.3.3; Roose und Van Noorden, 1995; Sanderson, 1999).

Aus den Erfahrungen mit MMPs in klinischen Studien kann ferner geschlossen werden, dass eine Behandlung von Patienten mit weit fortgeschrittenen oder sogar schon metastasierten Tumorstadien einen nur noch geringen oder gar keinen therapeutischen Nutzen mehr erbringen kann. Wenn überhaupt ein Behandlungsvorteil mit MMPs beobachtet wurde, dann in Kombination mit einem Chemotherapeutikum und nur bei frühen Tumorstadien (Coussens et al., 2002). Daher ist es mittlerweile ein anerkanntes Konzept, dass klinische Studien mit Proteasehemmstoffen, nach erfolgreichen, vorangegangenen präklinischen *in vivo*-Untersuchungen, auch Patienten mit früheren Tumorstadien einschließen sollten (Matrisian et al., 2003; Skiles et al., 2004; Vihinen et al., 2005). Zuallerletzt sollten, wie in klinischen Studien mit MMPs oft nicht möglich (siehe 2.3.1), Hemmstoffe eingesetzt werden, die eine Langzeit-Therapie in einer krebstherapeutischen Dosis erlauben, ohne schwerwiegende Nebenwirkungen hervorzurufen (Overall und Kleifeld, 2006 a). Dies würde auch einen großen Vorteil gegenüber den konventionellen zytotoxischen Chemotherapien darstellen, die darauf abzielen, alle im Körper schnell wachsenden Zellen abzutöten und deshalb regelmäßig schwere Nebenwirkungen verursachen (Brandt et al., 2001; Dropcho, 2004).

3 Zielsetzung der Arbeit

Das Scheitern antiproteolytischer Krebstherapeutika in klinischen Prüfungen ist zum großen Teil auf die mangelnde Selektivität und starken Nebenwirkungen der verwendeten MMPIs zurückzuführen. In dem höchst aggressiven experimentellen T-Zell Lymphommodell zeigen MMPIs sogar eine Korrelation von Selektivität und anti-metastatischer Wirkung. Synthetische Serinproteasehemmstoffe (sSPIs) stellen auch viel versprechende und attraktive Krebstherapeutika dar. Für die erfolgreiche Entwicklung von sSPIs als antiproteolytische Krebstherapeutika sollten die Fehler, die bei dem präklinischen und klinischen Einsatz von MMPIs begangen wurden, vermieden werden. Daher war es Ziel der Arbeit, Bedeutung, Wirkung und Nebenwirkung einer selektiven Hemmung von Serinproteasen mittels synthetischer uPA und FXa Hemmstoffe auf die experimentelle Metastasierung zu untersuchen. Dabei sollte zunächst ermittelt werden, ob die bei MMPIs nachgewiesene Korrelation zwischen Selektivität und anti-metastatischer Wirkung auch für sSPIs zutrifft. Dazu sollte eine Reihe strukturell eng verwandter synthetischer uPA-Hemmstoffe mit unterschiedlichen Selektivitäts- und Affinitätsprofilen Seite an Seite im T-Zell Lymphom Metastasierungsmodell eingesetzt werden. Zuvor sollte ermittelt werden, ob uPA hier potentielle Zielstruktur einer anti-proteolytischen Therapie ist. Da es Hinweise darauf gab, dass auch FXa eine Zielstruktur in dem T-Zell Lymphommodell darstellt, sollte oben genannte Korrelationshypothese zusätzlich mit unterschiedlich selektiven und affinen FXa-Hemmstoffen, die mit den zuvor eingesetzten uPA-Inhibitoren strukturell eng verwandt sind, in dem Modell überprüft werden. Ferner sollte die Relevanz von FXa und dem strukturell ähnlichen Enzym Matriptase als Zielmoleküle einer anti-proteolytischen Therapie in diesem Modell durch Bestimmung ihrer Expressionsspiegel untersucht werden. Bei dem Einsatz der sSPIs *in vivo* sollten auch therapeutische Nebenwirkungen sowie die beste Applikationsart von sSPIs ermittelt werden. Anschließend sollten im T-Zell Lymphommodell und experimentellen Fibrosarkom Metastasierungsmodell die therapeutische Potenz des FXa-Inhibitors WX-FX4 und des uPA-Inhibitors CJ-463, beides Beispiele hochgradig selektiver sSPIs, auf die Metastasierung und das Überleben von Mäusen ermittelt werden. Dies sollte auch eine detaillierte Untersuchung therapeutischer Nebenwirkungen über einen langen Behandlungszeitraum (bis zu 100 Tage) ermöglichen. Zuvor sollte jedoch die schwache antikoagulatorische Wirkung von WX-FX4, durch die sich der Hemmstoff auszeichnete, *in vitro* bestätigt werden, um bei dem Einsatz *in vivo* nicht die gefürchteten Nebenwirkungen bezüglich der Gerinnung hervorzurufen. Zusätzlich sollte im Fibrosarkommodell die zeitliche Relevanz von FXa und uPA im Verlauf der Metastasierung durch Untersuchung des optimalen Therapiezeitpunktes bestimmt werden.

4 Material und Methoden

Alle Einmalartikel wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Peske (Aindlingen-Arnhofen) bezogen. Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

4.1 Versuchstiere

Für das experimentelle Metastasierungsmodell mit Zellen des murinen L-CI.5s T-Zell Lymphoms wurden weibliche, pathogenfreie und immunkompetente Tiere des *syngenen* Mausstammes DBA/2 (Charles River, Sulzfeld) im Alter von acht bis zehn Wochen mit einem mittleren Gewicht von 23 g verwendet.

Für das experimentelle Metastasierungsmodell und die Überlebensstudien mit Zellen des humanen HT1080 Fibrosarkoms wurden weibliche, pathogenfreie und immunsupprimierte CD1 *nu/nu* Nacktmäuse (Charles River, Sulzfeld) im Alter von acht bis zehn Wochen mit einem mittleren Gewicht von 25 g verwendet. Alle Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen gehalten und die Experimente frühestens nach einer Eingewöhnungsphase der Tiere von einer Woche nach Lieferung begonnen.

4.2 Tumorzellen

Für die *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen dieser Arbeit wurden die Zellen des murinen T-Zell-Lymphoms L-CI.5s (Krüger et al., 1994a; Krüger et al., 1994b) und des humanen Fibrosarkoms HT1080pLZ12/K15-1 (Kopitz, 2005) verwendet. Beide Zelllinien sind stabil mit dem bakteriellen *lacZ*-Reporter gen transfiziert, welches für das Enzym β -D-Galaktosidase kodiert und dadurch eine Anfärbung der Tumorzellen sowohl in der Zellkultur als auch *ex vivo* in Form von Metastasen in den Organen mit Hilfe des Farbreagenz 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranoside (X-Gal, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) erlaubt (siehe unten, Krüger et al., 1998).

4.3 Metastasierungsmodelle

4.3.1 Experimentelle Metastasierung mit murinen L-CI.5s Zellen

Für die Untersuchung experimenteller Metastasierung im murinen T-Zell-Lymphom wurden, wie bereits beschrieben (Krüger et al., 1994a), am Tag 0 5.000 *lacZ*-markierte L-CI.5s Zellen pro Tier appliziert. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte in einem Volumen von 200 µl Phosphat gepufferter Saline (*phosphate buffered saline*, PBS, ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Biochrom KG, Berlin) mit einer 1 ml-Spritze und einer Kanüle (27 GA^{7/8}, 0,4 x 21, Rose GmbH, Trier) in die Schwanzvene jeder *syngenen* DBA/2 Maus. Die Mäuse wurden vorher zufällig in die einzelnen Gruppen eingeteilt, gewogen und mit einer Rotlichtlampe leicht erwärmt, um die Gefäße zu erweitern und damit die Inokulation zu erleichtern. Die Inokulation der Tumorzellen führte in diesem äußerst aggressiven Lymphom-Modell bereits innerhalb eines kurzen Zeitraumes von sechs Tagen zur Bildung von zahlreichen, gut sicht- und zählbaren Makro- (Durchmesser > 0,2 mm) und Mikrometastasen (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen mit einem Durchmesser < 0,2 mm) in der Leber (und nicht in der Lunge; Krüger et al., 2001). Die Mikrometastasen entstanden dabei modelltypisch (Krüger et al., 1994a) durch Absiedelung von etablierten Metastasen (Primärherden) in das Lebergewebe als sekundäre Invasion. Sogar einzelne Tumorzellen konnten nach X-Gal-Färbung (siehe 4.6) sichtbar gemacht werden. An Tag sieben nach Tumorzellinokulation (TZI) steigt in diesem Modell die Infiltration der Leber durch die Mikrometastasen dramatisch an (über 10.000 Metastasen je Leber) (Krüger et al., 1994a; Banke et al., 2003). Die Tumorlast würde schon wenige Tage später zum Tod der Tiere führen (eigene unveröffentlichte Daten). Durch diese Aggressivität und kurze Dauer eignete sich das T-Zell Lymphommodell als zuverlässiges *screening*-Modell für anti-metastatische Hemmstoffe. Nach Opferung der Mäuse mit Kohlendioxid (CO₂) zu mehreren definierten Zeitpunkten (Experiment zur Untersuchung der Expressionsmuster von Proteasen) oder an Tag sechs nach TZI (Zeitpunkt der Analysen in Experimenten mit Inhibitoren) konnten die Metastasen auf den Leberoberflächen unbehauelter und behauelter Tiere nach indigoblauer Anfärbung der Tumorzellen durch Umsetzung des X-Gal-Substrats (siehe unten) eindeutig quantifiziert werden (Krüger et al., 1994a; Arlt et al., 2002). Die Übersichtsbilder und die dazugehörigen Nahaufnahmen der Lebern wurden mit einem Olympus SZX-ILLK200 Mikroskop (Hamburg) und einer Nikon Coolpix 4500 Digitalkamera (Tokyo, Japan) aufgenommen und in Form von JPG-Dateien in Power Point® importiert.

4.3.1.1 Expressionsmuster von uPA, FX und Matriptase im Zeitverlauf der Metastasierung

An den Tagen 0 (3 h nach TZI), 1, 2, 5, 6 und 7 nach TZI wurden jeweils fünf bis sieben therapiefreie tumortragende und tumorzellfreie (Kontrolle) Mäuse geopfert, die Lebern entnommen und Teile davon für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen entfernt. Der linke und rechte Ober- sowie der Mittellappen wurden fixiert, um anschließend mittels X-Gal-Färbung die *lacZ*-markierten Tumorzellen auf der Organoberfläche sicht- und quantifizierbar zu machen (siehe 4.6). Danach wurden die für die molekularbiologischen Untersuchungen schockgefrorenen Leberstücke von jeweils vier repräsentativen Mäusen pro Tag auf ihre Expressionsmuster von uPA, FX und Matriptase im Zeitverlauf der experimentellen Metastasierung untersucht (siehe 4.8).

4.3.1.2 Selektivitäts-/Effektivitätskorrelationen mit FXa- und uPA-Inhibitoren sowie Ermittlung der antimetastatischen Wirkung von WX-FX4

Bei der Untersuchung der antimetastatischen Wirkung sowie eines Zusammenhanges zwischen antimetastatischer Wirkung und Selektivität der synthetischen Serinproteaseinhibitoren (sSPIs) CJ-513, CJ-502, CJ-435, CJ-503, CJ-504, CJ-510, CJ-441, DX-9065a (Tab. 4.1) und WX-FX4 (Tab. 5.1) wurden die Hemmstoffe innerhalb der jeweiligen Experimente im Rahmen der Behandlung in gleicher Konzentration und identischen Vehikeln gelöst eingesetzt, um eine hohe Vergleichbarkeit ihrer therapeutischen Wirkung zu erzielen. Von der jeweiligen Inhibitor-Applikationslösung wurden pro Behandlung und Maus 200 µl in einer Dosierung von 0,5 mg/kg (Experiment mit CJ-513, CJ-502, CJ-435, CJ-503) oder 1,5 mg/kg (Experiment mit CJ-513, CJ-435, CJ-503 und CJ-504, Experiment mit CJ-513, CJ-510, CJ-441, CJ-504 und DX-9065a und Experiment mit WX-FX4) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die zweimal tägliche Behandlung mit diesen sSPIs (Gesamtdosis von 1,5 bzw. 3 mg/kg/Tag) bzw. dem Lösungsmittel in den jeweiligen Kontrollgruppen erfolgte morgens und abends in Intervallen von jeweils 12 Stunden (mit Ausnahme der Applikationen am Tag der TZI, siehe unten). Die Behandlung wurde einen Tag vor TZI als Vorbehandlung begonnen und dann über die Dauer des gesamten Experimentes bis einen Tag vor Opferung und Organentnahme der Mäuse (mit Ausnahme des WX-FX4-Experiments, siehe unten) fortgesetzt. Die ersten drei Behandlungen wurden 24, 12 und 1 h vor TZI durchgeführt. Die weiteren Behandlungen erfolgten 1, 12, 24, 36 h, usw. nach TZI (mit Ausnahme des WX-FX4-Experiments, siehe unten). Die Behandlungen mit WX-FX4 wurden analog den Behandlungen mit den CJ-Inhibitoren (siehe oben) durchgeführt mit der Ausnahme, dass die Mäuse im Experiment mit

WX-FX4 ihre letzte Behandlung 1 h vor der Opferung bekamen. An Tag 6 nach TZI erfolgte die Tötung und Präparation der Mäuse und die Untersuchung der Bauchwände (Injektionsort der Behandlungen) auf Blutergüsse und der Bauchhöhlen auf mögliche innere Blutungen. Die Lebern wurden entnommen und Teile davon für biochemische Untersuchungen entfernt und schockgefroren. Der linke und rechte Ober- sowie der Mittellappen der Lebern wurde fixiert, um anschließend mittels X-Gal-Färbung die *lacZ*-markierten Tumorzellen auf der Organoberfläche sicht- und quantifizierbar zu machen (siehe 4.6). Zusätzlich wurde den Tieren in dem Experiment mit WX-FX4 unmittelbar nach der Tötung 300 µl Blut zur Gerinnungsanalyse abgenommen (genauere Beschreibung siehe unter 4.7.3).

4.3.1.3 Ermittlung der Wirksamkeit verschiedener Inhibitor-Applikationsarten am Beispiel von CJ-504 und CJ-463

Bei den Experimenten zum direkten Vergleich der Wirksamkeit der intraperitonealen mit der klinisch relevanteren (Alban, 2005) subkutanen (s.c.) Behandlungsform der sSPis in Bezug auf ihre anti-metastatische Wirkung wurden beispielhaft der FXa-Inhibitor CJ-504 und der uPA-Inhibitor CJ-463 (Tab. 4.1) eingesetzt. Pro Behandlung und Maus wurden 200 µl der jeweiligen Hemmstoff-Applikationslösung in einer Dosierung von 1,5 mg/kg verwendet. Die zweimal tägliche Behandlung (Gesamtdosis von 3 mg/kg/Tag) wurde in einer Gruppe intraperitoneal (wie schon unter 4.3.1.2 beschrieben) und in einer zweiten Gruppe subkutan (unter die Nackenhaut) durchgeführt. Der Behandlungszeitraum, die Applikationsintervalle und die Dauer des Experimentes waren dabei wie oben bereits für die Experimente mit CJ-Inhibitoren beschrieben (siehe 4.3.1.2). An Tag 6 nach TZI erfolgte die Tötung und Präparation der Mäuse. Die Lebern wurden entnommen und fixiert, um anschließend mittels X-Gal-Färbung die *lacZ*-markierten Tumorzellen auf der Organoberfläche sichtbar und quantifizierbar zu machen (siehe 4.6).

4.3.2 Experimentelle Metastasierung mit humanen HT1080 Zellen

Für die Untersuchung experimenteller Metastasierung im humanen Fibrosarkommodell wurden am Tag 0 1×10^6 *lacZ*-markierte HT1080 Fibrosarkomzellen pro Tier appliziert. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte in einem Volumen von 200 μ l PBS (Biochrom KG, Berlin) mit einer 1 ml-Spritze und einer Kanüle (27 GA^{7/8}, 0,4 x 21, Rose GmbH) in die Schwanzvene jeder immundefizienten CD1 *nu/nu* Nacktmaus. Dies führt innerhalb von 22 Tagen zur Bildung von zahlreichen makrometastatischen Herden in den Lungen (Schweinitz et al., 2004; Kopitz et al., 2005). Kurz vor der Inokulation der Tumorzellen wurden die Mäuse zufällig den einzelnen Gruppen zugeteilt, gewogen und mit einer Rotlichtlampe leicht erwärmt, um die Gefäße zu erweitern und damit die Inokulation der Tumorzellen zu erleichtern.

4.3.2.1 Ermittlung der antimetastatischen Effizienz und Evaluierung des optimalen Zeitfensters einer Therapie mit WX-FX4 (*i.p.*) und CJ-463 (*i.p.* und *s.c.*)

Bei der Bestimmung des Einflusses anti-proteolytischer Wirkstoffe auf die experimentelle Metastasierung im humanen Fibrosarkommodell wurde den Tieren 22 Tage nach Tumorzellinokulation (TZI) unmittelbar nach Opferung mit Kohlendioxid und anschließender Präparation 300 μ l Blut aus der Vena cava caudalis zur Gerinnungsanalyse abgenommen (Einzelheiten siehe unter 4.7.3). Anschließend wurden sie auf intraperitoneale und intradermale Blutungen untersucht und die Lungen entnommen. Ein Lungenflügel wurde für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Nach Fixierung des anderen Lungenflügels und Anfärbung mit X-Gal (siehe 4.6) waren die Metastasen aufgrund der indigo-blauen Farbe auf den Lungenoberflächen unbehandelter und behandelter Mäuse sichtbar und konnten eindeutig quantifiziert werden. Die Übersichtsbilder der Lungen wurden anschließend aufgenommen und bearbeitet. Außerdem wurde das Körpergewicht der Mäuse zu Beginn und Ende des Experimentes gemessen und die Gewichtsänderung dokumentiert, um neben der täglichen Beobachtung von physischem Erscheinungsbild, Mobilität und Atmung der Tiere (Lunge = Hauptorgan der Metastasierung) zusätzliche Aussagen über den Gesundheitszustand der Mäuse treffen zu können.

Von der jeweiligen Inhibitor-Applikationslösung wurden pro Behandlung und Maus 200 μ l in einer Dosierung von 1,5 mg/kg intraperitoneal verabreicht (entspricht einer Gesamtdosis von 3 mg/kg/Tag). Für die Ermittlung der anti-metastatischen Effizienz und des optimalen Zeitfensters einer anti-FXa- und anti-uPA-Therapie wurde die zweimal tägliche Behandlung mit dem FXa-Inhibitor WX-FX4 (Tab. 5.1) und dem uPA-Inhibitor CJ-463 (Tab. 4.1) in jeweils

einer Gruppe als „Kurzzeit-Therapie“ über 3 Tage und jeweils einer Gruppe als „Langzeit-Therapie“ über 23 Tage durchgeführt (5.3.4 und 5.4.1). In den Kurzzeit-Therapiegruppen wurde die Behandlung der Tiere mit den jeweiligen Wirkstoffen (WX-FX4 oder CJ-463) bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln einen Tag vor TZI begonnen und bereits einen Tag nach TZI wieder beendet (Einzelbehandlungen 24 h, 12 h und 1 h vor TZI und 1 h, 12 h, 24 h und 36 h nach TZI). In den Langzeit-Therapiegruppen wurden die Behandlung der Tiere mit WX-FX4 oder CJ-463 bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln auch einen Tag vor TZI analog der „Kurzzeit-Therapie“ begonnen, diese dafür aber über den Zeitraum des gesamten Experimentes bis einen Tag vor Opferung der Tiere an Tag 22 nach TZI fortgeführt (Einzelbehandlungen 24, 12 und 1 h vor TZI und 1, 12, 24, 36 h, usw. nach TZI). Die zweimal tägliche Behandlung mit diesen sSPIs bzw. dem Lösungsmittel in der Kontrollgruppe erfolgte dabei morgens und abends in Intervallen von jeweils 12 Stunden (mit Ausnahme der Applikationen am Tag der TZI, siehe oben).

Bei dem Experiment zur Überprüfung der anti-metastatischen Wirksamkeit einer subkutanen CJ-463-Behandlung im experimentellen Fibrosarkom (siehe auch 5.4.1) wurde CJ-463 als subkutane „Langzeit-Therapie“ (unter die Nackenhaut), analog der oben beschriebenen intraperitonealen CJ-463-Langzeit-Therapie in gleicher Dosierung, nach gleichem Behandlungsprotokoll und unter gleichen experimentellen Bedingungen eingesetzt.

4.3.2.2 Überlebensstudien mit WX-FX4 und CJ-463

Die Überlebensstudien mit dem FXa-Inhibitor WX-FX4 und dem uPA-Inhibitor CJ-463 wurden grundsätzlich wie unter 4.3.2 beschrieben entsprechend den Versuchen mit experimenteller Metastasierung durchgeführt. Die Behandlung mit WX-FX4 oder CJ-463 in der jeweiligen Gruppe erfolgte zweimal täglich subkutan unter die Nackenhaut in einer Dosierung von 1,5 mg/kg (entspricht einer Gesamtdosis von 3 mg/kg/Tag) in einem Volumen von 200 µl, wurde einen Tag vor TZI begonnen und im Gegensatz zu der unter 4.3.2.1 beschriebenen Behandlungsdauer erst an Tag 100 nach TZI beendet (Einzelbehandlungen 24, 12 und 1 h vor TZI und 1, 12, 24, 36 h, usw. nach TZI). Die Behandlung mit diesen sSPIs bzw. dem Lösungsmittel in der Kontrollgruppe erfolgte dabei, genau wie unter 4.3.2.1 aufgezeigt, morgens und abends in Intervallen von jeweils 12 Stunden (mit Ausnahme der Applikationen am Tag der TZI, siehe oben). Im Anschluss an Tag 100 folgte eine behandlungsfreie Nachbeobachtungszeit bis zum Versuchende (Tötung der letzten moribunden Maus). Unterschiede gab es auch in den Auswertungsparametern. So wurden die Mäuse in den Überlebensstudien zweimal täglich hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes und ihrer Fitness kontrolliert, moribunde Mäuse

protokolliert, getötet und schon vor der X-Gal-Färbung (siehe 4.6) auf den Grad der Metastasierung von Lunge/Thorax, Abdomen und Gehirn untersucht. Zudem wurden die Tiere auf intraperitoneale und intradermale Blutungen überprüft. Anschließend wurden die kompletten Lungen fixiert und nach X-Gal-Färbung auf ihren Tumorstatus genauestens untersucht. Eine Quantifizierung der Lungenmetastasen von moribunden Tieren der Kontrollgruppe war zu diesem finalen Erkrankungszeitpunkt aufgrund metastatischer Organüberwucherung und -durchsetzung nicht mehr möglich.

4.4 Proteaseinhibitoren

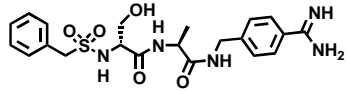
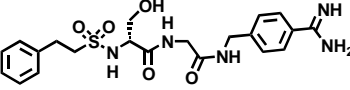
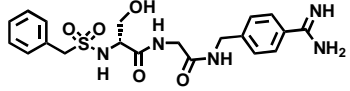
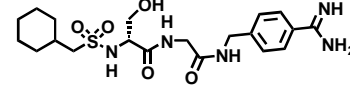
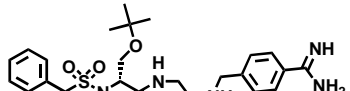
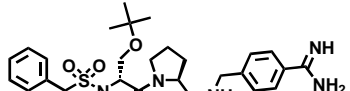
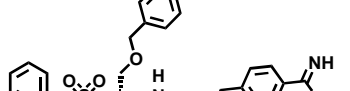
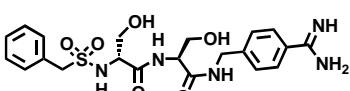
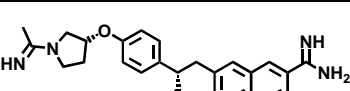
4.4.1 CJ-Inhibitoren

Die uPA-Inhibitoren Benzylsulfonyl-D-Ser-Ala-4-amidinobenzylamid (CJ-513), 2-Phenethylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-amidinobenzylamid (CJ-502), Benzylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-amidinobenzylamid (CJ-435), Cyclohexylmethylsulfonyl-D-Ser-Gly-4-amidinobenzylamid (CJ-503) und Benzylsulfonyl-D-Ser-Ser-4-amidinobenzylamid (CJ-463) (Tab. 4.1; Künzel et al., 2002; Schweinitz et al., 2004) wurden gemäß WO 01/96286 und WO 03/076391 von der Curacyte Chemistry GmbH (Jena) als Trifluoressigsäure (TFA)-Salz synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Die FXa-Inhibitoren Benzylsulfonyl-D-Ser(tBu)-Gly-4-amidinobenzylamid (CJ-504), Benzylsulfonyl-D-Ser(tBu)-Pro-4-amidinobenzylamid (CJ-510) und Benzylsulfonyl-D-Ser(Bzl)-Gly-4-amidinobenzylamid (CJ-441) (Tab. 4.1; Banke et al., 2003) wurden gemäß WO 01/96366 und WO 03/076457 von der Curacyte Chemistry GmbH (Jena) als Trifluoressigsäure (TFA)-Salz synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

Die synthetischen niedermolekularen Inhibitoren gehören alle zur Klasse der 4-Amidinobenzylamid-Derivate, sind strukturell eng miteinander verwandt und hemmen das aktive Zentrum der jeweiligen Zielprotease (uPA oder FXa). Der synthetische uPA-Inhibitor CJ-463 ist ein optimierter Hemmstoff, der aus einer systematischen Weiterentwicklung der oben genannten 4-Amidinobenzylamid-Derivate der ersten Generation (Tab. 4.1) hervorgegangen ist (Schweinitz et al., 2004). Für die *in vivo* Anwendung der CJ-Inhibitoren in den Lymphom- (siehe 4.3.1.2) und Fibrosarkom-Metastasierungsexperimenten (siehe 4.3.2.1) wurden die Inhibitoren täglich frisch in 100% Ethanol gelöst und mit *aqua ad iniectabilia* (steriles und pyrogenfreies Wasser zur Injektion, Delta-Pharma, Pfullingen) auf eine Endkonzentration von 5% (v/v) Ethanol verdünnt. Für die *in vivo* Anwendung der CJ-Inhibitoren in den Applikationsstudien im T-Zell Lymphommodell (siehe 4.3.1.3) wurden die Inhibitoren

Tabelle 4.1 Strukturformeln, Inhibitionskonstanten (K_i) und Halbwertszeiten der Eliminationsrate (β -Phase, $t_{1/2}$) der CJ-Inhibitoren und des Inhibitors DX-9065a

Inhibitor	Strukturformel	K_i (nM)					$t_{1/2}$ (min)
		<i>FXa</i>	<i>uPA</i>	<i>Plasmin</i>	<i>Thrombin</i>	<i>Trypsin</i>	
CJ-513		1.600	7,7	540	110	3,3	19,8
CJ-502		28.000	490	59.000	33.000	900	6
CJ-435		2.700	36	11.000	13.000	150	17,4
CJ-503		1.600	48	17.000	10.000	110	6
CJ-504		14	1.200	7.700	220	66	6
CJ-510		8,8	180	69	2	1,8	7,8
CJ-441		81	840	2.300	180	65	<6
CJ-463		13.000	20	750	14.000	22	30
DX-9065a		7	33.000	13.000	70.000	260	58,8

Gezeigte Daten repräsentieren den Mittelwert und den mittleren Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen, jeweils dreifach durchgeführten Experimenten.

vor Therapiebeginn in 100% *aqua ad iniectabilia* (Delta-Pharma, Pfullingen) gelöst, über die Dauer der gesamten Experimente in passenden Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und zwölf Stunden vor der jeweiligen Applikation bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Für die *in vivo* Anwendung in der Überlebensstudie (siehe 4.3.2.2) wurde CJ-463 jeweils wöchentlich in 100% *aqua ad iniectabilia* (Delta-Pharma, Pfullingen) gelöst, über die Dauer von jeweils einer Woche in passenden Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und zwölf Stunden vor der jeweiligen Applikation bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Auf Empfehlung von Dr. Torsten Steinmetzer (Curacyte Chemistry GmbH, Jena) wurde das Lösen der Inhibitoren im Laufe der Arbeit geändert (siehe oben), da zu Anfang mehr die hydrophoberen FX-Inhibitoren (z.B. CJ-504) und zu Ende mehr die hydrophileren uPA-Inhibitoren (z.B. CJ-463) im Vordergrund der Tierexperimente standen. Bis auf die Ausnahme des Lymphom-Metastasierungsexperimentes mit den uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-435 und CJ-503, in dem die Inhibitoren in einer Dosierung von 1,5 mg/kg/Tag verabreicht worden waren, erfolgte die Applikation der Inhibitoren in allen anderen Metastasierungsexperimenten sowie in der Überlebensstudie in einer Dosierung von 3 mg/kg/Tag. Die *in vivo*-Studien zur Bestimmung der Eliminationskinetik der Inhibitoren (Halbwertszeit der Eliminationsrate in der β -Phase, $t_{1/2}$, Tab. 4.1) wurden, wie bereits beschrieben (Hauptmann et al., 2002; Künzel et al., 2002; Schweinitz et al., 2004), von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher (Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt) durchgeführt. Die pharmakokinetischen Analysen beruhen auf intravenöser Injektion von 1 mg/kg in Ratten und anschließendem mehrmaligen Messen der Plasmaspiegel. Die 4-Amidinobenzylamid-Derivate haben, bis auf die verbesserte Pharmakokinetik des optimierten CJ-Inhibitors 463, aufgrund ihrer hohen Strukturähnlichkeit eine vergleichbar geringe Halbwertszeit der Eliminationsrate im Bereich von sechs (zum Beispiel CJ-504) bis zu 20 min (CJ-513; Tab. 4.1; Schweinitz et al., 2004).

4.4.2 WX-FX4

Der zur Klasse der 3-Amidinophenylalanin-Derivate gehörende FXa-Inhibitor (*R*)-2-(3-Adamantan-1-yl-ureido)-3-(3-carbamimidoly-phenyl)-*N*-phenethyl-propionamid (WX-FX4, Tab. 5.1; Müller et al., 2002) wurde gemäß WO 01/58859 von Markus M. Müller (AG Prof. Dr. Luis Moroder, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) als TFA-Salz synthetisiert und im Rahmen des SFBs 469 zur Verfügung gestellt. WX-FX4 ist ein synthetischer niedermolekularer Inhibitor, der das aktive Zentrum von FXa hochwirksam hemmt und dabei einen neuartigen Bindungsmodus aufweist (Müller et al., 2002). Seine pharmakokinetischen Eigenschaften (Halbwertszeit der Eliminationsrate, Tab. 5.1; Banke et al., 2005) sind ver-

gleichbar mit denen der 4-Amidinobenzylamid-Derivate der ersten Generation (Daten von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher, siehe 4.4.1). Für die *in vivo* Anwendung in den Metastasierungsexperimenten (siehe 4.3.1.2 und 4.3.2.1) wurde WX-FX4 täglich frisch in 100% Ethanol gelöst und mit *aqua ad iniectabilia* (Delta-Pharma, Pfullingen) auf eine Endkonzentration von 5% (v/v) verdünnt. Für die *in vivo* Anwendung in der Überlebensstudie (siehe 4.3.2.2) wurde WX-FX4 jeweils wöchentlich in 100% *aqua ad iniectabilia* (Delta-Pharma, Pfullingen) gelöst, über die Dauer von jeweils einer Woche in passenden Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und zwölf Stunden vor der jeweiligen Applikation bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Die Applikation erfolgte in allen Metastasierungsexperimenten in einer Dosierung von 3 mg/kg/Tag. Die Bestimmungen des Einflusses von WX-FX4 auf humane Prothrombinasekomplexaktivität (IC_{50}) sowie auf die Blutgerinnungsparameter aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Prothrombinzeit (PT) von humanem Plasma erfolgten in Kooperation von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher. Die Wirkung von WX-FX4 auf eine durch Kollagen, ADP, Thrombin oder Arachidonsäure verursachte Plättchenaggregation wurde in Kooperation von Dr. Ali Amirkhosravi (Florida Hospital Cancer Institute, Orlando, Florida, U.S.A.) durchgeführt.

4.4.3 DX-9065a

Der zur Klasse der *P*-Naphtamidin-Derivate gehörende FXa-Inhibitor (+)-(2*S*)-2-[4[[*(3S)*-1-Acetimidoyl-3-pyrrolidinyl]oxy]phenyl]-3-[7-amidino-2-naphthyl]propansäure (DX-9065a, Tab. 4.1; Nagahara et al., 1994) wurde von S. Kunitada (Daiichi Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) synthetisiert und als freundliche Gabe zur Verfügung gestellt. DX-9065a ist ein synthetischer niedermolekularer Inhibitor, der das aktive Zentrum von FXa hemmt und nicht strukturverwandt ist mit den CJ-Inhibitoren und dem Inhibitor WX-FX4. Er weist mit einer Halbwertszeit der Eliminationsrate von einer Stunde eine gute Pharmakokinetik auf (Daten von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher, siehe Tab. 4.1 und 4.4.1; Banke et al., 2003). Für die *in vivo* Anwendung im Lymphom-Metastasierungsexperiment (siehe 4.3.2.1) wurde DX-9065a täglich frisch in 100% Ethanol gelöst und mit *aqua ad iniectabilia* (Delta-Pharma, Pfullingen) auf eine Endkonzentration von 5% (v/v) verdünnt. DX-9065a wurde den Tieren in einer Dosierung von 3 mg/kg/Tag verabreicht. Die Bestimmungen des Einflusses von DX-9065a auf humane Prothrombinasekomplexaktivität (IC_{50}) sowie auf die Blutgerinnungsparameter aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Prothrombinzeit (PT) von humanem Plasma erfolgten in Kooperation von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher.

4.4.4 Bestimmung der Selektivitäten der eingesetzten Inhibitoren

Die Berechnung der Selektivitätsprofile von allen in dieser Arbeit verwendeten Hemmstoffen basierte auf den vorhandenen Affinitäten der Inhibitoren gegenüber den humanen Serinproteasen FXa, uPA, Plasmin, Thrombin und Trypsin (ausgedrückt durch die Dissoziationskonstanten; K_i -Werte; Tab. 4.1 und 5.1). Die Inhibitoren besitzen unterschiedliche K_i -Werte im mikro- bis nanomolaren Bereich gegenüber diesen fünf charakteristischen Serinproteasen, die an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Gerinnung, Fibrinolyse und/oder Tumorprogression beteiligt sind. Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte, wie bereits beschrieben (Stürzebecher et al., 1997), in Kooperation von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher und Dr. T. Steinmetzer (Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Erfurt) in Kinetik-Analysen durch Spaltung chromogener Substrate. Gegenüber den entsprechenden bovinen Serinproteasen zeigen die sSPIs sehr ähnliche K_i -Werte (Daten von Prof. Dr. Jörg Stürzebecher; Banke et al., 2003). Um die Bedeutung der Selektivität der Inhibitoren gegenüber den verschiedenen Serinproteasen in den Metastasierungsexperimenten sowie den Überlebensstudien untersuchen zu können, wurde die Selektivität eines Inhibitors gegenüber einer bestimmten Protease relativ zu den anderen vier Proteasen ermittelt. Dazu mussten die K_i -Werte der anderen Proteasen durch den K_i -Wert der zu untersuchenden Protease geteilt werden. Die Selektivität der Inhibitoren gegenüber uPA und FXa wurde relativ zu solchen Proteasen (Nicht-Zielproteasen) dargestellt, von denen man keine Beteiligung am Metastasierungsprozess vermutete (Trypsin), oder deren Hemmung starke Nebenwirkungen hervorrufen konnte (Thrombin aufgrund seiner zentralen und damit lebenswichtigen Rolle in der Gerinnungskaskade). Jeder sich daraus ergebenden Bruch war ein Maß an Selektivität, wobei niedrige Werte ($< 1,0$) schwache Selektivitäten und hohe Werte ($> 1,0$) stärkere Selektivitäten der Inhibitoren widerspiegelten. Dies erlaubte zum einen das Aufstellen einer Rangordnung der Inhibitoren entsprechend ihrer Selektivitäten sowie zum anderen einen direkten Vergleich ihrer Selektivitätsprofile. Zum Beispiel war CJ-435 ($K_{i \text{ [Thrombin]}} / K_{i \text{ [uPA]}} = 361$) über 1900-mal selektiver gegenüber uPA (im Verhältnis zu Thrombin) als CJ-504 ($K_{i \text{ [Thrombin]}} / K_{i \text{ [uPA]}} = 0.183$), wohingegen CJ-504 ($K_{i \text{ [Thrombin]}} / K_{i \text{ [FXa]}} = 15.71$) über 200-mal selektiver gegenüber FXa (im Verhältnis zu Thrombin) war als CJ-513 ($K_{i \text{ [Thrombin]}} / K_{i \text{ [FXa]}} = 0.07$). Solche Berechnungen wurden, basierend auf den K_i -Werten der Tab. 4.1 und 5.1, für alle möglichen Kombinationen aus Nicht-Zielproteasen/Zielproteasen durchgeführt und die Selektivitäten der Inhibitoren gegenüber uPA und FXa im Verhältnis zu Trypsin und/oder Thrombin beispielhaft gezeigt.

4.5 Zellbiologische Verfahren

4.5.1 Zellkultur

Die mit dem *lacZ*-Gen transfizierten murinen L-CI.5s T-Zell Lymphomzellen und die *lacZ*-transfizierten humanen HT1080 Fibrosarkomzellen wurden unter üblichen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 95% relative Luftfeuchtigkeit) in einem Inkubator (Foma Scientific, Biochrom KG, Berlin) kultiviert. Die adhärenenten *lacZ*-markierten HT1080 Fibrosarkomzellen wurden dabei in Zellkulturschalen (TPP, Trasadingen, Schweiz) in phenolrot-haltigem Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom KG, Berlin) mit Zusatz von 10% (v/v) inaktiviertem, südamerikanischen fötalen Kälberserum (FCS, Biochrom KG, Berlin), 10 mM HEPES Puffer (Biochrom KG, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin), 0,55 mM Arginin und 0,27 mM Asparagin kultiviert. Da es sich bei den L-CI.5s Zellen um Suspensionszellen handelt, erfolgte deren Kultivierung in Zellkulturflaschen (TPP, Trasadingen, Schweiz) in phenolrot-haltigem RPMI 1640 Medium (Biochrom KG, Berlin) und den gleichen Zusätzen wie für das DMEM Medium (siehe oben), ergänzt mit 50 µM β-Mercaptoethanol.

4.5.2 Bestimmung der Zellzahl

Für die Ermittlung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,0025 mm² (Assistent, Sondheim) verwendet. Die L-CI.5s- oder HT1080-Zellsuspension (letzte erst nach Ablösen der Zellen) wurde mit einem Volumenteil Trypanblau-Lösung (Gibco, Karlsruhe) versetzt. Es wurden die lebenden Zellen von je zwei diagonal gegenüberliegenden großen Kästchen (0,0025 mm²) gezählt. Das ausgezählte Volumen betrug bei der Tiefe von 0,1 mm pro Kästchen 0,00025 mm³ entsprechend 0,1 µl. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, musste die in einem Kästchen gezählte Zellzahl mit dem Faktor 10⁴ multipliziert werden. Aufgrund der vorangegangenen 1:2 Verdünnung der Zellen mit Trypanblau ergibt sich die Zellzahl pro ml aus der Summe der auf beiden Feldern gezählten Zellen multipliziert mit 1 x 10⁴.

4.5.3 Sulforhodamin B (SRB)-Zytotoxizitätsassay

Zur Untersuchung einer Toxizität von WX-FX4 auf die verwendeten humanen HT1080 Fibrosarkomzellen wurde der SRB-Zytotoxizitätsassay (Skehan et al., 1990; Voigt, 2005) angewendet (die Bestimmung einer Zytotoxizität von WX-FX4 auf humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC-Zellen) als gesunde Vergleichszellen und die verwendeten murinen L-Cl.5s T-Zell Lymphomzellen wurde in Kooperation von Stefan Sperl durchgeführt [Wilex AG, München]). Das Prinzip des *assays* beruht auf der stabilen Bindung des Farbstoffes (SRB) an zelluläres Protein bei saurem pH-Wert, dem Auswaschen von ungebundenem Farbstoff unter sauren Bedingungen und der Freisetzung des gebundenen Farbstoffes bei basischem pH-Wert. Die Menge des freigesetzten Farbstoffes in Lösung korreliert linear mit der Zellzahl und wird photometrisch erfasst (Skehan et al., 1990). Dazu wurden bereits 24 h vor Start des *assays* 25×10^3 HT1080 Fibrosarkomzellen in 100 μ l DMEM (mit allen Zusätzen, siehe oben) pro Well einer 96er-Mikrotiterplatte (Black Isoplate, steril, Klarboden, PERKIN ELMER/WALLAC GmbH, Freiburg) ausgesät und über Nacht bis zum Ansatz des SRB-Zytotoxizitätsassays unter üblichen Zellkulturbedingungen (siehe oben) inkubiert. WX-FX4 wurde in *aqua ad iniectabilia* (Delta-Pharma, Pfullingen) gelöst und als Stammlösung in einer Konzentration von 30 M bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch im SRB-Zytotoxizitätsassay erfolgte eine Verdünnung auf 300 mM in phenolrot-freiem DMEM (Gibco, Karlsruhe) und FKS. Weitere Verdünnungen erfolgten im selben Medium und wurden in einer sterilen 96-well Mikrotiterplatte vorgenommen. Dann wurden aus der Mikrotiterplatte mit den einen Tag zuvor ausgesäten HT1080 Zellen das DMEM Medium abgesaugt, alle Wells zweimal mit 200 μ l PBS²⁺ (PBS mit Zusatz von 0,49 mM MgCl₂ und 0,68 mM CaCl₂) gewaschen und der fertige Ansatz von der anderen Mikrotiterplatte auf die Zellen übertragen (Hemmstoffkonzentrationen in den Wells von 300 bis 0,3 mM). Als Positivkontrolle dienten *wells* mit Zellen und allen Zusätzen außer WX-FX4 und als Negativkontrolle (Leerwert) Versuchsmedium ohne Zellen in Wells, die im Laufe des Versuchs wie die anderen *wells* behandelt wurden. Dann wurde der ganze Ansatz unter Zellkulturbedingungen für 48 h inkubiert. Nach Entfernen des WX-FX4-haltigen Mediums durch Ausschlagen der Platte wurden die Zellen mit Spülmedium (PBS²⁺) 3x gewaschen, mit Trichloressigsäure-Fixierlösung (10% w/v, 4 °C, 100 μ l/*well*) für mindestens 2 h bei 4 °C fixiert und alle nicht adhärenen Zellen durch 5x Waschen mit *aqua dest.* entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit SRB-Färbelösung (0,4% Sulforhodamin B (w/v), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim in 1%er Essigsäurelösung (v/v), 75 μ l/*well*) für 30 min gefärbt. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Zellen mit 1%iger Essigsäurelösung 5x gewaschen, der gebundene Farbstoff mit Tris-Pufferlösung (10 mM Tris-Base,

100 µl/Loch) extrahiert und die Platte am Multilabel-Photometer mit einer Absorption bei 570 nm gemessen (BioluminTM 960, Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale CA, USA). Nach Analyse mit der Biolumin-Software (ExperimentTM Version 1.0, Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale CA, USA) und Abzug des ermittelten Leerwertes von den Probenwerten konnte die toxische Hemmstoffkonzentration, die sich durch einen beginnenden Extinktionsabfall zeigte, ermittelt werden.

4.6 X-Gal-Färbung

Um die mit dem *lacZ*-Gen markierten Tumorzellen auf den Organoberflächen sichtbar zu machen, wurden die Organe mit dem für die β -D-Galaktosidase spezifischen Färbesubstrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranoside in Analysetöpfchen (Greiner, Nußbach, Österreich) gefärbt (Krüger et al., 1998). Dazu wurden die Organe unmittelbar nach der Entnahme aus der Maus kurz in PBS gewaschen und für 90 bis 120 min in Fixierlösung (135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM K₂HPO₄, 2% (w/v) Formaldehyd, 0,2% (w/v) Glutaraldehyd) bei Raumtemperatur (RT) anfixiert. Dabei mussten die Lebern mit der runden Seite nach oben liegen und die Lungen mit einem kleinen Stück Mullbinde beschwert werden, um eine optimale Färbung zu gewährleisten. Dann wurden die Organe 3x gründlich mit PBS gewaschen und anschließend in X-Gal-Färbelösung (10 ml/Organ) lichtgeschützt für 4-6 h bei 37 °C (Deckel durfte nur lose aufliegen) und danach über Nacht bei 4 °C gefärbt. Auch hier mussten die Lebern mit der runden Seite nach oben liegen und die Lungen mit einem kleinen Stück Mullbinde beschwert werden. Die X-Gal-Färbelösung wurde dafür frisch aus einer X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim], Aufbewahrung lichtgeschützt bei -20 °C) angesetzt, indem diese 1:40 in einer Ausgangsfärbelösung (5 mM K₃Fe(CN)₆, 5 mM K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O, 2 mM MgCl₂, 0,01% [w/v] Natrium-Deoxycholat und 0,02% [v/v] Nonidet P 40, Aufbewahrung lichtgeschützt bei 4 °C) verdünnt wurde. Eine unspezifische Anfärbung der endogenen, als lysosomales Enzym in geringem Maße physiologisch in den Organen vorkommender β -Galaktosidase wurde durch den pH-Wert von 7,1 der X-Gal-Färbelösung verhindert. Nach der typischen indigo-blauen Färbung der Tumorzellen wurden die Organe nochmals in PBS gewaschen und dann in Fixierlösung (10 ml/Organ) bei 4 °C aufbewahrt.

