Zhe Wang

Dr. med.

Characterization of microvascular cell biomarkers for endothelial cell-based drug delivery in liver and pancreatic cancer

Promotionsfach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

BACKGROUND: Liver cancer and pancreatic cancer are two of the most prevalent types of cancer in the world today. These malignant diseases have very poor prognoses, therefore, improvement in diagnosis and therapy is urgently needed. The antibody-based tumor targeting represents a promising modern option for new targeting strategies. As shown in previous studies, the local antibody enrichment into the tumor tissue is significantly increased if the antibody applied into the tumor-feeding blood vessel. These experiments were done in mice and included anti-mouse antibody clones only.

HYPOTHESIS & AIM: According to our hypothesis, the principle of antibody capture during initial intravascular passage after intra-arterial application may highly increase the effectiveness of antibody-based drug delivery in humans. In the present study, we analyzed the potential of different endothelium-specific antibodies for their application in microvascular-based drug delivery in liver and pancreatic cancer.

METHODS & RESULTS: Expression of CD31, CD34, CD49e, CD54, CD102, CD105, CD146 and CD151 endothelium-specific antigens as well as binding of twelve different endothelium-surface specific mAb clones were analyzed in human tissue (liver, pancreas, HCC, primary and metastatic pancreatic cancer) using immunofluorescence and image-based quantitative analysis. According to this analysis, anti-CD31 (WM59) mAb, anti-CD31 (MEM05) mAb, anti-CD34 (Qbend-10) mAb, anti-CD34 (581) mAb, anti-CD49e (NKI-SAM-1) mAb, anti-CD49e (P1D6) mAb, anti-CD49e (Volociximab) mAb, anti-CD54 (HA-58) mAb and anti-CD102 (CBR-IC2/2) mAb were assigned as “fast binding antibodies”. Anti-CD105 (43A3) mAb, anti-CD146 (SHM-57) mAb and anti-CD151 (50-6) mAb were

assigned as “non-fast binding antibodies”. Determination of EC_{50} of antibody binding in endothelial cells in vitro (HUVEC) allowed the identical antibody allocation to “fast binding antibodies” or to “non-fast binding antibodies” categories as in analysis of tissue slides. Furthermore, the study of EC_{50} after a long incubation period (15 minutes) reflected the EC_{50} after a short exposure time (10 seconds). Different mAb clones showed a very various binding activity with the same endothelial markers whereas the binding activity of single mAb clones was independent from the tissue type. Anti-CD49e (NKI-SAM-1) mAb showed a very low EC_{50} of antibody binding concentration and constant results in EC_{50} determination of mAbs binding to cells and human tissue. Cell viability assay did not show any cytotoxicity of this antibody on endothelial cells in vitro. The intracellular up-take and release of two antibody clones (NKI-SAM-1 and CBR-IC2/2) was studied using immunofluorescence analysis in vitro. It demonstrated that all these antibodies were effectively loaded and stored for a long time by endothelial cells in vitro. Finally, the efficacy of the intravascular antibody capture was modeled using a very short exposure to endothelial cell suspension and also with isolated mouse liver perfusion. These experiments showed that both anti-human (NKI-SAM-1) and anti-mouse (5H10-27) mAbs were effectively captured by endothelial cells demonstrating high translational potential of CD49e marker as targeting molecule.

CONCLUSIONS: The present study validated the technological basis for the assessment of the targeting potential of selective endothelium-specific antibody clones. Our findings identified the high potential of several antibody clones, especially anti-CD49e, for endothelium-based targeting and drug delivery.

Zhe Wang
Dr. med.

Charakterisierung von mikrovaskulären Zellbiomarkern für die endotheliale zellbasierte Arzneimittelgabe bei Leber- und Bauchspeicheldrüsenkrebs

Promotionsfach: Chirurgie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

Hintergrund: Leberkrebs und Bauchspeicheldrüsenkrebs gehören zu den häufigsten Krebsarten weltweit. Diese bösartigen Erkrankungen haben sehr schlechte Prognosen, daher ist eine Verbesserung der Diagnose und Therapie dringend erforderlich. Das Antikörper-basierte Tumor-Targeting stellt eine vielversprechende moderne Option für neue Targeting-Strategien dar. Wie in früheren Studien gezeigt, ist die lokale Antikörperanreicherung im Tumorgewebe signifikant erhöht, wenn der Antikörper in das Tumor-zuführende Blutgefäß appliziert wird. Diese Experimente wurden bei Mäusen durchgeführt und haben ausschließlich anti-Maus-Antikörper-Klone eingeschlossen.

