

Stefan Kei Thomann  
Dr. med.

## **Antikörper- und Nanopartikel-basierte CD146-gerichtete Anreicherungsprinzipien an das Blutgefäßsystem des hepatozellulären Karzinoms**

Fach/Einrichtung: Chirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

### **Einleitung**

Im Rahmen der Entstehung eines HCC kommt es zu funktionellen und morphologischen Veränderungen der zuführenden Blutgefäße, die experimentell therapeutisch und diagnostisch genutzt werden können. Eine spezifische Anreicherung von monoklonalen Antikörpern und Nanopartikeln an das Tumorgefäßsystem des HCC erscheint als ein vielversprechender Ansatz für die gezielte Medikamentenverabreichung. In der vorliegenden Studie wurden die technologischen Grundlagen für eine solche Therapie mit dem Endothelmarker CD146 gelegt.

### **Zielsetzung**

Zielsetzung war

- I) die Charakterisierung der Oberflächenexpression von LSEC und TEC in der Maus und im Menschen zur Identifikation eines Markers hoher Spezifität,
- II) die deskriptive Expressionsanalyse von CD146 in Endothelien des Pankreas und des Pankreaskarzinoms, der Milz und des Jejunums sowie die Darstellung der Übertragbarkeit der Expressionsverhältnisse auf die humane Situation,
- III) die quantitative Expressionsanalyse von CD146 in LSEC und TEC auf mRNA- und Proteinebene sowie die CD146-Expressionsanalyse organotypischer Endothelien mittels mittlerer mikroskopischer Gefäßfluoreszenz,
- IV) die Untersuchung möglicher Mechanismen der CD146-Überexpression in HCC-TEC,
- V) die Testung von CD146-Antikörper und Nanopartikel-basierten Anreicherungsprinzipien an die HCC-Tumormikrozirkulation *in vivo*.

### **Material und Methoden**

Immunfluoreszenz- und immunhistochemische Analysen erfolgten mit murinen und humanen Leber- und HCC-Präparaten. Die durchschnittliche Gefäßfluoreszenz wurde für die Ermittlung organotypischer CD146-Gefäßexpression gemessen. Quantitative Expressionsanalysen von TEC und LSEC auf mRNA- und Proteinebene erfolgten per qRT-PCR und ELISA. Die LSEC-Kapillarisation *in vitro* und einhergehende CD146-

Expressionsänderungen wurden über zellbasierte Fluoreszenzmessungen ermittelt. *In vivo* Experimente mit mAb und MNP erfolgten mit tumortragenden AlbTag-, Hep55.1C- und Panc02-Mäusen.

## **Ergebnisse**

Die Analyse verschiedener Endothel-Oberflächenmarker (CD13, CD31, CD34, CD105, CD146, CD202b) erfolgte über Immunofluoreszenz. Mit CD146 gelang uns die Identifikation eines intraluminell überexprimierten Oberflächenmoleküls im HCC-Tumorendothel. Mit Primärendothelzellisolaten aus Tumor und Lebergewebe wurde der Beweis der CD146 Überexpression auf mRNA- und Proteinebene erbracht. CD146-mRNA Level sind in TEC signifikant um 16,2% erhöht, auf Proteinebene bestätigte sich eine 2,6-fache Überexpression in TEC (4,4 fg / Zelle) zu LSEC (1,6 fg / Zelle). Mit Kapillarisierungsexperimenten von LSEC *in vitro* wurde ein Mechanismus vorgestellt, der die CD146-Überexpression in TEC *in vivo* erklären könnte.

Über intravenöse Applikation von ME-9F1 in tumortragende AlbTag- und Panc02-Mäuse wurde die rapide Akzessibilität von luminal endothelialen CD146 gezeigt. Mit der intraarteriellen Injektion (A. hepatica) von PE-konjugierten ME-9F1 in AlbTag-Mäuse wurde eine Tumorendothel-spezifische Markierung des Tumorgefäßbetts in HCC erreicht.

Eine kontraststeigernde luminale Blockade von organotypischen CD146 wurde durch eine zweizeitige intravenöse Injektion von unkonjugierten ME-9F1 unter temporärer Okklusion des Tumorstromgebietes (A. hepatica) etabliert. Eine scherkraftabhängige Bindung von anti-CD146 Nanopartikeln wurde in *in vitro*-Perfusionskammern bewiesen und in Panc02-Mäuse auf das *in vivo*-Modell übertragen. In AlbTag- und Panc02-Mäusen kommt es zu einer starken Endozytose der MNP im RES, die der spezifischen Markierung im Tumorgefäßbett von AlbTag-HCC überwiegt.

## **Schlussfolgerungen**

In der vorliegenden Studie wurden das Tumorendothel und seine Oberflächenexpression in HCC und Pankreaskarzinom in der Maus und im Menschen charakterisiert. Nach Identifikation von CD146 als geeigneten Marker in HCC und Pankreaskarzinom, wurden unterschiedliche Prinzipien zur hochspezifischen Anreicherung von Antikörpern und Nanopartikeln an das Tumorgefäßbett evaluiert. Die Daten zeigen, dass eine spezifische Anreicherung an das Tumorgefäßbett mit dem Marker CD146 über verschiedene Mechanismen gelingt. Da eine gefäßspezifische Anreicherung zu erhöhten

Wirkstoffkonzentrationen tumoral und gleichzeitig verminderten systemischen Nebenwirkungen führen kann, haben die Ergebnisse dieser Studie eine klinische Relevanz. Die Ergebnisse bilden eine solide technologische Basis für die Weiterentwicklung einer Scherkraft-abhängigen und tumorendothelialen Markierung von CD146, die zur spezifischen Bildgebung und Therapie in HCC verwendet werden kann.