4.7 Biochemische Verfahren

4.7.1 Proteingewinnung und Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

4.7.1.1 Proteingewinnung aus Zellen

Für die Proteingewinnung aus L-CI.5s Zellen wurden 20 ml einer L-CI.5s Zellsuspension (kultiviert in einer 75 cm² Zellkulturflasche) in ein 50 ml-Schraubdeckelröhrchen (TPP, Trasadingen, Schweiz) gegeben und zentrifugiert (4 °C, 170 g, 4 min, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Für die Proteingewinnung aus HT1080 Zellen wurde eine ca. 80% konfluent mit Zellen besiedelte Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) mit PBS gewaschen, mit EDTA (0,5 M EDTA; Biochrom KG, Berlin; 1:30 verdünnt in PBS) abgelöst, dann in ca. 10 ml PBS aufgenommen und zentrifugiert (4 °C, 170 g, 4 min, siehe oben). Das Pellet (L-CI.5s oder HT1080 Zellen) wurde zweimal gewaschen, indem jeweils der Überstand abgenommen und das Pellet mit ca. 20 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert (4 °C, 170 g, 4 min, siehe oben) wurde. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml Tris gepufferte Saline (*tris buffered saline*, TBS, pH 8,5) mit 1% (v/v) Triton X-100 resuspendiert und über Nacht (ca. 12 h) bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde das Zelllysate zentrifugiert (4 °C, 12.000 g, 1 h, Beckman J2-HS, Rotor JA-20, Beckman, München), der Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert.

4.7.1.2 Proteingewinnung aus Gewebe

In ein Kryo-Schraubdeckelgefäß mit Silikon-Dichtring (Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe) wurden wenige Zirkoniumkügelchen (1,0 mm im Durchmesser, Biospec Products Inc., Bartlesville, USA) und 300-800 µl (je nach Größe des Gewebestückes) eiskalter Extraktionspuffer (50 mM Tris HCl, 5 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 200 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, pH 7,5) gegeben (alles auf Eis). Dann wurde ein ca. 0,5 cm³ großes, in flüssigem Stickstoff gefrorenes Leberstück hinzugegeben, noch gefroren in einem MinibeadbeaterTM (Biospec Products Inc., Bartlesville, USA) ca. 20 sec homogenisiert und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (4° C, 12.000 g, 10 min, siehe oben) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen (ohne die evtl. vorhandene Fettschicht), in einem Schnappdeckelreaktionsgefäß (JOSEF PESKE Ohg, Aindling) gesammelt, aliquotiert (20-50 µl Aliquots), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.7.1.3 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Vor den zymographischen Analysen wurde der Gesamtproteingehalt in den verschiedenen Proben mit Hilfe des BCATM (*Bicinchoninic acid*) Protein assays (Pierce, Rockford IL, USA) bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA (bovines Serumalbumin) in Konzentrationen von 4 bis 0,06125 mg/ml in 1:2 (v/v) Verdünnungsschritten verwendet. Der BSA-Standard wurde in dem Puffer gelöst, der auch in den zu bestimmenden Proben enthalten ist, also z.B. für Gewebeproben in 1:10 oder 1:100 verdünntem Extraktionspuffer, je nachdem ob die Gewebhomogenate vor der Proteinbestimmung 1:10 oder 1:100 mit H₂O verdünnt wurden. Die Durchführung erfolgte in einer durchsichtigen 96 well-Mikrotiterplatte (mit Flachboden, TPP, Trasadingen, Schweiz), indem in jeweils zwei wells (Doppelbestimmungen) je 10 µl des Standards bzw. der vorverdünnten Probe (Gewebe meist 1:100) gegeben und dann zu diesen noch 200 µl der fertigen BCA Lösung (Lsg1:Lsg2 = 1:50) hinzugefügt wurden. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der Absorption bei 570 nm am Multilabel-Photometer (BioluminTM 960, Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale CA, USA). Die Analyse erfolgt mit Hilfe der Biolumin-Software (ExperimentTM Version 1.0, Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale CA, USA).

4.7.2 Zymographie

Für den zymographischen Nachweis von hochmolekularem- (*high molecular weight*-, HMW-) und niedermolekularem-uPA (*low molecular weight*-, LMW-uPA) und den Gelatinasen (MMP-2 und -9) erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der jeweiligen Proteinproben in einem Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gel (SDS-PAGE; Dicke: 0,75 mm). Das Sammelgel enthielt dabei 5% (w/v) Polyacrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6,8), 0,1% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS), 0,05% (w/v) Aminopersulfat (APS) und 0,05% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Das Trenngel enthielt 10% (w/v) Polyacrylamid, 375 mM Tris/HCl (pH 8,6), 0,1% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS), 0,05% (w/v) APS, 0,05% (v/v) TEMED und 0,1% (w/v) Gelatine (aus Schweinehaut). Dem Trenngel für die uPA-Zymographie wurde noch ca. 3,8 µg/ml (entspricht 42 mU) Plasminogen (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg) hinzugefügt. Plasminogen diente als Substrat für im Zelllysate oder in Gewebhomogenaten vorhandenes uPA, wurde von uPA zu Plasmin umgewandelt und baute dann Gelatine ab. Die MMP-Zymographie erfolgte mit 15 µg (Lunge) bis 30 µg Gesamtprotein (Leber oder Zelllysate) pro Bahn, die uPA-Zymographie mit 5 bis 7,5 µg Gesamtprotein (Lunge, Leber oder Zelllysate) pro Bahn unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Zum

Auftragen wurden die Proben 4:1 mit Probenpuffer (*Loading Buffer*, 250 mM Tris, 40% [v/v] Glycerin, 8% [w/v] SDS, Spatelspitze Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt. Als Größenstandard wurden 12 µl *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA) aufgetragen. Als Positivkontrolle dienten 0,1 ng humanes HMW-uPA bzw. jeweils 100 ng rekombinantes humanes MMP-2 und MMP-9 (Roche Molecular Biochemicals, Penzberg), welches für 30 min mit 2 mM Amino-Phenyl-Mercuric-Acetat aktiviert wurde. Nach der Elektrophorese (Sammel- und Trenngel bei 20 mA in Elektrophoresekammern von Mini-Protean III Systemen [BioRad, München]) in Laufpuffer (3,1 g/l Tris + 14,4 g/l Glyzin + 1 g/l SDS) wurden die MMP-Gele in MMP-Inkubationspuffer I (50 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, 2,5% [v/v] Triton X-100, pH 7,5) und die uPA-Gele in uPA-Inkubationspuffer I (100 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, 2,5% [v/v] Triton X-100, pH 7,5) zweimal 15 min unter Schwenken gewaschen, um das SDS zu entfernen und dadurch die Proteine zu renaturieren. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der MMP-Gele in MMP-Inkubationspuffer II (50 mM Tris/HCl, 5 mM CaCl₂, 200 mM NaCl, pH 7,5) und der uPA-Gele in uPA-Inkubationspuffer II (100 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, pH 7,5) für 19 Stunden bei 37 °C. Das EDTA im uPA-Inkubationspuffer II schaltete dabei jegliche in den Proben vorhandene Aktivität von MMPs inklusive Gelatinasen aus. Danach wurden die Gele wie bereits früher beschrieben (Edwards et al., 1996) für 1-2 h in Coomassie-Färbelösung (30% [v/v] Isopropanol, 10% [v/v] Eisessig, 0,2% [w/v] Coomassie brilliant blue) gefärbt und dann bis zum optimalen Kontrast in Entfärbelösung (10% [v/v] Isopropanol, 10% [v/v] Eisessig) gewaschen. Die Gele wurden anschließend mit einem Geldokumentationssystem (Bio-Profil Vilber Loumat, Trocy, Frankreich) und der dazugehörigen Photo Capt Software[®] im Durchlichtverfahren digital fotografiert.

4.7.3 ROTEG[®]-Blutgerinnungsassay

Das ROTEG[®] *Whole Blood Haemostasis System* (Rotation Thrombelastography, Pentapharm, München) ermöglicht die Erkennung einer gestörten Gerinnung und beurteilt die Interaktion von Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren und zellulären und plasmatischen Bestandteilen des Blutsystems bei der Gerinnung. Das System basiert auf einer mit der Blutprobe gefüllten, fixierten Küvette aus Kunststoff (ROTEG[®] *all-plastic reaction cups*), in der eine Nadel ständig rotiert. Die Bewegungen der Nadel, in zunehmendem Maße von einem anhaftenden Blutgerinnsel in der Küvette behindert, werden von einem optomechanischen Detektionssystem erfasst. Die Messungen wurden gemäß der Empfehlung des Herstellers abgeändert nach Ca-

latzis et al., 1996 und Calatzis et al., 2000 durchgeführt. Es wurden ausschließlich Pipetten und Schnappdeckelreaktionsgefäße aus Polypropylen für den Umgang mit Blut und Reagenzien verwendet, da es durch Kontakt der Gerinnungsenzyme an Glasoberflächen zur Aktivierung und Verbrauch der Kofaktoren kommt. Zum Testen der Wirkung der FXa-Inhibitoren WX-FX4 und DX-9065a sowie des hochspezifischen und klinisch als Antikoagulant zugelassenen Thrombin-Inhibitors Lepirudin (rekombinantes Hirudin; Deitcher, 2003); freundliche Gabe von Prof. Dr. Axel Stemberger, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der TU München) auf die Gerinnung *in vitro* wurde humanes Zitratplasma und -blut (Standard entsprechend 1 Teil Zitratlösung und neun Teile Plasma/Vollblut) verwendet. Plasma und Vollblut wurden von dem Institut für Transfusionsmedizin des DRK (Frankfurt) zur Verfügung gestellt. 22 µl einer Hemmstofflösung (Lösungsmittel *aqua ad iniectabilia* [Delta-Pharma, Pfullingen]) wurden zu Plasma/Vollblut gegeben, um Endkonzentrationen in den Proben von 1, 8, oder 16 µM zu erhalten (300 µl Gesamtvolumen). Für die *ex vivo* Untersuchungen wurden in einer 1 ml Spritze aus Kunststoff als Antikoagulant 33 µl 3,13% (w/v) Natriumzitrat-2-Hydrat (entspricht 109 mM; Eifelfango[®], Bad Neuenahr-Ahrweiler) vorgelegt und unmittelbar nach Tötung einer Maus während der Endautopsie der jeweiligen Tierversuche (siehe 4.3.1.2 und 4.3.2.1) dieser rasch 270 µl Blut mit einer Kanüle (25 GA1, 0,5 x 25, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) aus der *Vena cava caudalis* entnommen. Das Zitratblut wurde in ein 1,5 ml Schnappdeckelreaktionsgefäß gegeben und durch leichtes Schütteln homogenisiert, um die Zitratlösung im Blut gleichmäßig zu verteilen. Wenn die *in vitro* Proben hergestellt oder vier Blutproben abgenommen worden waren, wurden 300 µl der jeweiligen Zitratplasma- oder Zitratblutprobe zu den in der ROTEG[®]-Küvette vorgelegten 20 µl 200 mM CaCl₂, welches das Natriumzitrat antagonisierte, gegeben und alles mit der Pipettenspitze leicht verrührt. Nach Auswahl der Messung der Gerinnungszeit am Computer (*coagulation time*; CT: Messung des Anteils von Gerinnungsfaktoren und Antikoagulantengabe an der Gerinnung) wurden die zu messenden gefüllten Küvetten rasch per Hand in die gewünschte Messposition des jeweiligen ROTEG[®]-Kanals gebracht und gemessen. Die Gerinnungsbildung wurde automatisch durch den Kontakt des Zitratblutes mit der unphysiologischen Küvettenwand sowie durch die höchstwahrscheinlich vorhandene endogene Gewebsthorboplastin-Aktivität des Blutes ausgelöst. Die Elastizität des sich bildenden Gerinnsels wurde kontinuierlich über die Zeit als Rekalzifizierungszeit mit Hilfe eines Photosensors gemessen und die gesamte Kinetik der Gerinnungsbildung und -verfestigung bis hin zur Lyse und Einschluss der Thrombozyten in Kurvenform mit der ROTEG[®]-Software graphisch dargestellt.

4.8 Molekularbiologische Verfahren

4.8.1 RNA-Isolation

4.8.1.1 RNA-Isolation aus Zellen

Für die RNA-Isolation aus L-CI.5s Zellen wurden 20 ml einer Zellsuspension (kultiviert in einer 75 cm² Zellkulturflasche) in ein 50 ml-Schraubdeckelröhrchen gegeben und zentrifugiert (4 °C, 170 g, 4 min, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde 1x gewaschen, indem der Überstand abgenommen und das Pellet mit ca. 20 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert wurde (4 °C, 170 g, 4 min, siehe oben). Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml kaltem (4 °C) Trizol[®] (Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA) resuspendiert, in ein 1,5 ml-Schnappdeckelreaktionsgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) unter dem Abzug inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol, nach 15 sec Schütteln eine weitere Inkubation bei RT über 2-3 min und danach eine Zentrifugation (15 min, 12.000 g, 4 °C, Beckman J2-HS, Rotor JA-20, Beckman, München). Die obere, RNA enthaltende farblose Phase wurde abgenommen (ca. 500 µl), in ein Schnappdeckelreaktionsgefäß mit 500 µl vorgelegtem Isopropanol gegeben, kurz geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert, um die RNA zu fällen. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (10 min, 12.000 g, 4 °C, siehe oben) und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Die RNA wurde mit 1 ml 80% (v/v) Ethanol in DiEthylPyroCarbonat-Wasser (DEPC-H₂O, [200 µl DEPC / 1 H₂O]) gewaschen, zentrifugiert (5 min, 5400 g, 4 °C, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) und der Ethanol abgenommen und verworfen. Nach 10-minütigem Trocknen des RNA-Pellets an der Luft wurde dieses in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen und über Nacht bei 4 °C gelöst. Am nächsten Tag erfolgten die Bestimmung der RNA-Konzentration mit einem Photometer (Beckman DU 640, Beckman, München) und eine Degradationskontrolle in einem Agarosegel (1% Agarose [Cambrex, Rockland, USA] in Tris-Acetat-EDTA-Puffer [TAE-Puffer; 40 mM TRIS-Acetat, 1 mM EDTA: Merck, Schwalbach; pH=8,5], ca. 0,002% Ethidiumbromid), bevor die RNA in Aliquots bei -80 °C zur Aufbewahrung eingefroren wurde.

4.8.1.2 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Isolation aus Gewebe wurde wie bereits beschrieben (Martin et al., 1996) durchgeführt. Pro Gewebeprobe wurden 8 ml eiskalte *Solution D* (4 M Guanidin Thiocyanat [Fluka, Buchs, Schweiz], 25 mM Na-Zitrat [pH 7,0], 100 mM β-Mercaptoethanol, 0,5% [w/v] Lau-

royl Sarcosine, 0,1% [v/v] Antifoam 289, in DEPC-H₂O (siehe oben) in ein 50 ml-Schraubdeckelröhrchen gegeben (unter Abzug auf Eis). Dann wurde die in flüssigem Stickstoff gefrorene Gewebeprobe hinzugefügt und mit einem Homogenisator (Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel KIKA-Labortechnik, Staufen i. Br.) in der *Solution D* für 30 s homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,8 ml 2 M Na-Azetat (pH 4,0), 8,0 ml Phenol (wassergesättigt) und 1,6 ml Chloroform. Nach 15 s Schütteln und 15 min Ruhen auf Eis wurde das Homogenat in ein autolaviertes Corex-Röhrchen (Corning, New York, U.S.A.) umgefüllt, mit Parafilm abgedeckt und zentrifugiert (20 min, 12.000 g, 4 °C, Beckman J2-HS, Rotor JA-20, Beckman, München). Dann wurde die obere Phase (ca. 7 ml) abgenommen, in ein 50 ml-Schraubdeckelröhrchen umgefüllt, mit dem gleichen Volumen eiskaltem (-20 °C) Isopropanol versetzt und nach kurzem Schütteln über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden alle Proben mit Isopropanol (Apotheke des Klinikum rechts der Isar der TU München) auf gleiche Volumina aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, ca. 3300 g, 4 °C, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2,0 ml DEPC-H₂O resuspendiert, mit 2,0 ml 50% (v/v) Phenol, 50% (v/v) Chloroform (wassergesättigt) versetzt und 10 bis 20s geschüttelt. Dann wurde alles in ein 15 ml-Schraubdeckelröhrchen umgefüllt und zentrifugiert (5 min, ca. 3300 g, 4 °C, siehe oben). Zum Fällen der RNA wurde der Überstand abgenommen, in ein 15ml-Schraubdeckelröhrchen überführt, mit dem halben Volumen 7,5 M NH₄-Acetat und dem 2,5-fachen Volumen (ca. 4 ml) 100% Ethanol versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (25 min, ca. 3300 g, siehe oben, RT) wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet ca. 30 min getrocknet, anschließend in 50 bis 200 µl DEPC-H₂O (je nach Größe, siehe oben) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Schnappdeckelreaktionsgefäß (für RNA) umgefüllt. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration mit einem Photometer (Beckman DU 640, Beckman, München) und einer Degradationskontrolle in einem Agarosegel (siehe unter 4.8.1.1) wurde die RNA in Aliquots bei -80 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

4.8.2 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*, quantitative RT-PCR; in Kooperation durchgeführt mit C. Pennington und D. R. Edwards, Norwich, UK)

Die quantitative RT-PCR wurde wie bereits beschrieben (Arlt et al., 2002; Kopitz et al., 2005) durchgeführt. Ein µg der Gesamt-RNA einer Probe wurde in einem 20 µl Ansatz unter Verwendung von 2 µl *Random Hexamers* (100 ng/µl) und 2 µl *Superscript II* Reverse Transkrip-

tase (Life Technologies Inc., Paisley, Großbritannien) nach den Herstellerangaben revers transkribiert. Oligonukleotidprimer und mit Fluoreszenz markierte TaqMan[®]-Sonden, spezifisch für murine uPA, FX und Matriptase (Tab. 4.2) wurden unter Verwendung der *Primer Express 1.0* Software (PE Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien) hergestellt. Um die Amplifikation von genomischer DNA zu verhindern und sicherzustellen, dass das erhaltene PCR-Signal tatsächlich auf die cDNA zurückzuführen ist, wurden die Sonden in verschiedenen Exons direkt an Exon/Exon-Grenzen plaziert. BLAST-N-Suchen wurden für alle *Primer*- und Sonden-Nukleotidsequenzen durchgeführt, um die jeweilige Genspezifität sicherzustellen. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch eine direkte Sequenzierung der Amplikons bestätigt. Spezifische Primer und Sonden für ribosomale 18S RNA wurden als endogene Kontrolle verwendet, um Unterschiede in der Gesamt-RNA der verschiedenen Proben berücksichtigen zu können. Entsprechende TaqMan[®] 18S RNA-Primer und eine 5' VIC-markierte Sonde wurden entsprechend den Herstellerangaben verwendet (PE Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien). Die Quantifizierung der Expression der untersuchten Gene in den verschiedenen Proben in Relation zur 18S RNA-Expression erfolgte unter Verwendung des ABI *Prism 7700* Sequenz-Detektionssystems (TaqMan[®], Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien). Die PCR-Reaktionen aller Proben wurden in geeigneten *96-well*-Mikrotiterplatten (Applied Biosystems, Darmstadt) als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dazu wurde 0,5% der cDNA, 12,5 µl 2x TaqMan[®] Universal PCR Mastermix (PE Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien), 100 nM Sonde und 200 nM jedes Primers zusammengegeben und anschließend auf ein Endvolumen von 25 µl mit *aqua dest.* aufgefüllt. Für die Quantifizierung wurde anhand einer ausgewählten cDNA eine Verdünnungsreihe hergestellt (18S RNA: 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 und 0,031 ng cDNA; mRNA: 20, 10, 5, 2, 1 und 0,5 ng), die der Erstellung einer Eichgeraden diente. Das Programm für den Thermocycler beinhaltet eine

Tabelle 4.2 *TaqMan* Primer und Sonden

uPA	Vorwärts <i>Primer</i> : Rückwärts <i>Primer</i> : Sonde:	5'-GAAACCCTACAATGCCACAGA-3' 5'-GACAAACTGCCTTAGGCCAATC -3' 5'-CACAATTACTGCAGGAACCCTGACAAC -3'
Faktor X	Vorwärts <i>Primer</i> : Rückwärts <i>Primer</i> : Sonde:	5'- AACGAAGACAATGAAGGGTTCTG -3' 5'- TGAATCGCCTGGCCTGAT -3' 5'- CATCCTCACTGCTGCCACTGTCTCC -3'
Matriptase	Vorwärts <i>Primer</i> : Rückwärts <i>Primer</i> : Sonde:	5'- AGATCTTTCTGGATGCGTATGAGA -3' 5'- GGACTTCATTGTACAGCAGCTTCA -3' 5'- TTTATCAGCCTGGCCAGCCAGGTG -3'

initiale Haltephase für 120 s bei 50 °C und anschließenden 10 min bei 95 °C. Diesem folgte ein zweistufiges TaqMan[®] PCR Programm mit abwechselnd 15 s bei 95 °C und 60 s bei 60 °C über 40 Zyklen. Die Auswertung des PCR-Laufs und die Quantifizierung erfolgten mittels SDS-Software (PE Applied Biosystems, Warrington, Großbritannien).

4.9 Statistische Analysen

Statistisch auswertbare Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Sowohl für den statistischen Vergleich der Ergebnisse aus den Metastasierungsexperimenten (mittlere Zahl der Lungen- bzw. Lebermetastasen, der Körpergewichte und der Gerinnungsparameter in den verschiedenen Behandlungsgruppen) als auch für den statistischen Vergleich der Ergebnisse aus den quantitativen RT-PCR Analysen wurde der Mann-Whitney Rank-Sum-Test angewendet. Der statistische Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven erfolgte mit Hilfe des exakten Log-Rank-Tests. Unterschiede wurden als signifikant angesehen bei $p < 0,05$.

5 Ergebnisse

5.1 Steigerung der anti-metastatischen Wirksamkeit durch Selektivitäts- und nicht Affinitätsoptimierung synthetischer Serinprotease-Inhibitoren (sSPIs) im murinen T-Zell Lymphom

Im murinen T-Zell Lymphom konnte gezeigt werden, dass die anti-metastatische Wirksamkeit von Matrix Metalloproteaseinhibitoren direkt mit ihrer Selektivität (und nicht Affinität) für die Zielprotease (MMP-9) korreliert (Arlt et al., 2002). Da auch Serinproteasen die Metastasierung vieler Tumorarten fördern, stellte sich die Frage, ob eine solche Korrelation zwischen Selektivität für eine Zielprotease und anti-metastatischer Wirksamkeit ebenfalls für Serinproteaseinhibitoren besteht. Unter den Serinproteasen konnte insbesondere für das uPA-System eine metastasierungsfördernde Wirkung nachgewiesen werden. Um daher oben genannte Hypothese zu überprüfen, musste zunächst der Nachweis von uPA als potentiell Zielmolekül bei der Metastasierung in dem experimentellen T-Zell Lymphom erbracht werden. Um anschließend testen zu können, ob eine anti-uPA-Therapie die Metastasierung in diesem Tumormodell wirksam hemmen kann, sollte eine Reihe von uPA-Inhibitoren eingesetzt werden. Die gezielte Verwendung von Hemmstoffen mit eindeutig unterschiedlichen Selektivitäts- und Affinitätsprofilen sollte schließlich die Überprüfung der Hypothese, ob auch die anti-metastatische Wirkung von Serinproteaseinhibitoren mit ihrer Selektivität für eine Zielprotease korreliert, ermöglichen. Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden vorab in Banke et al., *Biol. Chem.* 2003 (384: 1515-1525) veröffentlicht.

5.1.1 Anstieg der uPA-Expression in der Leber im Zeitverlauf des Metastasierungsprozesses

Eine Untersuchung oben beschriebener Hypothese kann nur in einem Tumormodell erfolgen, in dem eine für die Metastasierung relevante Zielprotease bekannt ist. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob uPA im T-Zell Lymphommodell mögliches Zielenzym einer anti-metastatischen Inhibitortherapie sein konnte. Dazu wurde mittels quantitativer RT-PCR und spezifischen *Primern* für murine uPA-mRNA überprüft, ob die über die Zeit zunehmende, modelltypische Lebermetastasierung dieses Tumors bei den Mäusen mit einer erhöhten Expression von uPA-mRNA einhergeht. Nach intravenöser (i.v.) Tumorzellinokulation (TZI) von 5.000 *lacZ*-markierten L-CI.5s Lymphomzellen kommt es modelltypisch durch die erfolgreiche Extravasation und Proliferation der Zellen zu der Bildung von Makrometastasen (> 0,2 mm im Durchmesser). Zusätzlich kommt es im Zeitverlauf der Metastasierung zu einer

zunehmenden sekundären Invasion des Leberparenchyms in Form von Mikrometastasen (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen mit einem Durchmesser $< 0,2$ mm), ausgehend von etablierten Metastasen. Um einen Expressionsanstieg von uPA-mRNA im Verlauf dieser zunehmenden Tumorbelastung zu untersuchen, mussten die Tiere zu definierten Zeitpunkten (3 h, ein Tag, zwei, fünf, sechs und sieben 7 Tage) nach TZI getötet und deren Lebern untersucht werden. uPA-mRNA konnte sowohl in kultivierten Lymphomzellen als auch in metastasenfremen Lebern von Mäusen der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 5.1 A). Bei der Untersuchung der Lebern tumortragender Mäuse konnte ein leichter uPA-mRNA Expressionsanstieg bis fünf Tage nach TZI beobachtet werden (Abb. 5.1 A). An Tag 6

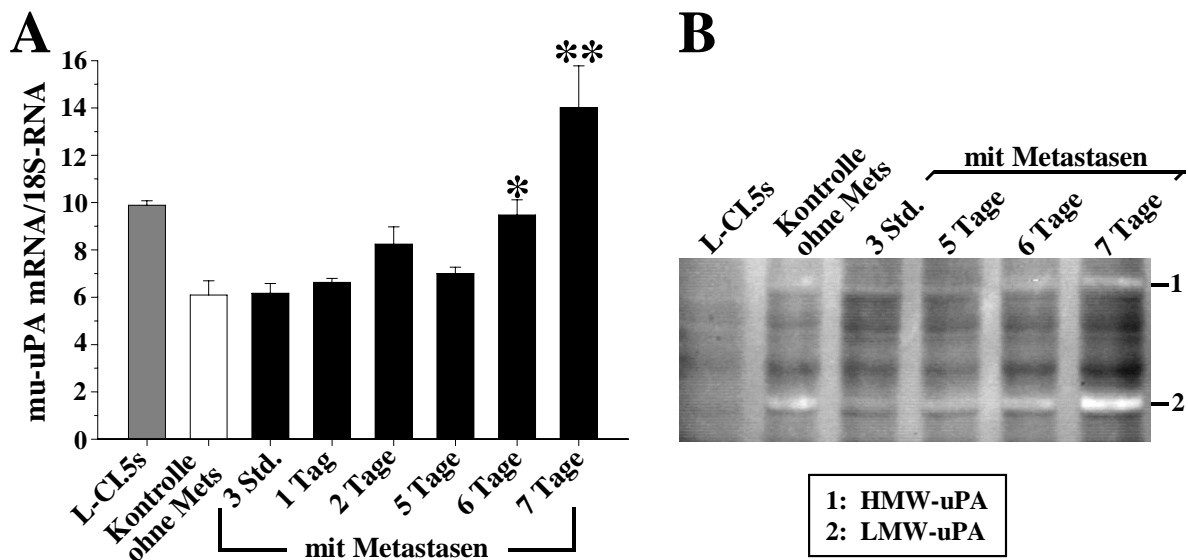


Abbildung 5.1: Expression von murinem uPA in der Leber im Zeitverlauf des T-Zelllymphom-Metastasierungsprozesses. An Tag 0 wurden 5.000 L-CI.5s Lymphomzellen pro *syngene* DBA/2 Maus iv appliziert und der Gehalt an muriner (mu) uPA mRNA mittels quantitativer RT-PCR (A) und uPA Protein mittels Zymographie (B) in den Lebern zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach TZI ermittelt. Zusätzlich Bestimmung von uPA mRNA und Protein in kultivierten L-CI.5s Zellen und Lebern tumorzellfreier Mäuse (Kontrollgruppe ohne Metastasen). A) Gezeigt sind relative Spiegel an mu-uPA mRNA zu 18S-RNA (y-Achse) von Lebern tumortragender (jeweils 3 Stunden, 1 Tag, 2, 5, 6 und 7 Tage nach TZI) und tumorzellfreier Mäuse (Kontrolle; n = 4 pro Gruppe): Geringfügig erhöhte Werte bis Tag 5 ($p > 0,05$; 3 Std.: $6,2 \pm 0,4$; 1 Tag: $6,6 \pm 0,2$; 2 Tage: $8,2 \pm 0,7$; 5 Tage: $7,0 \pm 0,3$) gegenüber der Kontrollgruppe ($6,1 \pm 0,6$). Signifikanter Anstieg gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 6 ($p = 0,03$; ein Stern über der Säule; $9,5 \pm 0,6$), weiterer signifikanter Anstieg an Tag 7 im Vergleich zu Kontrolle und Tag 6 ($p < 0,02$; zwei Sterne über den Säulen; $14,0 \pm 1,8$). Expression relativer mu-uPA Spiegel bei L-CI.5s Zellen ($9,9 \pm 0,2$). Darstellung von Mittelwerten \pm mittlerem Standardfehler (Fehlerbalken). B) Dargestellt ist der Gehalt an HMW- und LMW-uPA in Lebergewebe metastasenbelasteter (jeweils 3 Stunden, 5, 6 und 7 Tage nach TZI; Spuren 3-6) und metastasenfremier Tiere (Kontrolle; Spur 2): Vorhandensein von HMW- und LMW-uPA in metastasenfremen Lebern (Spur 2), keine Induktion im Zeitverlauf der Metastasierung bis Tag 5 (Spuren 3-4). Leichte Zunahme der uPA-Spiegel an Tag 6 und 7 (Spuren 5-6). Kein Nachweis einer Expression von uPA Protein in L-CI.5s Zellen. Gezeigte Daten sind repräsentativ für mindestens vier verschiedenen Mäuse pro Gruppe.

kam es zu einer signifikanten Erhöhung der uPA-mRNA Expression gegenüber der Kontrolle. Diese wurde durch die noch stärkere Expression an Tag 7 signifikant übertroffen (Abb. 5.1 A). Zu diesem fortgeschrittenen experimentellen Zeitpunkt stieg die Dichte der sekundären Tumorzellinfiltration des Lebergewebes so drastisch an, dass eine Abgrenzung einzelner Metastasen nicht mehr möglich war.

Da uPA auf mRNA Ebene detektiert werden konnte, wurde als Nächstes untersucht, ob uPA auch auf Proteinebene im Verlauf der Metastasierung im Lebergewebe nachgewiesen werden kann und ob die Menge des Enzyms bei zunehmender metastatischer Organbelastung ansteigt. Hierfür wurde Lebergewebe zymographisch untersucht und die Menge an uPA-Protein in den Lebern der DBA/2 Mäuse zu den oben genannten Zeitpunkten im T-Zell Lymphom-Metastasierungsmodell bestimmt. Dabei konnten basale Spiegel von HMW- und des Spaltungsproduktes LMW-uPA Protein nachgewiesen werden, deren Mengen im Zeitverlauf der Metastasierung, vor allem nach sieben Tagen, leicht anstiegen (Abb. 5.1 B). Im Gegensatz zu den basalen Spiegeln metastasenfrier Kontrolllebern konnte kein uPA Protein in kultivierten L-CI.5s-Zellen mittels zymographischer Analyse gefunden werden (Abb. 5.1 B). Da basale uPA-Spiegel im Zeitverlauf der Metastasierung des T-Zelllymphoms nachgewiesen werden konnten, die zudem einen Anstieg bei zunehmender metastatischer Organbelastung der Mäuse zeigten, sollte untersucht werden, ob die Metastasierung dieses Tumormodells wirkungsvoll durch eine anti-uPA-Therapie mit synthetischen Inhibitoren reduziert werden könnte.

5.1.2 Anti-metastatische Wirkung von uPA-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität im murinen T-Zell Lymphom

Da im Zeitverlauf der Metastasierung dieses aggressiven T-Zell Lymphommodells basale und bei fortgeschrittener Metastasierung sogar ansteigende uPA-Spiegel in den Lebern der Tiere nachgewiesen werden konnten und uPA eine zentrale Rolle in der proteolytischen Kaskade einnimmt, konnte von einem möglichen Beitrag dieser Serinprotease an der Metastasierung in dem Tumormodell ausgegangen werden. Daher sollte untersucht werden, ob eine anti-uPA-Therapie die Tumorzellkolonisierung der Leber und die darauf folgende Ausbildung experimenteller Metastasen verhindern könnte. Um dies zu testen, wurden die zur Klasse der 4-Amidinobenzylamid-Derivate gehörenden und strukturell eng verwandten uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-503 und CJ-435 im T-Zell Lymphommodell eingesetzt. Diese zeichneten sich durch eine starke uPA-Affinität (Tab. 4.1) und ansteigende uPA-Selektivität (beispielhaft dargestellt in Bezug auf Trypsin und Thrombin, Abb. 5.2; berechnet auf der Grundlage von Tab. 4.1) aus. Aufgrund der unterschiedlichen Selektivitätsprofile konnte auch der Frage nach

einer möglicherweise gesteigerten anti-metastatischen Wirkung durch Verwendung uPA-selektiver Serinproteaseinhibitoren nachgegangen werden. Um eine größtmögliche anti-metastatische Wirkung zu erzielen, sollte einerseits die frühe Tumorzellkolonisierung der Leber, die vor allem auf die Zirkulation in und Extravasation aus dem Blutgefäßsystem der intravenös applizierten Tumorzellen zurückzuführen ist, verhindert werden. Andererseits sollte die kurze Halbwertszeit der Eliminationsrate der Inhibitoren (siehe Tab. 4.1) berücksichtig

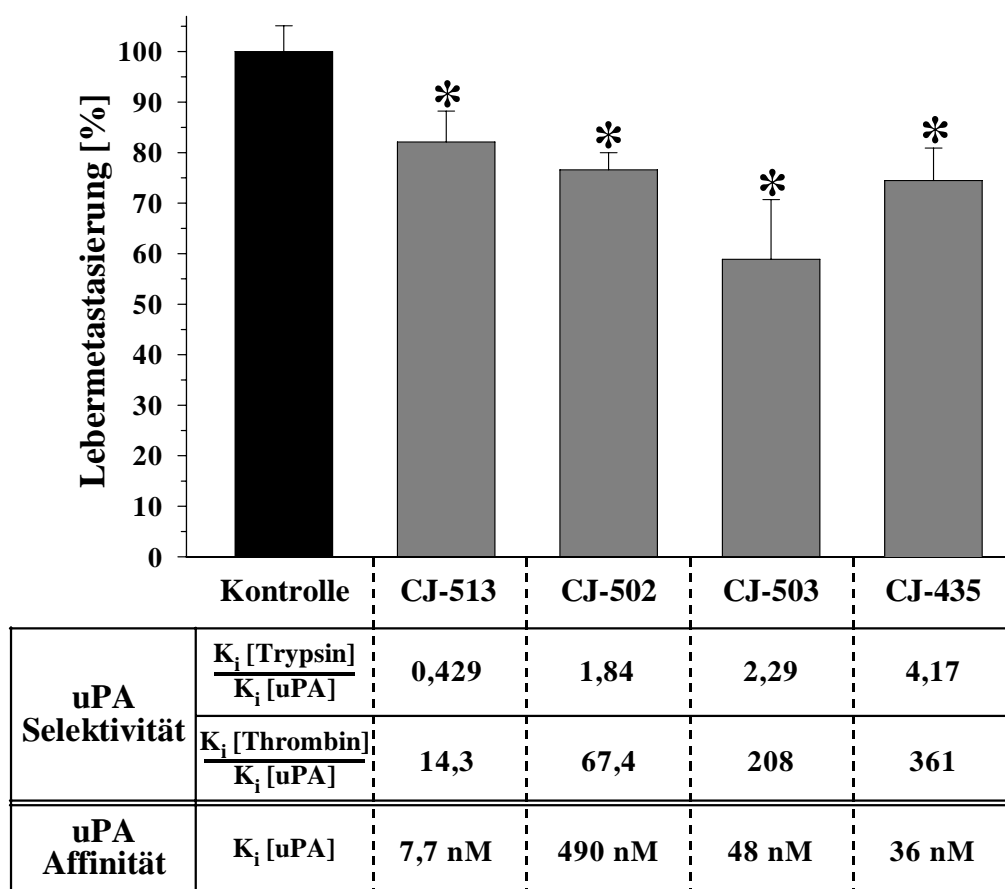


Abbildung 5.2: Therapeutische Wirkung der uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-503 und CJ-435 auf die Makrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell. Gegenüberstellung von anti-metastatischer Wirkung (Säulendiagramm) und uPA-Selektivität und -Affinität (Tabelle) der Serinproteaseinhibitoren (Dosis: 0,5 mg/kg zweimal täglich). Die Inhibitoren sind von links nach rechts entsprechend steigender uPA-Selektivität (beispielhaft dargestellt in Bezug auf Trypsin und Thrombin) angeordnet. Darstellung der relativen Anzahl experimenteller Makrometastasen (> 0,2 mm im Durchmesser) auf der Oberfläche der Mäuselebern in den Behandlungsgruppen (CJ-513: n = 11, anti-metastatische Wirkung: $17,9 \pm 6,1\%$; CJ-502: n = 10, Wirksamkeit: $23,4 \pm 3,4\%$; CJ-503: n = 10, Wirksamkeit: $41,1 \pm 11,8\%$; CJ-435: n = 10, Wirksamkeit: $25,5 \pm 6,4\%$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $138,1 \pm 7,1$, entsprechend $100 \pm 5,1\%$; n = 11 Mäuse). Die anti-metastatischen Wirkungen der Behandlungsgruppen waren in allen Fällen statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle (Stern über den Säulen; CJ-513: p = 0,03; CJ-502: p = 0,005; CJ-503: p = 0,01; CJ-435: p = 0,004), aber nicht untereinander (p > 0,05). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler.

werden. Dazu mussten die ersten Behandlungen um den Zeitpunkt der TZI herum durchgeführt werden. In diesem ersten Hemmstoff-*screening* wurden die Inhibitoren den DBA/2 Mäusen der jeweiligen Behandlungsgruppe in einer Dosis von 0,5 mg/kg zweimal täglich intraperitoneal über den Zeitraum des gesamten Experimentes bis zum Versuche verabreicht, um auch späte Schritte der experimentellen Metastasierung zu beeinflussen (Abb. 5.2). Mittels Quantifizierung der X-Gal-gefärbten Makrometastasen (> 0,2 mm im Durchmesser) auf der Oberfläche der Mäuselebern konnte eine signifikante Reduktion der Metastasierung um circa 20 bis 40% in den verschiedenen Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe sechs Tage nach Injektion der L-CI.5s Zellen nachgewiesen werden (Abb. 5.2). Dabei ließ sich keine Korrelation zwischen anti-metastatischer Wirkung und uPA-Selektivität, nach deren Zunahme die Inhibitoren von links nach rechts angeordnet waren, feststellen (Abb. 5.2). CJ-503 war, trotz nicht signifikanter Unterschiede zwischen den Inhibitoren, mit einer über 40%-igen Reduktion der Metastasierung der anti-metastatisch wirksamste Inhibitor (nur 18 bis 26%-ige Abnahme der Metastasierung mit CJ-513, CJ-502 und CJ-435). Um der Ursache dieser stärkeren anti-metastatischen Wirkung von CJ-503 nachzugehen, mussten auch die Selektivitätsprofile der vier Inhibitoren gegenüber FXa, Plasmin, Thrombin und Trypsin berechnet werden. Dabei zeigte sich, dass sich der Inhibitor von den anderen durch seine höhere Selektivität für FXa unterschied (z.B. mit Thrombin als Nicht-Zielprotease: CJ-503: 6,25; CJ-513: 0,0688; CJ-502: 1,18; CJ-435: 4,82). Entgegen der Annahme einer überwiegenden Rolle von uPA in diesem Tumormodell gab es ferner auch keinen Zusammenhang zwischen anti-metastatischer Wirkung und uPA-Affinität der Inhibitoren (Abb. 5.2). Daher musste als Nächstes untersucht werden, ob FXa bei der Metastasierung dieses Tumormodells eine Rolle spielt und ob eine selektive Hemmung dieses Enzyms von Vorteil bei einer anti-metastatischen Inhibitortherapie ist. Dazu sollte der FXa-Inhibitor CJ-504 eingesetzt werden. Um zu evaluieren, ob eine Dosissteigerung auch zu signifikant unterschiedlichen anti-metastatischen Wirkungen zwischen den Behandlungsgruppen führt, sollte zusätzlich die Dosis auf 1,5 mg/kg zweimal täglich erhöht werden.

