

LOAN BAN EXPIRES

~~4-MAY-2001~~

Deutsche Gesellschaft
für **Chirurgie**

Forumband 2001 · Band 30
Schriftleitung: M. D. Menger

600000

**Chirurgisches
Forum 2001
für experimentelle
und klinische
Forschung**

Herausgeber: K. Schönleben, Präsident

4-MAY-2001 BSDS

BOSTON SPA
LS23 7BQ

CHIRURGISCHES FORUM FÜR EXPERIMENTELLE UND
KLINISCHE FORSCHUNG

*E/OC



3181.473000

ISSU 118



Springer

1/1

II. Molekulare Onkologie 1

- Die Rolle der Apoptose-regulierenden Proteine Bcl-xL und Bax
in der durch Gemcitabin induzierten Cytotoxizität beim Pankreaskarzinom
*The role of the apoptosis-regulating proteins Bcl-xL and Bax
in gemcitabine-induced cytotoxicity in pancreatic carcinoma*
H. Ungefroren, B. Schniewind, D. Henne-Bruns und H. Kalthoff 25
- Inhibition von ICE (Caspase-1) induziert Zelltod in Pankreaskarzinomzellen
Inhibition of ICE (caspase-1) induces cell death in pancreatic carcinoma cells
S. Schlosser, F. Gansauge, M. Ramadani, H. G. Beger und S. Gansauge 29
- Prävention von Metastasenwachstum beim Pankreaskarzinom
in vivo durch Apoptoseinduktion mittels Genistein
*Prevention of metastatic pancreatic cancer growth in vivo by induction
of apoptosis with genistein*
M. W. Müller, P. Büchler, H. A. Reber, O. J. Hines, H. Friess, M. W. Büchler
und H. G. Beger 33
- Rapamycin inhibiert das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung
über Antiangiogenese
Rapamycin inhibits tumor growth and metastasis by antiangiogenesis
M. Guba, P. von Breitenbuch, E. Geissler, S. Farkas, C. Zülke, M. Anthuber,
K.-W. Jauch und M. Steinbauer 37
- Anti-angiogene Gentherapie mittels eines dominant negativen VEGF-R2
kodierendem Retrovirus
Antiangiogenic gene therapy with a dominant negative VEGF-R2 mutant retrovirus
P. Büchler, H. A. Reber, M. W. Büchler, H. Friess, A. Ullrich, O. J. Hines und H. G. Beger . 41
- Anti-angiogenetische Therapie zur Behandlung vom humanen Pankreaskarzinom
nach orthotoper Implantation in die Nacktmaus durch Blockade von NFκB
mit Hilfe des Proteasom Inhibitor PS-341
*Antiangiogenic therapy for the treatment of human pancreatic cancer orthotopically
implanted in nude mice via the inhibition of NFκB using the proteasome inhibitor
PS-341*
C. J. Bruns, M. T. Harbsion, R. J. Bold, J. P. Elliot, J. Adams, J. Abbruzzese,
A. H. Hölscher und D. J. McConkey 45

III. Molekulare Onkologie 2

- Expression der Multi-Drug-Resistance-Gene *mdr1* und *mrp*
in kolorektalen Karzinomen
*Expression of multidrug-resistance genes *mdr1* and *mrp* in colorectal carcinoma*
C. G. Schneider, S. B. Hosch, A. Reymann, G. Fröschle, J.-H. Bräsen und J. R. Izbicki . 49

Rapamycin inhibiert das Tumorwachstum und die Tumormetastasierung über Antiangiogenese

Rapamycin inhibits tumor growth and metastasis by antiangiogenesis

M. Guba¹, P. von Breitenbuch², E. Geissler², S. Farkas¹, C. Zülke¹, M. Anthuber¹, K.-W. Jauch¹ und M. Steinbauer¹

¹ Klinik und Poliklinik für Chirurgie

² Chirurgische Forschung der Universität Regensburg

Abstract

Conventional immunosuppressive drugs have been used effectively to prevent immunologic rejection in organ transplantation. However, cancer development and recurrence are ominous risk factors for these immunocompromised patients. In the present study we show that the new immunosuppressive drug rapamycin may have a unique ability to reduce the risk of cancer development, while simultaneously providing effective immunosuppression. Experimentally, rapamycin inhibited tumor metastasis and angiogenesis in *in vivo* mouse models. Furthermore, rapamycin demonstrated antiangiogenic activities linked to vascular endothelial growth factor antagonism. In contrast, the most widely recognized immunosuppressive drug, cyclosporine, promoted both primary tumor growth and metastasis in our models. This study suggests that the use of rapamycin, instead of cyclosporine, may reduce the chance of recurrent, or *de novo*, cancer development in high-risk transplant patients.

