

Felix Strübing
Dr. med.

Mikro- und makroskopisches Imaging experimenteller Lebertumoren mit Hilfe von endothelspezifischen Antikörpern

Fach/Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Eduard Ryschich

Einleitung: Die Prognose des hepatozellulären Karzinoms und des metastasierten duktales Pankreasadenokarzinoms sind sehr ungünstig und die therapeutischen Optionen begrenzt. Deshalb sind neue Therapien dringend benötigt. Im Rahmen des Tumorwachstums kommt es zur Ausbildung einer eigenen tumoralen Blutversorgung. Diese Tumorgefäße unterscheiden sich unter anderem in Morphologie, Strömungsverhältnissen und Expression von Oberflächenmolekülen von normalen Gefäßen. Diese Unterschiede können zur spezifischen Anreicherung monoklonaler Antikörper verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit sollen endothelgerichtete, antikörpervermittelte Techniken und Prinzipien für die Diagnostik und Therapie von hepatozellulärem Karzinom und duktalem Pankreasadenokarzinom untersucht werden.

Methoden: *In vitro* wurden Immunfluoreszenzfärbungen von murinen und humanen histologischen Schnitten angefertigt. Ein neues fluoreszenzbasiertes, histologisches Modell zur Bestimmung der Bindungsaffinität von monoklonalen Antikörpern wurde vorgestellt. Isolierte und kultivierte Lebersinusoidendothelzellen wurden ebenfalls mittels monoklonaler Antikörper angefärbt. *In vivo* wurden implantierbare, murine Modelle des hepatozellulären Karzinoms und duktales Pankreasadenokarzinoms verwendet. Verschiedene intravenöse und intraarterielle Injektionsprotokolle für monoklonale Antikörper und deren Dosierungen wurden verglichen. Die Menge an gebundenen Antikörpern in Leber, Tumor und Lunge wurde fluorimetrisch bestimmt. Die Bindung von ME9F1 Antikörpern nach intraarterieller Injektion wurde mittels ¹²⁵I-Szintigraphie und Bioverteilungsmessung analysiert.

Ergebnisse: Histologie und Lebersinusoidendothelzell-Färbungen zeigten, dass der ME9F1 mAb die niedrigste EC₅₀ und das günstigste Expressionsmuster der untersuchten Antikörper aufweist. Der ME9F1 mAb wurde deshalb für die Durchführung der weiteren *in vivo* Experimente selektiert. In den murinen Tumormodellen wurde die Bindung von ME9F1, RAM34 und IgG2a-Isotyp Antikörpern an das Tumorendothel verglichen. Auch hier zeigte der ME9F1 Antikörper die höchste Bindungsaffinität. Die histologischen Ergebnisse wurden *in vivo* verifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass auf Basis der vorliegenden histologischen Daten Rückschlüsse auf die Eignung eines monoklonalen Antikörpers zur *in vivo* Applikation gezogen werden können. Durch die Blockade extratumoralen Epitope konnte eine 1,2fache Anreicherung der Antikörper in beiden Tumorentitäten im Vergleich zur Leber erreicht werden. Ohne Blockade war durch die signifikant geringere Gefäßdichte der Tumoren keine Anreicherung möglich. Durch die intraarterielle isolierte hepatische Perfusion konnte die Anreicherung deutlich verbessert werden auf $6,8 \pm 3,8$ bis $12,3 \pm 5,8$ fach. Ohne Blockade war jedoch auch hier keine Anreicherung möglich. Nach der intraarteriellen Injektion der äußerst geringen Antikörperdosis von 1ng/gBW konnte durch die sofortige Bindung und die selektiv-arterielle Blutversorgung von Lebertumoren der Kontakt der monoklonalen Antikörper mit der systemischen Zirkulation vermieden werden. Dies führte dazu, dass der Großteil der Antikörper im Gewebe direkt bei der ersten mikrovaskulären Passage am Endothel abgefiltert wurde. Dies konnte zunächst fluoreszenz-mikroskopisch

gezeigt und dann nuklearmedizinisch verifiziert werden. In Szintigraphien mit ^{125}I -ME9F1 Antikörpern konnten nach intraarterieller Injektion die Tumoren lokalisiert werden, während in der Kontrollgruppe der intravenösen Injektion keine Lokalisierung möglich war. In der Messung der Bioverteilung wurden Werte von bis zu 162% ID/g erreicht sowie ein Verhältnis von Tumor:Leber von bis zu 26,4. Durch die endotheliale Filtration wurde eine hochselektive Anreicherung im Tumor erreicht. Eine diagnostische Anwendung der Methodik konnte mit der Szintigraphie bereits gezeigt werden. Mit QBEND10 wurde ein möglicher humaner Antikörper zur Übertragung der Methodik auf den Menschen vorgestellt.

Diskussion und Schlussfolgerung: Eine neue Methode zur Bestimmung der Affinität von monoklonalen Antikörpern konnte etabliert und die Übertragbarkeit der ermittelten Daten auf die *in vivo* Situation gezeigt werden. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methodik ist kostengünstig und in jedem Labor durchführbar. Verschiedene Injektionsprotokolle und Dosierungen zur Anreicherung von monoklonalen Antikörpern in Lebertumoren wurden verglichen. Es zeigte sich deutlich eine Überlegenheit der intraarteriellen Injektion über die intravenöse Injektion. Mit dem Nachweis der endothelialen Filtration wurde ein neues Paradigma zur Applikation von monoklonalen Antikörpern aufgestellt. Das Potenzial dieser Methode konnte in dieser Pilotstudie unter Beweis gestellt werden. Durch die hochselektive Anreicherung könnten in der zukünftigen Anwendung systemische Nebenwirkungen verringert oder sogar vermieden werden, bei gleichzeitig hoher lokaler Medikamentendosis. Keine der Techniken oder Prinzipien sind auf die Leber begrenzt, daher ist die Übertragung der vorgestellten Methoden auf andere Organsysteme möglich. Die vorliegende Arbeit hat somit eine solide Grundlage zur weiteren Erforschung der endothelialen Filtration und seiner klinischen Anwendungsmöglichkeiten gelegt.