5.1.3 Korrelation zwischen Selektivität und anti-metastatischer Wirkung der Inhibitoren im murinen T-Zell Lymphom

Es hatte sich gezeigt, dass die im vorherigen Experiment eingesetzten uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-503 und CJ-435 schon in der schwachen Dosis von 1 mg/kg/Tag signifikant anti-metastatisch wirksam waren. Da aber eine genauere Evaluierung eines Zusammenhangs zwischen anti-metastatischer Wirkung und Selektivität/Affinität von sSPis zusätzlich signifi-

kante Unterschiede zwischen den Inhibitoren erforderte, wurde die Behandlungsdosis auf 1,5 mg/kg zweimal täglich erhöht, um noch stärkere anti-metastatische Effekte zu erzielen. Die verstärkte anti-metastatische Wirkung von CJ-503 im vorigen Experiment warf die Frage auf, ob diese auf die höhere Selektivität des Inhibitors für FXa zurückzuführen war. Daher wurde, neben den uPA-Inhibitoren CJ-513 (höchste Affinität für uPA, siehe Abb. 5.2), CJ-435 (höchste Selektivität für uPA, siehe Abb. 5.2) und CJ-503 (höchste anti-metastatische Wirkung, siehe Abb. 5.2), zusätzlich der auch zur Klasse der 4-Amidinobenzylamid-Derivate gehörende, hoch selektive FXa Inhibitor CJ-504 (Tab. 4.1 und Abb. 5.3) im T-Zell Lymphommodell eingesetzt. Der Zeitraum und die einzelnen Zeitpunkte der Inhibitorbehandlungen waren dabei wie unter 5.1.3 beschrieben, um größtmögliche anti-metastatische Wirkungen zu erreichen. Es konnte nun eine deutlich stärkere anti-metastatische Wirkung der sSPIs mit einer 35- bis 96%-igen Reduktion der Metastasierung im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden (Abb. 5.3). Durch die Dosissteigerung kam es diesmal auch zu signifikant unterschiedlichen anti-metastatischen Effekten zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (Abb. 5.3). Dies ermöglichte jetzt eine Anordnung der Inhibitoren nach ihrer jeweiligen anti-metastatischen Wirksamkeit (Abb. 5.3). Beim Vergleich dieser Rangordnung mit den jeweiligen Selektivitäts- und Affinitätsprofilen der sSPIs konnte kein Zusammenhang sowohl zwischen ihrer anti-metastatischen Wirkung und der uPA-Selektivität (gezeigt in Bezug auf Thrombin, sehr ähnlich in Bezug auf die anderen Nicht-Ziel-Serinproteasen) als auch ihrer uPA-Affinität gefunden werden, obwohl allen Inhibitoren eine signifikante Reduktion der Lebermetastasierung gemeinsam war (Abb. 5.3). Ferner zeigte die anti-metastatische Wirkung der Inhibitoren auch keine Korrelation mit den jeweiligen Selektivitäts- und Affinitätsprofilen der sSPIs gegenüber Plasmin, Thrombin und Trypsin (berechnet auf der Grundlage von Tab. 4.1). Die CJ-504-Therapie erzielte mit einer 96%-igen Reduktion der Makrometastasierung die stärkste anti-metastatische Wirkung aller Inhibitoren. CJ-504 wies, gegenüber den anderen sSPIs, sowohl die höchste FXa-Selektivität (gezeigt in Bezug auf Thrombin, ähnlich in Bezug auf die anderen Nicht-Ziel-Serinproteasen) als auch die höchste FXa-Affinität auf (über 200fach selektiver als CJ-513 und über 190fach affiner als CJ-435; Abb. 5.3). Demgegenüber besaß der Hemmstoff, verglichen mit den anderen Inhibitoren, die niedrigste uPA-Selektivität und -Affinität (über 1.900fach weniger selektiv als CJ-435 und über 150fach weniger affin als CJ-513; Abb. 5.3). Insgesamt korrelierte die Reduktion der Metastasierung durch die Inhibitoren eng mit ihrer Selektivität für FXa, ohne Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen anti-metastatischer Wirkung und FXa-Affinität (Abb. 5.3). Als nächstes sollte eine Reihe von FXa-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität im T-Zell Lymphommodell eingesetzt werden,

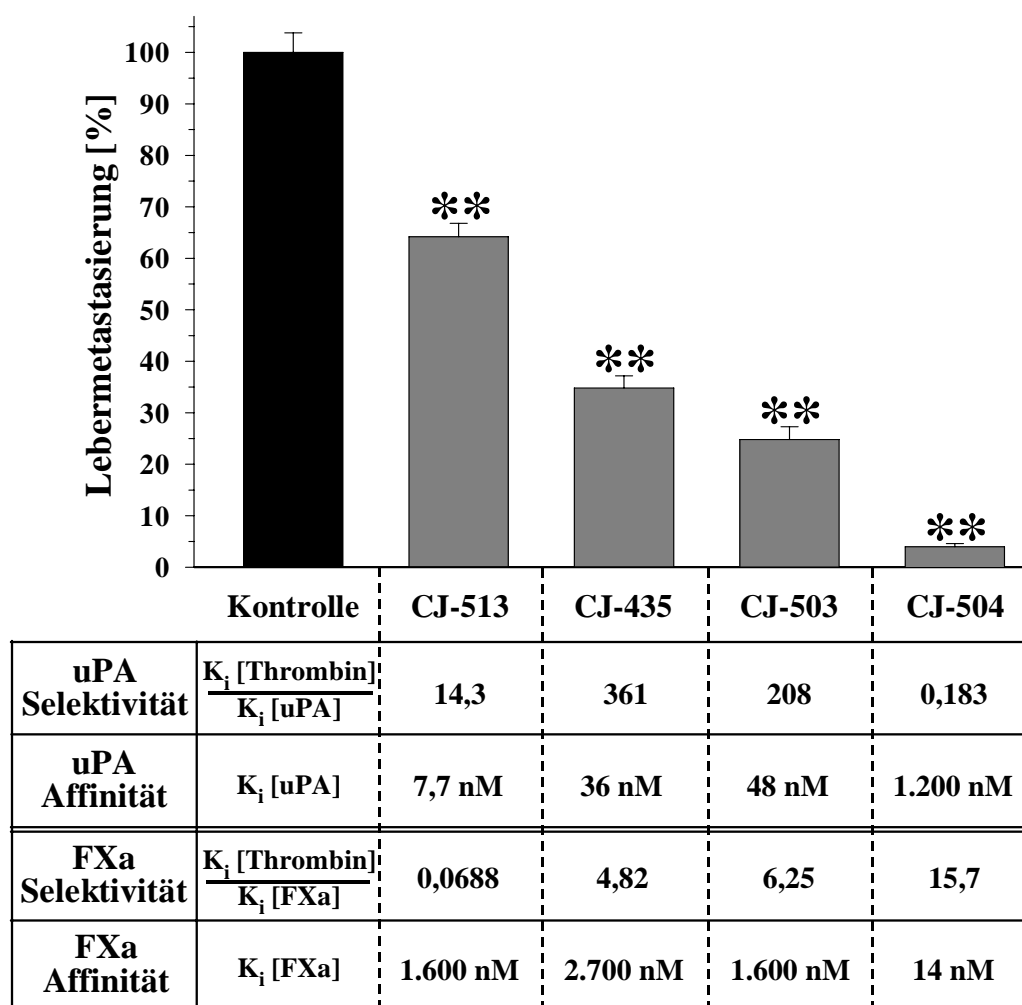


Abbildung 5.3: Therapeutische Wirkung der uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-435 und CJ-503 und des FXa-Inhibitors CJ-504 auf die Makrometastasierung der Leber im murinen L-Cl.5s T-Zell-Lymphommodell. Gegenüberstellung von anti-metastatischer Wirkung (Säulendiagramm) und Selektivität und Affinität der Serinproteaseinhibitoren (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) gegenüber uPA und FXa (Tabelle). Selektivitäten werden beispielhaft dargestellt in Bezug auf Thrombin. Anordnung der Inhibitoren von links nach rechts entsprechend steigender anti-metastatischer Wirkung. Gezeigt wird die relative Anzahl experimenteller Makrometastasen auf der Oberfläche der Mäuselebern in den Behandlungsgruppen (CJ-513: n = 11, anti-metastatische Wirkung: $35,8 \pm 2,6\%$; CJ-435: n = 11, Wirksamkeit: $65,2 \pm 2,4\%$; CJ-503: n = 11, Wirksamkeit: $75,2 \pm 2,5\%$; CJ-504: n = 11, Wirksamkeit: $96,0 \pm 0,6\%$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $140,8 \pm 5,3$, entsprechend $100 \pm 3,8\%$; n = 12 Mäuse). Die anti-metastatischen Wirkungen der Behandlungsgruppen waren in allen Fällen statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle (erster Stern über den Säulen; für alle Vergleiche: $p < 0,0001$). Auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen waren für alle Vergleiche statistisch signifikant (zweiter Stern über den Säulen; CJ-435 verglichen mit CJ-503: $p = 0,009$; für alle anderen Vergleiche: $p < 0,0001$). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler.

um den Zusammenhang zwischen anti-metastatischer Wirkung der Inhibitoren und ihrer Selektivität für FXa näher zu untersuchen. Dies sollte auch den Ausschluss einer Korrelation zwischen anti-metastatischer Wirkung und FXa-Affinität der Hemmstoffe ermöglichen.

5.1.4 Korrelation zwischen Faktor Xa-Selektivität und anti-metastatischer Wirkung der Inhibitoren im murinen T-Zell Lymphom

Aus den bisherigen Untersuchungen konnten die Hypothesen abgeleitet werden, dass die experimentelle Metastasierung des murinen T-Zell Lymphoms erfolgreich durch selektive Hemmung von FXa oder einem FXa-ähnlichen Enzym verringert werden kann und dass die FXa-Selektivität und nicht -Affinität eng mit der jeweiligen anti-metastatischen Wirkung der sSPis korreliert. Daraus ergab sich unmittelbar die Frage, ob sich diese Ergebnisse auch mit einer Reihe von FXa-Inhibitoren unterschiedlicher Selektivität bestätigen ließen. Dazu wurden die FXa-Inhibitoren CJ-510 und CJ-441 (siehe Tab. 4.1), die zur selben Klasse der eng strukturverwandten 4-Amidinobenzylamid-Derivate gehören, nebeneinander mit dem FXa-Inhibitor CJ-504, der die höchste anti-metastatische Wirkung in den bisherigen Experimenten zeigte, und dem uPA Inhibitor CJ-513 im murinen T-Zell Lymphommodell eingesetzt. CJ-513 diente dabei als interne Kontrolle, um mögliche Schwankungen der Metastasenzahlen zwischen den Experimenten unter der Therapie zu erkennen. Um größtmögliche anti-metastatische Wirkungen zu erreichen, wurden die Inhibitorbehandlungen in einer Dosis von 1,5 mg/kg zweimal täglich über den gleichen Zeitraum und zu den gleichen Zeitpunkten wie unter 5.1.3 beschrieben durchgeführt. Mit allen vier Hemmstoffen konnte eine signifikante anti-metastatische Wirkung mit einer bis zu 60%-igen Reduktion der Metastasierung sowohl gegenüber der Kontrolle als auch untereinander erzielt werden (Abb. 5.4). Dabei war die Wirkung der FXa-Inhibitoren ausnahmslos stärker als die des uPA-Inhibitors. Der FXa-Inhibitor CJ-504, der innerhalb der Klasse der 4-Amidinobenzylamid-Derivate die höchste Selektivität für FXa aufwies, führte zur stärksten Reduktion der Metastasierung aller CJ-Inhibitoren (60%, Abb. 5.4). Im Vergleich zu CJ-504 zeigte CJ-441 eine weniger gute anti-metastatische Wirkung (50%) bei 10-fach niedriger Selektivität für FXa und CJ-510 eine nur schwache anti-metastatische Wirkung (30%) bei 70-fach niedriger Selektivität für FXa (Abb. 5.4). Der oben genannten Hypothese entsprechend konnte eine enge Korrelation von anti-metastatischer Wirkung und FXa-Selektivität der Hemmstoffe (dargestellt in Bezug auf Thrombin, sehr ähnlich in Bezug auf die anderen Nicht-Ziel-Serinproteasen, Abb. 5.4) nachgewiesen werden. Dabei konnte erneut kein Zusammenhang zwischen FXa-Affinität und anti-metastatischer Potenz der sSPis gefunden werden (Abb. 5.4). Auf den Lebern un behandelter Kontrolltiere

waren mit durchschnittlich 170 Metastasen/Organ (Abb. 5.4) mehr Makrometastasen/Leber sichtbar als in den vorangegangenen Experimenten (Abb. 5.2 bis 5.3).

Es hätte sein können, dass die anti-metastatische Wirkung der FXa-selektiven Inhibitoren auf einer speziellen Eigenschaft der strukturell eng verwandten 4-Amidinobenzylamid-Derivate beruhte. Daher sollte die Wirkung einer selektiven anti-FXa-Therapie mit einem anderen,

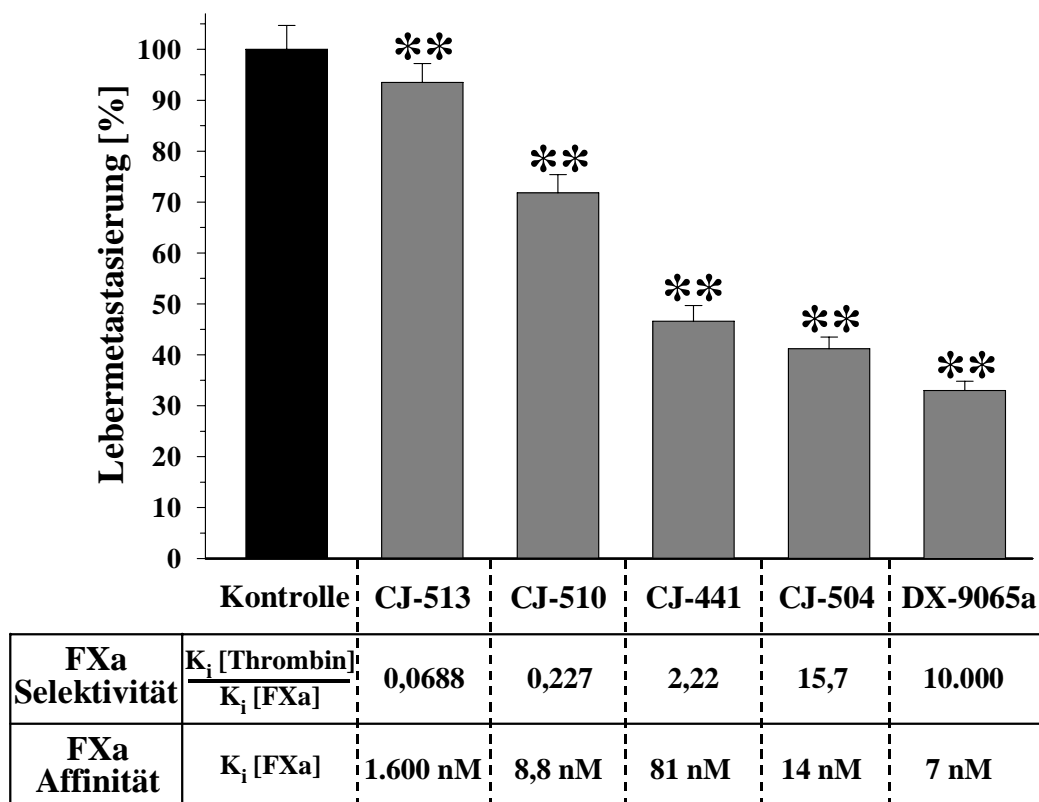


Abbildung 5.4: Therapeutische Wirkung des uPA-Inhibitors CJ-513 und der unterschiedlich selektiven FXa-Inhibitoren CJ-510, CJ-441, CJ-504 und DX-9065a auf die Makrometastasierung der Leber im murinen L-C1.5s T-Zell-Lymphommodell. Gegenüberstellung von anti-metastatischer Wirkung (Säulendiagramm) und Selektivität und Affinität der Serinproteaseinhibitoren (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) für FXa (Tabelle). Selektivitäten werden beispielhaft dargestellt in Bezug auf Thrombin. Anordnung der Inhibitoren von links nach rechts entsprechend steigender anti-metastatischer Wirkung. Gezeigt wird die relative Anzahl experimenteller Makrometastasen auf der Oberfläche der Mäuselebern in den Behandlungsgruppen (CJ-513: n = 12, anti-metastatische Wirkung: $6,5 \pm 3,7\%$; CJ-510: n = 10, Wirksamkeit: $28,2 \pm 3,6\%$; CJ-441: n = 12, Wirksamkeit: $53,4 \pm 3,1\%$; CJ-504: n = 12, Wirksamkeit: $58,8 \pm 2,3\%$; DX-9065a: n = 13, Wirksamkeit: $67,0 \pm 1,8\%$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $173,5 \pm 8,1$, entsprechend $100 \pm 4,7\%$; n = 13 Mäuse). Die anti-metastatischen Wirkungen der Behandlungsgruppen waren in allen Fällen statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle (CJ-513 verglichen mit der Kontrolle: p = 0,02; für alle anderen Vergleiche: p < 0,0001). Auch die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen waren für alle Vergleiche statistisch signifikant (zweiter Stern über den Säulen; CJ-513 verglichen mit CJ-510: p = 0,001; CJ-441 verglichen mit CJ-504: p = 0,03; CJ-441 verglichen mit DX-9065a: p = 0,001; CJ-504 verglichen mit DX-9065a: p = 0,008; für alle anderen Vergleiche: p < 0,0001). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler.

strukturell unterschiedlichen Inhibitor im T-Zell Lymphommodell bestätigt werden. Dazu wurde in diesem Experiment zusätzlich der sich in späten Phasen klinischer Studien befindende FXa-selektive Inhibitor DX-9065a parallel zu den anderen Hemmstoffen eingesetzt. Dabei kam es zu einer signifikanten Hemmung der Metastasierung (67%) gegenüber der Kontrolle, die zudem signifikant effizienter war als die der CJ-504-Therapie (Abb. 5.4). Sowohl FXa-Selektivität (z.B. 600fach höher in Bezug auf Thrombin, Abb. 5.4) als auch Halbwertszeit der Eliminationsrate (Tab. 4.1) waren bei DX-9065a höher als bei CJ-504.

Da Serinproteasen an vielen lebenswichtigen physiologischen Stoffwechselprozessen beteiligt sind, hätte ihre Hemmung unerwünschte Nebenwirkungen *in vivo* hervorrufen können, wie z.B. Gerinnungsstörungen. Daher wurden die Mäuse bei der Autopsie am Ende der drei bisher gezeigten Metastasierungsexperimente auf mögliche Einblutungen in die Bauchhöhle sowie Blutergüsse an der Bauchwand (Injektionsort der Behandlung) kontrolliert. Dabei konnten nur bei 15% der Mäuse, die mit den hochselektiven FXa-Inhibitoren behandelt worden waren, kleinere Blutergüsse (subkutane Blutungen mit ca. 2 mm Durchmesser) an der Injektionsstelle gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Zudem gab es bei den Tieren, auch unter einer stärkeren Therapiedosis von 1,5 mg/kg pro Behandlung, über die gesamten experimentellen Zeiträume keine Hinweise auf verändertes äußeres Erscheinungsbild, Kachexie oder gestörte Mobilität als mögliche medikamenteninduzierte Nebenwirkungen. Alle gezeigten antimetastatischen Effekte sowie die Wirksamkeits-/Selektivitäts-Korrelationen der anti-FXa-Therapie mit synthetischen Inhibitoren spielten sich bisher auf der Ebene der Makrometastasierung ab (5.1.2 bis 5.1.4). Diese Form der Metastasierung macht aber nur einen Teil der Tumorbelastung der Organe in diesem Modell aus (siehe 5.1.1). Daher stellte sich die Frage, ob vergleichbare Ergebnisse auch auf der Ebene der modelltypischen sekundären Invasion von Tumorzellen in die Leber als Mikrometastasen (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen mit einem Durchmesser < 0,2 mm) erzielt werden konnten.

5.1.5 Korrelation zwischen Faktor Xa-Selektivität und Hemmung der Mikrometastasierung der Inhibitoren im murinen T-Zell Lymphom

Bisher wurde gezeigt, wie die Behandlung tumortragender Mäuse mit den Inhibitoren die Bildung der größeren Makrometastasen (> 0,2 mm im Durchmesser), die aus erfolgreicher initialer Extravasation und anschließendem Auswachsen (Proliferation) der intravenös inokulierten Tumorzellen resultieren, verhindern konnte (Abb. 5.5 a, b und c). Bekanntermaßen breitet sich das murine L-CI.5s T-Zell Lymphom zusätzlich in Form einer stark verstreuten Mikrometastasierung (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen mit einem

Durchmesser $< 0,2$ mm) aus, indem sich Lymphomzellen einige Tage nach Tumorzellinokulation aus etablierten Metastasen absiedeln und sekundär das Lebergewebe infiltrieren. Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob die zweimal tägliche, sich über den gesamten experimentellen Zeitraum erstreckende Inhibitor-Behandlung (siehe 5.1.2 bis 5.1.4) auch die mikrometastatische Kolonisierung der Leber beeinflussen könnte. Zudem sollte getestet werden, ob die anti-FXa-Therapie dabei wirksamer ist als die anti-uPA-Therapie. Darüber hinaus stellte sich die Frage, ob sich die bei der Reduktion der Makrometastasierung gezeigte Korrelation zwischen anti-metastatischer Wirkung der sSPIs und ihrer FXa-Selektivität auch auf

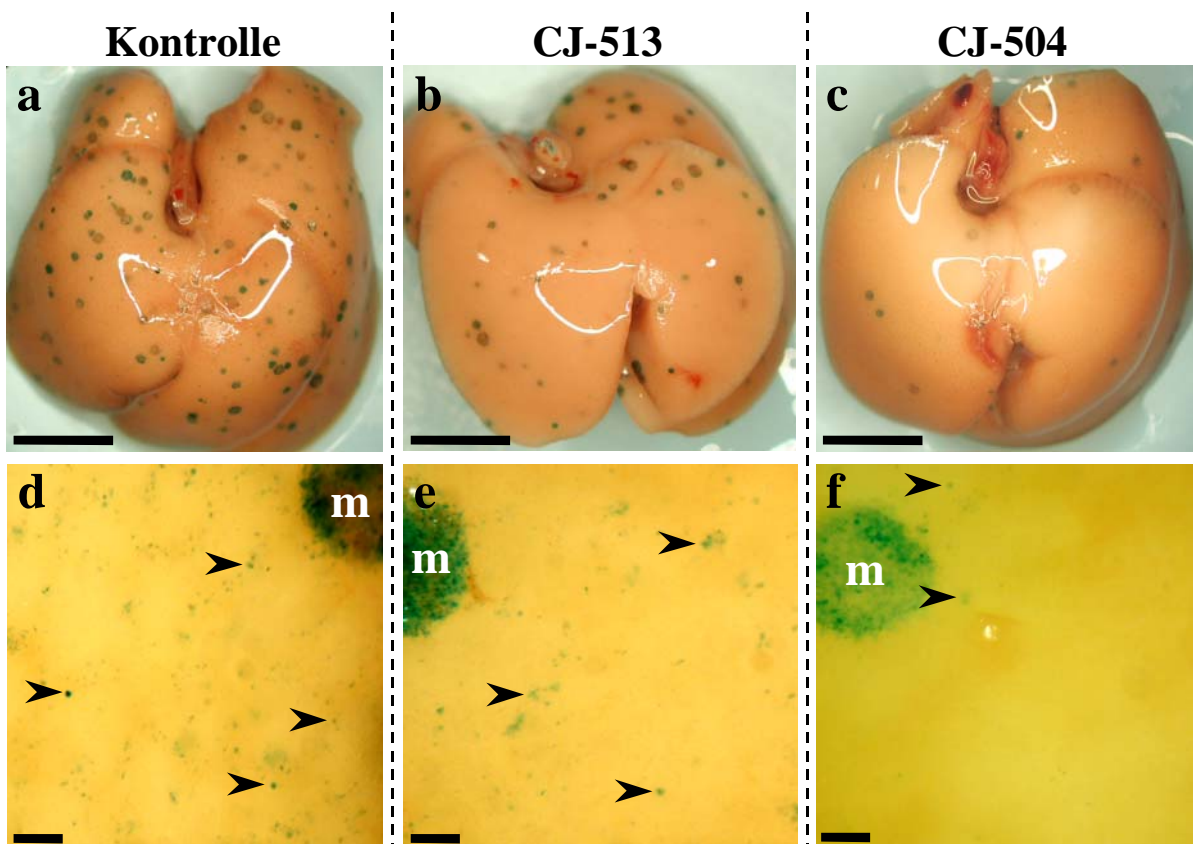


Abbildung 5.5: Therapeutische Wirkung der Inhibitoren CJ-513 und CJ-504 auf die Mikrometastasierung der Leber im murinen L-C1.5s T-Zell-Lymphommodell. *a-c*) Darstellung repräsentativer, X-Gal gefärbter kompletter Lebern behandelter Mäuse und der Kontrolle aus den Metastasierungsexperimenten: Mäßige Reduktion indigo-blauer *lacZ*-markierter Makrometastasen (Metastasen mit einem Durchmesser $> 0,2$ mm) auf der Oberfläche des Leberparenchyms mit CJ-513 (*b*) sowie starke Hemmung mit CJ-504 (*c*) im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrolle (*a*; Balken = 5 mm). *d-f*) Gezeigt sind Nahaufnahmen von Ausschnitten oben dargestellter Lebern (*a-c*) der jeweiligen Behandlungsgruppen: Keine Reduktion indigo-blauer *lacZ*-markierter Mikrometastasen (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen mit einem Durchmesser $< 0,2$ mm; Pfeile) auf der Oberfläche des Leberparenchyms mit CJ-513 (*e*) und drastische Hemmung mit CJ-504 (*f*) im Vergleich zu der Kontrolle (*d*). Makrometastasen = m. Balken = 0,1 mm. Ausschnitte sind sowohl für die ganze Leber als auch für alle Mäuselebern der jeweiligen Behandlungsgruppe repräsentativ.

der Ebene der Mikrometastasierung bestätigen lässt. Hierfür wurde die Dichte der Mikrometastasierung, die durch die X-Gal-Färbung eindeutig erkennbar gewordenen war, auf den Leberoberflächen der Mäuse in den drei bisher gezeigten Experimenten bestimmt. Dabei zeigte sich, dass auch die Hemmung der Mikrometastasierung eng mit der FXa-Selektivität der Inhibitoren korrelierte: Die Behandlung mit dem uPA-Inhibitor CJ-513 führte, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5.5 d), zu keiner Reduktion der Mikrometastasierung (Abb. 5.5 e). Im Gegensatz dazu zeigte CJ-504, der von allen Inhibitoren der Klasse der 4-Amidinobenzylamid-Derivate die höchste Selektivität für FXa aufwies, eine drastische Abnahme der Mikrometastasierung (Abb. 5.5 f). Die wenigen Mikrometastasen auf den Lebern der CJ-504-Behandlungsgruppe fanden sich hauptsächlich in der nahen Umgebung der Makrometastasen (Abb. 5.5 f). Die DX-9065a-Behandlung ergab, trotz der strukturellen Unterschiede des FXa-Inhibitors gegenüber den CJ-Inhibitoren, eine vergleichbar starke Reduktion der Mikrometastasierung wie mit CJ-504 (Daten nicht gezeigt). In den Kontrollgruppen aller Experimente konnten auf der Oberfläche der jeweiligen Mäuselebern ungefähr 140 Makrometastasen (Abb. 5.5 a) und mehr als 10.000 Mikrometastasen (Abb. 5.5 d) bestimmt werden. Dabei überstieg die Anzahl der Mikrometastasen bei weitem die Zahl inokulierter Tumorzellen (5.000). Aus dem erfolgreichen Einsatz FXa-selektiver Inhibitoren gegen die experimentelle Makro- und Mikrometastasierung im T-Zell Lymphommodell ergab sich die Frage, ob auch auf der Expressionsebene eine Korrelation zwischen FX oder einem dem FX strukturell ähnlichen Enzym und der zunehmenden metastatischen Organbelastung der Tiere im Zeitverlauf der experimentellen Metastasierung nachzuweisen war.

5.1.6 Modulation der FX- und Matriptase-Expression in der Leber im Zeitverlauf des Metastasierungsprozesses

Aus den vorangegangenen Untersuchungen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass FXa oder ein FXa ähnliches Enzym möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung des T-Zelllymphoms spielt. Daher wurde als Nächstes untersucht, ob die zunehmende metastatische Organbelastung, die sich im Zeitverlauf der experimentellen Metastasierung dieses Tumormodells entwickelt, mit einer veränderten Expression von murinem FX (Proform von FXa) oder einem dem murinen FXa strukturell ähnlichen Enzym einhergeht. Dazu wurde eine quantitative RT-PCR mit spezifischen *Primern* für murine FX- und Matriptase-mRNA eingesetzt und das Lebergewebe als Zielgewebe der Metastasierung analysiert. Die membranständige Serinprotease Matriptase (MT-SP1) wurde aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu FXa und ihrem bekannten fördernden Einfluß auf die Pathogenese und Pro-

gression maligner Tumore ausgewählt. In metastasenfremen Lebern von DBA/2 Kontrollmäusen zeigte sich eine FX-mRNA Expression, deren basale Spiegel im Zeitverlauf der Metastasierung bis Tag 6 unverändert blieben (Abb. 5.6 A). An Tag 7, als die Tumorzellinfiltration der Leber mit Makro- und vor allem Mikrometastasen modelltypisch drastisch anstieg, kam es zu einer schwachen, aber signifikanten Abnahme der FX-mRNA. In kultivierten Lymphomzellen hingegen zeigte sich keine FX-mRNA Expression (Abb. 5.6 A).

Matriptase-mRNA konnte in metastasenfremen Lebern von DBA/2 Kontrollmäusen nachgewiesen werden (Abb. 5.6 B). Im Zeitverlauf der Metastasierung zeigten sich, bis auf eine schwache, aber signifikante Zunahme an Tag 7, keine Veränderungen (Abb. 5.6 B). Auch in den kultivierten Lymphomzellen *in vitro* kam es zu einer Expression von Matriptase-mRNA. Da eine Therapie mit Serinproteaseinhibitoren in proteolytische Systeme eingreift und diese Systeme voneinander abhängig sind und sich gegenseitig beeinflussen (DeClerck et al., 1997),

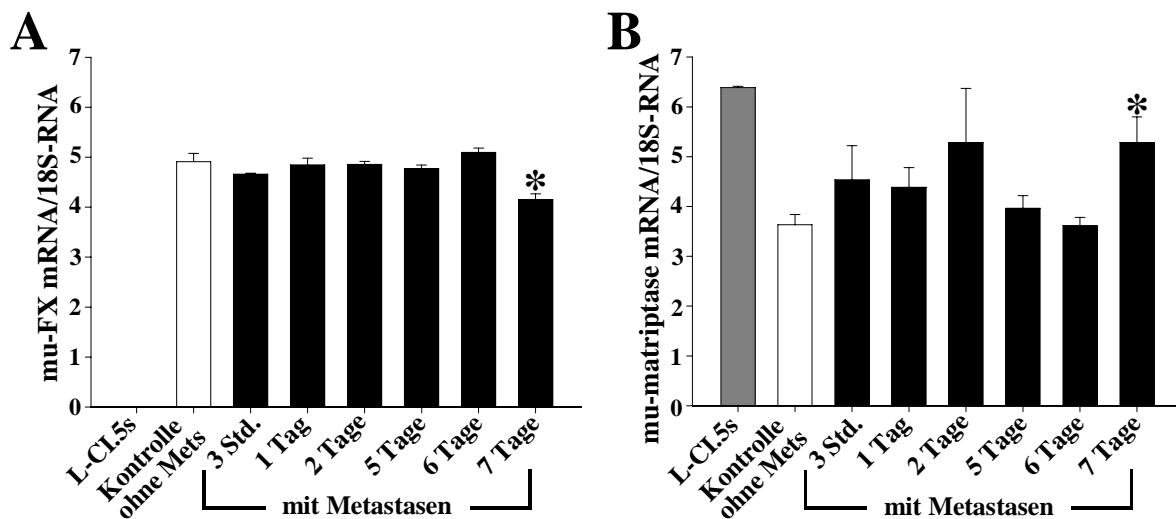


Abbildung 5.6: Expression von muriner FX- und Matriptase mRNA in der Leber im Zeitverlauf des T-Zell-Lymphom Metastasierungsprozesses. An Tag 0 wurden 5.000 L-CI.5s Lymphomzellen pro *syngene* DBA/2 Maus *iv* appliziert und der Gehalt an muriner (mu) FX- (A) und Matriptase-mRNA (B) in den Lebern mit quantitativer RT-PCR jeweils 3 Stunden, 1 Tag, 2, 5, 6 und 7 Tage nach TZI ermittelt (n = 4 pro Gruppe). Zusätzliche mRNA-Bestimmung kultivierter L-CI.5s Zellen als auch von Lebern tumorzellfreier Mäuse (Kontrollgruppe ohne Metastasen, n = 4 pro Gruppe). Darstellung von Mittelwerten ± mittlerem Standardfehler (Fehlerbalken). **A)** Gezeigt sind relative Spiegel an mu-FX mRNA zu 18S-RNA (y-Achse): Basale Werte bis Tag 6 ($p > 0,05$; 3 Std.: $4,7 \pm 0,02$; 1 Tag: $4,8 \pm 0,1$; 2 Tage: $4,9 \pm 0,1$; 5 Tage: $4,8 \pm 0,1$; 6 Tage: $5,1 \pm 0,1$) gegenüber der Kontrollgruppe ($4,9 \pm 0,2$). Signifikanter Abfall im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 7 ($p = 0,02$; Stern über der Säule; $4,1 \pm 0,1$). Keine Expression an relativer mu-FX mRNA bei kultivierten L-CI.5s Zellen. **B)** Darstellung relativer Spiegel an mu-Matriptase mRNA zu 18S-RNA (y-Achse): Basale Werte bis Tag 6 ($p > 0,05$; 3 Std.: $4,5 \pm 0,7$; 1 Tag: $4,4 \pm 0,4$; 2 Tage: $5,3 \pm 1,1$; 5 Tage: $4,0 \pm 0,3$; 6 Tage: $3,6 \pm 0,2$) gegenüber der Kontrolle ($3,6 \pm 0,2$). Signifikanter Anstieg im Vergleich zur Kontrolle an Tag 7 ($p = 0,03$; Stern über der Säule; $5,3 \pm 0,5$). Expression basaler relativer mu-Matriptase mRNA-Spiegel bei L-CI.5s Zellen ($6,4 \pm 0,03$).

sollte eine kompensatorisch gesteigerte Expression oder Aktivierung anderer Proteasen wie uPA, MMP-2 und MMP-9 in den gezeigten Tierexperimenten als mögliche therapeutische Nebenwirkung zymographisch untersucht werden.

5.1.7 Keine kompensatorische Induktion von uPA, MMP-2 und MMP-9 durch anti-metastatische Inhibitortherapie

Bekanntermaßen können sich proteolytische Systeme, die in Zusammenhang mit der Entstehung und Entwicklung von Metastasen stehen, gegenseitig beeinflussen und regulieren. Daher konnte es als Nebenwirkung der anti-proteolytischen Serinproteaseinhibitortherapie trotz zum Teil hochselektiver Enzymhemmung zu einer kompensatorischen Gegenregulation proteolytischer Enzyme kommen. Da die Proteasen uPA, MMP-2 und -9 im experimentellen T-Zell Lymphommodell eine Rolle bei der Metastasierung spielen (siehe 5.1.1; Arlt et al., 2002; Arlt, 2004), wurde folglich die Expression dieser Enzyme in den Mäuselebern der vorangegangenen Experimenten zymographisch bestimmt. Dabei konnte im Lebergewebe von Tieren des Experiments mit den Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-435 und CJ-503, die in der schwachen Dosis von 0,5 mg/kg zweimal täglich verabreicht worden waren, in allen Fällen kein Hinweis auf eine ausgleichend gesteigerte Expression oder Aktivierung von Gesamt-uPA, MMP-2 und MMP-9 als Folge der uPA-Inhibitorbehandlungen gefunden werden (Abb. 5.7 A).

Auch in den beiden Experimenten mit den Inhibitoren CJ-513, CJ-510, CJ-441, CJ-504, DX-9065a (Abb. 5.7 B, links) und CJ-435 und CJ-503 (Abb. 5.7 B, rechts), die in der stärkeren Dosis von 1,5 mg/kg zweimal täglich verabreicht worden waren, konnte keine gegenregulatorische Induktion oder gesteigerte Expression von uPA und den MMP-Gelatinasen in den Mäuselebern durch die Inhibitorbehandlungen nachgewiesen werden. Die Behandlungen mit den hochselektiven FXa-Inhibitoren zeigten in diesem Zusammenhang keinen wesentlichen Unterschied gegenüber den Therapien mit den weniger selektiven uPA- und FXa-Inhibitoren (Abb. 5.7 B). Die leichte Abnahme der Expression von proMMP-9 in den Behandlungsgruppen korrelierte mit der Reduktion der Metastasierung in diesen Gruppen (Abb. 5.7 B). In den bisher gezeigten Experimenten wurden die Inhibitoren den Tieren intraperitoneal appliziert. Die subkutane Verabreichung von Medikamenten stellt aber die klinisch relevantere und damit anzustrebende Behandlungsform dar. Daher sollte getestet werden, ob die anti-metastatische Wirkung der Inhibitortherapie unabhängig von der Applikationsart ist (intraperitoneal gegenüber subkutan) oder ob sich die subkutane Behandlungsform als signifikant

schlechter erweist. Dazu sollten die Wirkungen einer intraperitonealen und einer subkutanen CJ-504-Therapie im T-Zell Lymphommodell Seite an Seite verglichen werden.

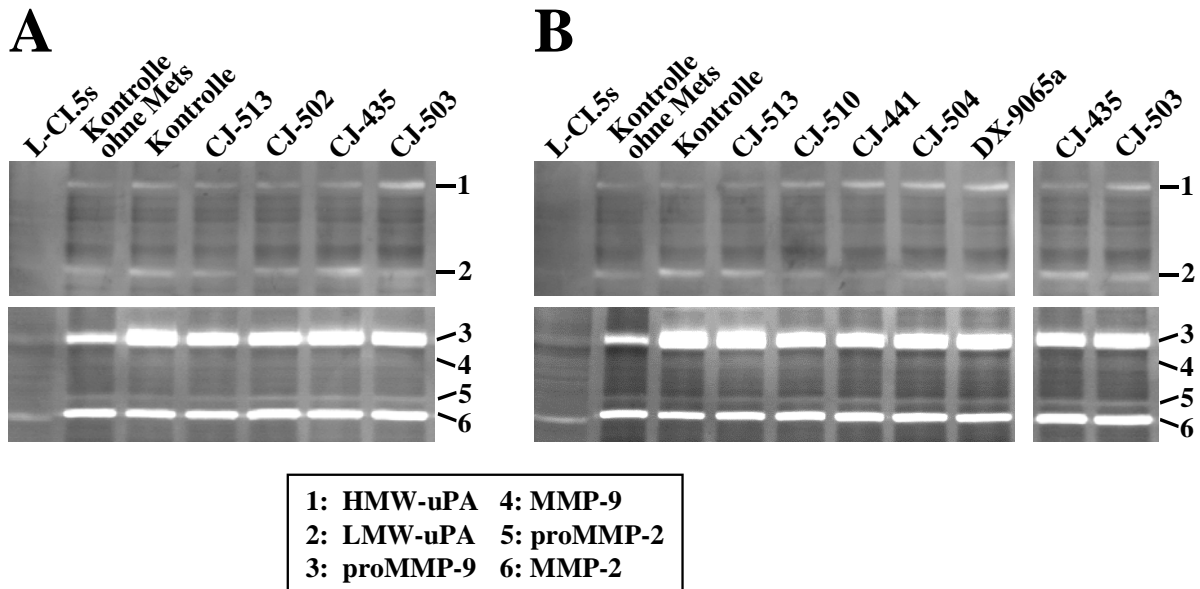


Abbildung 5.7: Zymographische Analyse der Expression von uPA und den Gelatinasen MMP-2 und -9 in der Leber nach anti-metastatischer sSPI-Therapie. Gezeigt ist der Gehalt an uPA, MMP-2 und -9 in den Lebern mit uPA- und FXa-Inhibitoren sowie Vehikel-behandelter DBA/2 Mäuse nach Beendigung des jeweiligen T-Zell Lymphomexperiment (A und B). Daten sind repräsentativ für mindestens sieben verschiedene Mäuse pro Gruppe. **A)** Metastasenbelastete (Spuren 3-7) und metastasenfrie Lebern (Spur 2) von Mäusen aus dem Metastasierungsexperiment mit CJ-513, CJ-502, CJ-435 und CJ-503 (Dosis: 1 mg/kg/Tag): Im Vergleich zu metastasenfremen Lebern (Spur 2) Anstieg der pro-MMP-9-Expression bei der Metastasierung (Spur 3) und insgesamt leichte Abnahme in den verschiedenen Behandlungsgruppen (Spuren 4-7). HMW-, LMW-uPA und aktiviertes MMP-2 sind in metastasenfremen Lebern vorhanden (Spur 2) und wurden weder durch die Metastasierung (Spur 3) noch durch die verschiedenen Behandlungen induziert (Spuren 4-7). Vorhandensein sehr geringer MMP-2- und pro-MMP-9-Spiegel im L-Cl.5s-Zellysate (Spur 1). **B)** Metastasenbelastete (Spuren 3-10) und metastasenfrie Mäuselebern (Spur 2) aus den Metastasierungsexperimenten (Dosis: 3 mg/kg/Tag) mit den Inhibitoren CJ-513, CJ-510, CJ-441, CJ-504, DX-9065a (linke Felder) und CJ-513, CJ-435, CJ-503 und CJ-504 (rechte Felder: nur Darstellung der CJ-435- und CJ-503-Behandlungsgruppen, da Daten übriger Gruppen vergleichbar mit Ergebnissen gleicher Inhibitorbehandlungen in linken Feldern). Zunahme der Expression von proMMP-9 bei der Metastasierung (Spur 3) und leichte Abnahme in den verschiedenen Behandlungsgruppen (Spuren 4-10) in Korrelation mit der sinkenden Zahl an Metastasen im Vergleich zu metastasenfremen Lebern (Spur 2). Keine gesteigerte Expression von Gesamt-uPA und aktiviertem MMP-2 (metastasenfreme Lebern, Spur 2) durch die Metastasierung (Spur 3) oder die einzelnen Inhibitorbehandlungen (Spuren 4-10).

5.2 Unabhängigkeit der anti-metastatischen Wirkung eines Serinproteinase-Inhibitors von der Applikationsart (subkutane gegenüber intraperitoneale)

In den bisher gezeigten Experimenten wurden die Inhibitoren den Mäusen als intraperitoneale (i.p.) Injektionen verabreicht. Die subkutane (s.c.) Behandlungsform gilt aber, auch bei der Therapie mit Serinproteinase-Inhibitoren (Alban, 2005), als die klinisch relevantere Applikationsart. Daher stellte sich die Frage, ob die anti-metastatische sSPI-Therapie in experimentellen Metastasierungsmodellen in Form der zu favorisierenden subkutanen Behandlung gleich wirksam oder sogar effektiver ist als in der bisher durchgeführten intraperitonealen Behandlung. Für diese Fragestellung wurde das experimentelle T-Zell Lymphommodell verwendet, da es sich durch seine Aggressivität und den kurzen zeitlichen Verlauf als *screening*-Modell eignete und Serinprotease-Inhibitoren in diesem Modell erfolgreich die Metastasierung hemmen konnten. Als Inhibitor wurde CJ-504 eingesetzt, da er in zwei T-Zell Lymphomexperimenten der anti-metastatisch wirksamste sSPI der CJ-Reihe gewesen ist. CJ-504 wurde den Tieren in der bisher wirksamsten Dosis von 1,5 mg/kg zweimal täglich in einer Gruppe als intraperitoneale und in einer zweiten Gruppe als subkutane Behandlung über einen Zeitraum

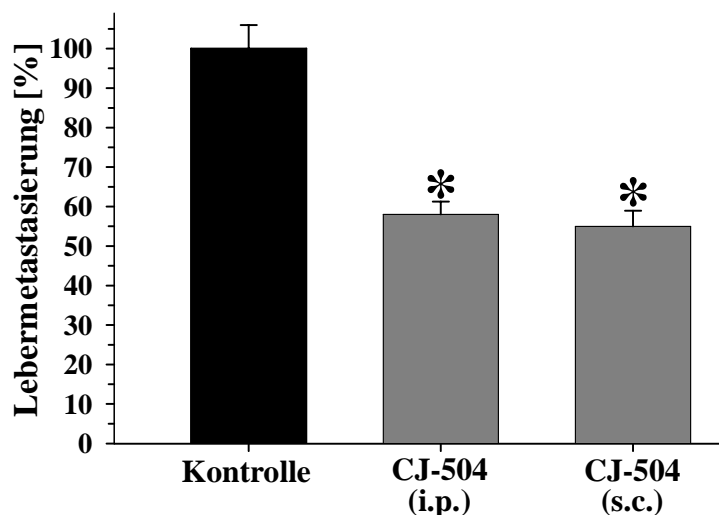


Abbildung 5.8: Therapeutische Wirkung subkutaner und intraperitonealer Therapie mit CJ-504 auf die Metastasierung der Leber im murinen L-Cl.5s T-Zell-Lymphommodell. Gezeigt ist die anti-metastatische Wirksamkeit subkutaner (s.c.) und intraperitonealer (i.p.) Therapie mit CJ-504 (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) auf die experimentelle Lebermetastasierung. Diese ist dargestellt als relative Anzahl der Makrometastasen auf der Oberfläche der Mäuselebern in den verschiedenen Behandlungsgruppen (CJ-504 i.p.: $n = 4$, anti-metastatische Wirkung: $42,0 \pm 3,3\%$; CJ-504 s.c.: $n = 4$, anti-metastatische Wirkung: $45,0 \pm 3,9\%$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $137,8 \pm 8,2$, entsprechend $100 \pm 6,0\%$; $n = 4$ Mäuse). Statistisch signifikante Reduktion der Metastasierung durch CJ-504 in beiden Applikationsarten (Stern über den Säulen; für beide Vergleiche: $p < 0,0009$) gegenüber der Kontrolle. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ($p > 0,05$). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler.

von 7 Tagen verabreicht. In beiden Behandlungsgruppen konnte eine signifikante Reduktion der Metastasierung um ca. 55% gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden (Abb. 5.8). Dabei zeigten die i.p.- und s.c.-Behandlungen keine signifikant unterschiedlichen anti-metastatischen Wirkungen (Abb. 5.8), was auch auf der Ebene der Mikrometastasierung bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Um dieses Ergebnis mit einem weiteren Inhibitor zu bestätigen, wurde in dem gleichen Tumormodell und unter den gleichen Bedingungen wie mit dem FXa-Inhibitor CJ-504 eine Applikationsstudie mit dem synthetischen uPA-Inhibitor CJ-463 (siehe Tab. 4.1) durchgeführt. Diese zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied der anti-metastatischen Wirksamkeit beider Applikationsarten ($p > 0,05$; Daten nicht gezeigt). Gegenüber der Kontrollgruppe kam es wiederum in beiden CJ-463-Behandlungsgruppen zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung ($p < 0,0001$; Daten nicht gezeigt). Da die anti-metastatische Wirksamkeit der sSPIs unabhängig von ihrer Applikationsart (intraperitoneale gegenüber subkutane) war, konnten die Inhibitoren damit den Tieren in den folgenden Experimenten auf beide Behandlungsweisen verabreicht werden, ohne eine applikationsbedingte Wirkungsabschwächung hervorzurufen.

5.3 Reduktion experimenteller Metastasierung und Verlängerung des Überlebens durch den hochselektiven und nur schwach anti-koagulatorisch wirkenden Faktor Xa-Inhibitor WX-FX4

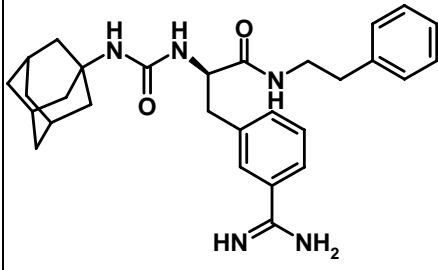
In den vorangegangenen Experimenten wurden selektive FXa-Inhibitoren mit Erfolg als anti-metastatische Therapeutika im T-Zell Lymphommodell eingesetzt. FXa-Inhibitoren wurden ursprünglich als viel versprechende Gerinnungshemmer entwickelt und werden heutzutage in der Klinik und klinischen Forschung erfolgreich als Antikoagulanzen verwendet. Bei einem Einsatz als Antimetastatika stellt genau diese gerinnungshemmende Wirkung die gefürchtete Nebenwirkung der FXa-Inhibitoren dar. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob ein FXa-Inhibitor einerseits hoch anti-metastatisch wirksam sein kann, ohne andererseits anti-koagulatorische Nebenwirkungen hervorzurufen. Dies warf auch die Frage nach einer eventuellen metastasierungsfördernden Rolle von FXa außerhalb der Gerinnungskaskade auf. Um dies zu untersuchen, sollte es zum gezielten Einsatz eines FXa-Inhibitors kommen, der einerseits eine hohe Selektivität für FXa aufweist und andererseits die Blutgerinnung nur in geringem Maße beeinflusst. Der synthetische FXa-Inhibitor WX-FX4 zeichnet sich durch eine hohe Affinität für FXa (bovin) aus, was ein guter Ausgangspunkt für eine starke Selektivität

war. Darüber hinaus gab es Indizien für eine schwache anti-koagulatorische Wirkung des Hemmstoffs. Daher konnte der FXa-Inhibitor WX-FX4 zur Bearbeitung der Hypothese verwendet werden. Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse wurden vorab in Banke et al., *Thromb. Haemost.* 2005 (94: 1084-1093) veröffentlicht.