Einleitung

Tumorrezidive nach Transplantation bei Tumorpatienten oder *de novo* Entstehung von malignen Tumoren unter Immunsuppression stellen häufige und gefürchtete Komplikationen dar. Die Immunsuppression an sich erhöht das Risiko einer *de novo* Malignomentstehung um das 3-4-fache [3]. 54% der Patienten, die nach einer erfolgreichen Tumortherapie aufgrund einer Nierentransplantation immunsupprimiert werden, erleiden ein Tumorrezidiv innerhalb von 2 Jahren [1]. Nach Lebertransplantation aufgrund eines Cholangiokarzinoms wurden mit 51% etwa vergleichbar hohe Rezidivraten festgestellt [2]. Daher stellen Malignome nach erfolgreicher Transplantation, die häufigste Todesursache bei immunsupprimierten Patienten dar. Um die Malignomrate bei diesem Patientengut zu verringern, sollten optimaler Weise Immunsuppressiva verwendet werden, die gleichzeitig eine antitumorale Potenz besitzen. In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass der Einsatz von Rapamycin als Immunsuppressivum diesem Anforderungsprofil entsprechen könnte.

Methodik

Der Einfluss einer immunsuppressiven Dosis von Cyclosporin (10 mg/kg i.p. tägl.) und Rapamycin (1,5 mg/kg i.p. tägl.) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel) auf die Lebermetastasierung wurde am Tag 10 nach intraportaler Injektion von 3×10^5 CT-26 Maus Kolonkarzinomzellen bestimmt. Neben der Bestimmung des Lebergewichts und der Oberflächenmetastasierung wurden die Lebern histologisch untersucht. Der Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) Spiegel der Tiere wurde mittels ELISA gemessen ($n = 7$). In der transparenten Rückenhautkammer wurde zusätzlich der Einfluss der Immunsuppressiva auf das Tumorwachstum [Tumorzellen (TV)] und die Tumorneoangiogenese [Mikrovaskuläre Dichte (MVD)] unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie am Tag 1, 3, 5, 7, 9 und 11 bestimmt ($n = 7$). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Ergebnisse

Die tägliche Gabe von Rapamycin in immunsuppressiver Dosierung (Talspiegel am Tag 10: Rapamycin 39 ± 6 ng/ml vs. Cyclosporin 118 ± 21 ng/ml) führte zu einer deutlichen Reduktion der Metastasierung von CT-26 Zellen. Im Gegensatz zu Cyclosporin und der Kontrollgruppe zeigten Rapamycin behandelte Tiere ein signifikant geringeres Lebergewicht (Cyclosporin $1,9 \pm 0,1^*$ vs. Kontrolle $1,7 \pm 0,1$ vs. Rapamycin $1,3 \pm 0,1^*$ g) sowie eine signifikante Reduktion der Anzahl von Oberflächenmetastasen (Cyclosporin $203 \pm 32^*$ vs. Kontrolle 155 ± 32 vs. Rapamycin $25 \pm 10^*$) am Tag 10 nach intraportaler Injektion der Tumorzellen. Die histologische Auswertung der Leberschnitte zeigte bei Cyclosporin behandelten Tieren invasiv wachsende, gefäßreiche Tumore, während Rapamycin behandelte Tiere zum gleichen Zeitpunkt kleine, disseminierte und auffallend avaskuläre Tumore aufwiesen. Rapamycin führte dabei zu einer signifikanten Verringerung der Serum VEGF Spiegel (Cyclosporin $79 \pm 14^*$ vs. Kontrolle 60 ± 3 vs. Rapamycin $38 \pm 2^*$ pg/ml). Darüberhinaus führte Rapamycin im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikant verringerten Tumorwachstum (TV am Tag 13: Cyclosporin $207 \pm 80^*$ vs. Kontrolle 158 ± 56 vs. Rapamycin $33 \pm 12^*$ mm³) in der transparenten Rückenhautkammer. In der Intravitalmikroskopie konnten wir eine deutliche Verminderung der Tumorneoangiogenese (MVD am Tag 11: Cyclosporin $179 \pm 14^*$ vs. Kontrolle 116 ± 9 vs. Rapamycin $35 \pm 6^*$ cm⁻¹) als Ursache für dieses Phänomen identifizieren. Die Immunsuppression mit Cyclosporin zeigte bei beiden Parametern den gegenteiligen Effekt.