Hypothese & Zielsetzung: Nach unserer Hypothese kann das Prinzip der Antikörper-Anreicherung während der initialen intravaskulären Passage nach intraarterieller Applikation die Wirksamkeit der Antikörper-basierten Arzneimittelgabe beim Menschen stark erhöhen. In der vorliegenden Studie analysierten wir das Potenzial verschiedener Endothel-spezifischer Antikörper für die mikrovaskulär-basierten Substanzanreicherung in Leber- und Bauchspeicheldrüsenkrebs.

Methoden & Ergebnisse: Die Expressionen von CD31-, CD34-, CD49-, CD54-, CD102-, CD105-, CD146- und CD151-Endothel-spezifischen Antigenen sowie die Bindung von zwölf verschiedenen Endothel-oberflächenspezifischen mAb-Klonen wurden im menschlichen Gewebe (Leber, Pankreas, HCC, primärem und metastasiertem Bauchspeicheldrüsenkrebs) mit Immunfluoreszenz und bildbasierter quantitativer Analyse untersucht. Anhand dieser Analyse wurden anti-CD31 (WM59) mAb, anti-CD31 (MEM05) mAb, anti-CD34 (Qbend-10) mAb, anti-CD34 (581) mAb, anti-CD49e (NKI-SAM-1) mAb, Anti-CD49e (P1D6) mAb, anti-CD49e (Volociximab) mAb, anti-CD54 (HA-58) mAb und anti-CD102 (CBR-IC2 / 2) mAb als "schnell bindenden Antikörpern" charakterisiert. Anti-CD105 (43A3) mAb, anti-

CD146 (SHM-57) mAb und anti-CD151 (50-6) mAb wurden der Gruppe der „nicht-schnell bindenden Antikörpern“ zugeordnet. Die Bestimmung von EC50 der Antikörperbindung in Endothelzellen in vitro (HUVEC) erlaubte die identische Antikörperzuweisung zur „schnell-bindenden-Antikörpern“ oder „nicht-schnell-bindenden-Antikörpern“-Kategorien wie bei der Analyse von Gewebeschnitten. Darüber hinaus spiegelte die Untersuchung von EC50 nach einer langen Inkubationszeit (15 Minuten) die EC50 nach einer kurzen Expositionszeit (10 Sekunden) wider. Verschiedene mAb-Klone zeigten eine sehr unterschiedliche Bindungsaktivität mit den gleichen endothelialen Markern, während die Bindungsaktivität einzelner mAb-Klone unabhängig vom Gewebetyp war. Anti-CD49e (NKI-SAM-1) mAb zeigte eine sehr niedrige EC50-Antikörper-Bindungskonzentration und äquivalente Ergebnisse in der EC50-Bestimmung von mAbs-Bindung an Zellen und menschliches Gewebe. Der Viabilitätstest zeigte keine Zytotoxizität dieses Antikörpers auf Endothelzellen in vitro. Die intrazelluläre Aufnahme und Abgabe von zwei Antikörper-Klonen (NKI-SAM-1 und CBR-IC2/2) wurde in vitro mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Es zeigte sich, dass alle diese Antikörper effektiv aufgenommen und lange Zeit von Endothelzellen in vitro gespeichert wurden. Schließlich wurde die Wirksamkeit der intravaskulären Antikörper-Anreicherung unter Verwendung einer sehr kurzen Exposition gegenüber der Endothelzellsuspension sowie mit isolierter Maus-Leber-Perfusion modelliert. Diese Experimente zeigten, dass sowohl Anti-Human- (NKI-SAM-1) als auch Anti-Maus- (5H10-27) mAbs effektiv von Endothelzellen aufgenommen wurden, was ein hohes Translationspotential des CD49e-Markers als Targeting-Molekül demonstriert.

Schlussfolgerungen: Die vorliegende Studie validierte die technologische Grundlage für die Bewertung des Targeting-Potenzials von selektiven endothel-spezifischen Antikörper-Klonen. Unsere Ergebnisse identifizierten das hohe Potenzial mehrerer Antikörperklone, insbesondere anti-CD49e, für Endothel-basiertes Targeting und Substanzanreicherung.