5.3.1 Hohe Faktor Xa-Selektivität, niedrige anti-koagulatorische Wirkung *in vitro* und geringe Halbwertszeit von WX-FX4

Um bei dem Einsatz von WX-FX4 *in vivo* Nebenwirkungen zu vermeiden und größtmögliche anti-metastatischen Effekte zu erzielen, mußte zunächst untersucht werden, ob der synthetische Inhibitor hochselektiv für FXa war. Dazu wurden die Selektivitäten des Inhibitors gegenüber verschiedenen charakteristischen Serinproteasen, die in einer Vielzahl biologischer Prozesse wie Gerinnung, Fibrinolyse und Tumorprogression involviert sind, auf der Grundlage der Affinitäten für humane Enzyme berechnet (Tab. 5.1). Dabei zeigte WX-FX4, der die höchste Affinität im nanomolaren Bereich gegenüber FXa neben einer kaum vorhandenen uPA-Affinität besaß, eine starke FXa-Selektivität (Tab. 5.1). Diese war besonders deutlich im Bezug auf uPA (Tab. 5.1), wo sie mit dem über 13.000-fachen Wert deutlich höher war als bei den FXa-Inhibitoren der CJ-Reihe (Tab. 4.1). Sowohl FXa-Affinität als auch -Selektivität waren vergleichbar mit dem sich in späten Phasen klinischer Studien befindenden FXa-Inhibitor DX-9065a (über 4.700-fache FXa-Selektivität im Bezug auf uPA, siehe Tab. 4.1).

Tabelle 5.1 Strukturformel, Inhibitionskonstanten (K_i), FXa-Selektivität und Halbwertszeit der Eliminationsrate (β -Phase, $t_{1/2}$) des FXa-Inhibitors WX-FX4.

Strukturformel	K_i (μM)					$t_{1/2}$ (min)
	FXa	uPA	Plasmin	Thrombin	Trypsin	
	0,074	>1.000	52,5	1,3	5,3	<10
	FXa-Selektivität					
	$\frac{K_i [\text{uPA}]}{K_i [\text{FXa}]}$	$\frac{K_i [\text{Plasmin}]}{K_i [\text{FXa}]}$	$\frac{K_i [\text{Thrombin}]}{K_i [\text{FXa}]}$	$\frac{K_i [\text{Trypsin}]}{K_i [\text{FXa}]}$		
	>13.513,5	709,5	17,6	71,6		

Gezeigte Daten repräsentieren den Mittelwert und den mittleren Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen, jeweils dreifach durchgeführten Experimenten.

Trotz ähnlicher K_i -Werte gegenüber freiem FXa können Inhibitoren den im Prothrombinase-Komplex gebundenen FXa unterschiedlich stark hemmen, was wiederum zu einer verschiedenen hohen anti-koagulatorischen Wirkung *in vivo* führen kann (Sinha et al., 2003). Daher wurde der IC_{50} (für eine Halbierung der Enzymaktivität erforderliche Inhibitorkonzentration) der Prothrombinase-Komplex Aktivität von WX-FX4 bestimmt. Der Inhibitor war, im Vergleich zu DX-9065a, signifikant (5-fach) schwächer in der Hemmung der Prothrombinase-Komplex Aktivität ($P = 0,012$, Tab. 5.2) als Hinweis auf eine stärkere und selektivere Hemmung von freiem gegenüber im Prothrombinase-Komplex gebundenen FXa.

Trotz des geringen Einflusses auf die Prothrombinase-Komplex Aktivität musste eine entscheidende anti-koagulatorische Wirkung von WX-FX4 als mögliche spezifische Nebenwirkung einer FXa-Inhibitortherapie ausgeschlossen werden. Dazu wurde die Wirkung von WX-FX4 und dem Vergleichsinhibitor DX-9065a zunächst auf die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Prothrombin-Zeit (PT) von humanem Plasma in Gerinnungsanalysen *in vitro* bestimmt. WX-FX4 wies eine signifikant schwächere anti-koagulatorische Wirkung auf als DX-9065a ($P < 0,001$, Tab. 5.2), was sich in einer 4-fach höheren IC_{200} (für eine Verdopplung der Gerinnungszeit erforderliche Inhibitorkonzentration) der aPTT und einer 6-fach höheren IC_{200} der PT widerspiegelte (Tab. 5.2).

Da eine gerinnungsfördernde (und prometastatische) Wirkung der Blutplättchenaggregation bekannt ist (Bastida und Ordinas, 1988), die durch synthetische Hemmstoffe beeinflusst werden kann, wurde zusätzlich die direkte Wirkung von WX-FX4 auf die Plättchenaggregation bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ konnte dabei kein WX-FX4-induzierter Effekt auf eine durch Kollagen, ADP, Thrombin oder Arachidonsäure verursachte Plättchenaggregation gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 5.2 Erforderliche Konzentrationen von WX-FX4 und DX-9065a, um eine Verdopplung der Gerinnungszeiten (IC_{200} -Werte von aktivierter partieller Thromboplastinzeit [aPTT] und Prothrombin-Zeit [PT]) und eine 50%-ige Verringerung der Prothrombinase-Komplex Aktivität (IC_{50} -Werte) zu erzielen.

Inhibitor	IC_{200} (μM)		IC_{50} (μM)
	aPTT	PT	Prothrombinase-Komplex Aktivität
WX-FX4	$3,86 \pm 0,26$	$3,1 \pm 0,31$	$1,52 \pm 0,36$
DX-9065a	$1,05 \pm 0,19$	$0,52 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,05$

Gezeigte Daten repräsentieren den Mittelwert und den mittleren Standardfehler aus mindestens 3 unabhängigen, jeweils dreifach durchgeführten Experimenten.

Auch geringe antikoagulatorische Eigenschaften eines Inhibitors können möglicherweise durch eine lange *in vivo*-Halbwertszeit in der Blutzirkulation zu gerinnungshemmenden Nebenwirkungen führen. In pharmakokinetischen Analysen konnte jedoch nur eine relativ kurze Halbwertszeit der Eliminationsrate von WX-FX4 *in vivo* festgestellt werden (Tab. 5.1). Um die schwache anti-koagulatorische Wirkung des Inhibitors zu bestätigen, sollte ein zusätzlicher Plasma- und Vollblut-Gerinnungsassay als thrombelastographische Analyse durchgeführt werden.

5.3.2 Schwache Beeinflussung der Gerinnungszeiten von Plasma und Vollblut *in vitro* durch WX-FX4

WX-FX4 zeigte nur eine geringe anti-koagulatorische Wirkung *in vitro* hinsichtlich aPTT, PT und Prothrombinase-Komplex Aktivität sowie keinen Einfluss auf die Plättchenaggregation. Daher ergab sich die Frage, ob dieser schwache Einfluss auf die Blutgerinnung in einem zusätzlichen Plasma- und Vollblut-Gerinnungsassay bestätigt werden konnte. Vor allem der Vollblut-Gerinnungsassay war dabei für die *in vivo*-Wirkung des Inhibitors von hoher Aussagekraft aufgrund seiner Durchführung in Gegenwart von Thrombozyten als korpuskulärem Blutbestandteil. Dafür wurde die Thrombelastographie (ROTEG[®] *Whole Blood Haemostasis System*) eingesetzt und der Einfluß von WX-FX4 und dem Vergleichsinhibitor DX-9065a auf die Gerinnungszeiten von Plasma und Vollblut untersucht. Dabei konnte keine augenscheinlich veränderte Gerinnungszeit von Plasma oder Vollblut durch WX-FX4 in der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 1 µM gefunden werden (Abb. 5.9). Im Gegensatz dazu zeigte DX-9065a schon in dieser geringen Konzentration eine Verdopplung der Gerinnungszeiten beider Probenarten. Bei dem Einsatz höherer Konzentrationen von WX-FX4 und DX-9065a kam es sowohl im Plasma als auch im Vollblut zu einem dosisabhängigen Anstieg der Gerinnungszeit (Abb. 5.9). In der höchsten untersuchten Inhibitorkonzentration (16 µM) konnte in WX-FX4-behandelten Proben nur eine 2- bis 3-fache Verlängerung der Gerinnungszeit festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten DX-9065a-behandelte Proben in dieser hohen Konzentration eine 5- bis 6-fache Verlängerung der Gerinnungszeit (Abb. 5.9). Die anti-koagulatorische Wirkung von DX-9065a war in allen Konzentrationen und Probenarten signifikant höher als die von WX-FX4.

Um die anti-koagulatorische Aktivität von WX-FX4 mit einem weiteren gerinnungshemmenden Therapeutikum vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Wirkung des hochspezifischen und klinisch als Antikoagulanz zugelassenen Thrombin-Inhibitors Lepirudin (rekombinantes Hirudin) (Deitcher, 2003) auf Plasma und Vollblut thrombelastographisch bestimmt.

Auch nach einem Zeitraum von 30 min konnte dabei keine messbare Gerinnungsaktivität Lepirudin-behandelter Proben schon in der niedrigsten eingesetzten Konzentration (1 μM) gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Um nun herauszufinden, ob WX-FX4 trotz dieser schwachen anti-koagulatorischen Wirkung dennoch anti-metastatisch wirksam sein könnte, ohne dabei entscheidende Nebenwirkungen, vor allem bezüglich der Gerinnung, *in vivo* hervorzurufen, musste der Inhibitor als nächstes in einem experimentellen Metastasierungsmodell im Tier eingesetzt werden.

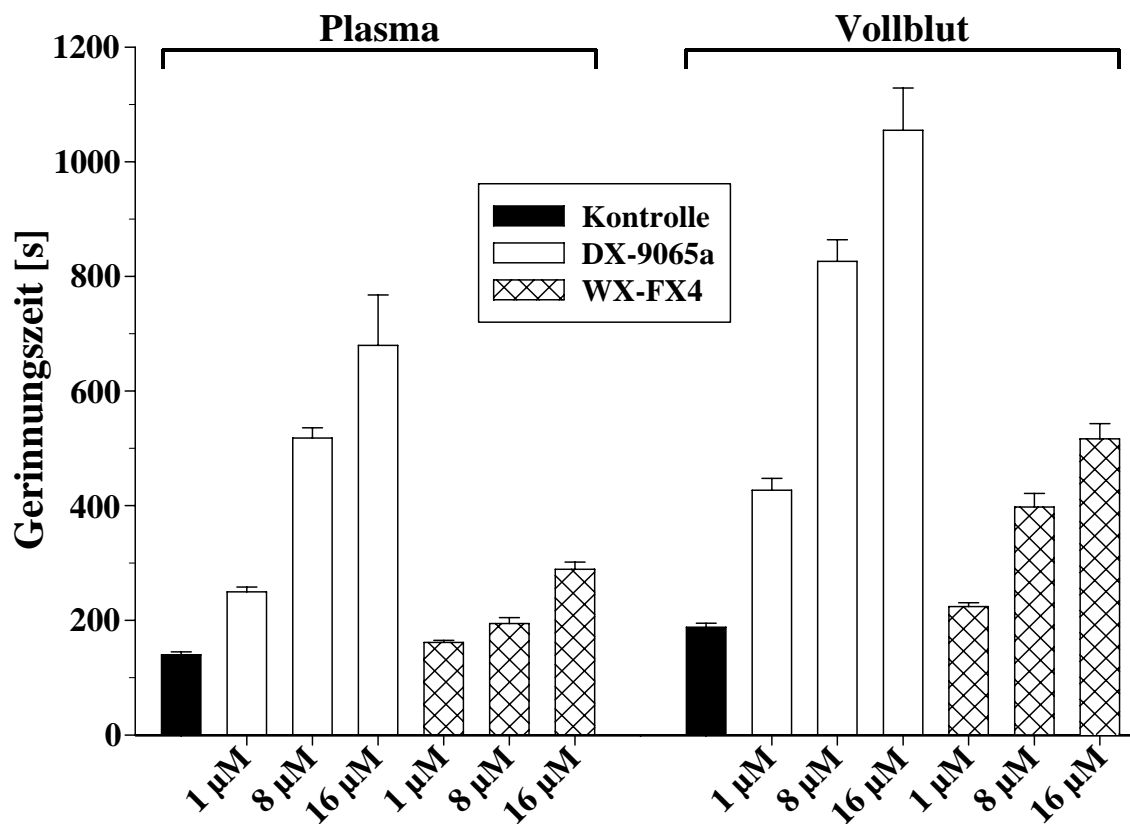


Abbildung 5.9: Einfluß von WX-FX4 auf die Gerinnungszeiten von Plasma und Vollblut *in vitro*. Bestimmung der Gerinnungszeiten von Plasma und Vollblut nach Zugabe der FXa-Inhibitoren WX-FX4 und DX-9065a (Konzentrationen [c] von 1, 8 und 16 μM) mittels Thrombelastographie (ROTEG® *Whole Blood Haemostasis System*). Plasma (linke Hälfte): Kaum Zunahme der Gerinnungszeit durch WX-FX4 (c = 1 μM : 162 ± 3 s; c = 8 μM : 194 ± 10 s; c = 16 μM : 289 ± 13 s), deutliche Verlängerung der Gerinnungszeit durch DX-9065a (c = 1 μM : 250 ± 8 s; c = 8 μM : 518 ± 18 s; c = 16 μM : 680 ± 88 s) in dosisabhängiger Weise im Vergleich zu Kontroll-Plasma (Gerinnungszeit von 140 ± 5 s). Vollblut (rechte Hälfte): noch stärkere Verlängerung der Gerinnungszeit durch DX-9065a (c = 1 μM : 427 ± 21 s; c = 8 μM : 826 ± 38 s; c = 16 μM : 1.055 ± 74 s), nur mäßige Zunahme der Gerinnungszeit durch WX-FX4 (c = 1 μM : 224 ± 7 s; c = 8 μM : 398 ± 24 s; c = 16 μM : 517 ± 24 s), verglichen zu Kontroll-Vollblut (188 ± 7 s). Die anti-koagulatorische Wirkung von WX-FX4 war in allen eingesetzten Konzentrationen signifikant niedriger als die von DX-9065a (Plasma: $P < 0,001$ (1 und 8 μM), $P = 0,012$ (16 μM); Vollblut: $P < 0,001$ (1 und 8 μM), $P = 0,002$ (16 μM)). Darstellung von Mittelwerten und mittlerem Standardfehler (= Fehlerbalken) pro Gruppe aus mindestens 3 unabhängigen, jeweils dreifach durchgeführten Experimenten.

5.3.3 Anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 auf die Makro- und Mikrometastasierung im murinen T-Zell Lymphom

Da WX-FX4 nur eine schwache anti-koagulatorische Wirkung *in vitro* besaß, konnte der Inhibitor nun in einem Metastasierungsexperiment *in vivo* mit der Erwartung an allenfalls geringfügige Nebenwirkungen bezüglich der Blutgerinnung eingesetzt werden. Dabei stellte sich die Frage, ob WX-FX4, trotz schwacher anti-koagulatorischer Eigenschaften, dennoch aufgrund seiner hohen FXa-Selektivität signifikant anti-metastatisch wirksam sein konnte. Um diesbezüglich eine erste Aussage treffen zu können, wurde der Inhibitor im dafür geeigneten experimentellen T-Zell Lymphom-Metastasierungsmodell, in dem eine Reduktion der Makro- und Mikrometastasierung der Leber durch FXa-selektive Inhibitoren gezeigt wurde (siehe 5.1.3 bis 5.1.5), eingesetzt. Dazu wurde WX-FX4 den Mäusen in einer Dosis von 1,5 mg/kg zweimal täglich (wirksamste Dosis in den bisherigen Inhibitorstudien, siehe 5.1.2 bis 5.1.5) über den Zeitraum des gesamten Experimentes intraperitoneal (gut untersuchte Applikationsform, siehe 5.1.2 bis 5.1.5) verabreicht. Um eine größtmögliche anti-metastatische Wirkung zu erzielen, wurden die ersten Behandlungen, wie schon unter 5.1.2 beschrieben, um den Zeitpunkt der Tumorzellinokulation herum durchgeführt. Dadurch sollte die initiale Extravasation der intravenös inokulierten Tumorzellen und damit die frühe Tumorzellkolonisation der Leber verhindert werden. Dabei konnte, mittels Quantifizierung der X-Galgefärbten Makrometastasen auf der Oberfläche der Mäuselebern, eine signifikante Reduktion der Metastasierung um über 91% in der WX-FX4-Behandlungsgruppe (Abb. 5.10 A und Bb) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 5.10 A und Ba) sechs Tage nach Injektion der L-CI.5s Zellen nachgewiesen werden.

Ein weiterer Parameter für die anti-metastatische Wirkung war die Reduktion der modelltypischen sekundären Invasion der Leber mit Tumorzellen in Form der Mikrometastasierung (einzelne Tumorzellen oder kleinere Tumorzellanhäufungen mit einem Durchmesser < 0,2 mm). Diese breitet sich zusätzlich bei diesem lymphoiden Tumorzelltyp sehr verstreut mit über 10.000 Metastasen je Leber, ausgehend von etablierten Metastasen, aus (Abb. 5.10 Bc) und sollte durch die späten Behandlungen gegen Ende des Experiments verhindert werden. Hierfür wurden die Mäuselebern nach Beendigung des Experiments auf die Dichte der jeweiligen Mikrometastasierung untersucht. Dabei konnte eine drastische Abnahme der Mikrometastasierung in Lebern WX-FX4-behandelter Mäuse gefunden werden (Abb. 5.10 Bd).

Um auch mögliche unerwünschte Nebenwirkungen der Therapie über den achttägigen Behandlungszeitraum zu erfassen, wurden körperliche Erscheinung und Mobilität der Mäuse über den Zeitverlauf des gesamten Experimentes zweimal täglich beobachtet. Dabei konnten

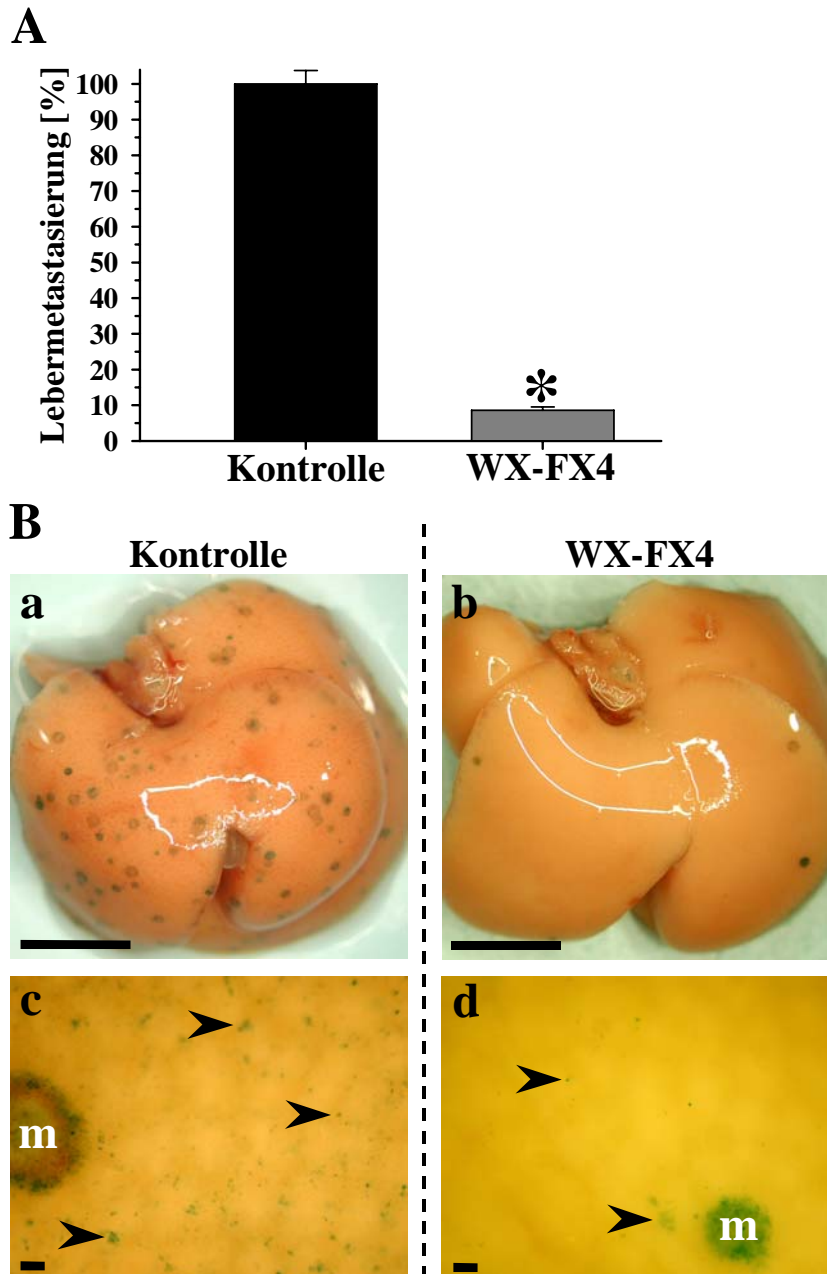


Abbildung 5.10: Therapeutische Wirkung von WX-FX4 auf die Makro- und Mikrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell. **A)** Gezeigt ist die anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) auf die experimentelle Makrometastasierung der Leber. Diese ist dargestellt als relative Anzahl der Metastasen auf der Oberfläche der Mäuselebern in der WX-FX4-Behandlungsgruppe ($n = 12$, anti-metastatische Wirkung: $91,4 \pm 0,9\%$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $140,8 \pm 5,3$, entsprechend $100 \pm 3,8\%$; $n = 12$ Mäuse). Die anti-metastatische Wirkung der WX-FX4-Behandlung war statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle (Stern über der Säule; $p < 0,001$). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler. **B)** Gezeigt ist die Reduktion der experimentellen Mikrometastasierung der Leber durch Therapie mit WX-FX4. Darstellung von Nahaufnahmen der Oberfläche des Leberparenchyms (*c, d*; Balken = 0,1 mm; Makrometastasen = m, Mikrometastasen = Pfeile) entsprechender X-Gal gefärbter kompletter Lebern (*a, b*; Balken = 5 mm) der Behandlungs- und Kontrollgruppe. Signifikante Reduktion sowohl indigo-blauer *lacZ*-markierter Makrometastasen (*b*) als auch starke Reduktion indigo-blauer *lacZ*-markierter Mikrometastasen (*d*) durch WX-FX4-Therapie (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) im Vergleich zur Kontrollgruppe (*a, c*). Gezeigte Ausschnitte (*c, d*) sind sowohl für die ganze Leber als auch für alle Mäuselebern der jeweiligen Gruppe repräsentativ.

bei den behandelten Tieren keine Beeinträchtigung des äußeren Erscheinungsbildes oder sonstige Auffälligkeiten gefunden werden.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die gezeigten anti-metastatischen Wirkungen von WX-FX4 auf einer zytotoxischen Eigenschaft des Hemmstoffs beruhten. Daher wurde zusätzlich die Wirkung des Inhibitors auf die L-CI.5s-Zellen sowie auf normale Endothelzellen *in vitro* mit einem Sulforhodamin B-Zytotoxizitätsassay untersucht. Dabei konnte keine zytotoxische Wirkung von WX-FX4 auf die Tumorzellen bis zu einer Konzentration von 30 mM, sowie auf normale Endothelzellen bis zu einer Konzentration von 300 μ M nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die antimetastatische Wirkung von WX-FX4 nicht auf einer zytotoxischen Hemmstoffeigenschaft beruhte. Da die anti-metastatische Therapie mit WX-FX4 im T-Zell Lymphommodell hochwirksam war, stellte sich die Frage, ob sich die Ergebnisse auch auf ein humanes, solides Tumormodell mit einem anderen Zielorgan der Metastasierung übertragen lassen. Um dies zu testen, musste WX-FX4 als nächstes in dem *lacZ*-markierten HT1080 Fibrosarkommodell eingesetzt werden.

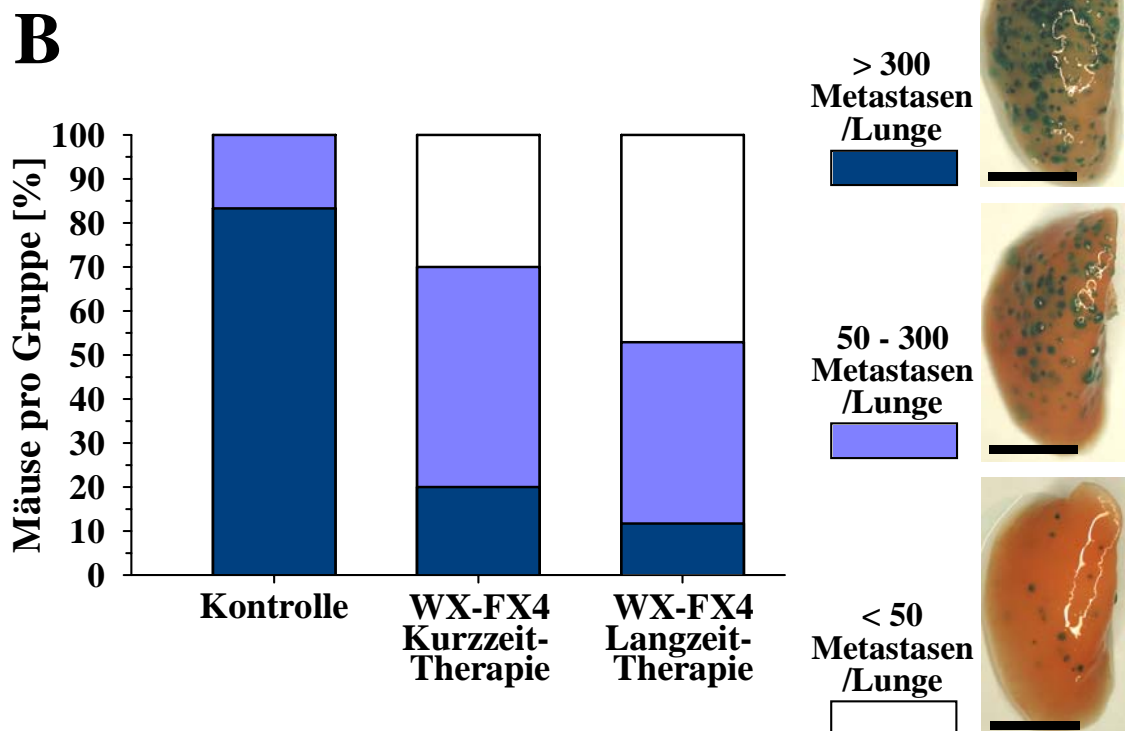
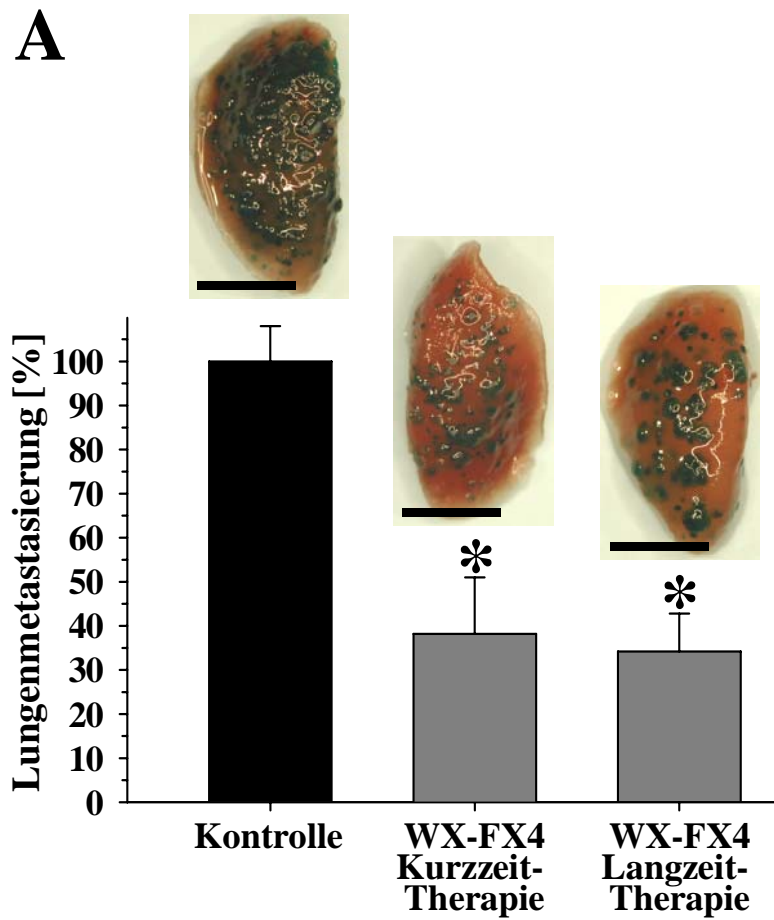
5.3.4 Anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 über verschiedene Behandlungszeiträume im humanen Fibrosarkom

Da die anti-proteolytische WX-FX4-Therapie im T-Zell Lymphommodell hochwirksam gegen die Metastasierung war, ergab sich, auch in klinischer Hinsicht, die Frage, ob sich die Ergebnisse auf ein solides Tumormodell mit humanen Tumorzellen und einem anderen Zielorgan der Metastasierung übertragen lassen. Daher wurde WX-FX4 als nächstes in dem Metastasierungsmodell mit humanen *lacZ*-markierten HT1080 Fibrosarkomzellen eingesetzt, in dem es nach intravenöser Inokulation von 1×10^6 Tumorzellen zur modelltypischen Bildung von Metastasen in der Lunge als Zielorgan kommt. Um zu zeigen, ob eine Therapie während des Zeitraumes von Zirkulation in und Extravasation aus dem Blutgefäßsystem der Tumorzellen schon ausreicht, um die experimentelle Lungenmetastasierung erfolgreich zu hemmen, wurde die Behandlung in einer Gruppe als „Kurzzeit-Therapie“ (ein Tag vor bis ein Tag nach Tumorzellinokulation) durchgeführt. Um zu zeigen, ob durch den Einfluss auch auf spätere Schritte der Metastasierung wie zum Beispiel Proliferation eine zusätzliche Wirkung erzielt werden kann, wurde die Behandlung in einer zweiten Gruppe als „Langzeit-Therapie“ mit maximaler Behandlungsdauer (ein Tag vor TZI bis 1 h vor Tötung an Tag 22) durchgeführt. Dies ermöglichte, das Zeitfenster der anti-FXa-Wirkung von WX-FX4 näher zu bestimmen und damit die Bedeutung von FXa in der Metastasierung zeitlich einzugrenzen. Weiterhin konnte mit der „Langzeit-Therapie“ untersucht werden, ob es möglich war, WX-FX4 über

einen so langen Zeitraum nebenwirkungsfrei zu verabreichen. 22 Tage nach Injektion der HT1080*lacZ*-K15 Zellen ergab die Quantifizierung der X-Gal-gefärbten Metastasen auf der Oberfläche der Mäuselungen eine signifikante Reduktion der Metastasierung sowohl in der WX-FX4-Kurzzeit- (über 61% Reduktion) als auch in der WX-FX4-Langzeit-Therapiegruppe (über 65% Reduktion) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 5.11 A). Die anti-metastatischen Wirkungen der beiden Behandlungsgruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied untereinander, wobei die „Langzeit-Therapie“ dem Trend nach etwas effektiver war (Abb. 5.11 A). Um den Unterschied von 4,0% im Mittelwert der Lungenmetastasen zwischen der „Kurzzeit-“ und „Langzeit-Therapie“ genauer zu untersuchen, wurden die Behandlungsgruppen anhand ihrer Metastasenmengen pro Maus in folgende drei Subkategorien unterteilt: Anteil von Mäusen mit niedriger (0 bis 50 Metastasen/Lunge), mittlerer (50 bis 300 Metastasen/Lunge) und hoher Anzahl an Metastasen (über 300 Metastasen/Lunge). Dabei war der Anteil an Mäusen, deren Lunge mit weniger als 50 Metastasen belastet waren, in der Langzeit-Therapiegruppe größer (47%) als in der Kurzzeit-Therapiegruppe (30%, Abb. 5.11 B). Im Gegensatz dazu besaß keine Maus der Kontrollgruppe eine mit weniger als 50 Metastasen belastete Lunge (Abb. 5.11 B).

Als nächstes musste getestet werden, ob die beobachteten anti-metastatischen Wirkungen von WX-FX4 auf einer zytotoxischen Eigenschaft des Hemmstoffs beruhten. Daher wurde zusätzlich die Wirkung des Inhibitors auf die Fibrosarkom-Zellen *in vitro*, wie schon unter 5.3.3 mit den Lymphom- sowie normalen Endothelzellen gezeigt, mit einem Sulforhodamin B-Zytotoxizitätsassay untersucht. Dabei konnte keine zytotoxische Wirkung von WX-FX4 auf

Abbildung 5.11 (S.79): Therapeutische Wirkung von WX-FX4 auf die Metastasierung der Lunge im humanen Fibrosarkommodell. A) Das Diagramm zeigt die anti-metastatische Wirksamkeit der „Kurzzeit-“ (3 Tage) und „Langzeit-Therapie“ (24 Tage) von WX-FX4 (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) auf die experimentelle Lungenmetastasierung. Dargestellt ist die relative Anzahl der Metastasen auf der Oberfläche der Mäuselungen in den beiden Behandlungsgruppen (WX-FX4-Kurzzeit-Therapie: n = 10, anti-metastatische Wirkung: $61,8 \pm 12,9\%$, $p = 0,001$; WX-FX4-Langzeit-Therapie: n = 17, anti-metastatische Wirkung: $65,8 \pm 8,6\%$, $p < 0,001$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $362,4 \pm 28,9$, entsprechend $100 \pm 8,0\%$; n = 18 Mäuse). Die anti-metastatischen Wirkungen beider Therapiegruppen waren statistisch signifikant gegenüber der Kontrolle (Stern über den Säulen) mit einem nicht signifikanten Unterschied untereinander ($p = 0,821$). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler. Über den Säulendiagrammen gezeigte Lungen sind in ihrer Zahl indigo-blauer *lacZ*-markierter Metastasen repräsentativ für den jeweiligen Gruppenmittelwert (Balken = 5 mm). **B)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Mäuse in der Kontrolle, WX-FX4-Kurzzeit- und -Langzeit-Therapiegruppe, deren Lungen mit niedriger (weniger als 50 Metastasen/Lunge; weiß), mittlerer (50 bis 300 Metastasen/Lunge; dunkelblau) und hoher (über 300 Metastasen/Lunge; hellblau) Zahl an Metastasen belastet waren. Die X-Gal-gefärbten Lungen rechts daneben sind repräsentativ für den jeweiligen Anteil an Metastasen (Balken = 5 mm).



die Tumorzellen bis zu einer Konzentration von 30 mM nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass die antimetastatische Wirkung von WX-FX4 nicht auf einer zytotoxischen Hemmstoffeigenschaft beruhte. Da die WX-FX4-Therapie aufgrund der signifikanten Reduktion der Metastasierung auch auf einen verbesserten Gesundheitszustand behandelte Mäuse schließen ließ, sollten der Gewichtsverlauf und das körperliche Befinden der Tiere als Parameter des Gesundheitszustandes überprüft werden.

5.3.5 Prävention tumorbedingten Gewichtsverlustes und weiterer Krankheitssymptome durch Therapie mit WX-FX4

Als nächstes wurde untersucht, ob die Reduktion der Lungenmetastasierung durch die WX-FX4-Therapie auch mit einem verbesserten Gesundheitszustand der Mäuse über den langen Zeitraum des Fibrosarkomexperiments einherging. Ein Parameter für den Gesundheitszustand der Tiere war ihr Gewicht. Hierfür wurden die Mäuse vor und nach dem Experiment gewogen und die Gewichtsänderung dokumentiert. Dabei zeigte sich, dass die WX-FX4-Therapie signifikant den tumorbedingten Gewichtsverlust der Tiere, wie er in der Kontrollgruppe mit über 10% auftrat, über den langen experimentellen Zeitraum verhindern konnte (Abb. 5.12): In der Kurzzeit-Therapiegruppe kam es zu einer Gewichtszunahme von über 8%, in der Langzeit-Therapiegruppe von über 1% (Abb. 5.12). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant.

Als weitere Hinweise auf den Gesundheitszustand der Tiere wurde ihre körperliche Erscheinung und Mobilität während des gesamten Experiments zweimal täglich kontrolliert. Zusätzlich wurde die Atmung der Mäuse beobachtet, da die Lunge das Hauptorgan der Metastasierung war. Dabei zeigten die Tiere der Kontrollgruppe schon ab Tag 20 erste Anzeichen von Kachexie, Dyspnoe und eingeschränkter Mobilität. Bei den Mäusen beider Behandlungsgruppen, auch in der Langzeit-Therapiegruppe mit einer Behandlungsdauer von 24 Tagen, konnte dagegen keine Beeinträchtigung der körperlichen Erscheinung festgestellt werden. Zudem zeigten sich bei den behandelten Tieren keine Einschränkung der Mobilität (auch nicht in Form unerwünschter Nebenwirkungen der Therapie) sowie keine Anzeichen einer Dyspnoe. Da auch durch den Einsatz eines hochspezifischen FXa-Inhibitors Gerinnungsstörungen *in vivo* als behandlungsbedingte Nebenwirkung nicht ausgeschlossen werden können, musste zusätzlich eine mögliche anti-koagulatorische Wirkung von WX-FX4 in den gezeigten Metastasierungsexperimenten thrombelastographisch untersucht werden.

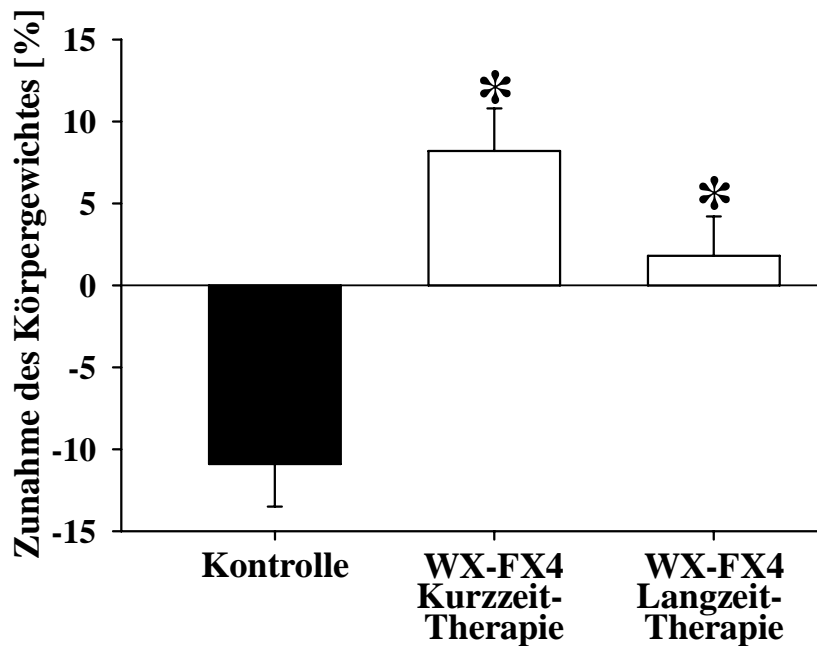


Abbildung 5.12: Therapie mit WX-FX4 verhindert tumorbedingten Gewichtverlust der Tiere im humanen Fibrosarkommodell. Dargestellt ist die Gewichtszunahme der Mäuse in den einzelnen Gruppen über den Zeitraum des gesamten Experimentes. Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere randomisiert in die Gruppen eingeteilt, um eine hohe Vergleichbarkeit der Gruppengewichte durch ähnliche Mittelwerte zu erzielen. Die Differenz zwischen den Mittelwerten der Anfangs- und Endgewichte der einzelnen Gruppen wurde errechnet und in [%]-Zunahme zum Mittelwert des Ausgangsgewichts dargestellt (WX-FX4-Kurzzeit-Therapie: $+8,2 \pm 2,6\%$; WX-FX4-Langzeit-Therapie: $+1,8 \pm 2,4\%$; Kontrollgruppe: $-10,9 \pm 2,0\%$). Die tumorbedingte Gewichtsabnahme in der Kontrollgruppe wurde durch die WX-FX4-Therapie signifikant verhindert (Stern über den Säulen; „Kurzzeit-Therapie“: $p < 0,001$; „Langzeit-Therapie“: $p = 0,001$). Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant ($p = 0,092$). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler.

5.3.6 Keine Verlängerung der Gerinnungszeit *ex vivo* durch anti-metastatische Therapie mit WX-FX4

Da die Therapie mit WX-FX4 frei von unspezifischen Medikamentennebenwirkungen wie Gewichtsverlust oder Änderung von äußerem Erscheinungsbild und Mobilität war, musste zusätzlich eine Veränderung der Blutgerinnung *in vivo* als mögliche spezifische und gefährliche Nebenwirkung einer anti-FXa-Therapie ausgeschlossen werden. Dafür wurden die Tiere in den gezeigten Experimenten bei der Autopsie auf mögliche Einblutungen in die Bauchhöhle sowie Hämatome an der Bauchwand (Injektionsort der Behandlung) untersucht. Dabei traten weder im T-Zell Lymphomexperiment mit der Leber als Metastasierungsorgan (5.3.3) noch im Fibrosarkomexperiment mit der Lunge als Metastasierungsorgan (5.3.4) intraperitoneale oder intradermale Blutungen bei WX-FX4-behandelten Mäusen auf (Daten nicht gezeigt).

Eine noch genauere Bestimmung einer möglicherweise nur schwachen, makroskopisch nicht erkennbaren anti-koagulatorischen Nebenwirkung von WX-FX4 *in vivo* war die Bestimmung der Gerinnungszeit *ex vivo*. Dafür wurden sowohl den Kontrolltieren als auch den WX-FX4-behandelten Mäusen beider Metastasierungsexperimente (5.3.3 und 5.3.4) zu Beginn der Autopsie (1 Std. nach der letzten Behandlung) Blut abgenommen, und die Vollblutgerinnungszeit als aussagekräftiger Parameter des Gerinnungsstatus mit der Thrombelastographie (ROTEG[®]-Analyse) bestimmt. Dabei konnte im T-Zell Lymphomexperiment nach 8-tägiger WX-FX4-Therapie keine signifikante Verlängerung der Blutgerinnungszeit der Mäuse im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 5.13 A). Darüber hinaus konnte sogar nach 24-tägiger Langzeit-Therapie mit WX-FX4 (wie auch nach dreitägiger WX-FX4-Kurzzeit-Therapie) im Fibrosarkomexperiment keine signifikant verlängerte Gerinnungszeit der Tiere, verglichen zur Kontrolle, festgestellt werden (Abb. 5.13 B). Durch eine anti-FXa-Therapie mit einem Serinproteaseinhibitor kommt es auch zu einem Eingreifen in proteolytische Systeme. Als weitere mögliche Nebenwirkung einer WX-FX4-Therapie musste daher noch als

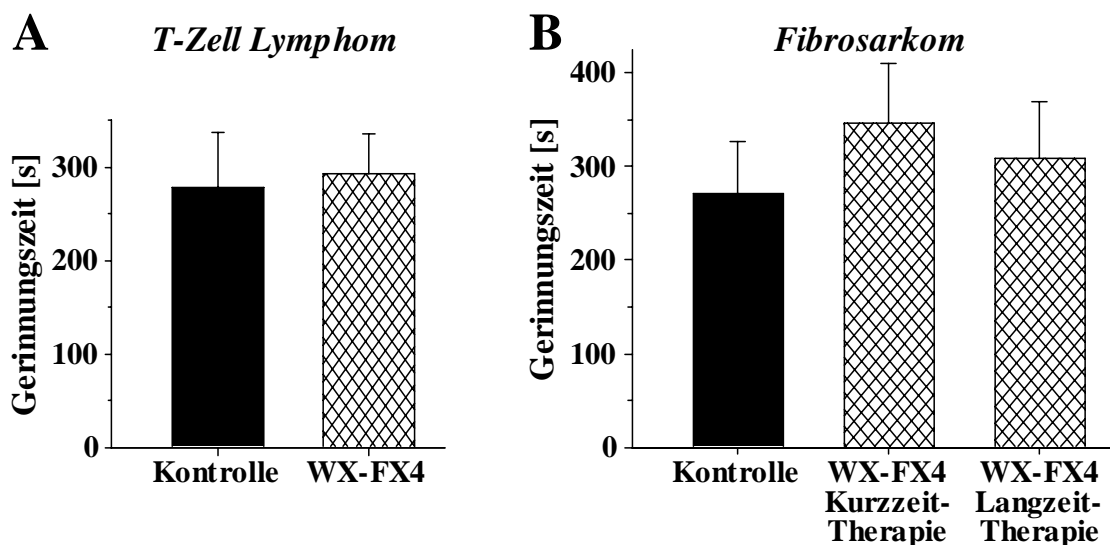


Abbildung 5.13: Therapie mit WX-FX4 hat keinen Einfluss auf die Gerinnungszeit *ex vivo*. Gezeigt ist die Wirkung von WX-FX4 auf die Vollblutgerinnungszeit der Mäuse im T-Zell Lymphom- (A) und Fibrosarkomexperiment (B). Die thrombelastographische Analyse der Gerinnungszeit wurde am Ende des jeweiligen experimentellen Metastasierungsexperiments sofort nach Tötung und anschließender Blutentnahme der Mäuse durchgeführt. **A)** DBA/2 Mäuse nach 8-tägiger WX-FX4- (1,5 mg/kg zweimal täglich, n = 6) oder Vehikelkontrollbehandlung (n = 6) aus dem experimentellen murinen T-Zell Lymphom-Metastasierungsexperiment. **B)** CD1 *nu/nu* Nacktmäuse nach 3-tägiger („Kurzzeit-Behandlung“, n = 7) und 24-tägiger („Langzeit-Behandlung“, n = 7) WX-FX4-Behandlung (1,5 mg/kg zweimal täglich) oder Vehikelkontrollbehandlung (n = 7) aus dem experimentellen humanen Fibrosarkom-Metastasierungsexperiment. Unterschiede der Gerinnungszeiten zwischen den einzelnen Gruppen beider Experimente waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Darstellung von Mittelwert und mittlerem Standardfehler (= Fehlerbalken) pro Gruppe.