Diskussion und Schlussfolgerung

Die vorliegenden Daten im Mausmodell zeigen, dass Rapamycin in einer immunsuppressiven Dosierung eine zusätzliche antitumorale Wirkung besitzt. Dieser Effekt auf das Tumorwachstum beruht auf einer antiangiogenetischen Wirkung, die auf eine verringerte VEGF Produktion der Tumorzellen zurückgeführt werden konnte. Diesen Ergebnissen kommt eine besondere Bedeutung zu, da zum gegenwärtigen Zeitpunkt davon ausgegangen werden muss, dass die bisherige Immunsuppression sowohl die *de novo* Tumorentstehung, als auch die Tumorprogression offensichtlich begünstigt [4]. Aus diesem Grund halten wir die Überprüfung dieser experimentellen Daten in kontrollierten Studien an

Patienten, die
nome transpl
sporin einges

Literatur

1. Penn I (2000)
2. Meyer CG, Pe
Transplantati
3. Penn I. (1998
147-158
4. Hojo M, Mor
Cyclosporine

Korresponden
sität Regenst
6801, Fax: ++

Patienten, die wegen einer Tumoranamnese oder bei erhöhtem Risiko für *de novo* Karzinome transplantiert werden, für notwendig. Dabei sollte Rapamycin alternativ zu Cyclosporin eingesetzt werden.

Literatur

1. Penn I (2000) Cancers in renal transplant recipients. *Adv Ren Replace Ther* 7: 147-156
2. Meyer CG, Penn I, James L (2000) Liver transplantation for cholangio-carcinoma: results in 207 patients. *Transplantation* 69: 1633-1637
3. Penn I. (1998) Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl* 147-158
4. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397: 530-534

Korrespondenzadresse: Dr. med. M. Guba, Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93042 Regensburg, Tel.: ++49(0) 941/944-6801, Fax: ++49(0) 941/944-6802, e-mail: markus.guba@klinik.uni-regensburg.de

Rapamycin inhibits tumor growth and metastasis by antiangiogenesis

M. Guba¹, P. von Breitenbuch², E. Geissler², S. Farkas¹, C. Zülke¹, M. Anthuber¹, K.-W. Jauch¹ and M. Steinbauer¹

¹ Surgical Clinic and Polyclinic

² Surgical Research at the University of Regensburg

Abstract

Conventional immunosuppressive drugs have been used effectively to prevent immunologic rejection in organ transplantation. However, cancer development and recurrence are ominous risk factors for these immunocompromised patients. In the present study we show that the new immunosuppressive drug rapamycin may have a unique ability to reduce the risk of cancer development, while simultaneously providing effective immunosuppression. Experimentally, rapamycin inhibited tumor metastasis and angiogenesis in *in vivo* mouse models. Furthermore, rapamycin demonstrated antiangiogenic activities linked to vascular endothelial growth factor antagonism. In contrast, the most widely recognized immunosuppressive drug, cyclosporine, promoted both primary tumor growth and metastasis in our models. This study suggests that the use of rapamycin, instead of cyclosporine, may reduce the chance of recurrent, or *de novo*, cancer development in high-risk transplant patients.

Abstract

Tumor recurrence after transplantation in tumor patients or *de novo* malignant tumor development in patients whilst immunosuppressed constitute a frequent and dreaded complication. Immunosuppression increases the risk of *de novo* malignant tumor development 3 to 4 fold [3]. A total of 54% of patients who are immunocompromised due to a kidney transplant following successful tumor therapy suffer from tumor recurrence within 2 years [1]. Following liver transplants due to cholangiocarcinoma, a comparatively high recurrence rate of 51% was observed [2]. This makes malignant tumors after successful transplantation the most frequent cause of death in immunocompromised patients. To lower the malignant tumor rate in this patient population, ideally immunosuppressive drugs should be used which also exhibit antitumor potency. In the present paper, we demonstrate that the use of rapamycin as an immunosuppressive drug could meet these requirements.