Letztes eine kompensatorisch gesteigerte Expression oder Aktivierung anderer Proteasen in den gezeigten Tierexperimenten mittels Zymographie überprüft werden, bevor der Inhibitor über einen längeren Zeitraum in einem Überlebensexperiment eingesetzt werden konnte.

5.3.7 Keine kompensatorische Induktion von uPA, MMP-2 und MMP-9 durch anti-metastatische Therapie mit WX-FX4

Es ist bekannt, dass an der Metastasierung beteiligte proteolytische Systeme sich gegenseitig beeinflussen und regulieren können. Daher hätte es, trotz hochselektiver Enzymhemmung, zu einer kompensatorischen Gegenregulation anderer proteolytischer Enzyme als mögliche Nebenwirkung einer anti-FXa-Therapie mit WX-FX4 kommen können. Um dies zu überprüfen, wurde mittels Zymographie die Expression der Proteasen uPA, MMP-2 und -9 (Gelatinasen A, B), die in den gezeigten Tumormodellen bei der Metastasierung eine Rolle spielen (siehe 5.1, Arlt, 2004; Nagel, 2004; Schweinitz et al., 2004), in den jeweiligen Zielorganen der Metastasierung bestimmt. Dabei konnte in den Mäuselebern aus dem T-Zell Lymphom-Metastasierungsexperiment kein Hinweis auf eine kompensatorisch gesteigerte Expression oder Aktivierung von uPA, MMP-2 und MMP-9 durch die WX-FX4-Therapie gefunden werden (Abb. 5.14 A).

Auch im Fibrosarkom-Metastasierungsexperiment kam es, sowohl durch die „Kurzzeit-“ als auch die „Langzeit-Therapie“ mit dem Inhibitor, zu keiner kompensatorischen Erhöhung oder Aktivierung von uPA sowie MMP-2 und -9 in den Mäuselungen (Abb. 5.14 B). Zusammengefasst erwies sich WX-FX4 damit in zwei verschiedenen Tumormodellen als höchst anti-metastatisch wirksam, mit Hinweisen auf Vorteil einer „Langzeit-Therapie“. Zudem führte die Behandlung zu einer Prävention tumorbedingten Gewichtsverlustes und weiterer Krankheitssymptome, ohne signifikante Nebenwirkungen nach einem langen Behandlungszeitraum hervorzurufen. Dies prädestinierte WX-FX4 dazu, in einem Überlebensexperiment über einen noch längeren Behandlungszeitraum im Fibrosarkommodell eingesetzt zu werden.

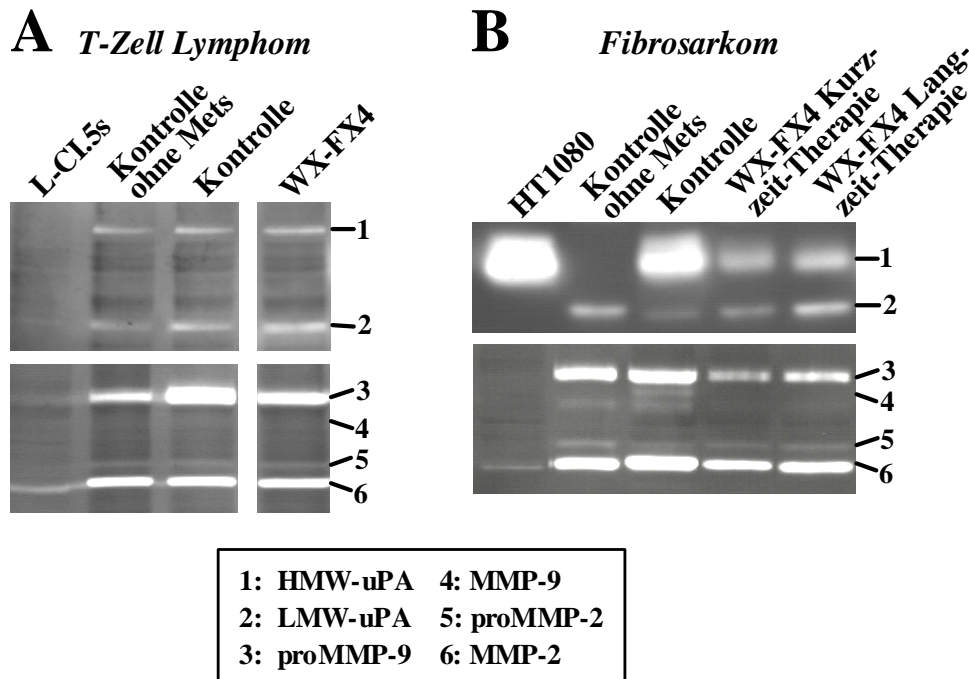


Abbildung 5.14: Zymographische Analyse der Expression von uPA und den Gelatinasen MMP-2 und -9 in den Zielorganen der Metastasierung nach anti-metastatischer Therapie mit WX-FX4. Dargestellt sind der Gehalt an uPA, MMP-2 und -9 in den Lebern (T-Zell Lymphomexperiment; A) und Lungen (Fibrosarkomexperiment; B) WX-FX4- und Vehikel-behandelter Mäuse nach Beendigung des jeweiligen Tierexperimentes. Gezeigte Daten sind repräsentativ für mindestens sieben verschiedenen Mäuse pro Gruppe. A) Metastasenbelastete (Spuren 3-4) und metastasenfrie (Spur 2) Lebern von DBA/2 Mäusen aus dem T-Zell Lymphom Metastasierungsexperiment: Zunahme der proMMP-9-Expression bei der Metastasierung (Spur 3) im Vergleich zu metastasenfrien Lebern (Spur 2). Sowohl HMW- und LMW-uPA als auch aktiviertes MMP-2 sind in metastasenfrien Lebern vorhanden (Spur 2), und wurden nicht durch die Metastasierung induziert (Spur 3). Keine wesentliche Änderung der Gesamt-uPA oder MMP-2/-9-Expression unter WX-FX4-Therapie (Spur 4). Lysat von L-CI.5s-Zellen zeigte nur sehr niedrige MMP-2/pro-MMP-9-Spiegel (Spur 1). B) Metastasenbelastete (Spuren 3-5) und metastasenfrie (Spur 2) Lungen von CD1 *nu/nu* Nacktmäusen aus dem Fibrosarkom Metastasierungsexperiment: Leichte Abnahme von LMW-uPA, Induktion von HMW-uPA und in geringem Maße auch von aktiviertem MMP-2 durch die Metastasierung (Spur 3). Die Kurzzeit- und Langzeit-Therapie mit WX-FX4 führte, im Vergleich zu metastasenbelasteten Lungen von Mäusen der Kontrollgruppe (Spur 3), zu verringerter (HMW-uPA, pro-MMP-9 und aktiviertes MMP-2) oder unveränderter (proMMP-2) Expression in Korrelation mit der abnehmenden Metastasenzahl der Lungen (Spuren 4-5). HMW-uPA und sehr geringe Spiegel von aktiviertem MMP-2 waren im Lysat von HT1080-Zellen vorhanden (Spur 1).

5.3.8 Verlängerung des Überlebens durch WX-FX4 im humanen Fibrosarkom

Es stellte sich die Frage, ob WX-FX4 aufgrund der im Fibrosarkommodell erzielten starken Reduktion der Lungenmetastasierung, der Prävention tumorbedingten Gewichtsverlustes und weiterer Krankheitssymptome sowie dem Fehlen signifikanter Nebenwirkungen nach einem langen Behandlungszeitraum auch zu einer Verlängerung des Überlebens tumortragender Tiere führen konnte. Zudem war es unklar, ob der Inhibitor über den Zeitraum von 24 Tagen nebenwirkungsfreier Behandlung hinaus (siehe 5.3.4) zweimal täglich verabreicht werden konnte, ohne anti-koagulatorische Nebenwirkungen hervorzurufen. Daher wurde WX-FX4 in einer

langfristigen Überlebensstudie im experimentellen Fibrosarkom-Metastasierungsmodell eingesetzt. Aufgrund der Hinweise auf eine stärkere Wirksamkeit der „Langzeit-Therapie“ (siehe 5.3.4) wurde der Inhibitor den Mäusen als kontinuierliche Behandlung von Tag -1 bis Tag 100, nach dem gleichem Applikationsschema wie unter 5.3.4 beschrieben, verabreicht. Im Anschluss daran folgte eine behandlungsfreie Nachbeobachtungszeit bis zum Versuchsende. Dabei zeigte sich, dass die Mäuse der WX-FX4 Behandlungsgruppe mit einer mittleren Überlebenszeit von 88 ± 24 Tagen signifikant länger als die Kontrollgruppe überlebten, und in einem Zeitraum von 230 Tagen starben (Abb. 5.15). Alle Vehikel-behandelten Kontrollmäuse starben dagegen schon innerhalb von 43 Tagen (mittlere Überlebenszeit = 36 ± 2 Tage; Abb. 5.15). An Tag 43 waren noch 80% der behandelten Mäuse am Leben (Abb. 5.15). Die Morbidität der Tiere zeigte nach Tag 70 keinen Zusammenhang mehr mit der jeweiligen Anzahl an

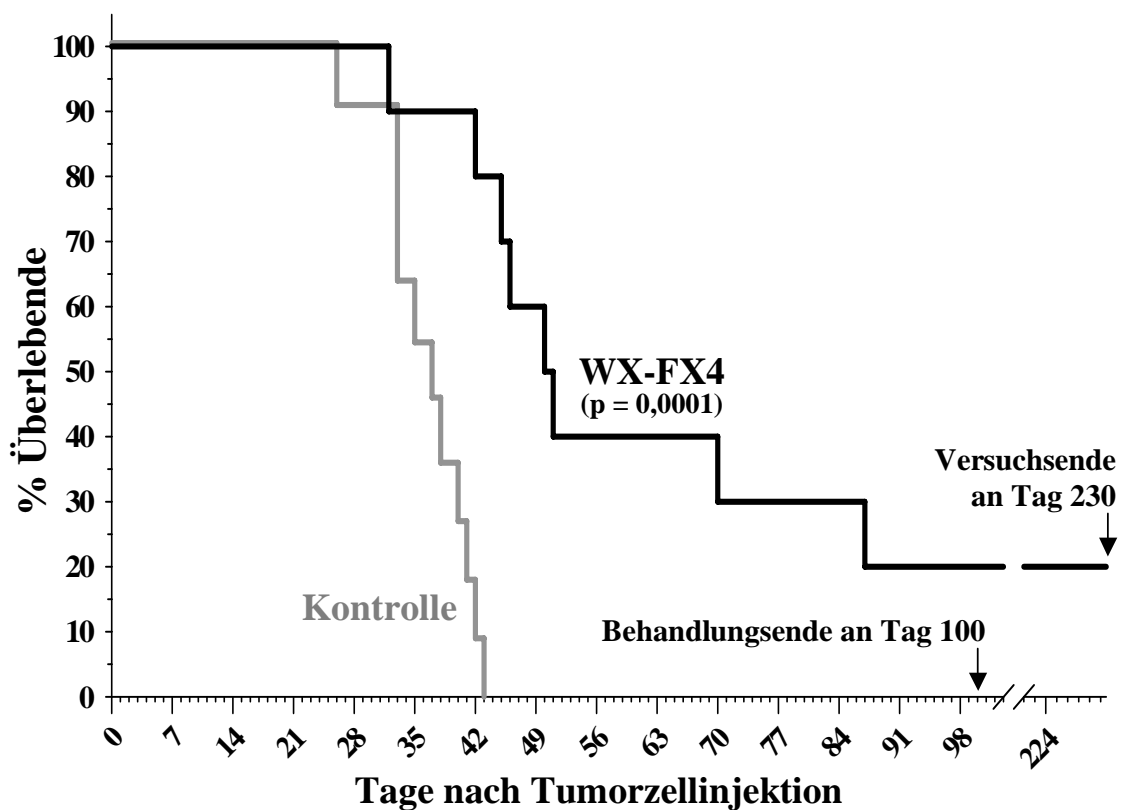


Abbildung 5.15: Therapie mit WX-FX4 verlängert das Überleben im humanen Fibrosarkommodell. Dargestellt ist das Überleben der Mäuse unter WX-FX4- oder Vehikelbehandlung (Kaplan-Meier-Überlebenskurven) im experimentellen Fibrosarkom-Metastasierungsmodell über einen Versuchszeitraum von 230 Tagen nach Tumorzellinjektion. Ende der zweimal täglichen Therapie an Tag +100, danach behandlungsfreie Nachbeobachtungszeit bis zum Versuchsende. Das Überleben der Mäuse wurde durch die WX-FX4-Therapie (3 mg/kg/Tag; schwarze Linie, n = 10) im Vergleich zur Kontrolle (graue Linie, n = 11) signifikant verlängert (p = 0,0001: Sterben der WX-FX4-Therapiegruppe innerhalb von 230 Tagen ($t_{50} = 50$ Tage), Sterben der Kontrolle innerhalb von 43 Tagen ($t_{50} = 37$ Tage)).

Lungenmetastasen, sondern konnte auf wenige vereinzelte Metastasen zurückgeführt werden. Durch das Auswachsen dieser Metastasen (Durchmesser von 2-3 mm oder mehr) im Verlauf des Experimentes kam es zu einer Ummauerung der Hauptbronchien und damit zu einer Behinderung der Atmung. Nach Behandlungsende an Tag 100 überlebten zwei der Mäuse der WX-FX4-Therapiegruppe einen weiteren Zeitraum von 130 Tagen (Abb. 5.15) mit unauffälligem äußeren Erscheinungsbild und Verhalten. Nach Versuchsabbruch an Tag 230 konnten bei diesen Tieren keine Metastasen gefunden werden.

Um bedeutende anti-koagulatorische Nebenwirkungen der WX-FX4-Therapie auszuschließen, wurden die Tiere, die sich während des Behandlungszeitraumes (bis Tag 100) im Sterben befanden, bei der Autopsie auf mögliche Einblutungen in die Bauchhöhle sowie Hämatome an der Bauchwand (Injektionsort der Behandlung) untersucht. Dabei konnten keine Anzeichen intraperitonealer oder intradermaler Blutungen WX-FX4-behandelter Mäuse gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Die Therapie mit dem FXa-Inhibitor WX-FX4 erzielte, im Gegensatz zu dem T-Zell Lymphom, im experimentellen Fibrosarkom nur eine mäßige anti-metastatische Wirkung. Da auch von einem Beitrag von uPA und uPAR zu der experimentellen Lungenmetastasierung der HT1080-Zellen ausgegangen werden konnte, sollte zusätzlich die Wirkung einer anti-uPA-Therapie mit einem selektiven uPA-Inhibitor im Fibrosarkommodell untersucht werden.

5.4 Reduktion experimenteller Metastasierung und Verlängerung des Überlebens durch den hochselektiven uPA-Inhibitor CJ-463

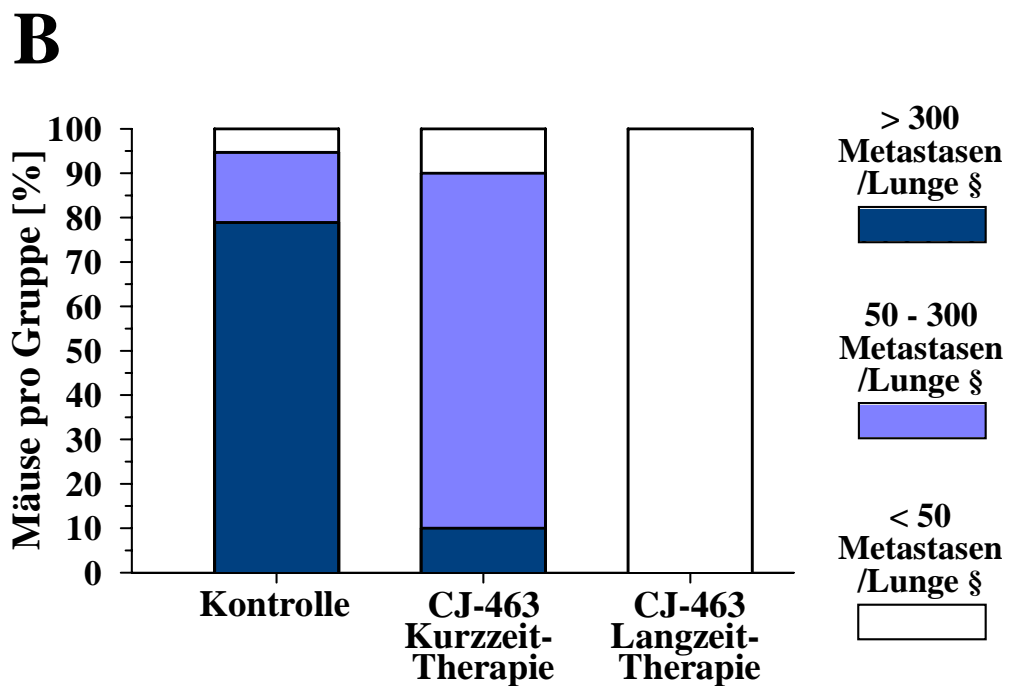
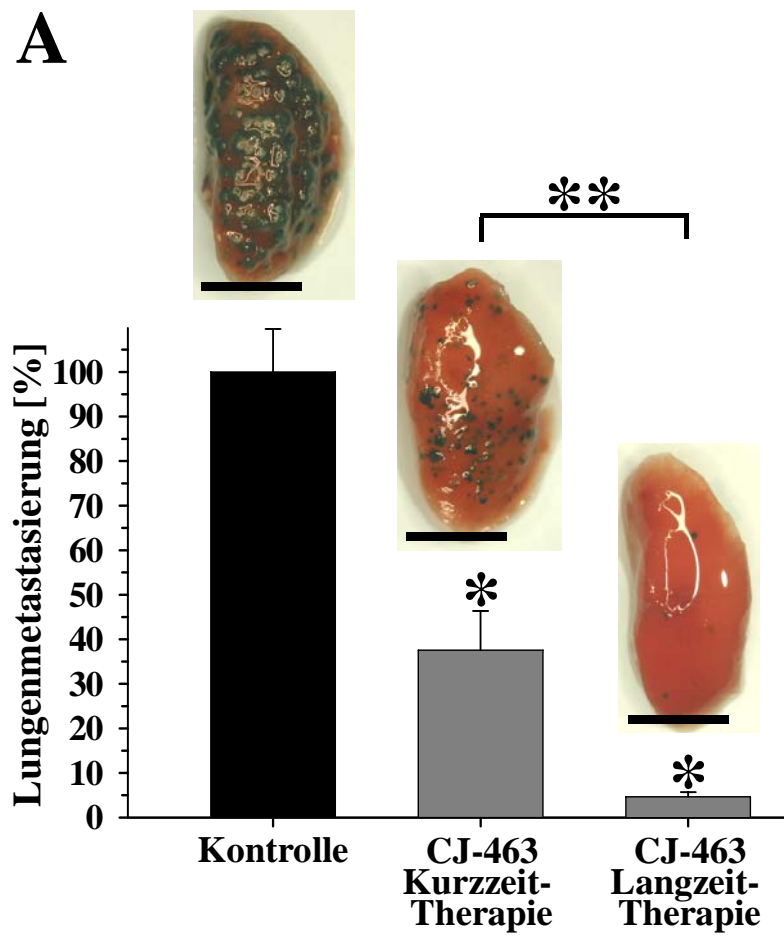
Im Fibrosarkommodell wurde bisher die Wirkung einer hochselektiven anti-FXa-Therapie auf die experimentelle Lungenmetastasierung untersucht. Dabei konnte mit WX-FX4 in diesem Tumormodell eine signifikante (maximal 65%ige Reduktion), aber im Vergleich zum Lymphommodell (91%ige Reduktion) nur mäßige anti-metastatische Wirkung erzielt werden. Daher konnte angenommen werden, dass auch andere Proteasen in diesem Tumormodell eine entscheidende Rolle spielen. Da gezeigt worden ist, dass die HT1080-Zelllinie große Mengen der prometastatischen Serinprotease uPA sezerniert und eine Zunahme der Zahl an Metastasen eng mit erhöhten uPA-Expressionsspiegeln im Lungengewebe korreliert (Arlt, 2004), konnte von einem Beitrag von uPA zu der experimentellen Metastasierung in diesem Modell ausgegangen werden. Dies wurde auch noch durch den Nachweis einer signifikanten Expression von uPAR durch die HT1080 Zellen unterstützt (Schweintz et al., 2004). Daher stellte sich die Frage, ob auch eine hochselektive anti-uPA-Therapie in dem Fibrosarkommodell zu

einer signifikanten anti-metastatischen Wirkung führen konnte. Die in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse wurden vorab in Schweinitz, Steinmetzer, Banke et al., *J. Biol. Chem.* 2004 (279: 33613-33622) veröffentlicht.

5.4.1 Anti-metastatische Wirksamkeit von CJ-463 über verschiedene Behandlungszeiträume im humanen Fibrosarkom

Zunächst wurde untersucht, ob eine anti-uPA-Therapie im Fibrosarkommodell, in dem von einer prometastatischen Rolle von uPA ausgegangen werden konnte, signifikant die experimentelle Lungenmetastasierung reduzieren konnte. Bei der Berechnung des Selektivitätsprofils des synthetischen uPA-Inhibitors CJ-463 zeigte sich, dass dieser eine noch höhere uPA-Selektivität als die bisher gezeigten 4-Amidinobenzylamid-Derivate (besonders deutlich gegenüber FXa und Thrombin als Nicht-Zielproteasen, Tab. 4.1) neben einer bekanntlich langsameren Eliminationsrate besaß (Tab. 4.1). Daher wurde CJ-463 in dem experimentellen Metastasierungsmodell mit humanen *lacZ*-markierten HT1080 Fibrosarkomzellen eingesetzt, in dem es nach intravenöser Inokulation von 1×10^6 Tumorzellen zur modelltypischen Bildung von Metastasen in der Lunge als Zielorgan kommt (siehe auch 5.3.4). Die intraperitoneale Behandlung (1,5 mg/kg zweimal täglich) wurde, wie schon unter 5.3.4 mit WX-FX4 dargestellt, in Form zweier Therapiegruppen unterschiedlicher Behandlungsdauer durchgeführt. Dies sollte es erlauben, einerseits das Zeitfenster der Wirkung des uPA-Inhibitors zu untersuchen, und damit die Rolle von uPA in der Metastasierung zeitlich einzuordnen und andererseits eine Vorhersage für eine mögliche überlebensverlängernde Wirkung von CJ-463

Abbildung 5.16 (S. 88): Therapeutische Wirkung von CJ-463 auf die Metastasierung der Lunge im humanen Fibrosarkommodell. A) Gezeigt ist die anti-metastatische Wirksamkeit der „Kurzzeit-“ (3 Tage) und „Langzeit-Therapie“ (23 Tage) von CJ-463 (Dosis: 1,5 mg/kg zweimal täglich) auf die experimentelle Lungenmetastasierung. Diese ist dargestellt als relative Anzahl der Metastasen auf der Oberfläche der Mäuselungen in den beiden Behandlungsgruppen (CJ-463-Kurzzeit-Therapie: $n = 10$, anti-metastatische Wirkung: $62,4 \pm 8,8\%$; CJ-463-Langzeit-Therapie: $n = 16$, anti-metastatische Wirkung: $95,4 \pm 1,0\%$) im Verhältnis zu der mit dem Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert der Metastasen = $343,5 \pm 33,2$, entsprechend $100 \pm 9,7\%$; $n = 19$ Mäuse). Die anti-metastatischen Wirkungen beider CJ-463-Therapiegruppen waren sowohl gegenüber der Kontrolle (Stern über den Säulen; „Kurzzeit-Therapie“: $p = 0,002$, „Langzeit-Therapie“: $p < 0,0001$) als auch untereinander (zwei Sterne über den Säulen; $p < 0,0001$) statistisch signifikant. Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler. Über den Säulendiagrammen gezeigte Lungen sind in ihrer Zahl indigo-blauer *lacZ*-markierter Metastasen repräsentativ für den jeweiligen Gruppenmittelwert (Balken = 5 mm). **B)** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Mäuse in der Kontrolle, CJ-463-Kurzzeit- und -Langzeit-Therapiegruppe, deren Lungen mit niedriger (weniger als 50 Metastasen/Lunge; weiß), mittlerer (50 bis 300 Metastasen/Lunge; dunkelblau) und hoher (über 300 Metastasen/Lunge; hellblau) Zahl an Metastasen belastet waren. Für Beispiele von Lungen des jeweiligen Anteils an Metastasen siehe Abb. 5.11.



§ Fotos beispielhafter Lungen siehe Abb. 5.11

treffen zu können: Die „Kurzzeit-Therapie“ erfolgte einen Tag vor bis einen Tag nach Tumorzellinokulation (während der Zirkulation der Tumorzellen in dem Blutgefäßsystem und der extravasationsassoziierten Proteolyse der Metastasierung). Die „Langzeit-Therapie“ wurde gemäß der „Kurzzeit-Therapie“ begonnen und im Verlauf der zunehmenden Metastasierung bis zum Tag vor der Tötung der Mäuse (Tag 22) fortgeführt. Dadurch sollten auch spätere Schritte der Metastasierung wie zum Beispiel Proliferation beeinflusst werden. Die ersten Behandlungen in beiden Gruppen (um den Zeitpunkt der TZI herum) erfolgten analog der WX-FX4-Behandlung im Fibrosarkommodell (siehe 5.3.4), um auch hier die frühe Kolonisierung der Lunge durch Tumorzellen zu verhindern. Dabei zeigte die Therapie mit CJ-463 über beide Behandlungszeiträume eine signifikante Reduktion der X-Gal-gefärbten Metastasen auf der Oberfläche der Mäuselungen im Vergleich zur Kontrolle („Kurzzeit-Therapie“: über 62% Reduktion, „Langzeit-Therapie“: über 95% Reduktion; Abb. 5.16 A). Die bemerkenswerte anti-metastatische Wirkung der „Langzeit-Therapie“ war dabei signifikant höher als die der „Kurzzeit-Therapie“ (Abb. 5.16 A). Dabei konnte die „Langzeit-Therapie“ auch, im Gegensatz zur „Kurzzeit-Therapie“, bei einer Maus gänzlich das Auftreten von Lungenmetastasen verhindern.

Als weiterer Parameter der anti-metastatischen Wirksamkeit und zugleich Hinweis auf eine mögliche überlebensverlängernde Wirkung von CJ-463 wurden die Behandlungsgruppen anhand ihrer Metastasenmengen pro Maus in drei Subkategorien, wie unter 5.3.4 beschrieben, unterteilt. Dabei zeigte sich, dass alle Mäuselungen der Langzeit-Therapiegruppe mit weniger als 50 Metastasen belastet waren (100%, Abb. 5.16 B). Im Gegensatz dazu besaß nur jeweils eine Maus in der Kurzzeit-Therapiegruppe (10%) und in der Kontrollgruppe (5%) eine mit weniger als 50 Metastasen belastete Lunge (Abb. 5.16 B).

Nach dem erfolgreichen intraperitonealen Einsatz von CJ-463 stellte sich die Frage, ob eine klinisch relevantere, subkutane CJ-463-Therapie zu einer ebenfalls starken Reduktion der Metastasierung in diesem Modell führen konnte. Dafür wurde der Inhibitor in einem zweiten Experiment im experimentellen Fibrosarkom als subkutane „Langzeit-Therapie“, analog der oben beschriebenen intraperitonealen CJ-463-Langzeit-Therapie in gleicher Dosierung eingesetzt. Dabei zeigte die subkutane CJ-463-Therapie eine ähnlich starke, signifikante ($p = 0,001$) Reduktion der Metastasierung um $84,9 \pm 4,06\%$ ($n = 11$) im Vergleich zur Kontrolle ($n = 13$). Um zu untersuchen, ob die anti-metastatische Wirkung von CJ-463 auch zu einem verbesserten Gesundheitszustand der Mäuse führte, sollten der Gewichtsverlauf und das körperliche Befinden der Tiere überprüft werden. Weiterhin sollten auch Gerinnungsstörungen

als mögliche, oft nicht sichtbare Nebenwirkung einer Therapie mit einem Serinproteaseinhibitor mittels thrombelastographischer Analyse ausgeschlossen werden.

5.4.2 Prävention tumorbedingten Gewichtsverlustes und weiterer Krankheitssymptome durch nebenwirkungsfreie CJ-463-Therapie

Es wurde untersucht, ob die Reduktion der Lungenmetastasierung durch die CJ-463-Therapie auch mit einem verbesserten Gesundheitszustand der Mäuse über den langen Zeitraum des Fibrosarkomexperiments (5.4.1) einherging und ob die „Langzeit-Therapie“ mit ihrer drastischen anti-metastatischen Wirkung dabei von Vorteil war gegenüber der „Kurzzeit-Therapie“. Dazu wurde der Gewichtsverlauf der Mäuse über den Zeitverlauf des Experiments als objektives Kriterium eines veränderten Gesundheitszustandes bestimmt, indem die Tiere zu Beginn und am Ende des Versuchs gewogen und die Gewichtsänderung ermittelt wurde. Dabei kam es in den CJ-463-Therapiegruppen zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Tiere von über 8% („Kurzzeit-Behandlung“) und 14% („Langzeit-Behandlung“) im Vergleich zu dem tumorbedingten, fast 9%-igen, Gewichtsverlust der Kontrolle (Abb. 5.17). Zusätzlich führte die „Langzeit-Therapie“ zu einer signifikant stärkeren Zunahme des Körpergewichts von 6,2% gegenüber der „Kurzzeit-Therapie“ (Abb. 5.17).

Als weitere Kriterien eines guten Gesundheitszustandes wurden physisches Erscheinungsbild, Mobilität und Atmung der Tiere während des gesamten Experiments zweimal täglich (jeweils zur Behandlung) auf Unregelmäßigkeiten überprüft. Bei den Kontrolltieren kam es dabei schon ab Tag 20 zu beginnender Kachexie und gestörter Koordination, verbunden mit eingeschränkter Atmung und Luftnot als Zeichen der Lungenmetastasierung. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse sowohl unter CJ-463-Kurzzeit- als auch CJ-463-Langzeit-Therapie (Behandlungsdauer von 23 Tagen) während des gesamten Experiments eine unauffällige Atmung sowie keine Anzeichen eines reduzierten Gesundheitszustandes (auch nicht in Form unerwünschter therapeutischer Nebenwirkungen).

Trotz der hochselektiven uPA-Hemmung durch CJ-463 waren, insbesondere über den langen Behandlungszeitraum der 23-tägigen „Langzeit-Therapie“, auch mögliche Gerinnungsstörungen *in vivo* als unspezifische medikamenteninduzierte Nebenwirkung eines Serinprotease-Inhibitors nicht auszuschließen. Um dies zu überprüfen, wurden die Tiere im Experiment mit intraperitonealer CJ-463-Therapie auf mögliche Einblutungen in die Bauchhöhle und Hämatome an der Bauchwand (Injektionsort der Behandlung) sowie im Experiment mit subkutaner CJ-463-Therapie auf Hämatome in und unter der Nackenhaut (Injektionsort der Behandlung) bei der Autopsie am Ende des jeweiligen Experiments untersucht. Dabei konnten in beiden

Fibrosarkomexperimenten keine intraperitonealen oder intradermalen Blutungen CJ-463-behandelter Mäuse nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Um auch eine möglicherweise nur schwache anti-koagulatorische Nebenwirkung der CJ-463-Therapie *in vivo* auszuschließen, wurde zusätzlich die Gerinnungszeit der Tiere bei der Autopsie am Ende des jeweiligen Fibrosarkomexperiments mittels thrombelastographischer Analyse (ROTEG®) *ex vivo* bestimmt (durchgeführt wie unter 5.3.6 beschrieben). Dabei konnten keine signifikant verlängerten Gerinnungszeiten sowohl intraperitoneal als auch subkutan behandelter Mäuse in beiden Experimenten im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden ($p > 0,05$ für alle Vergleiche; Daten nicht gezeigt). CJ-463 erwies sich somit als höchst anti-metastatisch wirksam mit einer signifikanten Überlegenheit der „Langzeit-“ gegenüber der „Kurzzeit-Therapie“ sowohl bei der Hemmung der Lungenmetastasierung als auch bei der Prä-

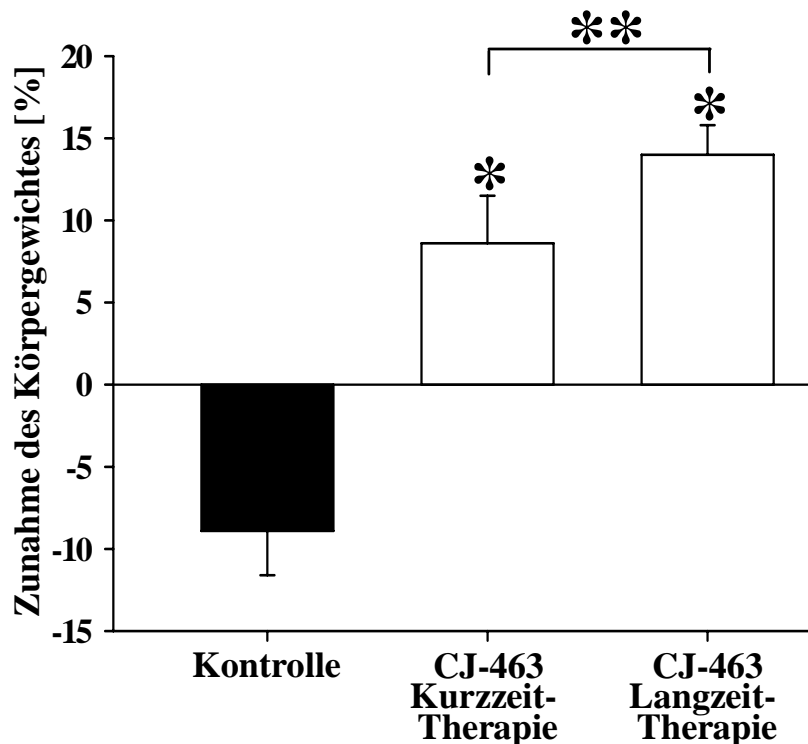


Abbildung 5.17: Therapie mit CJ-463 verhindert tumorbedingten Gewichtsverlust der Tiere im humanen Fibrosarkommodell. Dargestellt ist die Gewichtszunahme der Mäuse in den einzelnen Gruppen über den Zeitraum des gesamten Experimentes. Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere randomisiert in die Gruppen eingeteilt, um eine hohe Vergleichbarkeit der Gruppengewichte durch ähnliche Mittelwerte zu erzielen. Die Differenz zwischen den Mittelwerten der Anfangs- und Endgewichte der einzelnen Gruppen wurde errechnet und in [%]-Zunahme zum Mittelwert des Ausgangsgewichts dargestellt (CJ-463-Kurzzeit-Therapie: $+8,6 \pm 2,9\%$; CJ-463-Langzeit-Therapie: $+14,0 \pm 1,8\%$; Kontrollgruppe: $-8,9 \pm 2,7\%$). Die tumorbedingte Gewichtsabnahme in der Kontrollgruppe wurde durch die CJ-463-Therapie signifikant verhindert (Stern über den Säulen; „Kurzzeit-Therapie“: $p < 0,05$; „Langzeit-Therapie“: $p < 0,0001$). Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war statistisch signifikant (zwei Sterne über den Säulen; $p < 0,0001$). Fehlerbalken = mittlerer Standardfehler.

vention tumorbedingten Gewichtsverlustes. Durch die Therapie konnten auch weitere Krankheitssymptome ohne ein Auftreten wesentlicher Nebenwirkungen (z.B. Gerinnungsstörungen) über einen langen Behandlungszeitraum verhindert, und damit ein verbesserter Gesundheitszustand der Tiere gegenüber der Kontrolle erreicht werden. Aufgrund dieser deutlichen Hinweise auf eine mögliche überlebensverlängernde Wirkung von CJ-463 sollte der Inhibitor nun in einem Überlebensexperiment über einen langen Behandlungszeitraum im Fibrosarkommodell in der klinisch relevanteren subkutanen Applikationsart eingesetzt werden.

5.4.3 Verlängerung des Überlebens durch CJ-463 bei der experimentellen Metastasierung mit humanen Fibrosarkomzellen

Zuletzt wurde untersucht, ob es, entsprechend der zahlreichen und deutlichen Hinweise auf eine überlebensverlängernde Wirkung von CJ-463, tatsächlich in dem Fibrosarkommodell zu einer Überlebensverlängerung oder sogar Heilung der Mäuse durch Therapie mit dem Inhibitor kommen konnte. Zudem sollte geprüft werden, ob eine zweimal tägliche Behandlung über den schon gezeigten Zeitraum von 24 Tagen nebenwirkungsfreier Behandlung hinaus (siehe 5.4.1) gefahrlos möglich war und ob die CJ-463-Therapie auch noch nach diesem fortgeschrittenen experimentellen Zeitraum zu einem verbesserter Gesundheitszustand der Mäuse führen konnte. Daher wurde der Inhibitor in einer langfristigen Überlebensstudie im experimentellen Fibrosarkom-Metastasierungsmodell eingesetzt. Aufgrund der signifikant stärkeren Wirksamkeit der „Langzeit-“ gegenüber der „Kurzzeit-Therapie“ (siehe 5.4.1 und 5.4.2) wurde CJ-463 als kontinuierliche Behandlung von Tag -1 bis Tag 100 in der klinisch relevanteren subkutanen Applikationsart (kaum ein Unterschied zu intraperitonealer Behandlung, siehe 5.4.1) und nach dem gleichem Applikationsschema wie unter 5.3.4 beschrieben verabreicht. Im Anschluss daran folgte eine behandlungsfreie Nachbeobachtungszeit bis zum Versuchsende. Es zeigte sich, dass die Vehikel-behandelte Kontrollgruppe schon innerhalb von 43 Tagen verstarb, als noch alle CJ-463-behandelten Mäuse am Leben waren, und damit eine mittlere Überlebenszeit von 36 ± 2 Tagen aufwies (Abb. 5.18). Im Gegensatz dazu führte die CJ-463-Therapie zu einer signifikanten Überlebensverlängerung der Mäuse, die erst in einem Zeitraum von 420 Tagen verstarben (mittlere Überlebenszeit = 208 ± 46 Tage; Abb. 5.18) und bis wenige Tage vor ihrem Tod einen unauffälligen Gesundheitszustand aufwiesen. Die Lungen der mit CJ-463 behandelten Mäuse zeigten bis Tag 117 nur wenige vereinzelte Metastasen, die aber im Vergleich zur Kontrolle vergrößert waren (Durchmesser von 2-3 mm oder mehr). Aufgrund ihrer Lage in der Nähe der Hauptbronchien kam es zu einer Behinderung der Atmung. Nach Tag 117 konnten keine Metastasen mehr in Abdomen, Lunge/Thorax und Gehirn

in den überlebenden Mäusen der CJ-463-Behandlungsgruppe als Hinweis auf eine mögliche Heilung der Tiere gefunden werden. Bei keiner Maus aus der Behandlungsgruppe konnte ein Zusammenhang zwischen Morbidität und der jeweiligen Anzahl an Lungenmetastasen festgestellt werden.

Die sich über einen Zeitraum von 100 Tagen erstreckende Langzeit-Therapie mit CJ-463 ermöglichte zudem eine Bestimmung möglicher medikamenteninduzierter Gerinnungsstörungen *in vivo* als unspezifische Nebenwirkung der Serinproteaseinhibitor-Therapie. Jedoch konnten bei der Autopsie der behandelten Mäuse keine signifikanten anti-koagulatorischen Nebenwirkungen in Form intraperitonealer oder intradermaler Blutungen, auch nicht in der Nackenregion als Injektionsort der Behandlung, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

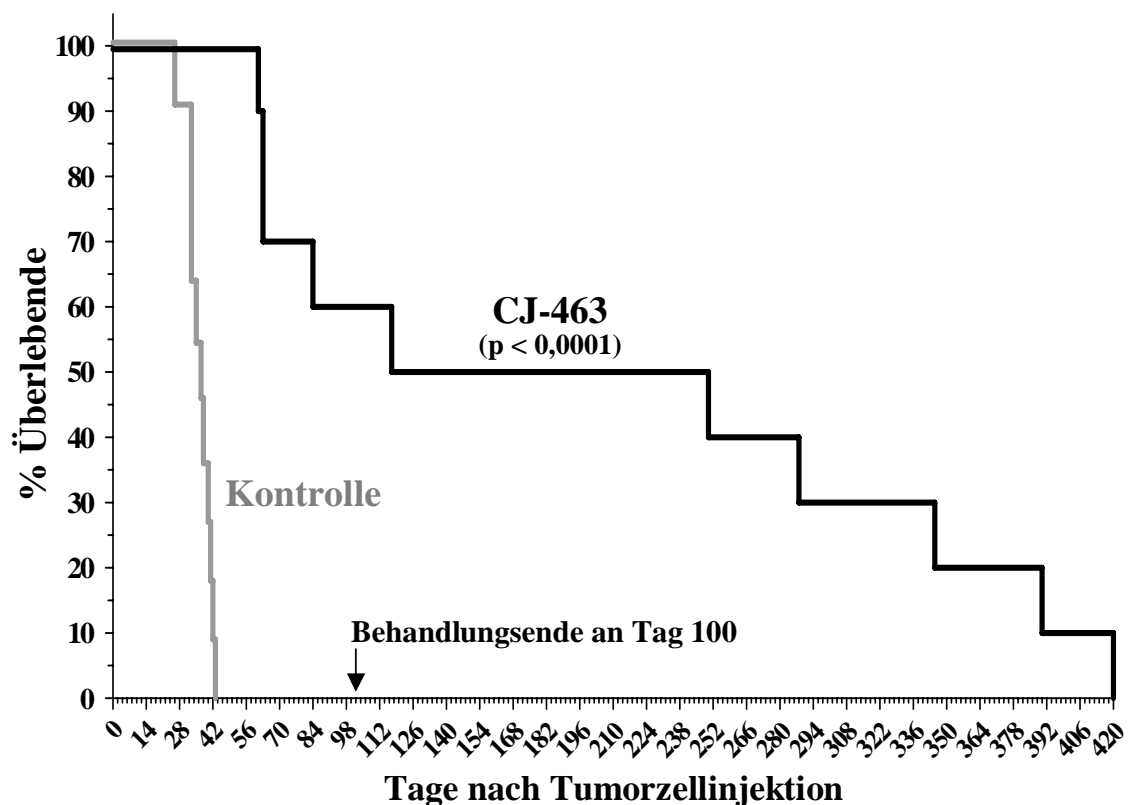


Abbildung 5.18: Therapie mit CJ-463 verlängert das Überleben im humanen Fibrosarkommodell. Dargestellt ist das Überleben der Mäuse unter CJ-463- oder Vehikelbehandlung (Kaplan-Meier-Überlebenskurven) im experimentellen Fibrosarkom-Metastasierungsexperiment über einen Versuchszeitraum von 420 Tagen nach Tumorzellinjektion. Ende der zweimal täglichen Therapie an Tag +100, danach behandlungsfreie Nachbeobachtungszeit bis zum Versuchsende. Das Überleben der Mäuse wurde durch die CJ-463-Therapie (3 mg/kg/Tag; schwarze Linie, n = 10) im Vergleich zur Kontrolle (graue Linie, n = 11) signifikant verlängert ($p < 0,0001$): Sterben der CJ-463-Therapiegruppe innerhalb von 420 Tagen ($t_{50} = 117$ Tage), Sterben der Kontrolle innerhalb von 43 Tagen ($t_{50} = 37$ Tage).

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass synthetische Serinproteasehemmstoffe (sSPIs), die selektiv gegen bestimmte metastasierungsfördernde Serinproteasen gerichtet sind, signifikant besser die Metastasierung hemmen als sSPIs mit niedrigerer Selektivität. Zum ersten Mal wurde systematisch eine Reihe eng strukturverwandter sSPIs in parallelen Behandlungsgruppen in einem aggressiven, murinen T-Zell Lymphom Lebermetastasierungsmodell eingesetzt. Das Modell erlaubte es, die anti-metastatischen Wirkungen der niedermolekularen 4-Amidinobenzylamid-Derivate, die unterschiedliche Selektivitäts- und Affinitätsprofile gegenüber an der Metastasierung beteiligter Serinproteasen aufweisen, zu vergleichen. Durch dieses *in vivo*-Screening konnte FXa oder eine dem FXa ähnliche Protease als wichtige krebstherapeutische Zielprotease in dem Modell ermittelt werden. FXa-Hemmstoffe waren signifikant wirksamer bei der Hemmung der Metastasierung als uPA-Hemmstoffe. Darüber hinaus konnte erstmalig gezeigt werden, dass die FXa-Selektivität und nicht -Affinität von sSPIs eng mit ihrer anti-metastatischen Potenz korreliert. Zudem konnten die Nebenwirkungsfreiheit solcher sSPIs *in vivo*, sowie die anti-metastatisch gleichstarke Wirkung einer subkutanen *versus* intraperitonealen sSPI-Therapie am Beispiel von CJ-504 und CJ-463 nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit konnte zuerst die außergewöhnliche Eigenschaft des niedermolekularen FXa-Hemmstoffs WX-FX4 demonstriert werden, hochselektiv gegenüber FXa und zugleich nur schwach gerinnungshemmend zu sein. Anschließend konnte gezeigt werden, dass WX-FX4 sowohl die Lebermetastasierung im T-Zell Lymphommodell als auch die Lungenmetastasierung im humanen Fibrosarkommodell signifikant hemmen sowie das Überleben tumortragender Mäuse drastisch verlängern kann, ohne dabei Nebenwirkungen hervorzurufen. Eine alleinige WX-FX4 Therapie um die Tumorzellinokulation herum erwies sich im Fibrosarkommodell als nahezu gleichwirksam wie eine Therapie über den gesamten experimentellen Zeitraum, was auf die hauptsächliche Bedeutung von FXa bei der Zirkulation und Extravasation von Tumorzellen im Metastasierungsgeschehen deutete. Dem hochselektiven uPA-Inhibitor CJ-463, einer Optimierung der 4-Amidinobenzylamid-Derivate, konnte ebenfalls eine starke anti-metastatische, überlebensverlängernde und nebenwirkungsfreie Wirkung im Fibrosarkommodell nachgewiesen werden. Mit CJ-463 ließen sich außerdem Hinweise auf eine gegenüber FXa zusätzliche Auswirkung von uPA auch auf spätere Schritte der experimentellen Metastasierung *in vivo* gewinnen. Insgesamt konnte eine direkte Verbindung zwischen der rationellen Auswahl neuartiger hochselektiver sSPIs und ihrer Effizienz, die Metastasierung *in vivo* nebenwirkungsfrei und hochwirksam zu hemmen, gezeigt werden.

6.1 FXa-Selektivität von sSPIs korreliert mit ihrer anti-metastatischen Potenz im T-Zell Lymphommodell

Die Serinprotease uPA ist an der Progression und Metastasierung vieler Krebserkrankungen beteiligt (Reuning et al., 1998; Sidenius und Blasi, 2003; Dano et al., 2005). In der Klinik dient sie, insbesondere bei Brustkrebs, als tumorbiologischer Prognosefaktor. Dabei ist sie wichtiger Bestandteil von Verlaufskontrolle, Therapieplanung und -ansprechen verschiedener krebstherapeutischer Behandlungskonzepte (Harbeck et al., 2004 a; Harbeck et al., 2004 b; Schmitt et al., 2004; Decock et al., 2005). Für die Progression lymphoider Tumorerkrankungen wurde uPA bisher jedoch nicht als klinischer Prognosefaktor eingesetzt. In Übereinstimmung damit wurden in dieser Arbeit auch nur geringe Expressionsspiegel von uPA in dem verwendeten murinen T-Zell Lymphom Lebermetastasierungsmodell gefunden, die jedoch bei stark fortgeschrittener Metastasierung einen signifikanten Anstieg zeigten. Da uPA aufgrund seiner zentralen Rolle in proteolytischen Kaskaden eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung vieler Tumore spielt (Reuning et al., 1998; Sidenius und Blasi, 2003), kann die Serinprotease im verwendeten T-Zell Lymphommodell auch mit diesen geringen Expressionsspiegeln ein bedeutsames therapeutisches Zielenzym darstellen. Die Interaktion zwischen uPA und seinem Rezeptor (uPAR) löst eine extrazelluläre Proteolysekaskade aus, die unter anderem die Aktivierung von Plasminogen und MMPs beinhaltet (Rabbani und Mazar, 2001). Dadurch kann es zu der direkten Aktivierung von MMP-9 kommen (Hahn-Dantona et al., 1999), dessen Expressionsspiegel mit der Aggressivität humaner lymphoider Tumoren und dem Überleben an diesen Tumoren erkrankter Patienten korrelieren (Kossakowska et al., 1992; Sakata et al., 2004). In dem verwendeten T-Zell Lymphom Mausmodell korreliert die Expression von MMP-9 mit der Tumorprogression (Krüger et al., 2001; Arlt et al., 2002). Zudem ist es bekannt, dass selektive MMP-9 Inhibitoren die Lebermetastasierung in diesem Tumormodell wirksam hemmen (Arlt et al., 2002). Dies zeigt auch, dass Mitglieder unterschiedlicher Proteaseklassen einen gemeinsamen Beitrag zu der Metastasierung von Tumoren leisten können (DeClerck et al., 1997; Wagener, 1999; Lijnen, 2001). Die Hemmung solcher Proteasen kann auch Auswirkungen auf Ereignisse außerhalb der Proteolysekaskade haben, zum Beispiel über eine Sequestrierung und/oder Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder anderer an der Metastasierung beteiligter Faktoren (Egeblad und Werb, 2002; Reuning et al., 2003a). Die Tatsache, dass niedermolekulare uPA-Hemmstoffe der Reihe der 4-Amidinobenzylamid-Derivate die Lebermetastasierung von Mäusen im T-Zell Lymphommodell schon in der schwachen Dosis von 1 mg/kg/Tag erfolgreich hemmen konnten, legte eine Beteiligung von uPA in diesem Modell nahe. Jedoch konnte bei keinem der eingesetzten Inhibitoren ein Zusammenhang

zwischen anti-metastatischer Wirkung und Affinität oder Selektivität für uPA gefunden werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich eine eindeutige Korrelation zwischen der FXa-Selektivität von Inhibitoren der Reihe der 4-Amidinobenzylamid-Derivate und ihrer anti-metastatischen Wirksamkeit. Zudem konnte mit allen FXa-Hemmstoffen eine stärkere Reduktion sowohl der Makro- als auch der Mikrometastasierung erzielt werden als mit den uPA-Inhibitoren. Daher musste die Bedeutung von uPA in diesem Tumormodell neu überdacht und zu Gunsten von FXa relativiert werden. Bezüglich den Serinproteasen Thrombin, Plasmin und Trypsin zeigten sowohl die Affinitäten als auch die Selektivitäten der verwendeten sSPIs keinen Zusammenhang mit der anti-metastatischen Wirkung der Hemmstoffe. Dies weist darauf hin, dass sowohl eine unselektivere als auch selektivere Inhibition dieser Enzyme ohne Bedeutung für die Reduktion der Metastasierung in diesem Modell war, was diese Serinproteasen zu Nicht-Zielproteasen machte. Insgesamt konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass FXa selbst oder ein dem FXa strukturell ähnliches Enzym signifikant an der Entstehung und Progression der Lebermetastasierung des T-Zell Lymphommodells beteiligt ist und folglich eine Zielprotease für die Krebstherapie in diesem Modell darstellt. Dieses Konzept wurde durch den erfolgreichen Einsatz des bekannten, strukturell mit den 4-Amidinobenzylamid-Derivaten unverwandten und hochselektiven FXa-Hemmstoffs DX-9065a, der in der vorliegenden Arbeit als externer Vergleichsinhibitor diente und in immer neuen klinischen Studien als Antikoagulans eingesetzt wird (Becker et al., 2004; Becker et al., 2006), weiter untermauert. Zusätzlich zu seiner zentralen Rolle in der Blutgerinnungskaskade (Stassen et al., 2004) übt FXa nicht gerinnungshemmende Aktivitäten über eine Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden aus. Dies kann Auswirkungen auf verschiedene Krankheiten einschließlich Krebs haben (Leadley et al., 2001). FXa ist auch an der Ablagerung von Fibrin beteiligt (Tanaka et al., 2005), was die Anhaftung von Tumorzellen an das Endothel von Blutgefäßen im Verlauf der Metastasierung erleichtert (Francis et al., 1998). Zudem konnte FXa in den interzellulären Räumen von Tumorzellen in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen werden (Zacharski et al., 1986; Zacharski et al., 1988). Weitere Hinweise auf die Beteiligung von FXa an der Metastasierung kamen von *in vivo*-Studien in Mausmodellen. Es konnten zum Beispiel eine Verringerung von Lungenmetastasen eines Sarkoms durch ein FXa-selektives Protein aus dem Speicheldrüsensekret eines mexikanischen Blutegels (Tuszynski et al., 1987), eine Reduktion von Lungenmetastasen eines malignen Melanoms durch ein antikoagulatorisches und für FXa hochselektives Peptid aus Hakenwürmern (Donnelly et al., 1998) sowie eine Abnahme von Lungenmetastasen eines malignen Melanoms durch einen synthetischen, niedermole-

kularen und selektiven FXa-Inhibitor nachgewiesen werden (Rossi et al., 2006). Im verwendeten T-Zell Lymphom Metastasierungsmodell konnten jedoch keine verstärkten FXa-Expressionsspiegel in den Mäuselebern trotz der im Verlauf zunehmenden Metastasierung gefunden werden. Dennoch kann FXa auch in Form der hier beobachteten, stationär bleibenden Expressionsspiegel, eine entscheidende Rolle im Metastasierungs geschehen des verwendeten T-Zell Lymphommodells spielen. Dies resultiert aus der Tatsache, dass niedrige FXa-Spiegel für die Aktivierung von Signaltransduktionswegen ausreichen, und dadurch zur Progression und Metastasierung von Tumoren führen können, (Francis et al., 1998; Leadley et al., 2001; Sampson und Kakkar, 2002). Auffällig war ein kleiner, aber signifikanter Abfall der FXa-Expression in den Lebern der Tiere an Tag 7. Da die Leber Ort der FXa-Synthese ist, wies dies, wie auch in der Klinik häufig beobachtet (Kemkes-Matthes et al., 1987; Castelino und Salem, 1997), auf eine beginnende Leberinsuffizienz der Tiere zu diesem fortgeschrittenen experimentellen Zeitpunkt als Folge der massiven sekundären Tumorzellinfiltration der Organe hin. Ob diese späte sekundäre Tumorzellinfiltration von etablierten Metastasen der Leber oder möglicherweise eines anderen Organs wie z.B. der Milz ausgeht, ist noch unklar (unveröffentlichte Daten AG Krüger). Die Tatsache, dass die Mikrometastasen auf den Mäuselebern oft in der unmittelbaren Umgebung der Makrometastasen angesiedelt waren, wie z.B. bei den mit CJ-504 behandelten Tieren gezeigt, spricht allerdings für die etablierten Lebermetastasen als Ursprung der sekundären Invasion. Dagegen spricht, dass auch schon eine massive Infiltration der Leber bei Mäusen mit einer sehr niedrigen Anzahl etablierter Lebermetastasen an Tag 7 beobachtet werden konnte (eigene unveröffentlichte Daten).

Mit Hemmstoffen der Klasse der 4-Amidinobenzylamid- und P-Naphtamidin-Derivate wurde die These aufgestellt, dass FXa ein wichtiges Zielenzym einer antiproteolytischen Therapie gegen die Metastasierung im T-Zell Lymphommodell darstellt. Diese These konnte durch den erfolgreichen Einsatz des 3-Amidinophenylalanin-basierten FXa Hemmstoffs WX-FX4 bestätigt werden. Damit konnte mit FXa-selektiven Hemmstoffen aus insgesamt drei unterschiedlichen Strukturklassen der Nachweis erbracht werden, dass FXa eine entscheidende Rolle bei der Metastasierung des verwendeten T-Zell Lymphoms spielt. Das Therapiekonzept, eine anti-metastatische Wirkung durch Hemmung von FXa zu erzielen, konnte mit WX-FX4 sogar auf ein Tumormodell mit humanen Tumorzellen erweitert werden. Dennoch kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass nicht FXa, sondern eine strukturell ähnliche Protease Zielprotease der verwendeten FXa-Hemmstoffe ist. Die Inhibition dieser Protease wäre dann, anstelle von FXa, als ursächlich für die beobachteten anti-metastatischen Effekte anzusehen. Die membranständige Serinprotease Matriptase (MT-SP1), ein Mitglied

der Familie der transmembranständigen Serinproteasen (Szabo et al., 2003), ist z.B. solch eine FXa ähnliche Protease. Sie besitzt eine ebenso enge S2-Bindungsposition wie FXa, was die Bevorzugung ähnlicher Substrate zur Folge hat (Friedrich et al., 2002). Die Serinprotease wird von Tumorzellen exprimiert (Oberst et al., 2001; Tanimoto et al., 2001) und steht in Zusammenhang mit der Progression, Metastasierung und klinischen Prognose vieler Tumoren (Ihara et al., 2002; Oberst et al., 2002; Netzel-Arnett et al., 2003; Suzuki et al., 2004; Forbs et al., 2005). In Übereinstimmung damit fand sich im T-Zell Lymphom Metastasierungsmodell ein geringer, aber dennoch signifikanter Expressionsanstieg von Matriptase-mRNA in den Lebern der Tiere an Tag 7. Dieser traf mit der drastischen Zunahme der metastatischen Organbelastung zu diesem fortgeschrittenen experimentellen Zeitpunkt zusammen. Dies konnte als Hinweis auf eine Beteiligung des Enzyms an der Metastasierung dieses Tumormodells angesehen werden. Allerdings wurden die stärksten Reduktionen sowohl der Makro- als auch der Mikrometastasierung mit den drei strukturell gänzlich unverwandten, höchst FXa-selektiven Inhibitoren CJ-504, DX-9065a und WX-FX4 erzielt. Dies macht es wahrscheinlich, dass FXa und nicht eine FXa ähnliche Protease die entscheidende Rolle bei der Metastasierung des T-Zell Lymphommodells spielt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen zum ersten Mal bei synthetischen Serinproteasehemmstoffen nach, dass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen erhöhter Hemmstoffselektivität und verbesserter anti-metastatischer Inhibitorwirkung besteht. sSPIs mit höherer Selektivität und niedrigerer Affinität gegenüber FXa konnten die Metastasierung im verwendeten T-Zell Lymphommodell stärker reduzieren als solche mit geringerer FXa-Selektivität und größerer -Affinität. Dies deutet auf die Überlegenheit der Selektivität gegenüber der Affinität von sSPIs bei der Hemmung der Metastasierung hin. Damit legen die Ergebnisse dieser Studie die Vorstellung nahe, dass es bei Serinproteasehemmstoffen, deren kinetische Bindungseigenschaften sich schon im nanomolaren Bereich befinden, eher von Vorteil ist, die Selektivität für die Zielprotease zu steigern als weiterhin ihre Affinität, um eine bestmögliche anti-metastatische Wirkungen zu erzielen. Dieses Konzept wurde ursprünglich in demselben Tumormodell mit einer Reihe von synthetischen Matrix-Metalloproteinaseinhibitoren erstellt (Arlt et al., 2002). Dabei konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Selektivität und krebstherapeutischer Wirkung von gelatinaseselektiven Hemmstoffen nachgewiesen werden (Arlt et al., 2002). Beide Studien zusammengenommen untermauern allgemeiner gesehen die Auffassung, dass die Selektivität von Proteasehemmstoffen der Affinität überlegen ist, wenn eine größtmögliche krebstherapeutische Wirkung erzielt werden soll. Die Studien können damit als wegweisende Musterbeispiele für die künftige Entwicklung von Proteasehemmstof-

fen als Krebstherapeutika angesehen werden. Obwohl hohe Affinität zweifellos eine Voraussetzung für wirkungsvolle Hemmstoffe ist, wurde die Optimierung der Hemmstoffselektivität gegenüber der Zielprotease sowie der Nachteil einer Verwendung unselektiver Inhibitoren auch in der Vergangenheit schon oft thematisiert (Zucker et al., 2000; Coussens et al., 2002; Egeblad und Werb, 2002). Eine unselektive Enzymhemmung, ausgelöst durch den Einsatz von Breitspektrum-Proteasehemmstoffen, führte zu schwerwiegenden, unerwünschten Nebenwirkungen sowie reduzierten oder sogar aufgehobenen Therapieeffekten bei Krebspatienten (Overall und Lopez-Otin, 2002; Fingleton, 2003; Overall und Kleinfeld, 2006 a). Darüber hinaus konnte sogar eine verstärkte Metastasierung durch den Einsatz eines unselektiven Proteasehemmstoffs im verwendeten T-Zell Lymphommodell nachgewiesen werden (Krüger et al., 2001).

Eine wichtige Voraussetzung für die Einführung neuartiger Substanzen als Therapeutika ist ihre gute Verträglichkeit. Die hier verwendeten selektiven FXa-Inhibitoren wurden sehr gut von den Mäusen vertragen. Die Inhibitorbehandlungen führten nur bei einem kleinen Teil der Tiere zu allenfalls geringfügigen, nicht signifikanten Blutungen. Deren Inzidenz war vergleichbar mit der bei dem klinischen Einsatz selektiver FXa-Hemmstoffe auftretenden Häufigkeit anti-koagulatorischer Nebenwirkungen (Dyke et al., 2002; Alexander et al., 2004). Es konnte auch keine gegenregulatorische Aktivierung von Mitgliedern anderer proteolytischer Systeme wie z.B. uPA, MMP-2 oder -9 durch die in dieser Arbeit eingesetzten sSPIs *in vivo* gefunden werden. Solch eine mögliche Nebenwirkung der anti-proteolytischen Therapie, ausgelöst durch die Interaktion proteolytischer Systeme (DeClerck et al., 1997), ist aus einer früheren Studie mit dem verwendeten Metastasierungsmodell bekannt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem unselektiven MMP-Inhibitor zu einer Hochregulierung von MMP-9 (Gelatinase B) und dem Wachstumsfaktor HGF schon in Abwesenheit von Tumorzellen führt und in Anwesenheit von Tumorzellen sogar die Metastasierung fördert (Krüger et al., 2001). Demgegenüber konnte selbst den weniger selektiven Inhibitoren dieser Arbeit eine anti-metastatische Wirkung nachgewiesen werden. Die Pharmakokinetik ist eine weitere wichtige Eigenschaft, auf die bei der Entwicklung und dem Einsatz von Hemmstoffen *in vivo* geachtet werden muss (Undevia et al., 2005; Workman et al., 2006). Daher musste zuletzt ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Korrelation von anti-metastatischer Wirkung und FXa-Selektivität der sSPIs auf unterschiedliche Pharmakokinetiken der Hemmstoffe zurückzuführen war. Dazu wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften der hier eingesetzten 4-Amidinobenzylamid-Derivate verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich die relativ kurzen Halbwertszeiten der Eliminationsrate der Inhibitoren nur unwesentlich voneinander unter-

schieden. Zudem konnte kein Zusammenhang zwischen der Pharmakokinetik und der anti-metastatischen Wirkung der Hemmstoffe festgestellt werden. Vielmehr waren die Hemmstoffe mit der größten Halbwertszeit der Eliminationsrate (CJ-513 und CJ-435) weniger anti-metastatisch wirksam als die selektiveren Inhibitoren mit einer zugleich kleineren Halbwertszeit der Eliminationsrate (CJ-503 und CJ-504).

6.2 Favorisierung subkutaner gegenüber intraperitonealer Applikation von sSPIs in der Krebstherapie

Wie oben dargestellt, wurde der erstmalige Nachweis einer Korrelation zwischen Selektivität und anti-metastatischer Wirkung von Proteasehemmstoffen mit einer Reihe von synthetischen Matrix-Metalloproteinaseinhibitoren erbracht (Arlt et al., 2002). Jedoch wiesen diese große strukturelle Unterschiede auf (Hydroxamattyp- vs. Barbiturattyp-Inhibitoren). Daher mussten sie, um größtmögliche Effekte zu erzielen, in unterschiedlichen Dosierungen und Applikationsarten (intraperitoneal vs. peroral) Seite an Seite im T-Zell Lymphommodell eingesetzt werden (Arlt et al., 2002). Dies ließ zwar eine erste, grundlegende Überprüfung der Hypothese einer Korrelation zwischen Selektivität und anti-metastatischer Wirkung von Proteasehemmstoffen zu („*proof of principle*“; Arlt et al., 2002), erschwerte aber aufgrund oben genannter verschiedener Variablen den kritischen Vergleich ihrer Selektivitäts-Effektivitätsprofile. In der vorliegenden Arbeit wurde diesen Kritikpunkten bei der Untersuchung einer Korrelation zwischen Selektivität und anti-metastatischer Wirkung von sSPIs Rechnung getragen. Die hier verwendeten sSPIs gehören alle zur Familie der 4-Amidinobenzylamid-Derivate und sind daher strukturell äußerst ähnlich. Dies erlaubte es, die Inhibitoren innerhalb eines Experiments in derselben Dosierung (1,5 oder 3 mg/kg/Tag) und Applikationsart (intraperitoneal) im T-Zell Lymphommodell einzusetzen. Damit ließ sich, im Vergleich zu oben genannter MMPI-Studie (Arlt et al., 2002), eine höhere Validität der nachgewiesenen Selektivitäts-Effektivitäts-Korrelation der untersuchten Inhibitoren erzielen. Die intraperitoneale Applikation von Proteasehemmstoffen und anderer Therapeutika ist jedoch, im Hinblick auf ihren klinischen Einsatz, gegenüber der im klinischen Alltag routinemäßig durchgeführten subkutanen Verabreichung von nur geringer Relevanz (Alban, 2005). Trotz intensiver Suche nach alternativen, nicht-invasiven Applikationsarten (Motlekar und Youan, 2006) werden zu injizierende Standardmedikamente wie z.B. Insulin(-analoga) oder Heparinderivate im klinischen Alltag seit Jahrzehnten fast ausschließlich subkutan verabreicht (Hermansen, 2004; Ansell und Bergqvist, 2004). Trotzdem erwies sich die intraperitoneale Therapie mit den In-

hibitoren in der vorliegenden Arbeit insgesamt als überaus effektives Behandlungskonzept zur Reduktion der experimentellen Metastasierung. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass die anti-metastatische Wirksamkeit der beispielhaft im T-Zell Lymphommodell (FXa-Inhibitor CJ-504) sowie im T-Zell- und Fibrosarkommodell (uPA-Inhibitor CJ-463) eingesetzten, hochselektiven sSPIs unabhängig von ihrer Applikationsart (intraperitoneale vs. subkutane) ist. Dies lässt auf eine vergleichbare Effektivität beider Applikationsarten bei 4-Amidinobenzylamid-Derivaten schließen. Damit können die aus dem intraperitonealen Einsatz von sSPIs gewonnenen Erkenntnisse auf die zu favorisierende (klinisch relevantere), subkutane Anwendung solcher Hemmstoffe übertragen werden, ohne eine applikationsbedingte Wirkungsabschwächung zu befürchten. Dies erlaubte es konkret in der vorliegenden Arbeit, die anti-metastatische Wirkung einer subkutanen CJ-463-Therapie gezielt zu untersuchen, ohne dabei einen dramatischen Wirkungsverlust zu erwarten und trotzdem von den oben genannten Erkenntnissen intraperitoneal eingesetzter sSPIs als Krebstherapeutika zu profitieren. Damit konnte sich, im Fall der Leitstruktur CJ-463, auf direktestem Wege in Richtung der klinischen Entwicklung von 4-Amidinobenzylamid-basierten sSPIs als Krebstherapeutika konzentriert werden.

6.3 Effiziente und nebenwirkungsfreie anti-metastatische Wirksamkeit von WX-FX4 als Hinweis auf prometastatische Wirkung von FXa unabhängig von der Gerinnungskaskade

Bei der überwiegenden Mehrheit aller bisher durchgeführten präklinischen Krebsstudien mit Hemmstoffen von Serinproteasen aus der Gerinnungskaskade wurden die Inhibitoren mit folgenden Absichten eingesetzt: Entweder sollte, ganz allgemein, die Beteiligung der Blutgerinnung bei der Entstehung, Progression und Metastasierung von Krebserkrankungen untersucht werden (Hejna et al., 1999; Bobek und Kovarik, 2004; Xie et al., 2005), oder der therapeutische Effekt der Wirkstoffe auf die tumorzellvermittelte Aktivierung der Gerinnung und deren schwerwiegende Folgen (thrombembolische Ereignisse, Wachstum und Absiedelung maligner Tumoren) bestimmt werden (Francis et al., 1998; Hillen, 2000; Francis und Amirkhosravi, 2002). Dabei muss bedacht werden, dass jegliches anti-koagulatorisches Behandlungskonzept, auch in der Krebstherapie, nachteilig das hämostatische Gleichgewicht des Zielorganismus beeinflussen kann, mit dem Resultat folgenschwerer Nebenwirkungen (Szalony et al., 2003; Alexander et al., 2005; Gerotziafas und Samama, 2005). Dies konnte am deutlichsten am Beispiel des selektiven FXa-Hemmstoffs rNAP5 (rAcAP5; Rebello et al., 1997; Spencer und

Becker, 2000) demonstriert werden. rNAP5 hemmt sowohl freien als auch im Prothrombinasekomplex gebundenen FXa in gleichem Maße (Stassens et al., 1996). Der FXa-Inhibitor wurde als Krebstherapeutikum in einem experimentellen Primärtumormodell eines Lewis-Lungenkrebses und in einem experimentellen Metastasierungsmodell eines malignen Melanoms eingesetzt. Dabei löste die Therapie mit rNAP5 in beiden Tumormodellen schwerwiegende bis tödliche Nebenwirkungen bei den Mäusen in Form massiver intraperitonealer Blutungen aus (Sterblichkeit bis zu 80% schon nach 10-tägiger Therapiedauer; Hembrough et al., 2003). Dies belegt die, trotz selektiver FXa-Inhibition, außerordentlich starke blutgerinnungshemmende Wirkung der Substanz *in vivo*. Hervorzuheben ist, dass diese potente antikoagulatorische Wirkung, verbunden mit den daraus resultierenden Nebenwirkungen, schon in einer Dosierung auftraten, die noch nicht für eine krebstherapeutische Wirkung des FXa-Inhibitors ausreichte (Hembrough et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen sind aus Studien mit weiteren antikoagulatorisch wirksamen, synthetischen FXa-Inhibitoren bekannt (Gerotziafas und Samama, 2005).

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Serinproteaseinhibitor WX-FX4 kann dagegen als Vorreiter einer ganz neuen Art von selektiven FXa-Hemmstoffen angesehen werden. Er übt, wie hier mehrfach und über z.T. äußerst lange Behandlungszeiträume experimentell gezeigt, nur eine schwache gerinnungshemmende Wirkung aus. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass WX-FX4, im Gegensatz zu z.B. rNAP5, hauptsächlich auf freien FXa wirkt, während er deutlich weniger Einfluss auf die gerinnungsaktivere Form des Enzyms hat, nämlich FXa gebunden im Prothrombinasekomplex (Faktor Xa, Va, Kalzium und Phospholipide). Komplexegebundener FXa ist 300.000-mal wirkungsvoller bei der proteolytischen Spaltung von Prothrombin zu Thrombin als in seiner freien Form (Mann et al., 1990). Ein FXa-Hemmstoff, der als Antikoagulans eingesetzt wird, sollte dagegen den Prothrombinasekomplex auf der Oberfläche aktivierter Blutplättchen in ausreichendem Maße hemmen (Mann et al., 1990; Rezaie, 2003; Sinha et al., 2003). Folglich ist die Aktivitätsbestimmung des Prothrombinasekomplexes, wie hier bei WX-FX4 und DX-9065a durchgeführt, von größerer Voraussagekraft für die gerinnungshemmende Wirkung von FXa-Hemmstoffen *in vivo* als die alleinige Bestimmung ihrer K_i -Werte gegenüber FXa (Sinha et al., 2003). WX-FX4 zeigte eine deutlich geringere Hemmung der Prothrombinasekomplexaktivität als der bekannteste und in der Klinik schon als gängiges Antikoagulans eingesetzte FXa-Hemmstoff DX-9065a. Dies stimmt damit überein, dass WX-FX4 bei dem Einsatz *in vivo* keine Störungen der Blutgerinnung als unerwünschte Nebenwirkung hervorrief. Ein Ausbleiben anti-koagulatorischer Nebenwirkungen ließ sich schon aufgrund der allenfalls schwachen Veränderungen der Ge-

rinnungswerte *in vitro* und *in vivo* vermuten, konnte aber letztendlich erst durch das Fehlen von Blutergüssen oder Blutungen bei den mit WX-FX4 behandelten Mäusen bestätigt werden. Von DX-9065a dagegen ist bekannt, dass er sowohl freien als auch im Prothrombinasekomplex gebundenen FXa mit vergleichbarer Affinität hemmt (Rezaie, 2003). Das anti-koagulatorische Potential von DX-9065a, welches in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegt werden konnte, spiegelt sich auch in der Zulassung und erfolgreichen Verwendung des Inhibitors zur Verhinderung von thrombembolischen Ereignissen im Menschen wieder (Kaiser, 2003; Ieko et al., 2004; Becker et al., 2006).

Trotz dieser schwachen gerinnungshemmenden Wirkung zeigte sich der hochselektive FXa-Inhibitor WX-FX4 als überaus effektives Antimetastatikum in zwei verschiedenen experimentellen Metastasierungsmodellen (über 90%ige Reduktion der Metastasierung). Seine antimetastatische Wirkung übertraf sogar die des antikoagulatorisch wesentlich leistungsfähigeren FX-Hemmstoffs DX-9065a (um über 20%) im selben Tumormodell. Diese Ergebnisse werden von denjenigen anderer Studien untermauert, in denen auch gezeigt werden konnte, dass anti-koagulatorisch kaum oder gar nicht effektive FXa-Inhibitoren und Inhibitoren weiterer Mitglieder der Gerinnungskaskade dennoch wirkungsvolle antimetastatische Krebstherapeutika sein können: Der selektive FXa-Inhibitor MCM09 z.B. besitzt bei deutlich niedrigerer antikoagulatorischer Aktivität wie Heparin eine gleichstarke antimetastatische Wirkung (Rossi et al., 2006). Dem „*tick anticoagulant peptide*“, einem selektiven FXa-Inhibitor, konnte kürzlich eine Reduktion von Melanom-Metastasen unabhängig von einem Einfluss auf die Fibrinbildung nachgewiesen werden (Bruggemann et al., 2005). Die anti-metastatische Wirkung synthetischer Sulfaminoheparosan-Sulfate z.B. scheint unabhängig von dem Vorhandensein ihrer AT-III-Bindungsstelle zu sein, welche für die gerinnungshemmende Eigenschaft der Substanzen verantwortlich ist (Poggi et al., 2002). Mit einer Serie antikoagulatorisch nicht aktiver, niedermolekularer Heparinderivate z.B. konnte eine signifikante Reduktion von Lungenmetastasen in Mäusen erreicht werden (Kragh et al., 2005). Damit weisen die *in-vivo*-Ergebnisse mit WX-FX4, zusammengenommen mit denjenigen oben genannter anderer Studien, auf eine prometastatische Wirkung von FXa unabhängig von seiner blutgerinnungshemmenden Rolle in der Gerinnungskaskade hin. Die Tatsache, dass FXa über verschiedene Signaltransduktionswege außerhalb der Gerinnungskaskade zu einer Vermehrung und Abwanderung von Tumorzellen führen kann (Sampson und Kakkar, 2002; Jiang et al., 2004; Morris et al., 2006), unterstreicht dies zusätzlich. Eine fördernde Wirkung von FXa auf die Genese verschiedenster Erkrankungen einschließlich Krebs, unabhängig von seiner Funktion in der Blutgerinnung, wird schon länger vermutet (Leadley et al., 2001).

Um der Wirkungsweise von WX-FX4 und damit der prometastatischen Funktion von FXa außerhalb der Gerinnungskaskade in einem ersten Schritt nachzugehen, muss die Auswirkung von WX-FX4 auf ein von FXa ausgelöstes und über den PAR-2 Rezeptor vermitteltes intrazelluläres Kalzium-Signal (McLean et al., 2001) in den verwendeten HT1080 Fibrosarkomzellen betrachtet werden. Von dem PAR-2 Rezeptor ist eine Aktivierung durch freien FXa und eine darauf folgende Auslösung intrazellulärer Signalwege, z.B. über die „mitogen activated protein kinases“ (MAP Kinasen) der „extracellular-signal-regulated kinase“ (ERK)-Familie bekannt (Bono et al., 2000; Gabazza et al., 2004; Feistritz et al., 2005; Tanaka et al., 2005). Über solche und andere gerinnungsunabhängigen intrazellulären Signalwege kann FXa, wie in der Einleitung ausführlich geschildert, die Entwicklung, Progression und Metastasierung maligner Tumoren fördern (Adida et al., 1996; Leadley et al., 2001; Sampson und Kakkar, 2002; Jiang et al., 2004; Morris et al., 2006). Allerdings führt die Zugabe von FXa zu den HT1080 Zellen bereits in Abwesenheit von WX-FX4 zu keiner Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Signals (unveröffentlichte Daten A. Amirkhosravi). Dies deutet darauf hin, dass bei den in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen kein durch FXa aktivierbarer Signalweg über den PAR-2 Rezeptor *in vitro* vorhanden ist. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die beobachtete anti-metastatische Wirkung von WX-FX4 *in vivo* auf einer Hemmung einer FXa-vermittelten Aktivierung des PAR-2 Rezeptors auf Tumorzellseite beruht. Eine mögliche tumorzellassoziierte Induktion der PAR-2 Expression *in vivo* sowie eine metastasierungsfördernde Rolle von PAR-2 auf Wirtszellseite können jedoch zum derzeitigen Kenntnisstand nicht ausgeschlossen werden. Weiterführende Untersuchungen müssen dies klären.

Für die Hypothesierung einer prometastatischen Rolle von FXa außerhalb der Gerinnungskaskade musste auch weitestgehend ausgeschlossen werden, dass die anti-metastatische Wirkung von WX-FX4 auf völlig anderen, nicht oben genannten Wirkstoffeigenschaften beruht. Auch eine nur schwach antikoagulatorisch wirksame Substanz kann durch einen im Ausgleich langen Verbleib in der Blutzirkulation zu einer relevanten Gerinnungshemmung führen (siehe auch 6.1). Der Vergleich der Halbwertszeiten der Eliminationsrate der Inhibitoren zeigt jedoch, dass diejenige von WX-FX4 wesentlich kürzer ist als die von DX-9065a, und sich im selben niedrigen Bereich wie die der hier verwendeten 4-Amidinobenzylamid-basierten Derivaten befindet. Dies schließt eine relevante anti-koagulatorische Wirkung von WX-FX4 als Ursache für die anti-metastatische Wirkung des Inhibitors aus. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass eine Blutplättchenaktivierung am Ort der Einnistung der Tumorzellen im Gefäßsystem die Metastasierung fördern kann (Camerer et al., 2004; Palumbo et al., 2005). Dementsprechend führt eine therapeutische Hemmung der Plättchenaktivierung in Metastasie-

rungsmodellen, die eine intravenöse Verabreichung von Tumorzellen beinhalten, zu einer verminderten Metastasierung (Amirkhosravi et al., 2003; Mousa, 2005). Jedoch ist es höchst unwahrscheinlich, dass die anti-metastatische Wirkung von WX-FX4 auf eine direkten Hemmung der Plättchenaktivierung und -aggregation zurückzuführen ist, da keine direkte inhibitorische Wirkung von WX-FX4 auf die Plättchenaggregation *in vitro* festgestellt werden konnte. Zuletzt kann auch weitestgehend ausgeschlossen werden, dass ein zytotoxischer Einfluss von WX-FX4 als ursächlich für dessen beobachtete anti-metastatischen Effekte angesehen werden kann. Hemmstoffkonzentrationen über 300µM hinaus, die bei normalen Endothelzellen beginnende zytotoxische Effekte auslösten, wurden in der vorliegenden Arbeit weder *in vitro* verwendet, noch den Tieren bei der Behandlung *in vivo* verabreicht.

Zusammengefasst wird mit WX-FX4 der Nutzen eines hochselektiven, synthetischen Serinproteasehemmstoffs demonstriert, der zwei ganz entscheidende Merkmale aufweist: Auf der einen Seite ist er hochselektiv gegenüber der Zielprotease FXa, auf der anderen Seite nur ein schwaches Antikoagulans. Dies ermöglicht es, seinen inhibitorischen Einfluss auf FXa von Nebenwirkungen auf die Blutgerinnung abzukoppeln, und eine prometastatische Funktion von FXa außerhalb der Gerinnungskaskade aufzudecken. Wie hier am Beispiel von WX-FX4 gezeigt, kann eine zielgerichtete Entwicklung synthetischer Serinproteasehemmstoffe auf der Basis einer Auftrennung von Hemmstoffeigenschaften von großem Vorteil für die zukünftige Auswahl vielversprechender Krebstherapeutika sein.

6.4 Optimales anti-metastatisches Therapiezeitfenster eines FXa-Inhibitors am Beispiel von WX-FX4 und zeitliche Relevanz von FXa im Verlauf der Metastasierung

Mit dem sich über einen relativ großen Zeitraum erstreckenden Fibrosarkom-Metastasierungsmodell (Dauer mehr als 21 Tage) und dem hochselektiven FXa-Inhibitor WX-FX4 (höhere Selektivität gegenüber FXa als CJ-504 und DX-9065a im Verhältnis zu uPA als Nicht-Zielprotease) konnte der Frage nach dem ungefähren zeitlichen Wirkungsfenster einer FXa-Hemmung auf die experimentelle Metastasierung nachgegangen werden. Dabei zeigte sich, dass eine Kurzzeitbehandlung der Tiere mit WX-FX4 in diesem Modell schon ausreicht, um die entscheidende anti-metastatische Wirkung einer anti-FXa Therapie zu erzielen. Diese Behandlungsform erstreckt sich von einem Tag vor bis einen Tag nach der Tumorzellinokulation (TZI), beinhaltet eine Wirkstoffapplikation um den Zeitpunkt der TZI herum und damit eine Wirkstoffpräsenz im Gefäßsystem während der Inokulation der Tumorzellen. Mit einer länger andauernden Behandlung über den Tag nach der TZI hinaus bis zu dem Ende

des Experimentes als maximal mögliche Therapiedauer („Langzeit-Therapie“) lässt sich keine signifikant additive anti-metastatische Wirkung erzielen. Auch eine weitere Verbesserung des Gesundheitszustandes kann nicht erreicht werden. Dieses Ergebnis einer fast ausschließlichen Wirkung der anti-FXa-Therapie um den Zeitpunkt der TZI herum steht in Einklang mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. Dort wurden antikoagulatorische Substanzen als Therapeutika gegen die Metastasierung eingesetzt und vergleichbare Ergebnisse erzielt (Amirkhosravi et al., 2003; Hembrough et al., 2003; Berezky et al., 2005). In einigen Studien kam es sogar zu einer deutlich reduzierten oder vollständig aufgehobenen anti-metastatischen Wirkung, wenn die Behandlung mit unselektiven Antikoagulantien erst verzögert begonnen wurde (im Zeitraum von mehreren Stunden nach TZI; McCulloch und George, 1987; Amirkhosravi und Francis, 1995). Auch die verzögerte Gabe (60 min nach TZI) eines selektiven, niedermolekularen FXa-Hemmstoffs führte zu einer fast vollständigen Aufhebung seiner anti-metastatischen Wirkung (Rossi et al., 2006).

Sowohl bei der „Kurzzeit-“ als auch „Langzeit-Therapie“ spielt die Vorbehandlung der Tiere, wie in jedem gezeigten *in vivo*-Experiment der vorliegenden Arbeit durchgeführt, eine wichtige Rolle als bedeutendes therapeutisches Element. Diese soll, in Form einer Wirkstoffapplikation einen Tag sowie kurz vor der TZI, die Präsenz des jeweiligen Inhibitors zum Zeitpunkt der TZI gewährleisten. Solch eine anti-metastatische Vorbehandlung ist keine künstlich hervorgerufene experimentelle Therapiesituation, sondern könnte, wie schon von Hejna et al. vorgeschlagen (Hejna et al., 1999), auch im klinischen Alltag von größtem Nutzen sein. Zum Beispiel kann es bei vollständigem chirurgischen Entfernen oder operativer Größenreduktion eines Tumors zu einer Verschleppung einzelner Tumorzellen kommen, die auch bei größter operativer Umsicht und subtilster Technik (z.B. „*no touch isolation technique*“; Atkin et al., 2005) nie ganz auszuschließen ist. Dadurch entstehende Lokalrezidive oder Fernmetastasen stellen eine gefürchtete operative „Nebenwirkung“ dar und führen zu einer erheblichen Prognoseverschlechterung für den Patienten (Atkin et al., 2005; Hirota et al., 2005). Dieses Risiko könnte, wie schon experimentell gezeigt (Hejna et al., 1999), durch eine routinemäßige, präoperative anti-metastatische Vorbehandlung deutlich verringert werden.

Wie oben ausführlich geschildert, reicht eine Kurzzeitbehandlung der Tiere mit WX-FX4 in dem Fibrosarkommodell schon aus, um die maximale anti-metastatische Wirkung des hochselektiven FXa-Inhibitors zu erzielen. Aus Untersuchungen mit intravitaler Videomikroskopie ist bekannt, dass der Prozess der Extravasation von Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem bei der experimentellen Metastasierung innerhalb weniger Stunden nach intravenöser TZI beginnt und nach 24 h (also gegen Ende der „Kurzzeittherapie“) zu über 90% abgeschlossen ist (Koop

et al., 1996; Naumov et al., 1999; Im et al., 2004). Dies bedeutet, dass der therapeutische Effekt der anti-FXa-Therapie mit WX-FX4 hauptsächlich auf die Hemmung früher experimenteller Metastasierungsschritte wie Zirkulation und Überleben in sowie Extravasation von Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem zurückzuführen ist. Diese Prozesse werden optimal in experimentellen Metastasierungsmodellen wie dem hier verwendeten Fibrosarkommodell, bei dem die Metastasierung durch die intravenöse TZI in der Blutzirkulation beginnt, nachgeahmt (Francis und Amirkhosravi, 2002). Damit weisen oben genannte Ergebnisse dieser und anderer Studien zusammengenommen auf eine maßgebliche Rolle der Serinprotease FXa bei entscheidenden Schritten der Metastasierung wie Zirkulation und Überleben in sowie Extravasation von Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem hin. Dies wurde auch schon früher von anderen Arbeitsgruppen angedeutet (Francis und Amirkhosravi, 2002; Sampson und Kakkar, 2002).

Zum jetzigen Zeitpunkt kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass FXa nicht auch eine Rolle bei späteren Metastasierungsschritten (wie z.B. der Proliferation; Nakata et al., 1998), die der Extravasation der Tumorzellen folgen, spielen kann. Dies lässt sich aus verschiedenen Beobachtungen, die im Rahmen dieser Arbeit gemacht wurden, schlussfolgern: Erstens wiesen länger mit WX-FX4 behandelte Tiere („Langzeittherapie“) im Fibrosarkommodell einen größeren Anteil geringer belasteter Lungen auf als Tiere der „Kurzzeitbehandlungsgruppe“. Zweitens besaßen WX-FX4 behandelte Tiere in der Überlebensstudie ab einem weit fortgeschrittenen experimentellen Zeitraum (> 70 Tage) nur noch vereinzelte Lungenmetastasen. Allerdings waren diese deutlich vergrößert im Vergleich zu Metastasen von Tieren, die nach einem kürzeren experimentellen Zeitraum geopfert worden waren. Ob dies nur eine gewisse Proliferation über den Versuchszeitraum widerspiegelt, oder als Hinweis auf eine von der Therapie unbeeinträchtigte Tumorpheriferation zu werten ist, lässt sich zum derzeitigen Kenntnisstand nicht beurteilen. Drittens lässt sich bei Mäusen im T-Zell Lymphommodell, die über den vollen experimentellen Zeitraum mit einer anti-FXa-Therapie behandelt werden, eine Reduzierung der sekundären Mikrometastasierung im Vergleich zu nur um den Zeitpunkt der Tumorzellinokulation herum behandelte Tiere feststellen (eigene bisher unveröffentlichte Daten). Damit kann, nach dem derzeitigen Kenntnisstand, von einem geringfügigen Vorteil einer längeren Therapiedauer mit einem FXa-Inhibitor ausgegangen werden. Dies kann als Hinweis auf eine gewisse Rolle von FXa auch bei späten Schritten der experimentellen Metastasierung, wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen angedeutet (Nakata et al., 1998; Sampson und Kakkar, 2003; Loynes und Zacharski, 2003), angesehen werden.