Surgical Forum 2001, Volume 30

Methodology

The influence of an immunosuppressive dosage of cyclosporine (10 mg/kg i.p. daily) and rapamycin (1.5 mg/kg i.p. daily), compared to the control group (excipient), on liver metastasis was determined on day 10 after the intraportal injection of 3×10^5 CT-26 mouse colon carcinoma cells. In addition to determining the weight of the liver and surface metastasis, the livers were histologically analyzed. The serum vascular endothelial growth factor (VEGF) levels of the animals were measured using ELISA ($n = 7$). In the transparent skinfold chamber, additionally the influence of the immunosuppressive drugs on tumor growth [tumor volume (TV)] and the tumor neoangiogenesis [microvascular density [MVD]] was determined using intravital microscopy on days 1, 3, 5, 7, 9 and 11 ($n = 7$). * $p < 0.05$ vs. control group.

Results

The daily administration of an immunosuppressive dosage of rapamycin (trough level on day 10: rapamycin 39 ± 6 ng/ml vs. cyclosporine 118 ± 21 ng/ml) resulted in a considerable decrease in CT-26 cell metastasis. In contrast to cyclosporine and the control group, animals treated with rapamycin exhibited a significantly lower liver weight (cyclosporine $1.9 \pm 0.1^*$ vs. controls 1.7 ± 0.1 vs. rapamycin $1.3 \pm 0.1^*$ g), and the number of surface metastases was significantly reduced (cyclosporine $203 \pm 32^*$ vs. controls 155 ± 32 vs. rapamycin $25 \pm 10^*$) on day 10 after the intraportal injection of the tumor cells. The histological evaluation of the liver sections showed invasive growth of tumors containing plenty of vessels in animals treated with cyclosporine, while animals treated with rapamycin contained small, disseminated and strikingly avascular tumors over the same time frame. Rapamycin resulted in a significant reduction in the serum VEGF level (cyclosporine $79 \pm 14^*$ vs. controls 60 ± 3 vs. rapamycin $38 \pm 2^*$ pg/ml). Moreover, compared to the control group, rapamycin resulted in significantly reduced tumor growth (TV on day 13: cyclosporine $207 \pm 80^*$ vs. controls 158 ± 56 vs. rapamycin $33 \pm 12^*$ mm³) in the transparent skinfold chamber. In intravital microscopy we were able to identify a considerable decrease in tumor neoangiogenesis (MVD on day 11: cyclosporine $179 \pm 14^*$ vs. controls 116 ± 9 vs. rapamycin $35 \pm 6^*$ cm⁻¹) as the cause for this phenomenon. Immunosuppression with cyclosporine showed the opposite effect for both parameters.

Discussion and conclusion

The present data from the mouse model shows that rapamycin, when used in an immunosuppressive dosage, has an additional antitumor effect. This effect on tumor growth is based on antiangiogenic action, which we were able to attribute to lower VEGF production of the tumor cells. These results are particularly important since it must be assumed at the present time that immunosuppression seems to favor both *de novo* tumor development and tumor progression [4]. For this reason, we consider it necessary to review this experimental data in controlled studies on patients who

receive transplants due to tumor anamnesis or an increased risk for *de novo* cancer. Rapamycin should be used as an alternative to cyclosporine.

Literature

1. Penn I (2000) Cancers in renal transplant recipients. *Adv Ren Replace Ther* 7:147-156
2. Meyer CG, Penn I, James L (2000) Liver transplantation for cholangio-carcinoma: results in 207 patients. *Transplantation* 69: 1633 -1637
3. Penn I. (1998) Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl* 147-158
4. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M (1999) Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397: 530-534

Correspondence address: Dr. med. M. Guba, Surgical Clinic and Polyclinic of the University of Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93042 Regensburg, Tel.: ++49(0) 941/944-6801, Fax: ++49(0) 941/944-6802, [E-mail: markus.guba@klinik.uni-regensburg.de](mailto:markus.guba@klinik.uni-regensburg.de)



May 18, 2017

Certification

Park IP Translations

TRANSLATOR'S DECLARATION:

I, Kerstin Roland, hereby declare:

That I possess advanced knowledge of the German and English languages. The attached German into English translation has been translated by me and to the best of my knowledge and belief, it is a true and accurate translation of:
Rapamycin inhibiert das Tumorstadium und die Tumormetastasierung über
Antiangiogenese

Kerstin Roland

Kerstin Roland

Project Number: MEGOP_1705_006

15 W. 37th Street 8th Floor
New York, NY 10018
212.581.8870
ParkIP.com

West-Ward Exhibit 1061
Guba 2001
Page 009