6.5 Optimales anti-metastatisches Therapiezeitfenster eines uPA-Inhibitors am Beispiel von CJ-463 und zeitliche Bedeutung von uPA während der Metastasierung

Mit dem sich über einen großen Zeitraum von mehr als 21 Tagen erstreckenden Fibrosarkom-Metastasierungsmodell (Schweinitz et al., 2004; Kopitz et al., 2005) und dem hochselektiven uPA-Inhibitor CJ-463 konnte auch der Frage nach dem ungefähren zeitlichen Wirkungsfenster einer uPA-Hemmung auf die experimentelle Metastasierung nachgegangen werden. Die Leitstruktur CJ-463 erschien als idealer Kandidat für die Untersuchung dieser Fragestellung, da ihre uPA-Selektivität die der in dieser Arbeit verwendeten 4-Amidinobenzylamid-Derivate, bei zugleich langsamerer Eliminationsrate, deutlich übertrifft (Schweinitz et al., 2004). Es zeigte sich, dass eine Kurzzeitbehandlung der Tiere (siehe 6.4) mit CJ-463, im Gegensatz zu oben beschriebener anti-FXa Therapie (siehe 6.4), noch nicht für die maximale anti-metastatische Wirkung des Inhibitors ausreicht. Vielmehr bedarf es einer „Langzeit-Behandlung“ mit CJ-463, basierend auf einem größtmöglichen therapeutischen Zeitfenster (d.h. über den gesamten experimentellen Zeitraum; siehe 6.4), um die volle, bemerkenswert hohe anti-metastatische und gesundheitsverbessernde Wirkung einer anti-uPA-Therapie auszuschöpfen. Diese übertrifft sogar, bei guter Verträglichkeit und völligem Ausbleiben entscheidender unerwünschter Nebenwirkungen, die Wirkung einer anti-FXa-Therapie (siehe oben). Dass eine „Langzeit-anti-uPA-Therapie“, wie hier am Beispiel von CJ-463 gezeigt, einer „Kurzzeit-Therapie“ und generell einer anti-FXa-Therapie in diesem Zusammenhang überlegen ist, ergibt sich auch anhand weiterer Beobachtungen: Zum einen führt eine „anti-uPA-Langzeittherapie“ zu einer ausnahmslos niedrigen metastatischen Organbelastung der Tiere (weniger als 50 Metastasen/Lunge) als wichtiger Hinweis auf einen deutlichen Überlebensvorteil. Zum anderen kann sogar durch eine solche Behandlungsstrategie das Auftreten von Lungenmetastasen vollständig verhindert werden, wie am Beispiel eines Tieres der CJ-463 Langzeit-Behandlungsgruppe gezeigt. Dies kann als Hinweis auf eine mögliche Heilung angesehen werden. Auch die Tatsache, dass bei der Hälfte der langzeitbehandelten CJ-463 Tiere des Überlebensexperimentes überhaupt keine Metastasen nachgewiesen werden konnten, was ihren signifikanten Überlebensvorteil letztendlich erklärt, weist auf die überragende Wirksamkeit und die unbedingte Notwendigkeit einer sich über den gesamten experimentellen Zeitraum erstreckenden anti-uPA-Therapie in diesem Modell hin. Aus den gleichen Gründen wie bei einer anti-FXa-Therapie (siehe 6.4) wird auch bei einer anti-uPA-Therapie der Vorteil einer Vorbehandlung der Tiere zur Hemmung der Metastasierung propagiert (Hejna et al., 1999). Die genannten Ergebnisse und Schlussfolgerungen stehen in Einklang mit Berichten anderer Arbeitsgruppen über den Einsatz von uPA-Inhibitoren als anti-metastatische The-

rapeutika, und werden durch diese zusätzlich ergänzt (Schmitt et al., 2000; Muehlenweg et al., 2001; Reuning et al., 2003b; Setyono-Han et al., 2005).

Wie am Beispiel von CJ-463 gezeigt, lässt sich mit einer „Kurzzeit-anti-uPA-Behandlung“ im Fibrosarkommodell schon eine signifikante, einer „Kurzzeit-“ und sogar „Langzeit-anti-FXA-Therapie“ in etwa ebenbürtige anti-metastatische Wirkung erzielen. Wie unter 6.4 beschrieben, umfasst eine solche „Kurzzeit-Therapie“ nahezu vollständig den Zeitraum früher experimenteller Metastasierungsschritte wie Zirkulation, Überleben und Festsetzen in sowie Extravasation von Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem (Koop et al., 1996; Naumov et al., 1999; Im et al., 2004; Heyder et al., 2006). Damit kann auf eine relevante metastasierungsfördernde Wirkung von uPA schon bei frühen Schritten der experimentellen Metastasierung, wie schon von anderen vorgeschlagen (Reuning et al., 1998; Reuning et al., 2006), geschlossen werden. Eine „Langzeit-anti-uPA-Therapie“, wie mit CJ-463 beispielhaft gezeigt, führt zu einer zusätzlichen signifikanten anti-metastatischen Wirkung und zu einer dramatischen Überlebensverlängerung. Dies weist, in Übereinstimmung mit anderen Studien (Reuning et al., 1998; Reuning et al., 2003b; Sidenius und Blasi, 2003; Reuning et al., 2006), auf eine ebenso bedeutende Rolle von uPA auch bei späteren Schritten der experimentellen Metastasierung hin. Diese sind hauptsächlich im Zeitraum zwischen dem Ende der „Kurzzeit-Therapie“ (Tag 1) und der Beendigung des Experiments an Tag 21 angesiedelt (siehe 2.1.1 und 6.4). Sie umfassen die Proliferation, Invasion und den Abbau der extrazellulären Matrix der Tumorzellen sowie die Tumorangio-genese, die bei Überschreiten einer bestimmten Größe der Metastasen erforderlich ist (Folkman, 1986; Günthert; 1997; MacDonald et al., 2002; Bogenrieder et al., 2003; Fidler, 2003; Kopfstein und Christofori, 2006). Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass uPA sowohl bei den frühen als auch bei den späten Schritten der experimentellen Metastasierung im Fibrosarkommodell eine bedeutende Rolle zu spielen scheint. Darauf weist auch die Tatsache hin, dass die HT1080-Zelllinie große Mengen von uPA sezerniert und eine Zunahme der Zahl an Metastasen in diesem Modell eng mit einer Erhöhung der uPA-Expressionsspiegel im Lungengewebe korreliert (Arlt, 2004; Schweinitz et al., 2005). Zudem zeigen die HT1080 Zellen eine signifikante Expression von uPAR (Schweinitz et al., 2005). Kritisch betrachtet präsentierten sich die wenigen Metastasen, die bei den CJ-463-behandelten Tieren des Überlebens-experiments auftraten, im Vergleich zur Kontrolle sichtbar vergrößert (ausgewachsen). Dies kann einerseits als Hinweis auf eine nicht bestmöglich durchgeführte und damit noch verbesserungswürdige anti-uPA-Therapie gewertet werden. Andererseits kann daraus auch auf eine möglicherweise nur schwache oder erst gar nicht vorhandene proliferati-

onsfördernde Wirkung von uPA in diesem Modell geschlossen werden, wie es auch schon in einem anderen Tumormodell angedeutet wurde (Merchan et al., 2006).

6.6 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte in einem ersten Schritt gezeigt werden, dass die Serinprotease FXa eine wichtige Rolle im Metastasierungsgeschehen des murinen T-Zell Lymphom- und humanen Fibrosarkommodells spielt. In Übereinstimmung damit führte eine Optimierung der Selektivität synthetischer Serinproteaseinhibitoren gegenüber FXa zu gesteigerten therapeutischen Effekten auf die Metastasierung. Allerdings kann, trotz der Verwendung strukturell völlig verschiedener, höchst FXa-selektiver Inhibitoren, zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass eine FXa strukturell ähnliche Protease das Zielenzym der verwendeten Hemmstoffe ist. Um daher die Bedeutung von FXa im Metastasierungsgeschehen *in vivo* zu validieren, sollen in Zukunft FX-*knock-out*- und FX-überexprimierende Mäuse generiert werden. Da FXa eine äußerst zentrale und damit für die normale Physiologie lebenswichtigen Rolle in der Blutgerinnung spielt, muss dabei jedoch bedacht werden, dass eine willkürliche Modulation der FXa-Expression im Wirt schwere Nebenwirkungen hervorrufen kann. Daher soll zukünftig auch die Bedeutung einzelner Signalkaskaden, über die FXa gerinnungsunabhängig die Entwicklung und Progression maligner Tumoren fördern kann, genauer *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. In diesem Zusammenhang sind aktuell insbesondere die Protease-aktivierten Rezeptoren- (*protease activated receptors*, PAR)-1 und -2 von Interesse, die als „*downstream-targets*“ von FXa fungieren. Da es sich bei PAR-1 und -2 um membranständige Rezeptoren handelt, soll deren Bedeutung in Zukunft sowohl auf Tumorzell- als auch auf Wirt-Seite untersucht werden.

Die *in vivo*-Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten deuten darauf hin, dass FXa nicht nur bei frühen, sondern möglicherweise auch bei späten Schritten der experimentellen Metastasierung eine gewisse Rolle spielt. Um dies näher zu beleuchten, soll zukünftig zuerst in *in vitro*-Experimenten die Auswirkung von FXa allein oder in Kombination mit selektiven FXa-Inhibitoren wie z.B. WX-FX4 auf Proliferation, Invasion und Migration von Tumorzellen untersucht werden. Anschließend soll *in vivo* in spontanen Metastasierungsmodellen der Einfluss selektiver FXa-Inhibitoren auf Wachstum und Metastasierung von Primärtumoren evaluiert werden.

Von der Serinprotease uPA wird schon länger eine Beteiligung an späten experimentellen Metastasierungsschritten vermutet. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen dies allerdings, zu-

mindest bei den verwendeten Metastasierungsmodellen, kritisch in Frage. Um dies zu klären, müssen in Zukunft, genau wie oben für FXa geschildert, auch die Auswirkung von uPA allein und in Kombination mit selektiven uPA-Inhibitoren wie z.B. CJ-463 auf Proliferation, Invasion und Migration von Tumorzellen *in vitro* bestimmt, sowie selektive uPA-Inhibitoren *in vivo* in spontanen Metastasierungsmodellen eingesetzt werden.

Die gezeigte Anwendung anti-metastatisch wirksamer Serinproteaseinhibitoren in Form einer „Kurzzeit-“ oder „Langzeittherapie“ ist als erster Schritt im Rahmen eines „*proof of principle*“ zu sehen. Zukünftig sollen selektive Inhibitoren auch in späten therapeutischen Zeitfenstern (alleinige Therapie wenige Tage vor Beendigung eines Experiments) *in vivo* eingesetzt werden, um die Bedeutung von FXa und uPA zu fortgeschrittenen experimentellen Metastasierungszeitpunkten näher zu untersuchen. Die Wirksamkeit einer solchen adjuvanten, „späten“ Inhibitortherapie, an dem eine Metastasierung zwar schon zu diagnostizieren ist, aber aufgrund ihrer geringen Einzeltumorgröße noch keine klinischen Symptome oder gar sekundäre Tumorzellinvasion hervorruft, wäre von größter klinischer Relevanz.

Mit einer 50%-igen Reduktion der Hemmstoffkonzentration konnte immer noch eine signifikante anti-metastatische Wirkung von CJ-463 erzielt werden (Schweinitz et al., 2004). Allerdings bedarf es in der Zukunft weiterer Untersuchungen, um statistisch signifikante Dosis-Wirkungsbeziehungen, die im Hinblick auf die klinische Einführung synthetischer Serinproteaseinhibitoren unerlässlich sind, über eine größere Spannbreite an Hemmstoffkonzentrationen zu erstellen. Des Weiteren soll zukünftig in zielgerichteten *in vivo*-Experimenten die Eliminationskinetik der Inhibitoren weiter bestimmt werden. Auch eine mögliche Akkumulation der Wirkstoffe in dem jeweiligen Zielorgan der Metastasierung, die aufgrund der Hydrophobizität und verstärkten hepatobiliärer Ausscheidung einiger Inhibitoren durchaus denkbar wäre (Schweinitz et al., 2004), muss in Zukunft evaluiert werden. Dies soll insgesamt eine bessere Charakterisierung des Wirkungs- und Nebenwirkungsprofils der Serinproteaseinhibitoren im Hinblick auf deren klinische Entwicklung ermöglichen.

Zum derzeitigen Kenntnisstand ist noch nicht vollständig geklärt, ob der sprunghafte massive Infiltrationsanstieg der Leber mit Mikrometastasen an Tag 6 im T-Zell Lymphommodell („sekundäre Invasion“) von etablierten Metastasen der Leber (lokale Gewebsinvasion) oder eines weiteren Organs wie z.B. der Milz (erneute Intravasations-/ Extravasationsvorgänge) ausgeht. Die Klärung dessen wäre wichtig, da eine unterschiedliche Interpretation der Ergebnisse mit Proteaseinhibitoren die Folge wäre. Um dies zu untersuchen, sollen zukünftig wenige Tage nach TZI die Milzarterien/-venen der Tiere ligiert werden, um eine potentielle metastatische Streuung dieses Organs zu verhindern.

Es ist auch noch nicht vollständig geklärt, ob bei anti-proteolytisch behandelten Tieren, bei denen sich trotz Inokulation von Tumorzellen keine Metastasen finden lassen, eine Heilung durch die selektive Serinproteaseinhibitortherapie eingetreten ist. Es könnten auch Metastasen an makroskopisch nur schwer zu diagnostizierenden Orten entstanden sein, die zum Tode der Tiere beitragen. Daher soll in Zukunft auch eine Detektion solcher metastatischen Herde durch Erfassung ihrer meist erhöhten Stoffwechselaktivität mittels positronenemissionstomographischer Analyse ermöglicht werden.

Abschließend soll es sich in Metastasierungsmodellen von größerer klinischer Relevanz zukünftig zeigen, ob das anti-metastatische Therapiekonzept mit hochselektiven synthetischen FXa- und uPA-Inhibitoren auch dort über einen langen Zeitraum ohne Auftreten von Nebenwirkungen durchführbar ist und neben eindeutigen Behandlungserfolgen zu einer signifikanten Überlebensverlängerung führt.

7 Literaturverzeichnis

- Acuff, H.B., Carter, K.J., Fingleton, B., Gorden, D.L. und Matrisian, L.M. (2006).** Matrix metalloproteinase-9 from bone marrow-derived cells contributes to survival but not growth of tumor cells in the lung microenvironment. *Cancer Res.*, **66**: 259-266.
- Adida, C., Ambrosini, G., Plescia, J., Crotty, P.L., Costa, J. und Altieri, D.C. (1996).** Protease receptors in Hodgkin's disease: expression of the factor Xa receptor, effector cell protease receptor-1, in Reed-Sternberg cells. *Blood*, **88**: 1457-1464.
- Alban, S. (2005).** From heparins to factor Xa inhibitors and beyond. *Eur. J. Clin. Invest.*, **35**: 12-20.
- Alexander, J.H., Yang, H., Becker, R.C., Kodama, K., Goodman, S., Dyke, C.K., Kleinman, N.S., Hochman, J.S., Berger, P.B., Cohen, E.A., Lincoff, A.M., Burton, J.R., Bovill, E.G., Kawai, C., Armstrong, P.W. und Harrington, R.A. (2005).** First experience with direct, selective factor Xa inhibition in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: results of the XaNADU-ACS Trial. *J. Thromb. Haemost.*, **3**: 439-447.
- Alexander, J.H., Dyke, C.K., Yang, H., Becker, R.C., Hasselblad, V., Zillman, L.A., Kleinman, N.S., Hochman, J.S., Berger, P.B., Cohen, E.A., Lincoff, A.M., Saint-Jacques, H., Chetcuti, S., Burton, J.R., Buegler, J.M., Spence, F.P., Shimoto, Y., Robertson, T.L., Kunitada, S., Bovill, E.G., Armstrong, P.W. und Harrington, R.A. (2004).** Initial experience with factor-Xa inhibition in percutaneous coronary intervention: the XaNADU-PCI Pilot. *J. Thromb. Haemost.*, **2**: 234-241.
- Al-Mehdi, A.B., Tozawa, K., Fisher, A.B., Shientag, L., Lee, A. und Muschel, R.J. (2000).** Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat. Med.*, **6**: 100-102.
- Amirkhosravi, A., Mousa, S.A., Amaya, M., Blaydes, S., Desai, H., Meyer, T. und Francis, J.L. (2003).** Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb. Haemost.*, **90**: 549-554.
- Amirkhosravi, A. und Francis, J.L. (1995).** Coagulation activation by MC28 fibrosarcoma cells facilitates lung tumor formation. *Thromb. Haemost.*, **73**: 59-65.
- Andolfo, A., English, W.R., Resnati, M., Murphy, G., Blasi, F. und Sidenius, N. (2002).** Metalloproteases cleave the urokinase-type plasminogen activator receptor in the D1-D2 linker region and expose epitopes not present in the intact soluble receptor. *Thromb. Haemost.*, **88**: 298-306.
- Andreasen, P.A., Egelund, R. und Petersen, H.H. (2000).** The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**: 25-40.
- Ansell, J. (2005).** Long-term anticoagulation: the prospects for alternatives to warfarin. *Semin. Vasc. Surg.*, **18**: 134-138.
- Ansell, J. und Bergqvist, D. (2004).** Current options in the prevention of thromboembolic disease. *Drugs*, **64**: 1-5.
- Arlt, M. (2004).** Kombination spezifitätsoptimierter Proteaseinhibitoren als effiziente antimetastatische Therapie in präklinischen Modellen. Dissertation, Technische Universität München.
- Arlt, M., Kopitz, C., Pennington, C., Watson, K.L., Krell, H.W., Bode, W., Gänsbacher, B., Khokha, R., Edwards, D.R. und Krüger, A. (2002).** Increase in Gelatinase-specificity of Matrix Metalloproteinase Inhibitors Correlates with Antimetastatic Efficacy in a T-Cell Lymphoma Model. *Cancer Res.*, **62**: 5543-5550.
- Atkin, G., Chopada, A. und Mitchell, I. (2005).** Colorectal cancer metastasis: in the surgeon's hands? *Int. Semin. Surg. Oncol.*, **2**: 5.

- Bachmeier, B.E., Iancu, C.M., Jochum, M. und Nerlich, A.G. (2005).** Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **5**: 149-163.
- Banke, I.J., Arlt, M.J., Mueller, M. M., Sperl, S., Stemberger, A., Stürzebecher, J., Amirkhosravi, A., Moroder, L. und Krüger, A. (2005).** Effective inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival in mice by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anticoagulant activity. *Thromb. Haemost.*, **94**: 1084-1093.
- Banke, I.J., Arlt, M.J., Pennington, C., Kopitz, C., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Gänsbacher, B., Quigley JP, Edwards, D.R., Stürzebecher, J. und Krüger, A. (2003).** Increase of anti-metastatic efficacy by selectivity- but not affinity-optimization of synthetic serine protease inhibitors. *Biol. Chem.*, **384**: 1515-1525
- Baramova, E.N., Bajou, K., Remacle, A., L`Hoir, C., Krell, H.W., Weidle, U.H., Noel, A. und Foidart, J.M. (1997).** Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *F.E.B.S. Lett.*, **405**: 157-162.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. und Woessner JF (2004).** *The Handbook of Proteolytic Enzymes. 2.* Auflage, Academic Press, Cambridge, Großbritannien.
- Bastida, E. und Ordinas, A. (1988).** Platelet contribution to the formation of metastatic foci: the role of cancer cell-induced platelet activation. *Haemostasis*, **18**: 29-36.
- Becker, R.C., Alexander, J.H., Dyke, C.K., Huang, Y., Saint-Jacques, H., Hasselblad, V., Harrington, R.A. und Bovill, E.G. (2006).** Effect of the novel direct factor Xa inhibitor DX-9065a on thrombin generation and inhibition among patients with stable atherosclerotic coronary artery disease. *Thromb. Res.*, **117**: 439-446.
- Becker, R.C., Alexander, J., Dyke, C.K. und Harrington, R.A. (2004).** Development of DX-9065a, a novel direct factor Xa antagonist, in cardiovascular disease. *Thromb. Haemost.*, **92**: 1182-1193.
- Benaud, C.M., Oberst, M., Dickson, R.B. und Lin, C.Y. (2002).** Deregulated activation of matriptase in breast cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*, **19**: 639-649.
- Berezcky, B., Gilly, R., Raso, E., Vago, A., Timar, J. und Tovari, J. (2005).** Selective antime-tastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migra-tion and microvascular arrest. *Clin. Exp. Metastasis*, **22**: 69-76.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. und Hanahan, D. (2000).** Matrix metalloproteinase-9 triggers the an-giogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell. Biol.*, **2**: 737-744.
- Billroth, T. (1878).** Lectures on surgical pathology and therapeutics. *A handbook for students and practitioners.* The New Sydenham Society, London, **8**.
- Binnema, D.J., Dooijewaard, G. und Turion, P.N. (1991).** An analysis of the activators of single-chain urokinase-type plasminogen activator (scu-PA) in the dextran sulphate euglobulin fraction of normal plasma and of plasmas deficient in factor XII and prekallikrein. *Thromb. Haemost.*, **65**: 144-148.
- Bissett, D., O`Byrne, K.J., von Pawel, J., Gatzemeier, U., Price, A., Nicolson, M., Mercier, R., Mazabel, E., Penning, C., Zhang, M.H., Collier, M.A. und Shepherd, F.A. (2005).** Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **23**: 842-849.
- Bobek, V. und Kovarik, J. (2004).** Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed. Pharmacother.*, **58**: 213-219.
- Boccaccio, C. und Comoglio, P.M. (2005).** A functional role for hemostasis in early cancer deve-lopment. *Cancer Res.*, **65**: 8579-8582.

- Bode, W. und Huber, R. (2000).** Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 241-252.
- Bogenrieder, T. und Herlyn, M. (2003).** Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, **22**: 6524-6536.
- Bono, F., Schaeffer, P., Hérault, J.P., Michaux, C., Nestor, A.L., Guillemot, J.C. und Herbert, J.M. (2000).** Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**: 107-112.
- Brandstetter, H., Kuhne, A., Bode, W., Huber, R., von der Saal, W., Wirthensohn, K. und Engh, R.A. (1996).** X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition. *J. Biol. Chem.*, **271**: 29988-29992.
- Brandt, L., Kimby, E., Nygren, P. und Glimelius, B. (2001).** A systematic overview of chemotherapy effects in Hodgkin's disease. *Acta Oncol.*, **40**: 185-223.
- Brueggemann, L.W., Reitsma, P.H. und Spek, C.A. (2005).** Anticoagulants inhibit tumor metastasis independent of fibrin formation. *Hematologica Reports*, **1**: 112-113.
- Bukys, M.A., Blum, M.A., Kim, P.Y., Brufatto, N., Nesheim, M.E. und Kalafatis, M. (2005).** Incorporation of factor Va into prothrombinase is required for coordinated cleavage of prothrombin by factor Xa. *J. Biol. Chem.*, **280**: 27393-27401.
- Bura, A., Cailleux, N., Bienvenu, B., Leger, P., Bissery, A., Boccalon, H., Fiessinger, J.N., Levesque, H. und Emmerich, J. (2004).** Incidence and prognosis of cancer associated with bilateral venous thrombosis: a prospective study of 103 patients. *J. Thromb. Haemost.*, **2**: 441-444.
- Caine, G.J., Stonelake, P.S., Lip, G.Y. und Kehoe, S.T. (2002).** The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia*, **4**: 465-473.
- Calatzis, A., Haas, S., Goedje, O., Calatzis, A.I., Hipp, R. und Walenga, J.M. (2000).** Thrombelastographic coagulation monitoring during cardiovascular surgery with the ROTEG Coagulation Analyzer. In: Pifarre, R. (Hrsg) *Management of bleeding in cardiovascular surgery*. Hanley&Belfus, 215-226.
- Calatzis, A., Fritzsche, P., Kling, M., Hipp, R. und Stemberger, A. (1996).** A comparison of the technical principle of the roTEG coagulation analyzer and conventional thrombelastographic systems. *Ann. Haematol.*, **72**: 90.
- Camerer, E., Oazi, A.A., Duong, D.N., Cornelissen, I., Advincula, R. und Coughlin, S.R. (2004).** Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood*, **104**: 397-401.
- Castellino, F.J. und Ploplis, V.A. (2005).** Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb. Haemost.*, **93**: 647-654.
- Castellino, D.J. und Salem, H. (1997).** Natural anticoagulants and the liver. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **12**: 77-83.
- Chambers, A.F. und Matrisian, L.M. (1997).** Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **89**: 1260-1270.
- Chau, I., Rigg, A. und Cunningham, D. (2003).** Matrix metalloproteinase inhibitors-an emphasis on gastrointestinal malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **45**: 151-176.
- Chen, E.X. und Siu, L.L. (2005).** Development of molecular targeted anticancer agents: successes, failures and future directions. *Curr. Pharm. Des.*, **11**: 265-272.
- Cohen, A.T., Alikhan, R., Arcelus, J.I., Bergmann, J.F., Haas, S., Merli, G.J., Spyropoulos, A.C., Tapon, V.F. und Turpie, A.G. (2005).** Assessment of venous thromboembolism risk and the benefits of thromboprophylaxis in medical patients. *Thromb. Haemost.*, **94**: 750-759.
- Comoglio, P.M. und Boccaccio, C. (2001).** Scatter factors and invasive growth. *Semin. Cancer Biol.*, **11**: 153-165.

- Coussens, L. M., Fingleton, B. und Matrisian, L. M. (2002).** Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, **295**: 2387-2392.
- Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D. und Werb, Z. (2000).** MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*, **103**: 481-490.
- Creemers, E.E., Cleutjens, J.P. und Daemen, M.J. (2001).** Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ. Res.*, **89**: 201-210.
- D'Alessio, S., Fibbi, G., Cinelli, M., Guiducci, S., Del Rosso, A., Margheri, F., Serrati, S., Pucci, M., Kahaleh, B., Fan, P., Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Matucci-Cerinic, M. und Del Rosso, M. (2004).** Matrix metalloproteinase 12-dependent cleavage of urokinase receptor in systemic sclerosis microvascular endothelial cells results in impaired angiogenesis. *Arthritis Rheum.*, **50**: 3275-3285.
- Dano, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund L.R., Ploug, M. und Romer, J. (2005).** Plasminogen activation and cancer. *Thromb. Haemost.*, **93**: 676-681.
- Dano, K., Andreasen, P.A., Grondahl-Hansen, J., Kristensen, P., Nielsen, L.S. und Skriver, L. (1985).** Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv. Cancer Res.*, **44**: 139-266.
- Davidson, B., Konstantinovskiy, S., Nielsen, S., Dong, H.P., Berner, A., Vyberg, M. und Reich, R. (2004).** Altered expression of metastasis-associated and regulatory molecules in effusions from breast cancer patients: a novel model for tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, **10**: 7335-7346.
- De Cicco, M. (2004).** The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **50**: 187-196.
- DeClerck, Y.A., Imren, S., Montgomery, A.M., Mueller, B.M., Reisfeld, R.A. und Laug, W.E. (1997).** Proteases and protease inhibitors in tumor progression. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **425**: 89-97.
- Decock, J., Paridaens, R. und Cufer, T. (2005).** Proteases and metastasis: clinical relevance nowadays? *Curr. Opin. Oncol.*, **17**: 545-550.
- Deitcher, S.R. (2003).** Clinical utility of subcutaneous hirudins. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **5**: 27-31.
- Del Rosso, M., Fibbi, G., Pucci, M., D'Alessio, S., Del Rosso, A., Magnelli, L. und Chiarugi, V. (2002).** Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin. Exp. Metastasis*, **19**: 193-207.
- Della Porta, P., Soeltl, R., Krell, H.W., Collins, K., O'Donoghue, M., Schmitt, M. und Krüger, A. (1999).** Combined treatment with serine protease inhibitor aprotinin and matrix metalloproteinase inhibitor Batimastat (BB-94) does not prevent invasion of human esophageal and ovarian carcinoma cells in vivo. *Anticancer Res.*, **19**: 3809-3816.
- Deryugina, E.I., Zijlstra, A., Partridge, J.J., Kupriyanova, T.A., Madsen, M.A., Papagiannakopoulos, T. und Quigley, J.P. (2005).** Unexpected effect of matrix metalloproteinase down-regulation on vascular intravasation and metastasis of human fibrosarcoma cells selected in vivo for high rates of dissemination. *Cancer Res.*, **65**: 10959-10969.
- Diener, H.C. (2006).** Stroke prevention using the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Cerebrovasc. Dis.*, **21**: 279-293.
- Donnelly, K.M., Bromberg, M.E., Milstone, A., Madison, McNiff, J.M., Terwilliger, G., Konigsberg, W.H. und Capello, M. (1998).** Ancylostoma caninum anticoagulant peptide blocks metastasis in vivo and inhibits factor Xa binding to melanoma cells in vitro. *Thromb. Haemost.*, **79**: 1041-1047.
- Dropcho, E.J. (2004).** Neurotoxicity of cancer chemotherapy. *Semin. Neurol.*, **24**: 419-426.

- Dyke, C.K., Becker, R.C., Kleinman, N.S., Hochman, J.S., Bovill, E.G., Lincoff, A.M., Gerstenblith, G., Dzavik, V., Gardner, L.H., Hasselblad, V., Zillman, L.A., Shimoto, Y., Robertson, T.L., Kunitada, S., Armstrong, P.W. und Harrington, R.A (2002).** First experience with direct factor Xa inhibition in patients with stable coronary disease: a pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Circulation*, **105**: 2385-2391.
- Eccles, S.A. (2001).** Basic principles for the study of metastasis using animal models. In: Brooks, S.A. und Schumacher, U (Hrsg.) *Metastasis Research Protocols, Volume 2, Analysis of Cell Behavior In Vitro and In Vivo*. Humana Press, Totowa, New Jersey, 161-171.
- Edwards, D.R., Leco, K.J., Beaudry, P.P., Atadja, P.W., Veillette, C. und Riabowol, K.T. (1996).** Differential effects of transforming growth factor- β 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp. Gerontol.*, **31**: 207-223.
- Edwards, P.D. und Bernstein, P.R. (1994).** Synthetic inhibitors of elastase. *Med. Res. Rev.*, **14**: 127-194.
- Egeblad, M. und Werb, Z. (2002).** New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 161-174.
- Falanga, A. und Zacharski, L. (2005).** Deep vein thrombosis in cancer: the scale of the problem and approaches to management. *Ann. Oncol.*, **16**: 696-701.
- Fallowfield, L. (2005).** Acceptance of adjuvant therapy and quality of life issues. *Breast*, **14**: 612-616.
- Fehrenbacher, N. und Jaattela, M. (2005).** Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res.*, **65**: 2993-2995.
- Feistritzer, C., Lenta, R. und Riewald, M. (2005).** Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J. Thromb. Haemost.*, **3**: 2798-2805.
- Fidler, I. J. (2003).** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer*, **3**: 453-458.
- Fidler, I.J. (2002).** The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation*, **70**: 498-505.
- Fingleton, B. (2003).** Matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy: the current situation and future prospects. *Expert. Opin. Ther. Targets*, **7**: 385-397.
- Folgueras, A.R., Pendas, A.M., Sanchez, L.M. und Lopez-Otin, C. (2004).** Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int. J. Dev. Biol.*, **48**: 411-424.
- Folkman, J. (1986).** How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Res.*, **46**: 467-473.
- Forbs, D., Thiel, S., Stella, M.C., Stürzebecher, A., Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Stürzebecher, J. und Uhlend, K. (2005).** In vitro inhibition of matriptase prevents invasive growth of cell lines of prostate and colon carcinoma. *Int. J. Oncol.*, **27**: 1061-1070.
- Forster, Y., Meye, A., Albrecht, S. und Schwenzer, B. (2006).** Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. *Clin. Chim. Acta.*, **364**: 12-21.
- Francis, J.L. und Amirkhosravi, A. (2002).** Effect of antihemostatic agents on experimental tumor dissemination. *Semin. Thromb. Hemost.*, **28**: 29-38.
- Francis, J.L., Biggerstaff, J. und Amirkhosravi, A. (1998).** Hemostasis and malignancy. *Semin. Thromb. Hemost.*, **24**: 93-109.

- Friedrich, R., Fuentes-Prior, P., Ong, E., Coombs, G., Hunter, M., Oehler, R., Pierson, D., Gonzales, R., Huber, R., Bode, W. und Madison, E.L. (2002).** Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase. *J. Biol. Chem.*, **277**: 2160-2168.
- Frost, P. und Levin, B. (1992).** Clinical implications of metastatic process. *Lancet*, **339**: 1458-1461.
- Furie, B. und Furie, B.C. (1988).** The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, **53**: 505-518.
- Gabazza, E.C., Taguchi, O., Kamada, H., Hayashi, T., Adachi, Y. und Suzuki, K. (2004).** Progress in the understanding of protease-activated receptors. *Int. J. Hematol.*, **79**: 117-122.
- Gerotziafas, G.T. und Samama, M.M. (2005).** Heterogeneity of synthetic factor Xa inhibitors. *Curr. Pharm. Des.*, **11**: 3855-3876.
- Goretzki, L., Schmitt, M., Mann, K., Calvete, J., Chucholowski, N., Kramer, M., Gunzler, W.A., Janicke, F. und Graeff, H. (1992).** Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L. *F.E.B.S. Lett.*, **297**: 112-118.
- Gottesman, M.M., Fojo, T. und Bates, S.E. (2002).** Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 48-58.
- Günthert, U. (1997).** Biologie der Metastasierung und Tumorangiogenese. In: Ostendorf, P.C. und Seeber, S.(Hrsg.) *Hämatologie und Onkologie*. Urban und Schwarzenberg, München, 160-167.
- Hahn-Dantona, E., Ramos-DeSimone, N., Siple, J., Nagase, H., French, D.L. und Quigley, J.P. (1999).** Activation of proMMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **878**: 372-387.
- Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A. und Kalluri, R. (2003).** Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell*, **3**: 589-601.
- Han, B., Nakamura, M., Mori, I., Nakamura, Y. und Kakudo, K. (2005).** Urokinase-type plasminogen activator system and breast cancer. *Oncol. Rep.*, **14**: 105-112.
- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2000).** The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**: 57-70.
- Harbeck, N., Kates, R.E., Gauger, K., Willems, A., Kiechle, M., Magdolen, V. und Schmitt, M. (2004) a.** Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb. Haemost.*, **91**: 450-456.
- Harbeck, N., Kates, R.E., Schmitt, M., Gauger, K., Kiechle, M., Janicke, F., Thomassen, C., Look, M.P., und Foekens, J.A. (2004) b.** Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin. Breast Cancer*, **5**: 348-352.
- Hashimoto, M., Oiwa, K., Matsuo, O., Ueshima, S., Okada, K., Okada, Y., Okamoto, S., Giddings, J.C. und Janamoto, J. (2003).** Suppression of argatroban-induced endogenous thrombolysis by PKSI-527, and antibodies to TPA and UPA, evaluated in a rat arterial thrombolysis model. *Thromb. Haemost.*, **89**: 820-825.
- Hauptmann, J., Steinmetzer, T., Vieweg, H., Wikstrom, P. und Stürzebecher, J. (2002).** Influence of structural variations in peptidomimetic 4-amidinophenylalanine-derived thrombin inhibitors on plasma clearance and biliary excretion in rats. *Pharm. Res.*, **19**: 1027-1033.
- Hauptmann, J. und Stürzebecher, J. (1999).** Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside. *Thromb. Res.*, **93**: 203-241.
- Hawkins, D. (2004).** Limitations of traditional anticoagulants. *Pharmacotherapy*, **24**: 62-65.

- Hawkins, D. und Huston, S.A. (2006).** Pharmacoeconomic considerations in anticoagulant drug use. *Expert. Opin. Pharmacother.*, **7**: 989-1003.
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A., Werb, Z. und Rafii, S. (2002).** Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, **109**: 625-637.
- Hejna, M., Raderer, M. und Zielinski, C.C. (1999).** Inhibition of metastases by anticoagulants. *J. Natl. Cancer Inst.*, **91**: 22-36.
- Hembrough, T.A., Swartz, G.M., Papathanassiou, A., Vlasuk, G.P., Rote, W.E., Green, S.J. und Pribluda, V. (2003).** Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res.*, **63**: 2997-3000.
- Hermansen, K. (2004).** Waiting to inhale: noninjectable insulin, are we there yet? *Curr. Diab. Rep.*, **4**: 335-341.
- Heyder, C., Gloria-Maercker, E., Hatzmann, W., Zaenker, K.S. und Dittmar, T. (2006).** Visualization of tumor cell extravasation. *Contrib. Microbiol.*, **13**: 200-208.
- Hidalgo, M. und Eckhardt, S.G. (2001).** Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **93**: 178-193.
- Hillen, H.F. (2000).** Thrombosis in cancer patients. *Ann. Oncol.*, **11**: 273-276.
- Hirota, M., Shimada, S., Yamamoto, K., Tanaka, E., Sugita, H., Egami, H. und Ogawa, M. (2005).** Pancreatectomy using the no-touch isolation technique followed by extensive intraoperative peritoneal lavage to prevent cancer cell dissemination: a pilot study. *J.O.P.*, **6**: 143-151.
- Hirsh, J., O'Donnell, M. und Weitz, J.I. (2005).** New anticoagulants. *Blood*, **105**: 453-463.
- Hooper, J.D., Clements, J.A., Quigley, J.P. und Antalis, T.M. (2001).** Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.*, **276**: 857-860.
- Hoots, W.K. (2006).** Pathogenesis of hemophilic arthropathy. *Semin. Hematol.*, **43**: 18-22.
- Hortobagyi, G.N. (2005).** Moving into the future: treatment of bone metastases and beyond. *Cancer Treat. Rev.*, **31**: 9-18.
- Horton, J. (2005).** Venous thrombotic events in cancer: the bottom line. *Cancer Control*, **1**: 31-37.
- Hosaka, Y., Matsumoto, M., Shinozaki, M., Ohno, T., Yatagai, Y., Kamiya, M., Kurokawa, M., Nishida, H., Matsusue, T., Miziguchi, K. und Ishii, H. (2006).** Pharmacological characterization of the active synthetic factor Xa inhibitors M5551 and M55165. *Eur. J. Pharmacol.*, **529**: 164-171.
- Hougie, C., Barrow, E.M. und Graham, J.B. (1957).** Stuart clotting defect. I. Segregation of an hereditary hemorrhagic state from the heterogeneous group heretofore called stable factor (SPCA, proconvertin, factor VII) deficiency. *J. Clin. Invest.*, **36**: 485-496.
- Hu, L., Lee, M., Campbell, W., Perez-Soler, R. und Karparkin, S. (2004).** Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. *Blood*, **104**: 2746-2751.
- Ieko, M., Tarumi, T., Takeda, M., Naito, S., Nakabayashi, T. und Koike, T. (2004).** Synthetic selective inhibitors of coagulation factor Xa strongly inhibit thrombin generation without affecting initial thrombin forming time necessary for platelet activation in hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, **2**: 612-618.
- Ihara, S., Myoshi, E., Ko, J.H., Murata, K., Nakahara, S., Honke, K., Dickson, R.B., Lin, C.Y. und Taniguchi, N. (2002).** Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matriptase by adding beta 1-6 GlcNAc branching. *J. Biol. Chem.*, **277**: 16960-16967.

- Ilies, M.A., Scozzafava, A. und Supuran, C.T. (2002).** Therapeutic applications of serine protease inhibitors. *Expert. Opin. Ther. Patents*, **12**: 1181-1214.
- Im, J.H., Fu, W., Wang, H., Bhatia, S.K., Hammer, D.A., Kowalska, M.A. und Muschel, R.J. (2004).** Coagulation facilitates tumor cell spreading in the pulmonary vasculature during early metastatic colony formation. *Cancer Res.*, **64**: 8613-8619.
- Jedezsko, C. und Sloane, B.F. (2004).** Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.*, **385**: 1017-1027.
- Jedinak, A. und Maliar, T. (2005).** Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma*, **52**: 185-192.
- Jessani, N., Liu, Y., Humphrey, M. und Cravatt, B.F. (2002).** Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**: 10335-10340.
- Jiang, X., Bailly, M.A., Panetti, T.S., Cappello, M., Konigsberg, W.H. und Bromberg, M.E. (2004).** Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J. Thromb. Haemost.*, **2**: 93-101.
- Kaiser, B. (2003).** DX-9065a, a direct inhibitor of factor Xa. *Cardiovasc. Drug Rev.*, **21**: 91-104.
- Karnicki, K., McBane, R.D., Miller, R.S., Leadley, R.J., Morser, J., Owen, W.G. und Chesbro, J.H. (2004).** Inhibition and reversal of platelet-rich arterial thrombus in vivo: direct vs. indirect factor Xa inhibition. *J. Thromb. Haemost.*, **2**: 2162-2169.
- Kemkes-Matthes, B., Preissner, K.T., Langenscheidt, F., Matthes, K.J. und Mueller-Berghaus, G. (1987).** S protein/vitronectin in chronic liver diseases: correlations with serum cholinesterase, coagulation factor X and complement component C3. *Eur. J. Haematol.*, **39**: 161-165.
- Kim, A., Fall, P. und Wang, D. (2005).** Palliative care: optimizing quality of life. *J. Am. Osteopath. Assoc.*, **105**: 9-14.
- King, J., Zhao, J., Clingan, P. und Morris, D. (2003).** Randomised double blind placebo control study of adjuvant treatment with the metalloproteinase inhibitor, Marimastat in patients with inoperable colorectal hepatic metastases: significant survival advantage in patients with musculoskeletal side-effects. *Anticancer Res.*, **23**: 639-645.
- Koblinski, J.E., Ahram, M. und Sloane, B.F. (2000).** Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin. Chim. Acta.*, **291**: 113-135.
- Koop, S., Schmidt, E.E., MacDonald, I.C., Morris, V.L., Khokha, R., Grattan, M., Leone, J., Chambers, A.F. und Groom, A.C. (1996).** Independence of metastatic ability and extravasation: metastatic ras-transformed and control fibroblasts extravasate equally well. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 11080-11084.
- Kopfstein, L. und Christofori, G. (2006).** Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**: 449-468.
- Kopitz, C., Anton, M., Gänsbacher, B. und Krüger, A. (2005).** Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res.*, **65**: 8608-8612.
- Kopitz, C.C. (2005).** Modulation der experimentellen Metastasierung einer humanen Fibrosarkomzelllinie durch adenoviralen Gentransfer natürlicher Proteaseinhibitoren in das Maus-Wirtsgewebe. Dissertation, Technische Universität München.
- Kossakowska, A.E., Urbanski, S.J. und Edwards, D.R. (1991).** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) RNA is expressed at elevated levels in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, **77**: 2475-2481.
- Kragh, M. und Loechel, F. (2005).** Non-anti-coagulant heparins: a promising approach for prevention of tumor metastasis. *Int. J. Oncol.*, **27**: 1159-1167.

- Krüger, A., Arlt, M.J., Gerg, M., Kopitz, C., Bernardo, M.M., Chang, M., Mobashery, S. und Fridman, R. (2005).** Antimetastatic activity of a novel mechanism-based gelatinase inhibitor. *Cancer Res.*, **65**: 3523-3526.
- Krüger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gänsbacher B. und Schnitt, M. (2001).** Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res.*, **61**: 1272-1275.
- Krüger, A., Schirmacher, V. und von Hoegen P (1998).** The bacterial lacZ gene: an important tool for metastasis research and evaluation of new cancer therapies. *Cancer Metastasis Rev.*, **17**: 285-294.
- Krüger, A., Schirmacher, V. und von Hoegen P (1994) a.** Scattered micrometastases visualized at the single-cell level: detection and re-isolation of lacZ-labeled metastasized lymphoma cells. *Int. J. Cancer*, **58**: 275-284.
- Krüger, A., Umansky, V., Rocha, M., Hacker, H.J., Schirmacher, V. und von Hoegen P (1994) b.** Pattern and load of spontaneous liver metastasis dependent on host immune status studied with a lacZ transduced lymphoma. *Blood*, **84**: 3166-3174.
- Künzel, S., Schweinitz, A., Reissmann, S., Stürzebecher, J. und Steinmetzer, T. (2002).** 4-amidinobenzylamine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**: 645-648.
- Labelle, C.A. und Kitchens, C.S. (2005).** Disseminated intravascular coagulation: treat the cause, not the lab values. *Cleve. Clin. J. Med.*, **72**: 377-378, 383-385, 390.
- Lah, T.T., Duran Alonso, M.B. und Van Noorden, C.J. (2006).** Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **6**: 257-279.
- Leadley, R.J., Chi, L. und Porcari, A.R. (2001).** Non-hemostatic activity of coagulation factor Xa: potential implications for various diseases. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **1**: 169-175.
- Lee, A.Y. (2002).** Cancer and thromboembolic disease: pathogenic mechanisms. *Cancer Treat. Rev.*, **28**: 137-140.
- Lee, S.L., Dickson, R.B. und Lin, C.Y. (2000).** Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J. Biol. Chem.*, **275**: 36720-25.
- Leighl, N.B., Paz-Ares, L., Douillard, J.Y., Peschel, C., Arnold, A., Depierre, A., Santoro, A., Betticher, D.C., Gatzemeier, U., Jassem, J., Crawford, J., Tu, D., Bezjak, A., Humphrey, J.S., Voi, M., Galbraith, S., Hann, K., Seymour, L. und Shepherd, F.A. (2005).** Randomized phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor BMS-275291 in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.*, **23**: 2831-2839.
- Leiter, U., Meier, F., Schitteck, B. und Garbe, C. (2004).** The natural course of cutaneous melanoma. *J. Surg. Oncol.*, **86**: 172-178.
- Lijnen, H.R. (2001).** Elements of the fibrinolytic system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **936**: 226-236.
- Lindsay, M.A. (2003).** Target discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2**: 831-838.
- List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Sriuranpong, V., Redeye, V., Murdock, T., Burke, B., Nielsen, B.S., Gutkind, J.S. und Bugge, T.H. (2005).** Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. *Genes Dev.*, **19**: 1934-1950.
- List, K., Haudenschild, C.C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S.M., Swaim, W., Engelholm, L.H., Behrendt, M. und Bugge, T.H. (2002).** Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene*, **21**: 3765-3779.
- Longstaff, C. und Thelwell, C. (2005).** Understanding the enzymology of fibrinolysis and improving thrombolytic therapy. *F.E.B.S. Lett.*, **579**: 3303-3309.

- Lopez-Otin, C. und Overall, C.M. (2002).** Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**: 509-519.
- Loynes, J.T. und Zacharski, L.R. (2003).** The coagulation system as a target for experimental therapy of human gliomas. *Expert. Opin. Ther. Targets*, **7**: 399-404.
- Ludwig, R.J., Alban, S., Bistran, R., Boehncke, W.H., Kaufmann, R., Henschler, R. und Gille, J. (2006).** The ability of different forms of heparins to suppress P-selectin function in vitro correlates to their inhibitory capacity on bloodborne metastasis in vivo. *Thromb. Haemost.*, **95**: 535-540.
- Luzzi, K.J., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Kerkyliet, N., Morris, V.L., Chambers, A.F. und Groom, A.C. (1998).** Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am. J. Pathol.*, **153**: 865-873.
- Lynch, C.C. und Matrisian, L.M. (2002).** Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation*, **70**: 561-573.
- MacDonald, I.C., Groom, A.C. und Chambers, A.F. (2002).** Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays*, **24**: 885-893.
- MacDonald, N.J. und Steeg, P.S. (1993).** Molecular basis of tumour metastasis. *Cancer Surv.*, **16**: 175-199.
- Magdolen, U., Krol, J., Sato, S., Mueller, M.M., Sperl, S., Krüger, A., Schmitt, M. und Magdolen, V. (2002).** Natural inhibitors of tumor-associated proteases. *Radiol. Oncol.*, **36**: 131-1243.
- Mandala, M., Ferretti, G., Cremonesi, M., Cazzangia, M., Curigliano, G. und Barni, S. (2003).** Venous thromboembolism and cancer: new issues for an old topic. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **48**: 65-80.
- Mann, K.G., Nesheim, M.E., Church, W.R., Haley, P. und Krishnaswamy, S. (1990).** Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*, **76**: 1-16.
- Mannello, F., Tonti, G. und Papa, S. (2005).** Matrix metalloproteinase inhibitors as anticancer therapeutics. *Curr. Cancer Drug Targets*, **5**: 285-298.
- Maquoi, E., Munaut, C., Colige, A., Lambert, C., Frankenne, F., Noel, A., Grams, F., Krell, H.W. und Foidart, J.M. (2002).** Stimulation of matrix metalloproteinase-9 expression in human fibrosarcoma cells by synthetic matrix metalloproteinase inhibitors. *Exp. Cell. Res.*, **275**: 110-121.
- Martin, D.C., Rütther, U., Sanchez-Sweatman, O.H., Orr, F.W. und Khokha, R. (1996).** Inhibition of SV40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in Timp-1 transgenic mice. *Oncogene*, **13**: 569-576.
- Matrisian, L.M., Sledge, G.W. und Mohla, S. (2003).** Extracellular proteolysis and cancer: meeting summary and future directions. *Cancer Res.*, **63**: 6105-6109.
- Mayer, M. (1990).** Biochemical and biological aspects of the plasminogen activation system. *Clin. Biochem.*, **23**: 197-211.
- Mazzieri, R., Masiero, L., Zanetta, L., Monea, S., Onisto, M., Garbisa, S. und Mignatti, P. (1997).** Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *E.M.B.O. J.*, **16**: 2319-2332.
- McCullagh, K., Wadsworth, H. und Hann, M. (1984).** Carboxyalkyl peptide derivatives. *European Patent EP 126*, **974**: 1-111.
- McCulloch P. und George, W.D. (1987).** Warfarin inhibition of metastasis: the role of anticoagulation. *Br. J. Surg.*, **74**: 879-883.

- McKinell, R.G. (1999).** Metastasis. In: McKinnell, R.G., Parchment, R.E., Perantoni, A.O. und Pierce, G.B. *The Biological Basis of Cancer*. 2. Auflage, Cambridge University Press, New York, 50-68.
- McLean, K., Schirm, S., Johns, A., Morser, J. und Light, D.R. (2001).** FXa-induced responses in vascular wall cells are PAR-mediated and inhibited by ZK-807834. *Thromb. Res.*, **103**: 281-297.
- Melchor, J.P. und Strickland, S. (2005).** Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.*, **93**: 655-660.
- Merchan, J.R., Tang, J., Hu, G., Lin, Y., Mutter, W., Tong, C., Karumanchi, S.A., Russell, S.J. und Sukhatme, V.P. (2006).** Protease activity of urokinase and tumor progression in a syngeneic mammary cancer model. *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**: 756-764.
- Mignatti, P. und Rifkin, D.B. (1993).** Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol. Rev.*, **73**: 161-195.
- Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Hideshima, T., Richardson, P.G. und Anderson, K.C. (2005).** Proteasome inhibition as a therapeutic strategy for hematologic malignancies. *Expert. Rev. Anti-cancer Ther.*, **5**: 465-476.
- Montuori, N., Visconte, V., Rossi, G. und Ragno, P. (2005).** Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? *Thromb. Haemost.*, **93**: 192-198.
- Mook, O.R., Frederiks, W.M. und Van Noorden, C.J. (2004).** The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1705**: 69-89.
- Morajes, T.J., Zurawska, J.H. und Downey, G.P. (2006).** Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.*, **13**: 21-27.
- Morris, D.R., Ding, Y., Ricks, T.K., Gullapalli, A., Wolfe, B.L. und Trejo, J. (2006).** Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res.*, **66**: 307-314.
- Morris, V.L., MacDonald, I.C., Koop, S., Schmidt, E.E., Chambers, A.F. und Groom, A.C. (1993).** Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogenous metastasis: videomicroscopic analysis. *Clin. Exp. Metastasis*, **11**: 377-390.
- Motlekar, N.A. und Youan, B.B. (2006).** The quest for non-invasive delivery of bioactive macromolecules: a focus on heparins. *J. Control. Release*, **3**: 91-101.
- Motsch, J., Walther, A., Bock, M. und Bottinger, B.W. (2006).** Update in the prevention and treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, **19**: 52-58.
- Mousa, S.A. (2005).** Anti-thrombotics in thrombosis and cancer. *Future Oncol.*, **1**: 395-403.
- Muehlenweg, B., Sperl, S., Magdolen, V., Schmitt, M. und Harbeck, N. (2001).** Interference with the urokinase plasminogen activator system: a promising therapy concept for solid tumours. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **1**: 683-691.
- Mueller, M. M., Sperl, S., Sturzebecher, J., Bode, W., und Moroder, L. (2002).** (R)-3-Amidinophenylalanine-derived inhibitors of factor Xa with a novel active-site binding mode. *Biol. Chem.*, **383**: 1185-1191.
- Nagahara, T., Yokoyama, Y., Inamura, K., Katakura, S., Komoriya, S., Yamaguchi, H., Hara, T., und Iwamoto, M. (1994).** Dibasic (amidinoaryl)propanoic acid derivatives as novel blood coagulation factor Xa inhibitors. *J. Med. Chem.*, **37**: 1200-1207.
- Nagase, H. und Woessner, J.F. (1999).** Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, **274**: 21491-21494.

- Nagel, J. (2004).** Modulation des metastatischen Potenzials einer humanen Fibrosarkomzelllinie durch Ko-Expression von TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) und einer löslichen Form des Urokinase-Rezeptors. Dissertation, Technische Universität München.
- Nakata, M., Kanekura, S. und Maruyama, I. (1998).** DX9065a, an Xa inhibitor, inhibits prothrombin-induced A549 lung adenocarcinoma cell proliferation. *Cancer Lett.*, **122**: 127-133.
- Naumov, G.N., Wilson, S.M., MacDonald, I.C., Schmidt, E.E., Morris, V.L., Groom, A.C., Hoffman, R.M. und Chambers, A.F. (1999).** Cellular expression of green fluorescent protein, coupled with high-resolution in vivo videomicroscopy, to monitor steps in tumor metastasis. *J. Cell. Sci.*, **112**: 1835-1842.
- Netzel-Arnett, S., Hooper, J.D., Szabo, R., Madison, E.L., Quigley, J.P., Bugge, T.H. und Antalis, T.M. (2003).** Membrane anchored serine proteases: a rapidly expanding group of cell surface proteolytic enzymes with potential roles in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **22**: 237-258.
- Noel, A., Gilles, C., Bajou, K., Devy, L., Kebers, F., Lewalle, J.M., Maquoi, E., Munaut, C., Remacle, A. und Foidart, J.M. (1997).** Emerging roles for proteinases in cancer. *Invasion Metastasis*, **17**: 221-239.
- Nutescu, E.A., Shapiro, N.L., Chevalier, A. und Amin, A.N. (2005).** A pharmacologic overview of current and emerging anticoagulants. *Cleve. Clin. J. Med.*, **72**: 2-6.
- Oberst, M.D., Singh, B., Ozdemirli, M., Dickson, R.B., Johnson, M.D. und Lin, C.Y. (2003).** Characterization of matriptase expression in normal human tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **51**: 1017-1025.
- Oberst, M.D., Johnson, M.D., Dickson, R.B., Lin, C.Y., Singh, B., Stewart, M., Williams, A., Smyth, J.F., Gabra, H. und Sellar, G.C. (2002).** Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin. Cancer Res.*, **8**: 1101-1107.
- Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R.B. und Lin, C.Y. (2001).** Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.*, **158**: 1301-1311.
- Orr, F.W., Wang, H.H., Lefrenie, R.M., Scherbarth, S. und Nance, D.M. (2000).** Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J. Pathol.*, **190**: 310-329.
- Ossovskaya, V.S. und Bunnett, N.W. (2004).** Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.*, **84**: 579-621.
- Ossowski, L. (1996).** Experimental models of invasion and metastasis; can they provide reliable answers for the role of proteases in cancer? *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**: 1099-1103.
- Overall, C.M., Kleifeld, O. (2006) a.** Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **6**: 227-239.
- Overall, C.M., Kleifeld, O. (2006) b.** Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br. J. Cancer*, **94**: 941-946.
- Overall, C.M. (2004).** Dilating the degradome: matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) cuts to the heart of the matter. *Biochem. J.*, **383**: 5-7.
- Overall, C.M., Tam, E.M., Kappelhoff, R., Connor, A., Ewart, T., Morrison, C.J., Puente, X., Lopez-Otin, C. und Seth, A. (2004).** Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol. Chem.*, **385**: 493-504.
- Overall, C. M. und Lopez-Otin, C. (2002).** Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 657-672.
- Pantel, K. und Brakenhoff, R.H. (2004).** Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer*, **4**: 448-456.

- Pardee, A.B., Jacob, F. und Monod, J. (1958).** The role of the inducible alleles and the constutive alleles in the synthesis of beta-galactosidase in zygotes of *Escherichia coli*. *C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.*, **246**: 3125-3128.
- Parks, W.C., Wilson, C.L. und Lopez-Boado, Y.S. (2004).** Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **4**: 617-629.
- Pearsons, B., Wolf, P.L. und Vazquez, J. (1963).** A comparative study of a series of new indolyl compounds to localize beta-galactosidase in tissues. *Lab. Invest.*, **12**: 1249-1259.
- Pei, D. (2005).** Matrix metalloproteinases target protease-activated receptors on the tumor cell surface. *Cancer Cell*, **7**: 207-208.
- Poggi, A., Rossi, C., Casella, N., Bruno, C., Sturiale, L., Dossi, C. und Naggi, A. (2002).** Inhibition of B16-BL6 melanoma lung colonies by semisynthetic sulfaminoheparosan sulfates from *E. coli* K5 polysaccharide. *Semin. Thromb. Hemost.*, **28**: 383-392.
- Powers, J.C., Odake, S., Oleksyszyn, J., Hori, H., Ueda, T., Boduszek, B. und Kam, C. (1993).** Proteases-structures, mechanism and inhibitors. *Agents Actions Suppl.*, **42**: 3-18.
- Prandoni, P., Falanga, A. und Piccioli, A. (2005).** Cancer and venous thromboembolism. *Lancet Oncol.*, **6**: 401-410.
- Pruemer, J. (2005).** Prevalence, causes, and impact of cancer-associated thrombosis. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, **62**: 4-6.
- Putnam, J.B., Roysten, D., Chambers, A.F., Dunbar, S., Lemmer, J.H., Norman, P., Travis, E., Vaporciyan, A.A., Yang, S. und Zacharski, L.R. (2003).** Evaluating the role of serine protease inhibition in the management of tumor micrometastases. *Oncology*, **17**: 9-30.
- Quigley, J.P., Gold, L.I., Schwimmer, R. und Sullivan, L.M. (1987).** Limited cleavage of cellular fibronectin by plasminogen activator purified from transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**: 2776-2780.
- Rabbani, S.A. und Mazar, A.P. (2001).** The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, **10**: 393-415.
- Rajkumar, S.V., Richardson, P.G., Hideshima, T. und Anderson, K.C. (2005).** Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J. Clin. Oncol.*, **23**: 630-639.
- Ramos-DeSimone, N., Hahn-Datona, E., Siple, J., Nagase, H., French, D.L. und Quigley, J.P. (1999).** Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.*, **274**: 13066-13076.
- Rauch, B.H., Bretschneider, E., Braun, M. und Schror, K. (2002).** Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion. *Circ. Res.*, **90**: 1122-1127.
- Rebello, S.S., Blank, H.S., Rote, W.E., Vlasuk, G.P. und Lucchesi, B.R. (1997).** Antithrombotic efficacy of a recombinant nematode anticoagulant peptide (rNAP5) in canine models of thrombosis after single subcutaneous administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **283**: 91-99.
- Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Stürzebecher, J. und Stubbs, M.T. (1998).** Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA, and urokinase. *J. Med. Chem.*, **41**: 5445-5456.
- Reuning, U., Schmitt, M., Lubner, B., Beck, V. und Magdolen, V. (2006).** Methods to analyze the effects of the urokinase system on cancer cell adhesion, proliferation, migration, and signal transduction events. *Methods Mol. Med.*, **120**: 427-440.
- Reuning, U., Magdolen, V., Hapke, S. und Schmitt, M. (2003) a.** Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol. Chem.*, **384**: 1119-1131.

- Reuning, U., Sperl, S., Kopitz, C., Kessler, H., Krüger, A., Schmitt, M. und Magdolen, V. (2003) b.** Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): development of antagonists of uPA/uPAR interaction and their effects in vitro and in vivo. *Curr. Pharm. Des.*, **9**: 1529-1543.
- Reuning, U., Magdolen, V., Wilhelm, O.G., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H. und Schmitt, M. (1998).** Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int. J. Oncol.*, **13**: 893-906.
- Rezaie, A.R. (2003).** DX-9065a inhibition of factor Xa and the prothrombinase complex: mechanism of inhibition and comparison with therapeutic heparins. *Thromb. Haemost.*, **89**: 112-121.
- Rickles, F.R., Patierno, S. und Fernandez, P.M. (2003).** Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*, **124**: 58-68.
- Rickles, F.R. und Levine, M.N. (2001).** Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol.*, **106**: 6-12.
- Robertson, J.G. (2005).** Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry*, **44**: 5561-5571.
- Robinson, P.J. (2000).** Imaging liver metastases: current limitations and future prospects. *Br. J. Radiol.*, **73**: 234-241.
- Rockway, T.W. und Giranda, V.L. (2003).** Inhibitors of the proteolytic activity of urokinase type plasminogen activator. *Curr. Pharm. Des.*, **9**: 1483-1498.
- Rockway, T.W., Nienaber, V. und Giranda, V.L. (2002).** Inhibitors of the protease domain of urokinase-type plasminogen activator. *Curr. Pharm. Des.*, **8**: 2541-2558.
- Rooprai, H.K. und McCormick, D. (1997).** Proteases and their inhibitors in human brain tumours. *Anticancer Res.*, **17**: 4151-4162.
- Roose, J.P. und Van Noorden, C.J. (1995).** Synthetic protease inhibitors: promising compounds to arrest pathobiologic processes. *J. Lab. Clin. Med.*, **125**: 433-441.
- Rossi, C., Hess, S., Eckl, R.W., di Lena, A., Bruno, A., Thomas, O. und Poggi, A. (2006).** Effect of MCM09, an active site-directed inhibitor of factor Xa, on B16-BL6 melanoma lung colonies in mice. *J. Thromb. Haemost.*, **4**: 608-613.
- Sabeh, F., Ota, I., Holmbeck, K., Birkedal-Hansen, H., Soloway, P., Balbin, M., Lopez-Otin, C., Shapiro, S., Inada, M., Krane, S., Allen, E., Chung, D. und Weiss, S.J. (2004).** Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J. Cell Biol.*, **167**: 769-781.
- Sakata, K., Satoh, M., Someya, M., Asanuma, H., Nagakura, H., Oouchi, A., Nakata, K., Kogawa, K., Koito, K., Hareyama, M. und Himi, T. (2004).** Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, **100**: 356-365.
- Sampson, M.T. und Kakkar, A.K. (2002).** Coagulation proteases and human cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**: 201-207.
- Satomi, S., Yamasaki, Y., Tsuzuki, S., Hitomi, Y., Iwanga, T. und Fushiki, T. (2001).** A role for membrane-type serine protease (MT-SP1) in intestinal epithelial turnover. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**: 995-1002.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Daidone, M.G., Brynner, N., Duffy, M.J., Foekens, J.A. und Sweep, F.C. (2004).** Identification, validation, and clinical implementation of tumor-associated biomarkers to improve therapy concepts, survival, and quality of life of cancer patients: tasks of the Receptor and Biomarker Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Int. J. Oncol.*, **25**: 1397-1406.

- Schmitt, M., Wilhelm, O.G., Reuning, U., Krüger, A., Harbeck, N., Lengyel, E., Graeff, H., Gänsbacher, B., Kessler, H., Bürgle, M., Stürzebecher, J., Sperl, S. und Magdolen, V. (2000). The urokinase plasminogen activator system as a novel target for tumour therapy. *Fibrinol. Proteol.*, **14**: 114-132.
- Schmitt, M., Janicke, F., Moniwa, N., Chuckolowski, N., Pache, L. und Graeff, H. (1992). Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: biological and clinical significance. *Biol. Chem.*, **373**: 611-622.
- Schuster, V., Seidenspinner, S., Muller, C. und Rempen, A. (1999). Prenatal diagnosis in a family with severe type I plasminogen deficiency, liginous conjunctivitis and congenital hydrocephalus. *Prenat. Diagn.*, **19**: 483-487.
- Schuster, V., Mingers, A.M., Seidenspinner, S., Nussgens, Z., Pukrop, T. und Kreth, H.W. (1997). Homozygous mutations in the plasminogen gene of two unrelated girls with liginous conjunctivitis. *Blood*, **90**: 958-966.
- Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Banke, I.J., Arlt, M.J.E., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A. und Stürzebecher, J. (2004). Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.*, **279**: 33613-33622.
- Setyono-Han, B., Stürzebecher, J., Schmalix, W.A., Muehlenweg, B., Sieuwerts, A.M., Timmermans, M., Magdolen, V., Schmitt, M., Klijn, J.G. und Foekens, J.A. (2005). Suppression of rat breast cancer metastasis and reduction of primary tumour growth by the small synthetic urokinase inhibitor WX-UK1. *Thromb. Haemost.*, **93**: 779-786.
- Sidenius, N. und Blasi F (2003). The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, **22**: 205-222.
- Sinha, U., Lin, P.H., Edwards, S.T., Wong, P.W., Zhu, B., Scarborough, R.M., Su, T., Jia, Z.J., Song, Y., Zhang, P., Clizbe, L., Park, G., Reed, A., Hollenbach, S.J., Malinowsky, J. und Arfsten, A.E. (2003). Inhibition of purified factor Xa amidolytic activity may not be predictive of inhibition of in vivo thrombosis: implications for identification of therapeutically active inhibitors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**: 1098-1104.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. und Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**: 1107-1112.
- Skiles, J.W., Gonnella, N.C. und Jeng, A.Y. (2004). The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, **11**: 2911-2977.
- Soengas, M.S. und Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, **22**: 3138-3151.
- Soucie, J.M., Nuss, R., Evatt, B., Abdelhak, A., Cowan, L., Hill, H., Kolakoski, M. und Wilber, N. (2000). Mortality among males with hemophilia: relations with source of medical care. *Blood*, **96**: 437-442.
- Spencer, F.A. und Becker, R.C. Novel inhibitors of factor X for use in cardiovascular diseases. *Curr. Cardiol. Rep.*, **2**: 395-404.
- Sperl, S., Jacob, U., Arroyo de Prada, N., Stürzebecher, J., Wilhelm, O.G., Bode, W., Magdolen, V., Huber, R. und Moroder, L. (2000). (4-aminomethyl)phenylguanidine derivatives as nonpeptidic highly selective inhibitors of human urokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**: 5113-5118.
- Stadler, W.M., Kuzel, T.M., Raghavan, D., Levine, E., Vogelzang, N.J., Roth, B. und Dorr, F.A. (1997). Metastatic bladder cancer: advances in treatment. *Eur. J. Cancer*, **33**: 23-26.

- Stassen, J.M., Arnout, J. und Deckmyn, H. (2004).** The hemostatic system. *Curr. Med. Chem.*, **11**: 2245-2260.
- Stassens, P., Bergum, P.W., Gansemans, Y., Jespers, L., Laroche, Y., Huang, S., Maki, S., Messens, J., Lauwereys, M., Cappello, M., Hotez, P.J., Lasters, I. und Vlasuk, G.P. (1996).** Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**: 2149-2154.
- Staton, C.A., Brown, N.J. und Lewis, C.E. (2003).** The role of fibrinogen and related fragments in tumour angiogenesis and metastasis. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **3**: 1105-1120.
- Steinmetzer, T. (2003).** Synthetic urokinase inhibitors as potential antitumor drugs. *IDrugs*, **6**: 138-146.
- Stevenson, J.L., Choi, S.A. und Varki, A. (2005).** Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins-correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin. Cancer Res.*, **11**: 7003-7011.
- Stone, S.R. und Tapparelli, C. (1995).** Thrombin inhibitors as antithrombotic agents: the importance of rapid inhibition. *J. Enzyme Inhib.*, **9**: 3-15.
- Streuli, C. (1999).** Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **11**: 634-640.
- Stürzebecher, J., Vieweg, H., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stubbs, M.T., Renatus, M. und Wikstrom P. (1999).** 3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**: 3147-3152.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H. und Wikstrom, P. (1997).** Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J. Med. Chem.*, **40**: 3091-3099.
- Stürzebecher, J., Vieweg, H., Wikstrom, P., Turk, D. und Bode, W. (1992).** Interactions of thrombin with benzamidine-based inhibitors. *Biol. Chem.*, **373**: 491-496.
- Suzuki, M., Kobayashi, H., Kanayama, N., Saga, Y., Suzuki, M., Lin, C.Y., Dickson, R.B. und Terao, T. (2004).** Inhibition of tumor invasion by genomic down-regulation of matriptase through suppression of activation of receptor-bound pro-urokinase. *J. Biol. Chem.*, **279**: 14899-14908.
- Swartz, M.A. und Skobe, M. (2001).** Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc. Res. Tech.*, **55**: 92-99.
- Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R.B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T.M. und Bugge, T.H. (2003).** Type II transmembrane serine proteases. *Thromb. Haemost.*, **90**: 185-193.
- Szalony, J.A., Taite, B.B., Girard, T.J., Nicholson, N.S. und LaChance R.M. (2002).** Pharmacological intervention at disparate sites in the coagulation cascade: comparison of anti-thrombotic efficacy vs bleeding propensity in a rat model of acute arterial thrombosis. *J. Thromb. Thrombolysis*, **14**: 113-121.
- Takeuchi, T., Harris, J.L., Huang, W., Yan, K.W., Coughlin, S.R. und Craik, C.S. (2000).** Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J. Biol. Chem.*, **275**: 26333-26342.
- Tam, E.M., Morrison, C.J., Wu, Y.I., Stacks, M.S. und Overall, C.M. (2004).** Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**: 6917-6922.
- Tanaka, M., Arai, H., Liu, N., Nogaki, F., Nomura, K., Kasuno, K., Oida, E., Kita, T. und Oono, T. (2005).** Role of coagulation factor Xa and protease-activated receptor 2 in human mesangial cell proliferation. *Kidney Int.*, **67**: 2123-2133.

- Tanimoto, H., Underwood, L.J., Wang, Y., Shigemasa, K., Parmley, T.H. und O'Brien, T.J. (2001).** Ovarian tumor cells express a transmembrane serine protease: a potential candidate for early diagnosis and therapeutic intervention. *Tumour Biol.*, **22**: 104-114.
- Telfer, T.P., Denson, K.W. und Wright, D.R. (1956).** A new coagulation defect. *Br. J. Haematol.*, **2**: 308-316.
- Trousseau, A. (1895).** Phlegmasia alba dolens. *Clin. Med. Hotel Dieu de Paris.* The New Sydenham Society, London, **3**: 95.
- Tsirka, S.E. (2002).** Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem. Soc. Trans.*, **30**: 222-225.
- Tsuchiya, Y., Sawada, S., Yoshioka, I., Ohashi, Y., Matsuo, M., Harimaya, Y., Tsukada, K. und Saiki, I. (2003).** Increased surgical stress promotes tumor metastasis. *Surgery*, **133**: 547-555.
- Tuszynski, G.P., Gasic, T.B. und Gasic, G.J. (1987).** Isolation and characterization of antistasin. An inhibitor of metastasis and coagulation. *Biol. Chem.*, **262**: 9718-9723.
- Undevia, S.D., Gomez-Abuin, G. und Ratain, M.J. (2005).** Pharmacokinetic variability of anti-cancer agents. *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 447-458.
- Venkateswarlu, D., Perera, L., Darden, T. und Pedersen, L.G. (2002).** Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X. *Biophys. J.*, **82**: 1190-1206.
- Versteeg, H.H., Spek, C.A., Peppelenbosch, M.P. und Richel, D.J. (2004).** Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. *Mol. Med.*, **10**: 6-11.
- Vihinen, P. und Kähäri, V.M. (2002).** Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int. J. Cancer*, **99**: 157-166.
- Visse, R. und Nagase, H. (2003).** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases, structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, **92** : 827-839.
- Voigt, W. (2005).** Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol. Med.*, **110**: 39-48.
- Wada, H., Sase, T. und Yamaguchi, M. (2005).** Hypercoagulant states in malignant lymphoma. *Exp. Oncol.*, **27**: 179-185.
- Wagner, C. (1999).** *Molekulare Onkologie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Walsh, P.N. und Ahmad, S.S. (2002).** Proteases in blood clotting. *Essays Biochem.*, **38**: 95-111.
- Weigelt, B., Peterse, J.L. und van't Veer, L.J. (2005).** Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer*, **5**: 591-602.
- Wiles, N. und Hunt, B.J. (2006).** Anticoagulation via anti-Factor Xa inhibition. *Lupus*, **15**: 167-171.
- Workman, P., Abogaye, E.O., Chung, Y.L., Griffiths, J.R., Hart, R., Leach, M.O., Maxwell, R.J., McSheehy, P.M., Price, P.M. und Zweit J. (2006).** Minimally invasive pharmacokinetic and pharmacodynamic technologies in hypothesis-testing clinical trials of innovative therapies. *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**: 580-598.
- Xie, W.Z., Leibl, M., Clark, M.R., Dohrmann, P., Kunze, T. und Gieseler, F. (2005).** Activation of the coagulation system in cancerogenesis and metastasation. *Biomed. Pharmacother.*, **59**: 70-75.
- Xu, R., Zhou, B., Fung, P.C. und Li, X. (2006).** Recent advances in the treatment of colon cancer. *Histol. Histopathol.*, **21**: 867-872.
- Yusuf, S., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Afzal, R., Pogue, J., Granger, C.B., Budaj, A., Peters, R.J., Bassand, J.P., Wallentin, L., Joyner, C. und Fox, K.A. (2006).** Comparison of fondaparinux and enoxaparin in acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.*, **354**: 1464-1476.

- Zacharski, L.R., Hommann, M. und Kaufmann, R. (2004).** Rationale for clinical trials of coagulation: reactive drugs in hepatocellular carcinoma. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.*, **2**: 777-784.
- Zacharski, L.R. (2003).** Malignancy as a solid-phase coagulopathy: implications for the etiology, pathogenesis, and treatment of cancer. *Semin. Thromb. Hemost.*, **29**: 239-246.
- Zacharski, L.R. (2002).** Anticoagulants in cancer treatment: malignancy as a solid phase coagulopathy. *Cancer Lett.*, **186**: 1-9.
- Zacharski, L.R., Memoli, V.A. und Rousseau, M. (1988).** Thrombin-specific sites of fibrinogen in small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, **62**: 299-302.
- Zacharski, L.R., Memoli, V.A. und Rousseau, M. (1986).** Coagulation-cancer interaction in situ in renal cell carcinoma. *Blood*, **68**: 394-399.
- Zeslawska, E., Schweinitz, A., Karcher, A., Sondermann, P., Sperl, S., Stürzebecher, J. und Jacob, U. (2000).** Crystals of the urokinase type plasminogen activator variant beta(c)-uPA in complex with small molecule inhibitors open the way towards structure-based drug design. *J. Mol. Biol.*, **301**: 465-475.
- Zucker, S., Cao, J. und Chen, W. T. (2000).** Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene*, **19**: 6642-6650.

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildung 2.1:</u>	Schematische Darstellung der Entstehung von Metastasen.....	S. 4
<u>Abbildung 2.2:</u>	Schematische Darstellung des uPA-Systems.....	S. 12
<u>Abbildung 2.3:</u>	Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade.....	S. 15
<u>Tabelle 4.1:</u>	Strukturformeln, Inhibitionskonstanten (K_i) und Halbwertszeiten der Eliminationsrate (β -Phase, $t_{1/2}$) der CJ-Inhibitoren und des Inhibitors DX-9065a.....	S. 39
<u>Tabelle 4.2:</u>	<i>TaqMan Primer</i> und Sonden.....	S. 52
<u>Abbildung 5.1:</u>	Expression von murinem uPA in der Leber im Zeitverlauf des T-Zelllymphom-Metastasierungsprozesses.....	S.55
<u>Abbildung 5.2:</u>	Therapeutische Wirkung der uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-503 und CJ-435 auf die Makrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell.....	S. 57
<u>Abbildung 5.3:</u>	Therapeutische Wirkung der uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-435 und CJ-503 und des FXa-Inhibitors CJ-504 auf die Makrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell.....	S. 60
<u>Abbildung 5.4:</u>	Therapeutische Wirkung des uPA-Inhibitors CJ-513 und der unterschiedlich selektiven FXa-Inhibitoren CJ-510, CJ-441, CJ-504 und DX-9065a auf die Makrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell.....	S. 62
<u>Abbildung 5.5:</u>	Therapeutische Wirkung der Inhibitoren CJ-513 und CJ-504 auf die Mikrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell.....	S. 64
<u>Abbildung 5.6:</u>	Expression von muriner FX- und Matriptase mRNA in der Leber im Zeitverlauf des T-Zelllymphom-Metastasierungsprozesses.....	S. 66
<u>Abbildung 5.7:</u>	Zymographische Analyse der Expression von uPA und den Gelatinasen MMP-2 und -9 in der Leber nach anti-metastatischer sSPI-Therapie.....	S. 68
<u>Abbildung 5.8:</u>	Therapeutische Wirkung subkutaner und intraperitonealer Therapie mit CJ-504 auf die Metastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell.....	S. 69
<u>Tabelle 5.1:</u>	Strukturformel, Inhibitionskonstanten (K_i), FXa-Selektivität und Halbwertszeit der Eliminationsrate (β -Phase, $t_{1/2}$) des FXa-Inhibitors WX-FX4.	S. 71
<u>Tabelle 5.2:</u>	Erforderliche Konzentrationen von WX-FX4 und DX-9065a, um eine Verdopplung der Gerinnungszeiten (IC_{200} -Werte von aktivierter partieller Thromboplastinzeit [aPTT] und Prothrombin-Zeit [PT]) und eine 50%ige Verringerung der Prothrombinase-Komplex Aktivität (IC_{50} -Werte) zu erzielen.....	S. 72
<u>Abbildung 5.9:</u>	Einfluß von WX-FX4 auf die Gerinnungszeiten von Plasma und Vollblut <i>in vitro</i>	S. 74

<u>Abbildung 5.10:</u>	Therapeutische Wirkung von WX-FX4 auf die Makro- und Mikrometastasierung der Leber im murinen L-CI.5s T-Zell-Lymphommodell.....	S. 76
<u>Abbildung 5.11:</u>	Therapeutische Wirkung von WX-FX4 auf die Metastasierung der Lunge im humanen Fibrosarkommodell.....	S. 79
<u>Abbildung 5.12:</u>	Therapie mit WX-FX4 verhindert tumorbedingten Gewichtsverlust der Tiere im humanen Fibrosarkommodell.....	S. 81
<u>Abbildung 5.13:</u>	Therapie mit WX-FX4 hat keinen Einfluss auf die Gerinnungszeit <i>ex vivo</i>	S. 82
<u>Abbildung 5.14:</u>	Zymographische Analyse der Expression von uPA und den Gelatinasen MMP-2 und -9 in den Zielorganen der Metastasierung nach antimetastatischer Therapie mit WX-FX4.....	S. 84
<u>Abbildung 5.15:</u>	Therapie mit WX-FX4 verlängert das Überleben im humanen Fibrosarkommodell.....	S. 85
<u>Abbildung 5.16:</u>	Therapeutische Wirkung von CJ-463 auf die Metastasierung der Lunge im humanen Fibrosarkommodell.....	S.88
<u>Abbildung 5.17:</u>	Therapie mit CJ-463 verhindert tumorbedingten Gewichtsverlust der Tiere im humanen Fibrosarkommodell.....	S.91
<u>Abbildung 5.18:</u>	Therapie mit CJ-463 verlängert das Überleben im humanen Fibrosarkommodell.....	S. 93

9 Abkürzungsverzeichnis

aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ECM	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Grundsubstanz
FVIIa	Serinprotease Blutgerinnungsfaktor VIIa
FXa	Serinprotease <i>Stuart(-Prower)-factor</i> , Blutgerinnungsfaktor Xa, FXa
HMW	<i>high molecular weight</i> , hochmolekular, hohes Molekulargewicht
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
LMW	<i>low molecular weight</i> , niedriges Molekulargewicht
MMP	Matrix Metalloprotease
mu	murin
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PAR	<i>protease activated receptor</i> , Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PT	Prothrombin-Zeit
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
sSPIs	synthetische Serinproteaseinhibitoren/-hemmstoffe
TF	<i>tissue factor</i> , Gewebsthromboplastin
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i> , Gewebe-Typ Plasminogenaktivator
TZI	Tumorzellinokulation
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i> , Urokinase-Typ Plasminogenaktivator
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i> , Urokinase-Typ Plasminogenaktivator-Rezeptor
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranoside

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Achim Krüger**, meinem Doktorvater, für die Vergabe des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung; jederzeit stand er mir engagiert als kritischer Ansprech- und Diskussionspartner zur Verfügung. Er führte mich hervorragend in das wissenschaftliche Arbeiten ein und inspirierte mich stets, auch in schwierigeren Zeiten, durch seine innovativen und konstruktiven Anregungen und ausgezeichneten Ideen. Darüber hinaus begeisterte er mich durch seine hochmotivierte und produktive Arbeitsweise für Forschung und Wissenschaft. Insbesondere möchte ich mich auch für meine Einarbeitung in die tierexperimentellen Methoden und für die Durchführung der Tumorzellinokulationen bedanken.

Meinem Betreuer **Dr. Matthias J.E. Arlt**, der auf dem Weg der Dissertation stets zuverlässig an meiner Seite war, möchte ich hier herzlich meinen freundschaftlichen Dank aussprechen. Er unterstützte mich intensiv und unermüdlich mit hilfreichen Anmerkungen und kreativen Ideen, verbrachte viele fruchtbare Stunden mit mir bei der Durchführung der Tierexperimente im Tierstall und am Computer und trug durch seine ständige Hilfsbereitschaft und immer präsente Gesprächsbereitschaft entscheidend zum Gelingen der Arbeit bei.

Ich danke **Prof. Dr. Bernd Gänsbacher** für die Möglichkeit, in seinem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung diese wissenschaftliche Arbeit anzufertigen sowie für seinen ansteckenden Enthusiasmus und die anregenden Diskussionen.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** im Rahmen des **Sonderforschungsbereiches 469** sowie bei dem *Cancerdegradome* des *Framework Programme 6 der Europäischen Union* (beide an Prof. Dr. Achim Krüger) bedanken.

Mein weiterer Dank gilt **Prof. Dr. Jörg Stürzebecher** (Klinikum der Universität Jena, Erfurt) sowie **Dr. Andrea Schweinitz** und **Dr. Torsten Steinmetzer** (Curacyte Chemistry GmbH, Jena) für die Bereitstellung der uPA-Inhibitoren CJ-513, CJ-502, CJ-435, CJ-503 und CJ-463 und der FXa-Inhibitoren CJ-504, CJ-510, CJ-441 und DX-9065a, für die Bereitstellung der Inhibitionskonstanten, der Bestimmung der Prothrombinasekomplexaktivität, Gerinnungsparameter aPTT und PT und Eliminationskinetiken sowie für die vielfältige Unterstützung und die langen fruchtbaren Diskussionen. Auch **Dr. Helmut Giersiefen** (Curacyte AG, München) möchte ich für Bereitstellung des Hemmstoffs CJ-463 im Rahmen der Kooperation danken.

Prof. Dr. Luis Moroder und **Dr. Markus M. Müller** (MPI München, Martinsried) danke ich für die Bereitstellung des FXa-Inhibitors WX-FX4 im Rahmen des SFB 469 und für die stete konstruktive Kooperationsbereitschaft.

Bei **Dr. Caroline Pennington** und **Prof. Dr. Dylan R. Edwards** (University of East Anglia, Norwich, Großbritannien) möchte ich mich für die Durchführung der Quantitativen RT-PCR sowie für die konstruktive Unterstützung und produktive Zusammenarbeit bedanken.

Auch **Prof. Dr. Axel Stemberger** und **Dr. Sabine Brandt** haben mir bei der Einarbeitung in der Thrombelastographie und durch die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen zu der FXa-Thematik sowie der konstruktiven Unterstützung bei den Publikationen sehr geholfen.

Dr. Ali Amirkhosravi (Florida Hospital Cancer Institute, Orlando, Florida, U.S.A.) und **Dr. Stefan Sperl** (Wilex AG, München) bin ich dankbar für die wertvollen kritischen Anmerkungen und interessanten Diskussionen zu den Ergebnissen mit FXa-Inhibitoren. **Dr. Ali Amirkhosravi** danke ich zudem für die Bestimmung der Plättchenaggregation, **Dr. Stefan Sperl** für einen Teil der Zytotoxizitätsbestimmungen.

Hervorzuheben ist auch die kompetente Hilfe, die ich von **Dr. Charlotte Kopitz** erfahren habe. Sie hat mich souverän in verschiedene biochemische Methoden eingearbeitet und mich vielfach tatkräftig unterstützt bei der Durchführung der Tierversuche wie auch durch die sehr konstruktiven Gespräche und Kritiken. Außerdem konnte ich ihre stabil mit dem *lacZ*-Gen transfizierten HT1080 Fibrosarkomzellen in den Tierversuchen verwenden. Zudem bedanke ich mich ganz herzlich bei Ihr für das Korrekturlesen der Arbeit.

Katja Honert danke ich für die Einführung in die Arbeiten der Zellkultur und verschiedene molekularbiologische Arbeitstechniken sowie für die stets hilfsbereite vielfältige Unterstützung. **Stephanie Hahn** danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Thrombelastographie sowie für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen zu der FXa-Thematik. Allen nicht namentlich genannten **Mitarbeitern der AG Krüger**, den beteiligten **Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung** und ganz besonders den **Tierpflegerinnen** des Instituts möchte ich an dieser Stelle für die hervorragende Zusammenarbeit und Unterstützung der letzten Jahre meinen Dank aussprechen.

In Liebe und großer Dankbarkeit denke ich an meine **Eltern**, meinen Bruder **Bernd** und meine Verwandten **Gerda** und **Kai Sitter** und ihre bemerkenswerte Unterstützung.

Ein besonderer Dank von Herzen geht an **Juliane Gemaßmer** und **Leon**, die mir stets liebevoll und kräftespendend zur Seite standen und mich großartig unterstützten.

I Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Banke
Vornamen: Ingo Jörg
Geburtsdatum, -ort: 09.11.1977, Landsberg am Lech
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1984 - 1988 Grundschole in Schondorf am Ammersee
1988 - 1997 Gymnasium Landheim Schondorf am Ammersee
06/1997 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1997 - 06/1998 Sanitäter und Arzthelfer, Gebirgsjäger Mittenwald
10/1997 - 05/1998 Krankenpflegelehrgang (Sanitätslehrgang II)

Hochschulbildung:

10/1998 - 09/2000 **Vorklinisches Studium der Medizin**
Ludwig-Maximilians-Universität München
08/2000 Ärztliche Vorprüfung
10/2000 - 05/2005 **Klinisches Studium der Medizin**
Technische Universität München, Klinikum rechts der Isar
08/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 - 08/2003 Promotionsarbeit bei Prof. Dr. A. Krüger,
AG „Molekulare Onkologie“,
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung
03/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ärztliche Prüfung
05/2005 Approbation als Arzt
06/2005 - 09/2005 Einreichung der dritten Publikation im Rahmen der Promotion

Famulaturen im In- und Ausland:

04/1999, **Allgemein- und Viszeralchirurgie, Endoskopie**
08/1999 - 09/1999 PD Dr. B. Eibl-Eibesfeldt
Euromed Clinic, Fürth
08/2000 - 10/2000 **Experimentelle Onkologie und Therapieforchung**
PD Dr. A. Krüger und Prof. Dr. B. Gänsbacher
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
02/2001 - 03/2001 **Allgemein-, Viszeral-, Endoskopische- und Gefäßchirurgie**
PD Dr. B. Eibl-Eibesfeldt und Prof. Dr. H.-J. Günther
Kliniken Dr. Erler, Nürnberg

04/2001 **Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie,**
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

09/2001 - 10/2001 **Orthopädie, Unfallchirurgie und chirurgische Notfallambulanz,**
Queen Elizabeth Hospital, School of Clinical Medicine and Research,
University of the West Indies, Bridgetown, Barbados

03/2003 - 05/2003 **Orthopädie, Unfallchirurgie und Allgemeinchirurgie**
Chris Hani Baragwanath University Hospital,
Surgery and Trauma Center,
University of the Witwatersrand, Johannesburg, Südafrika

Praktisches Jahr im In- und Ausland

04/2004 - 06/2004 **Unfallchirurgie**
Prof. Dr. S. v. Gumpfenberg und Prof. Dr. M. Scherer
Chirurgische Klinik und Poliklinik,
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

06/2004 - 08/2004 **Hand-, Plastische- und Wiederherstellungschirurgie**
Prof. Dr. J. Grünert
Kantonsspital St. Gallen, Schweiz

08/2004 - 12/2004 **Toxikologie und Allgemeine Gastroenterologie**
II. Medizinische Klinik und Poliklinik,
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

12/2004 - 03/2005 **Orthopädie**
Prof. Dr. C. Gerber
Orthopädische Universitätsklinik Balgrist, Zürich, Schweiz

Assistenzarzt

seit 17.10.2005 zunächst 24 Monate Basisweiterbildung Chirurgie
(„Common Trunk“), Chirurgische Klinik und Poliklinik,
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

II Eigene Publikationen

Die wesentlichen Teile *der vorliegenden Arbeit* wurden vorab in nachfolgend aufgeführten Publikationen veröffentlicht.

Originalpublikationen:

Banke, I.J., Arlt, M.J.E., Müller, M.M., Sperl, S., Stemberger, A., Stürzebecher, J., Amirkhosravi, A., Moroder, L. und Krüger, A. (2005). Efficient inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anti-coagulant activity. *Thromb. Haemost.*, **94**: 1084-1093.

Schweinitz, A., Steinmetzer, T., **Banke, I.J.**, Arlt, M.J.E., Stürzebecher, A., Schuster, O., Geissler, A., Giersiefen, H., Zeslawska, E., Jacob, U., Krüger, A. und Stürzebecher, J. (2004). Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J. Biol. Chem.*, **279**: 33613-33622.

Banke, I.J., Arlt, M.J.E., Pennington, C., Kopitz, C., Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Gansbacher, B., Quigley, J.P., Edwards, D.R., Stürzebecher, J. und Krüger, A. (2003). Increase of anti-metastatic efficacy by selectivity- but not affinity-optimization of synthetic serine protease inhibitors. *Biol. Chem.*, **384**: 1515-1525.

Review:

Krüger, A., Krebs, T. und **Banke, I.J.** (2007). Anti-metastatic effects of serine protease inhibitors: animal models for analysis. *Haemostaseologie*, **27**: 64-70.